



Facultad de Ciencias Naturales y Museo
Universidad Nacional La Plata

**“Ecotoxicología y alteraciones
morfo-funcionales en gasterópodos marinos expuestos
a contaminación por Tributilestaño (TBT) y metales”**


Trabajo de Tesis para optar por el título de
Doctor en Ciencias Naturales

Lic. Mónica A. Primost

Director: Dr. Gregorio Bigatti

Codirector: Dr. Gustavo Darrigran

Año 2014



“Ecotoxicología y alteraciones morfo-funcionales en gasterópodos marinos expuestos a contaminación por Tributilestaño (TBT) y metales”

Lic. Mónica A. Primost

Director: Dr. Gregorio Bigatti

Codirector: Dr. Gustavo Darrigran

Facultad de Ciencias Naturales y Museo. Universidad Nacional de La Plata.

AGRADECIMIENTOS

Es difícil no olvidarse algún nombre en esta gran lista que tengo en mi mente, y eso es porque afortunadamente muchas personas han estado presentes en este trabajo.

El primer gran agradecimiento y para quienes va dedicado todo mi esfuerzo, es para MI FAMILIA. La que está conmigo desde siempre y la que pude formar aquí, en la Patagonia. Agradezco infinitamente el apoyo incondicional y agradezco que cada vez seamos más (en términos matemáticos) y más felices (en términos emocionales) para poder compartir todo...

A mi cada vez más COMPAÑERO, Fede por estar conmigo y por mirar siempre para adelante con nuestro proyecto de FAMILIA y de HOGAR. Gracias por darme a mi tesoro máspreciado, BENJAMÍN quien le da más sentido aún a nuestro presente y futuro.

Gracias a Grego, mi GUÍA, por confiar en mi desde siempre, por contar conmigo y por ponerle siempre buena onda hasta a las más pésimas noticias... no siempre todo se queda tan mal no?. Gracias por mostrarme lo interesante de hacer lo que hacemos y por transmitir esas ganas de hacer cosas nuevas todo el tiempo.

Gracias a Gustavo Darrigran por su incondicionalidad académica y no académica también. Gracias por estar ahí siempre.

Gracias a los Larbimes, COMPINCHES DE LA VIDA, por esas campañas de mucho miedo, mucha ciencia, mucho Gauchito Gil, mucho mate y muy buena compañía. Siempre juntos para todos lados, gracias por todo el tiempo que ya compartimos y todo lo que nos queda de aquí en más.

Gracias a mis amigos, como siempre digo, los PATAGÓNICOS y los MESOPOTÁMICOS. No hay distancia que evite el cariño y las buenas energías.

Gracias al CENPAT por darme mi hermoso lugar de trabajo.

Gracias a todos los TÉCNICOS que fueron conmigo en busca de las muestras que aún quemadas, y demás, terminaron contribuyendo a mi trabajo final.

Gracias a la gente de la FURG en Brasil, por recibirme esos tres meses, por dejarme trabajar allí y por ser mi compañía en ese país que tienen de tan raras costumbres y tan lindas playas. Gracias a Marcos Fernandes y a su familia por recibirme en Río y por responder muchas de mis rebuscadas preguntas.

Gracias a todas las personas que colaboraron con cada capítulo de mi tesis, desde la toma de muestras, el análisis de los datos y las correcciones, en especial gracias a

Marta Commendatore, Mónica Gil, Carmen Marinho, Federico Márquez, Sebastián Sabatini, Andrés Averbuj, Soledad Zabala, José Elías Fernandez-Alfaya, Sebastián Giulianelli y seguro de alguien me estoy olvidando en este momento.

Gracias a la UNLP por permitirme realizar mi doctorado en su institución.

Gracias, de antemano, a los miembros del jurado por tomarse el tiempo para leer y corregir este trabajo que realicé con mucha dedicación y entusiasmo.

Por último, gracias a todos y a cada uno de los que se cruzó en mi camino a lo largo de estos 5 años de mucho esfuerzo y satisfacción. Siempre hay una buena razón para hacer lo que a uno le gusta y para ponerle buena cara a todo lo adverso.

ÍNDICE

RESUMEN	7
ABSTRACT	10
INTRODUCCIÓN	12
OBJETIVOS	24
Objetivo general	25
Objetivos particulares	25
MATERIALES Y MÉTODOS	26
Área de estudio	27
Especies estudiadas	27
Recolección de organismos	28
Recolección de sedimentos	29
Procesamiento de gasterópodos	30
Procesamiento de sedimentos	31
Determinación de compuestos orgánicos de estaño en gasterópodos y sedimentos... 32	
Análisis de contenido de lípidos	35
Análisis de granulometría	36
Análisis de contenido de humedad y materia orgánica	36
CAPÍTULO 1-Alteraciones reproductivas y somáticas en relación a la contaminación portuaria en gasterópodos de golfo Nuevo	38
Introducción	39
Objetivos	44
Materiales y métodos	45
Variaciones estacionales en los parámetros de imposex	45
Fecundidad en <i>Buccinanops globulosus</i>	46
Análisis de datos	48
Resultados	49
Variaciones estacionales en los parámetros de imposex	49
Fecundidad en <i>Buccinanops globulosus</i>	58
Discusión	60
CAPÍTULO 2-Determinación de metales en gasterópodos comestibles y sedimentos.. 67	
Introducción	68
Objetivos	70
Materiales y métodos	70
Procesamiento de sedimentos para la determinación de metales	71
Procesamiento de organismos para la determinación de metales	72
Análisis de datos	73
Resultados	74
Discusión	78
CAPÍTULO 3-Biomarcadores de estrés oxidativo en <i>Buccinanops globulosus</i> afectados	

por imposex	85
Introducción	86
Objetivo	88
Materiales y métodos	88
Determinación de parámetros de estrés oxidativo.....	89
Análisis de datos.....	90
Resultados	91
Discusión	92
CAPÍTULO 4-Variación en la forma de la concha de <i>Buccinanops globulosus</i> , asociada a un gradiente de imposex	96
Introducción	97
Objetivos	98
Materiales y métodos	99
Análisis de datos.....	100
Resultados	102
Discusión	105
CAPÍTULO 5-Ensayos de toxicidad aguda con individuos de <i>Buccinanops globulosus</i> expuestos a TBT	109
Introducción	110
Objetivo	112
Materiales y métodos	112
Análisis de datos.....	115
Resultados	116
Discusión	118
DISCUSIÓN FINAL	121
CONCLUSIONES.....	130
BIBLIOGRAFÍA	133
APÉNDICE	163

RESUMEN

El golfo Nuevo presenta un gradiente de actividad marítima que se refleja en la presencia de contaminantes como Tributilestaño (TBT), metales e hidrocarburos poliaromáticos. Se ha demostrado la relación causa efecto entre la presencia de TBT en el ambiente marino y el desarrollo de caracteres sexuales secundarios masculinos (imposex) en hembras de cenogasterópodos; sin embargo, otros efectos adversos pueden producirse sobre los organismos expuestos a contaminantes durante largos periodos de tiempo. El objetivo de esta Tesis fue determinar los efectos que pueden producir los contaminantes asociados a una zona portuaria sobre especies de gasterópodos habitantes de golfo Nuevo. Se realizó un abordaje ecotoxicológico desde múltiples enfoques, así como la evaluación en detalle de la incidencia de imposex y la estacionalidad del fenómeno en especies con potencial interés pesquero.

Mediante muestreos en años sucesivos (2009-2012), en dos épocas del año (fría y cálida), se observó que las especies *Adelomelon ancilla* y *Buccinanops globulosus* presentan un marcado desarrollo de imposex, principalmente en la zona portuaria. Estas especies no presentaron variaciones estacionales en los parámetros de imposex, pudiendo ser utilizadas como biomonitores de la presencia de TBT en el medio en cualquier época del año. La especie *Buccinanops globulosus* fue elegida como el mejor biomonitor debido a su abundancia, alta fecundidad, fácil acceso y por responder a los contaminantes presentes en el ambiente.

El murícido *Trophon geversianus* resultó una especie de muy baja respuesta a la presencia de contaminantes tanto en el hábitat submareal como intermareal, desarrollando el fenómeno de imposex sólo en casos aislados, por lo que no sería una especie propicia para estudios de biomonitoreo, aunque es necesario evaluar aspectos como la bioacumulación y el mecanismo de acción del TBT en estas poblaciones.

Buccinanops globulosus, de elevada sensibilidad y rápida respuesta, presentó diferencias en la fecundidad medida en el campo entre dos sitios con diferente incidencia de imposex y tráfico marítimo. En la zona del puerto se registró un alto porcentaje de ovicápsulas con múltiples embriones pero éstos últimos, de tallas menores que los embriones del sitio de bajo tráfico marítimo (Cerro Avanzado). Estas diferencias en la talla de los embriones podría indicar una posible respuesta adaptativa a las condiciones adversas del medio. Asimismo las hembras portadoras de ovicápsulas del sitio más afectado por imposex (muelle Luis Piedra Buena) presentaron un menor

desarrollo del pene en relación con las hembras sin ovicápsulas en el mismo sitio.

Se determinó, mediante espectrofotometría de absorción atómica (EAA) la concentración de metales como hierro, zinc, cobre, aluminio, cadmio y plomo en tejidos, sedimentos y especies de bivalvos consumidas por los gasterópodos en 5 sitios dentro de golfo Nuevo para las tres especies estudiadas. Los mayores niveles de metales fueron detectados en la zona del muelle Luis Piedra Buena aunque no se encontró un patrón definido a lo largo del gradiente de imposex o actividad marítima. Los niveles de metales determinados en gasterópodos representan el primer registro para las especies en la zona continental Patagónica. De acuerdo a normativas internacionales y teniendo en cuenta la concentración de cada metal en el total de los organismos se calculó, para las tres especies, la tasa de ingesta semanal apta para consumo humano. Las especies *B. globulosus* y *T. geversianus* de todos los sitios evaluados, excedieron los niveles de cadmio permitidos para consumo humano según la regulación nacional para moluscos gasterópodos, indicando que no podrían ser consumidos enteros pero sí consumir sólo el pie.

A través de estudios bioquímicos de estrés oxidativo se determinaron por primera vez en gasterópodos de Argentina, los niveles de enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa (SOD), glutatión reducido (GSH) y glutatión-s-transferasa (GST), así como el nivel de daño oxidativo a lípidos a través de los niveles de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS). Estos parámetros fueron determinados en la glándula digestiva del nassarido *B. globulosus*. Se recolectaron especímenes de tres sitios con diferente incidencia de imposex y se observó que tanto el nivel de imposex como el tráfico marítimo estuvieron relacionados con los parámetros de estrés determinados. A su vez, estos parámetros no estuvieron relacionados positivamente con los niveles de metales registrados en los tejidos de *B. globulosus*, como suele ocurrir en otras especies de moluscos. Los resultados indican que las poblaciones de gasterópodos en la zona portuaria presentan un nivel de estrés oxidativo mayor que las de los sitios Punta Cuevas y Cerro Avanzado, con menor nivel de contaminantes. El sitio Cerro Avanzado (de bajo tráfico marítimo) podría tomarse como referencia para futuros estudios en relación a parámetros de estrés oxidativo en gasterópodos de la zona.

Mediante técnicas de morfometría geométrica y análisis multivariados se determinó que los gasterópodos de la especie *B. globulosus* presentan una forma de la concha significativamente diferente en relación a los niveles de imposex detectados en hembras del golfo Nuevo. Los gasterópodos de zonas más afectadas por imposex

presentaron formas redondeadas, mientras que los de las zonas menos afectadas por imposex presentaron formas ahusadas en su concha.

Ensayos de laboratorio en condiciones controladas permitieron calcular, a través del método Probit, la dosis letal media (DL₅₀ 96h) de TBT en *B. globulosus*. La dosis calculada fue de 5,41 µg TBT.g de organismo⁻¹ (peso húmedo) y resultó ser mucho mayor que las concentraciones ambientalmente registradas, así como las reportadas para otros invertebrados. La dosis letal calculada para *B. globulosus* indica que las concentraciones ambientales no representan un riesgo de extinción local para la especie y corrobora la tolerancia de los organismos a la presencia de compuestos de alta toxicidad como el TBT, aunque desarrollen el fenómeno de imposex.

A través de los efectos registrados en el presente trabajo en las distintas especies, se concluye que los gasterópodos estudiados presentan una gran capacidad de bioacumulación de compuestos metálicos, así como un amplio espectro de respuestas, desde los niveles de estrés oxidativo, la incidencia de imposex, el cambio en la forma de la concha y las diferencias en cuanto a la fecundidad. Todas ellas reflejan la exposición de los gasterópodos a sustancias tóxicas y disruptores endócrinos que están presentes en zonas de actividad marítima.

Se recomienda no consumir los gasterópodos de ninguna de las tres especies estudiadas en golfo Nuevo, a menos que sólo se ingiera el pie de los mismos, en las cantidades calculadas según la regulación vigente para gasterópodos en zonas de producción.

Asimismo se recomienda realizar monitoreo de los contaminantes portuarios en relación a la seguridad alimentaria de estas especies.

ABSTRACT

Pollutants such as Tributyltin (TBT), heavy metals, and polyaromatic hydrocarbons are present in Golfo Nuevo following a gradient of maritime traffic. Cause-effect relationship between TBT in marine environment and development of male secondary sexual characteristics in female gastropods (imposex) has been studied. Organisms exposed to pollutants for a long period of time may be reflecting adverse effects. The aim of the present study was to determine adverse effects on gastropods exposed to harbor contaminants in a maritime area using multiple approaches and quantifying the incidence of imposex in species that are potential resources for artisanal fisheries.

A well-marked development of imposex phenomenon in *Adelomelon ancilla* and *Buccinanops globulosus* was observed in the harbor area in winter and summer during successive years (2009-2012). Seasonal variations in imposex parameters were not observed and the gastropods could be used for biomonitoring studies.

Trophon geversianus had a very low response to TBT, with development of imposex only present in isolated cases at subtidal and intertidal areas. This suggests that *T. geversianus* would not be a good bioindicator, though there is a need to evaluate more aspects such as bioaccumulation and TBT behavior in the studied populations.

Differences in fecundity parameters of *B. globulosus* were observed. In the most polluted area (harbor), the egg capsules showed high percentage of multiple and small embryos, whereas in the low polluted area (Cerro Avanzado) they were fewer with larger sizes. This would indicate a possible adaptive response to adverse environmental conditions. Females without egg capsules had significant longer penis than the females with egg capsules attached to their shells.

Metals such as iron, zinc, copper, aluminum, cadmium and lead were quantified in gastropods, sediments and bivalve species by atomic absorption spectrophotometry (AAS) for different sites in Golfo Nuevo. High levels were detected in the polluted area, however, no patterns along gradients of imposex and maritime activity were found.

Cadmium levels in *B. globulosus* and *T. geversianus* exceeded the weekly tolerable intake for humans, and exceeded permissible levels for human consumption according to the national regulations for gastropods in all analyzed sites.

In the three species, the concentration of metals in tissues represent the first record in marine gastropods from continental Patagonia.

Buccinanops globulosus was chosen as the best biomonitor due to its abundance, high fecundity, easy access, and response to environmental pollutants.

Stress parameters as antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD), glutathione

(GSH) and glutathione-s-transferase (GST) as well as oxidative damage to lipids (TBARS) were quantified by biochemical techniques for the first time in the digestive gland of *B. globulosus*. An association between stress parameters and incidence of imposex was observed. However, a link between metal concentration in tissues and stress oxidative in gastropods was not revealed in the study. These results indicate higher oxidative stress levels at the polluted area (harbor) than in Punta Cuevas and Cerro Avanzado. The stress parameter values from Cerro Avanzado could be considered as a reference values in future studies in gastropods related to oxidative stress parameters.

Shell shape differences related to imposex incidence were detected in *B. globulosus* from Golfo Nuevo by geometric morphometric techniques and multivariate analysis. This was revealed by gastropods with rounded shells in imposex-affected areas, whereas in less imposex-affected areas they presented more elongated shapes.

Median lethal dose (LD_{50} 96h) was calculated by the Probit method in *B. globulosus* exposed to TBT under controlled laboratory conditions. Whelks were injected with different doses on the pedal region. LD_{50} was $5,41\mu\text{g TBT}\cdot\text{bw}^{-1}$. LD_{50} which resulted higher than than the environmental levels and acute toxicity for other invertebrates. Environmental levels of TBT do not represent a risk of local extinction for the species.

The main conclusion of this work was that the gastropods studied has a great capacity to bioaccumulate metals, as well as to a wide range of responses. Shell shape variation, differences in fecundity and oxidative stress levels were the consequence of gastropods exposure to endocrine disruptors and toxic substances present along maritime activity areas. Human consumption of gastropods in Golfo Nuevo is not recommended unless the foot could be separately when ingested and according to the amounts reported in this work. Monitoring studies of marine pollutants are also recommended in relation to food security.

INTRODUCCIÓN

El fenómeno de fijación de especies acuáticas incrustantes es un grave problema desde el punto de vista naval, debido a que los cascos de las embarcaciones y estructuras sumergidas se ven fuertemente afectadas por la adhesión (IMO 2002; Brady 2005; Schumacher *et al.* 2007; Schultz *et al.* 2011). Asimismo, resulta un problema a nivel ecológico, debido al favorecimiento del transporte de especies invasoras hacia todas partes del mundo, tanto en agua dulce como marinas (Darrigran 2002; Gollasch 2002; Orensanz *et al.* 2002; Davidson *et al.* 2009; Darrigran y Damborenea 2011).

Para resolver el problema de las incrustaciones biológicas, la industria ha venido desarrollando pinturas anti-incrustantes o *antifouling* con el objetivo de evitar el establecimiento y propagación de una variedad de especies acuáticas (Fitridge *et al.* 2012) a través del empleo de agentes biocidas. Para que una sustancia sea utilizada como biocida debe tener un amplio espectro de acción, ser de baja toxicidad para mamíferos, tener baja solubilidad en agua, no bioacumularse a través de la cadena trófica, tener baja persistencia en el medio, compatibilizar con las materias primas de las pinturas y tener una adecuada relación precio/calidad (IMO 2002).

Las pinturas anti-incrustantes fueron variando su composición desde resinas o brea, pasando por el cobre (Cu) en combinación con mercurio (Hg) y arsénico (As) hasta la elaboración de pinturas eficaces y económicas utilizando como biocida un compuesto orgánico de estaño, conocido como Tributilestaño (TBT de aquí en adelante) (Hails y Milne 1975). En los años 1970s, la mayoría de los buques de navegación marítima habían revestido sus cascos con pinturas a base de TBT (Senda 2009) y posteriormente su aplicación se extendió a las embarcaciones deportivas y de menor porte (IMO 2002; Almeida *et al.* 2007). La Tabla 1 resume la cronología de los principales tipos de pinturas utilizadas globalmente y las reglamentaciones que se sucedieron tras su liberación al medio ambiente. La familia de compuestos orgánicos de estaño (que incluyen al TBT) ha sido sintetizada desde los años 1960s y su utilidad fue incrementándose en varias aplicaciones. Desde molusquicidas, preservadores de la madera, desinfectantes, sistemas de refrigeración, entre otros usos (Ross 1965). A pesar de sus múltiples utilidades, los compuestos orgánicos de estaño (COE en adelante) se encuentran principalmente asociados a zonas de actividad marítima por su aplicación en sistemas anti-incrustantes (Fent 2003; Abdulla 2008; Titley-O'Neal *et al.* 2011).

Unos años más tarde de su masiva implementación y liberación en el ambiente, comenzaron a hacerse notorios los efectos producidos por los COE sobre especies que no eran componentes del grupo de especies incrustantes o *biofouling* para el cual

estaban destinadas (Alzieu y Heral 1984; Alzieu 1986; Gibbs y Bryan 1986; 1987). Una descripción más amplia de los efectos adversos de estos compuestos será presentada más adelante en esta introducción.

Tabla 1. Cronología del uso de anti-incrustantes y consecuencias. Adaptado de Dafforn *et al.* (2011).

Año	Principales acontecimientos
1800 hasta la actualidad	Utilización de cobre en recubrimientos antiincrustantes
1960	Desarrollo de recubrimientos convencionales de TBT
1974	Productores de cultivos de ostras registran malformaciones en el crecimiento
1980	Desarrollo de recubrimiento de TBT que permite controlar la tasa de liberación del biocida
1980	Relación entre TBT y las anomalías en las valvas de las ostras (<i>Crassostrea gigas</i>) e imposex en gasterópodos (<i>Nucella lapillus</i>)
1987-90	Prohibición de los recubrimientos de TBT en embarcaciones menores a 25m en Francia, Reino Unido, Estados Unidos, Canadá, Australia, Unión Europea, Nueva Zelanda y Japón
2000	Incremento de investigaciones sobre alternativas anti-incrustantes amigables con el ambiente
2001	Organización Marítima Internacional (IMO) adopta la convención sobre sistemas anti-incrustantes para eliminar el TBT de los recubrimientos en las embarcaciones:-Se propone la prohibición de aplicaciones futuras de TBT en todo tipo de embarcaciones a partir del año 2003. Se propone la prohibición definitiva de TBT en todo el mundo en el año 2008.
2008	Entra en vigencia la convención sobre sistemas anti-incrustantes de la Organización Marítima Internacional (<i>International Maritime Organization-IMO</i>).

Algunos países como Francia, Japón y Australia prohibieron la utilización de anti-incrustantes a base de TBT en embarcaciones pequeñas desde el año 1987 como primera medida, que luego se extendió al resto de las embarcaciones. Como esta medida no fue adoptada por muchos otros países, la Organización Marítima Internacional (*International Maritime Organization-IMO*) creó un grupo de trabajo para debatir el tema del uso de este compuesto en las pinturas en base a los efectos deletéreos que el TBT ocasionaba (Davies *et al.* 1997). Después de un largo periodo de debate e investigación, se adoptó la Convención Internacional sobre amenazas de las pinturas anti-incrustantes aplicadas a las embarcaciones (*International Convention on the Control of Harmful Anti-fouling Systems on Ships*) y es en este documento donde se dejó explícito el pedido a todos los países del mundo sobre la prohibición mundial del uso del TBT en todas las embarcaciones tomando como plazo máximo el año 2008 (IMO 2002). Luego de las medidas de control adoptadas por los países firmantes, se han registrado tendencias hacia la disminución de las concentraciones de estos compuestos en el ambiente marino (Evans *et al.* 1995; Evans *et al.* 1996; Champ 2000; Diez *et al.* 2002; Champ 2003), aunque en muchos casos se evaluó y cuestionó la efectividad de tal

prohibición (Santos *et al.* 2002; Gibson y Wilson 2003; Terlizzi *et al.* 2004; Garaventa *et al.* 2006; Smith *et al.* 2008 ; Sousa *et al.* 2009; Choi *et al.* 2013) debido a la persistencia de los contaminantes en concentraciones elevadas en diferentes compartimentos como agua, sedimento y organismos.

Argentina estableció en el año 1998 la Ordenanza 4/98 de la Prefectura Naval Argentina, en donde se prohíbe la utilización de compuestos a base de TBT en el ámbito marítimo (DPMA 1998). En síntesis, el uso de pinturas anti-incrustantes resulta ventajoso en lo económico para los dueños de las embarcaciones, ya que se reducen de manera importante los costos de mantenimiento de superficies sumergidas y el gasto de combustible ocasionado por una mayor fricción con el agua, mientras que se evita el transporte de especies indeseadas. Sin embargo, las consecuencias debido a la introducción de sustancias tóxicas en los ambientes acuáticos son desfavorables. Las investigaciones recientes apuntan a la búsqueda y utilización de revestimientos antiadherentes sin estaño (Takahashi 2009; Cao *et al.* 2011; Kirschner y Brennan 2012), así como anti-incrustantes producidos naturalmente por otras especies que evitan las incrustaciones, como los compuestos producidos por algas, esponjas y bacterias (Clare 1998; Burgess *et al.* 2003; Mol *et al.* 2009).

Los compuestos orgánicos de estaño (COE) fueron clasificados y ampliamente estudiados por ser disruptores que interfieren en el sistema endocrino alterando el normal funcionamiento de un organismo vivo o de alguno de sus órganos (Chacón *et al.* 2007; Ketata *et al.* 2008); por esto, el modo preciso de acción de este tipo de compuestos es todavía motivo de estudio. Los principales compuestos tóxicos estudiados por causar disrupción endócrina son compuestos utilizados a nivel industrial y en agricultura (Safe 2003), muchos de ellos son los denominados contaminantes orgánicos persistentes (COPs). Además de su amplia utilización, estos compuestos tienen la particularidad de persistir largos periodos de tiempo en el ambiente por su estabilidad química, su resistencia a la degradación y su acumulación en organismos y sedimentos (Safe 1986; Gray 2002). Los COE y otros contaminantes como los metales pesados, si bien no están en la lista de los COPs establecida en el Convenio de Estocolmo 2001 (UNEP 2000), cumplen con alguna de las características mencionadas como la persistencia y la capacidad de bioacumularse en los organismos, por lo que son incluidos junto con los COPs (Anupama Nair y Sujatha 2012).

La persistencia de los COE en el ambiente se ve favorecida por la adsorción sobre material particulado, por lo que los sedimentos actúan como sumideros de los

contaminantes en el tiempo (Maguire *et al.* 1986; de Mora *et al.* 1989; Waldock *et al.* 1989; de Mora y Pelletier 1997; Burton *et al.* 2004). Las concentraciones de COE reportadas en sedimentos para diferentes países del mundo muestran grandes variaciones según se trate de zonas de intensa actividad portuaria, ambientes marinos o de agua dulce (entre otras variables) y van desde la escala de los nanogramos hasta microgramos (μg) por litro de agua o gramos de sedimento seco (Watanabe *et al.* 1992; Antizar-Ladislao 2008; Titley-O'Neal *et al.* 2011). La bioacumulación de COE en vertebrados e invertebrados ha sido documentada (Kannan *et al.* 1995). En general, podría decirse que el ingreso de TBT a través de la dieta parecería ser la ruta de incorporación más importante (Finnegan *et al.* 2009) en animales, como fue visto en estudios de bioacumulación a través de tramas tróficas donde se incluyen organismos que ocupan niveles diferentes en el ecosistema (Coelho *et al.* 2002; Duft *et al.* 2005). Así como se acumulan, el TBT y sus derivados se degradan, aunque más lentamente, a través de procesos bióticos y abióticos (Watanabe *et al.* 1992; Bosma *et al.* 2001; Dubey y Roy 2003).

De los estudios realizados con animales, los moluscos son el grupo más utilizado para evaluar contaminantes y resultaron ser los más sensibles debido a la baja capacidad para metabolizarlos eficazmente (Meador 2000). Por ejemplo, la relación causa-efecto entre la presencia de COE liberados indiscriminadamente al ambiente y las anomalías observadas en organismos, se estableció desde 1970 cuando algunas poblaciones del bivalvo *Crassostrea gigas* y el gasterópodo *Nucella lapillus* en Francia e Inglaterra disminuyeron drásticamente sus densidades, atribuyendo este efecto a la introducción de las pinturas a base de TBT (Alzieu 1986; Bryan *et al.* 1986; Gibbs y Bryan 1986; 1987). En bivalvos, el efecto más estudiado fue la deformación, el engrosamiento de las valvas y la formación de cámaras rellenas de una sustancia gelatinosa en las mismas (Alzieu *et al.* 1986). En gasterópodos, el principal y más evidente efecto de la exposición al TBT fue el desarrollo de imposex en hembras habitantes de zonas portuarias. Este fenómeno definido como la sobreimposición de caracteres sexuales masculinos (desarrollo de un pene y/o un vaso deferente) en hembras de gasterópodos (Gibbs *et al.* 1991a), ha sido ampliamente estudiado y citado como uno de los más claros ejemplos de disrupción endocrina (Porte *et al.* 2006). El imposex ha sido descrito en especies de gasterópodos de todo el mundo y aún hoy se sigue monitoreando su incidencia en zonas de tráfico marítimo, debido en parte a la gran persistencia del TBT en el medio a pesar de la legislación vigente que prohíbe su uso.

Una extensa revisión bibliográfica de numerosos estudios de laboratorio con gasterópodos afectados por imposex reveló que la masculinización puede ocurrir en hembras expuestas a cuatro tipos de compuestos: estaño o compuestos de estaño, mezclas con compuestos de estaño, esteroides y otros contaminantes como Aroclor o Nonilfenol (Titley-O'Neal *et al.* 2011). Las hipótesis existentes sobre la masculinización en hembras de gasterópodos son varias, y aún no se ha dilucidado el mecanismo preciso de acción de los compuestos masculinizantes como el TBT (Tabla 2).

Tabla 2. Hipótesis propuestas acerca del modo de acción del TBT en la inducción de imposex en hembras de gasterópodos.

Hipótesis	Principal mecanismo	Referencia
Alteración en el factor morfogénico del pene (<i>Penis Morphogenic Factor-PMF</i>)	Alteraciones en el PMF (ubicado en el ganglio pedal) por neuropéptidos externos como TBT o propios de los organismos, como APGWamida.	(Oberdörster y McClellan-Green 2000; Oberdörster <i>et al.</i> 2005)
Inhibición de la enzima citocromo P-450	Inhibición de la enzima que cataliza la aromatización de andrógenos a estrógenos e incremento en los niveles de andrógenos.	(Bettin <i>et al.</i> 1996; Oehlmann <i>et al.</i> 1996a; Santos <i>et al.</i> 2005)
Inhibición de la excreción de testosterona	Inhibición de la conjugación de sulfuros de testosterona y otros metabolitos e incremento en los niveles de andrógeno.	(Ronis y Mason 1996; Oberdörster <i>et al.</i> 1998)
Modulación de niveles de testosterona libre	Alteración en la tasa de conversión de testosterona en ésteres de ácidos grasos, incrementando los niveles de testosterona libres en los tejidos.	(Gooding y LeBlanc 2001; Gooding <i>et al.</i> 2003)
Receptores retinoideos X (<i>Retinoid X Receptors-RXR</i>)	Inducción mediante RXR, importantes en el crecimiento y diferenciación del tracto genital en hembras expuestas a TBT.	(Nishikawa <i>et al.</i> 2004; Horiguchi <i>et al.</i> 2008)

Sternberg *et al.* (2010) postulan tres principales mecanismos de acción del TBT en la inducción de imposex. El primero es la hipótesis esteroidea, en la cual el desarrollo de imposex se daría por un aumento de los niveles de testosterona libre, causado por la inhibición de enzimas que actúan en el metabolismo esteroideo (Cyt P450, Sulfotransferasa y Acil coenzima A). El segundo es la hipótesis neuroendócrina, en donde el TBT podría actuar como un neurotóxico, causando una secreción anormal de neurohormonas (principalmente APGWamida) que regulan la diferenciación sexual en los organismos. El tercero es la hipótesis retinoidea, en la cual el TBT actúa imitando al ligando endógeno del receptor retinoideo X (RXR) que juega un rol fundamental en el desarrollo del órgano reproductor masculino. Esta última hipótesis ha sido la más ponderada por estudios posteriores que se han centrado en la búsqueda de este tipo de receptores y de otros de estructura similar en especies de invertebrados, vertebrados y humanos (Lima *et al.* 2011; Chapman y Guillette 2013; Pascoal *et al.* 2013). La Figura

1 muestra un esquema de los principales mecanismos mencionados anteriormente.

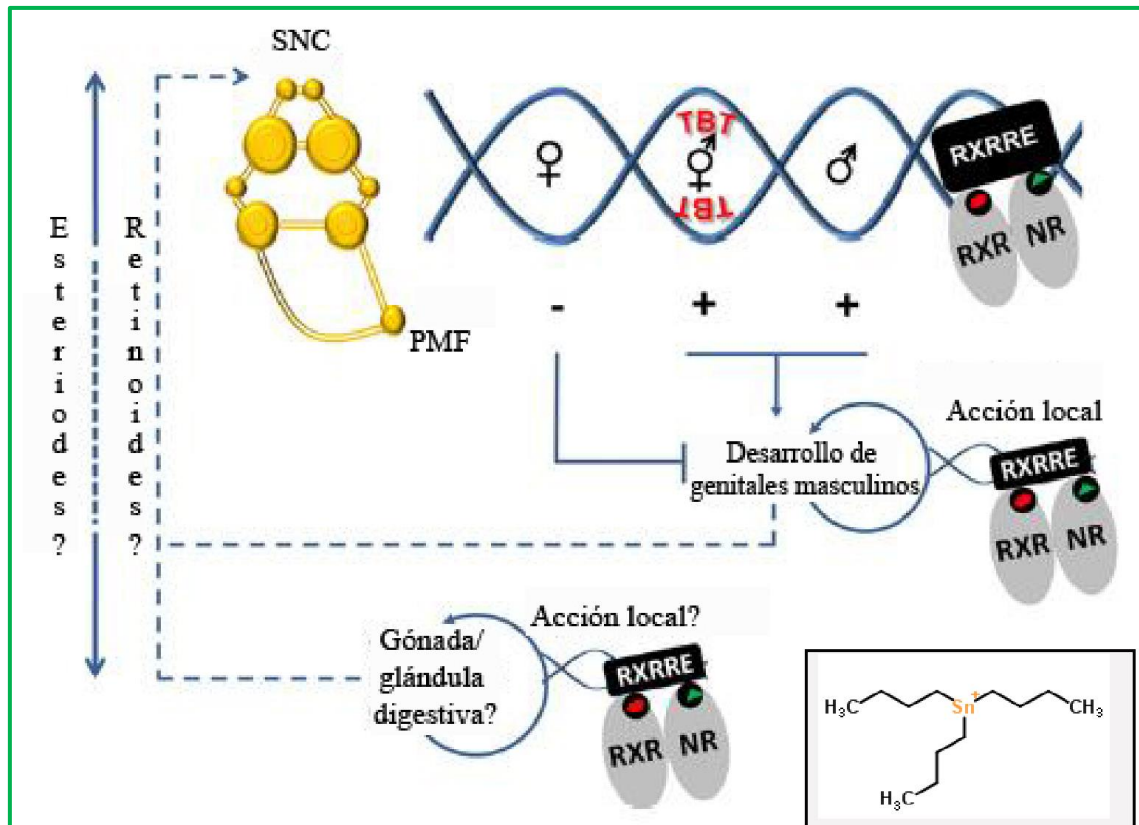


Figura 1. Estructura química del TBT (recuadro) y mecanismo hipotético para la inducción de imposex por TBT y el desarrollo del pene masculino en gasterópodos. La unión de un derivado retinoideo a un receptor retinoideo X (RXR) modulará genes diana del sistema nervioso central (SNC) en el macho a través de la interacción con los elementos de respuesta de RXR (RXRRE). El gen que codifica para el PMF (factor morfológico del pene) está bajo el control de la señalización de RXR y se induce en los machos durante la diferenciación del pene. La liberación del PMF inicia una cascada de eventos que conduce a la formación de un pene y un conducto deferente. En las hembras normales, el gen que codifica para el PMF se reprime en ausencia de un ligando de RXR, y por lo tanto la liberación del PMF se bloquea. El TBT puede unirse a RXR en el SNC de las hembras y esto conducirá a la activación de la vía de señalización que codifica el gen para el PMF, a través de un mecanismo similar al que ocurre durante el desarrollo del pene en machos. Aunque el inicio del desarrollo del imposex podría ser independiente de la gónada y/o de la glándula digestiva, estos órganos podrían ser importantes en la síntesis de los retinoides y los esteroides. La unión de TBT a RXR en la gónada y la glándula digestiva puede afectar los genes que codifican para el metabolismo de los retinoides y los esteroides que conducen a niveles de desequilibrio de estas hormonas, que a su vez pueden modular la señalización de RXR del SNC en el desarrollo de los órganos genitales masculinos en ambos sexos. Adaptado de Lima *et al.* (2011).

Si bien el imposex es conocido desde la implementación del TBT como biocida (1970s), en Argentina el fenómeno fue registrado por primera vez en el año 2000 (Penchaszadeh *et al.* 2001), luego del procesamiento de una muestra numerosa del gasterópodo *Buccinanops monilifer*, proveniente del puerto de Mar del Plata, en la que todos los especímenes parecían ser machos, cuando en realidad se trataba de una alta proporción de hembras con un grado avanzado de imposex (*Averbuj com. pers.*). Desde entonces, en el país se han realizado estudios que reportaron el fenómeno de imposex,

así como concentraciones de TBT y sus derivados en diferentes compartimentos (Willers 2004; Bigatti y Penchaszadeh 2005; Cledón *et al.* 2006; Narvarte 2006; Delucchi *et al.* 2007; Bigatti *et al.* 2009; Penchaszadeh *et al.* 2009; Arrighetti y Penchaszadeh 2010; Averbuj y Penchaszadeh 2010b; del Brío 2011; Delucchi *et al.* 2011; Teso *et al.* 2012) y evaluaron la incidencia del fenómeno a lo largo de toda la costa del país (Bigatti *et al.* 2009; Primost 2009). Los efectos ocasionados por los COE han sido demostrados en diferentes etapas del desarrollo para muchos taxones, incluyendo algas (Beaumont y Newman 1986), invertebrados (Lee 1991; Evans *et al.* 1995; Alzieu 2000; Bellas *et al.* 2005; Bellas 2006; Bhosle 2006; Jadhav *et al.* 2011), mamíferos marinos y de agua dulce (Tanabe 1999; Berge *et al.* 2004; Choi *et al.* 2011). En estos estudios se han detectado deformaciones en valvas calcáreas, desarrollo de imposex, cambios en la tasa respiratoria, cambios a nivel celular (como las defensas antioxidantes), mortalidad aguda, entre otros. En humanos también se han evaluado los efectos de la exposición a este tipo de sustancias y los resultados demuestran desde irritación de la piel hasta afecciones al sistema nervioso entre otros efectos (Kannan *et al.* 1999; Antizar-Ladislao 2008; Okoro *et al.* 2011). Estos efectos de tipo crónico son los más estudiados, sin embargo, debido a su alta toxicidad, el estudio de aspectos toxicológicos a corto plazo (que puedan afectar la supervivencia y el normal desarrollo de los organismos) no ha sido suficientemente explorado (Rüdel 2003). Algunos estudios de toxicidad aguda han sido tomados como referencia para establecer criterios de riesgo para la salud de los organismos y el ecosistema (Ej.: CEPA 2000; Hall *et al.* 2000; USEPA 2003), aunque los reportes son escasos y hasta inexistentes para algunas especies de importancia ecológica y económica.

Así como el Tributilestaño es objeto de estudio debido a que se asocia a zonas portuarias o de tráfico marítimo, los metales son objeto de estudio principalmente porque se encuentran en el ambiente debido a fuentes naturales o como consecuencia de la actividad del hombre sobre el ecosistema (Stengel *et al.* 2006). Del mismo modo, existen en la naturaleza concentraciones de metales que son esenciales para los organismos como hierro (Fe), cobre (Cu), zinc (Zn) y otros que no lo son como cadmio (Cd) y plomo (Pb), y su exceso podría provocar efectos como inducción de estrés oxidativo o daño en los tejidos celulares (Viarengo *et al.* 1990; Marigomez *et al.* 2002; Tanhan *et al.* 2005). Los metales son incorporados en los organismos por diferentes vías a las de los compuestos orgánicos (Walsh *et al.* 1995; Eisler 2010), y debido a que los gasterópodos son sensibles a contaminantes, es de especial interés conocer si los

organismos podrían ser utilizadas como bioindicadores de la presencia de estos elementos en el ambiente.

En la zona costera patagónica, se realizaron estudios sobre contaminantes vinculados particularmente a hidrocarburos y organoclorados (Commendatore *et al.* 2000; Esteves *et al.* 2006; Commendatore y Esteves 2007; Massara Paletto *et al.* 2008; Commendatore *et al.* 2012, entre otros). Los principales resultados indicaron la presencia de concentraciones variables de hidrocarburos tanto en sedimento como en moluscos bivalvos. Las zonas portuarias y de carga de petróleo crudo fueron las más afectadas por hidrocarburos de origen antropogénico, mientras que se encontraron niveles bajos de estos compuestos en otros sitios en donde el origen fue biogénico (marino y/o terrestre). En general, los niveles detectados fueron clasificados como “moderados” y muchos de estos estudios sirven actualmente como referencia para futuras investigaciones. Además de los hidrocarburos y metales, existen para la costa patagónica, registros de contaminación por TBT, provenientes de la actividad portuaria y el tráfico marítimo (Bigatti *et al.* 2009; Waisbaum *et al.* 2010; del Brío 2011; Delucchi *et al.* 2011) y puntualmente de organoclorados en la Bahía de Ushuaia (Amin *et al.* 2011). Asimismo, se han realizado estudios para determinar la concentración de metales en sedimentos y en animales (principalmente bivalvos) de la zona costera patagónica (Gil *et al.* 1988; Harvey y Gil 1988; Gil *et al.* 1989; Gil *et al.* 1996; Gil *et al.* 1999; Conti y Cecchetti 2003; Pérez *et al.* 2005; Gil *et al.* 2006; Vázquez *et al.* 2007; Mohamed 2008; Conti *et al.* 2011; Gil *et al.* 2011; Conti *et al.* 2012a; Giarratano *et al.* 2013; Marinho *et al.* 2013, entre otros).

Además de registrar las concentraciones de compuestos peligrosos, también se han realizado estudios que relacionan los efectos del TBT con la incidencia de imposex, malformaciones y pérdidas de peso en gasterópodos marinos (Penchaszadeh *et al.* 2001; Bigatti y Carranza 2007; Bigatti *et al.* 2009; Primost 2009; Averbuj y Penchaszadeh 2010b; Márquez *et al.* 2011; Primost y Bigatti 2011; Primost *et al.* 2011; Primost *et al.* 2012); así como, en el caso de hidrocarburos, su incorporación (Torres *et al.* 2013) y su posible degradación por otros organismos (Guibert *et al.* 2012, entre otros).

El golfo Nuevo presenta un gradiente de incidencia del fenómeno de imposex (Primost 2009) que va en decremento desde donde se concentra la actividad marítima hacia donde la actividad marítima es escasa e incluye hacia uno de sus extremos, áreas protegidas por la presencia de la ballena franca austral (*Eubalaena australis*). La ciudad de Puerto Madryn está emplazada en las costas del golfo Nuevo y cuenta con una

importante actividad turística e industrial. Esta última basada en la producción de aluminio y la industria pesquera. Estas actividades se ven potenciadas por la presencia del muelle Almirante Storni, diseñado en los años 70 como parte integrante del complejo industrial ALUAR (Aluminio Argentino S.A.), cuya actividad principal es la recepción de materias primas para la fabricación de aluminio, así como base de operaciones de los buques pesqueros y el puerto natural de mayor profundidad del país (Armada Argentina 2004). En los últimos años han surgido nuevas actividades vinculadas con el puerto, como el procesamiento de rocas porfídicas provenientes de canteras y el atraque de cruceros de gran porte cada vez más intensivo (APPM 2013). El otro muelle presente en la ciudad, ubicado a unos pocos metros del primero, es el muelle Comandante Luis Piedra Buena, habilitado desde 1910 para el embarque de todo tipo de mercaderías, hacia otros puertos patagónicos, Buenos Aires y exterior del país. En el año 2000 se inauguró para el atraque de cruceros turísticos internacionales de gran porte (APPM 2013), (Figura 2).



Figura 2. Zona portuaria en golfo Nuevo. (A, C): Muelle Almirante Storni -MAS-. (B, D): Muelle Luis Piedra Buena -MLP-. Fotografía (B) tomada de "Maxi Jonas Fotos".

Según las estadísticas de la Administración Portuaria de Puerto Madryn la actividad de embarcaciones en los muelles se relaciona con la exportación de productos como aluminio, pescado y pórfidos así como fruta fresca, fruta deshidratada e importación de alúmina y brea. Los servicios brindados incluyen la recepción de buques de carga general, de pasajeros, mineraleros, portacontenedores y pesqueros.

En la Figura 3 puede observarse gráficamente el número de embarcaciones que atracaron en la ciudad de Puerto Madryn en el periodo de duración de esta Tesis. Debe tenerse en cuenta, además la actividad de embarcaciones deportivas, la duración de la estadía de los grandes buques y las dimensiones de los mismos ya que la liberación de TBT proveniente de la pintura se da en forma continua en el tiempo (Brady 2005). Según los datos reportados, las embarcaciones que frecuentan los puertos del golfo Nuevo provienen de diferentes partes del mundo y varían en longitud desde 64m hasta 294m de eslora.

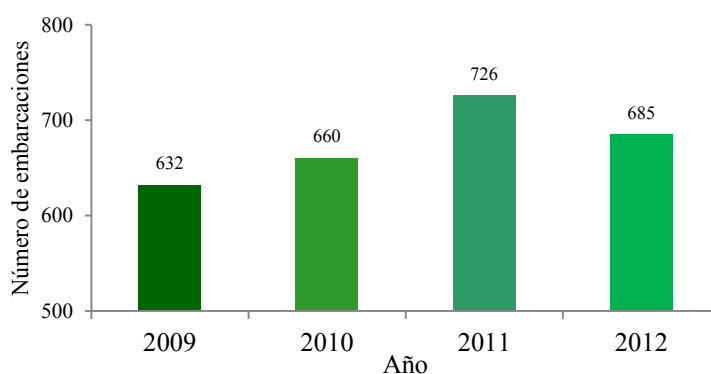


Figura 3. Número de embarcaciones que atracaron en los muelles ubicados en la ciudad de Puerto Madryn durante el periodo de realización de muestreos de gasterópodos y sedimentos del presente trabajo. Fuente: APPM (2013).

El empleo de especies u organismos bioindicadores es una herramienta útil para evaluar problemáticas de contaminación debido a que integran variables ambientales y que pueden ser relacionados con determinaciones químicas de diferentes compuestos realizadas en el laboratorio. Asimismo, la detección de biomarcadores dentro de un organismo es ampliamente utilizada como evidencia de la exposición a ciertos contaminantes (Livingstone *et al.* 1994; Lagadic y Caquet 1998; Suter 2001; Oehlmann y Schulte-Oehlmann 2002; Boelsterli 2003; Burger *et al.* 2007). En este trabajo se utilizaron moluscos gasterópodos pertenecientes a especies diferentes del grupo Neogastropoda: *Adelomelon ancilla* (Lightfoot, 1786), *Trophon geversianus* (Pallas, 1774) y *Buccinanops globulosus* (Kiener, 1834) como bioindicadores de la presencia de contaminantes organometálicos. Además de la ocurrencia del fenómeno de imposex, se evaluó la ocurrencia de otros efectos biológicos y la presencia de biomarcadores específicos. Para las tres especies, se conocían previamente datos sobre su biología y ecología que serán detallados en el capítulo 1 de esta Tesis y que fueron de utilidad en la discusión de los resultados obtenidos. La Figura 4 resume la anatomía general interna de los integrantes del grupo.

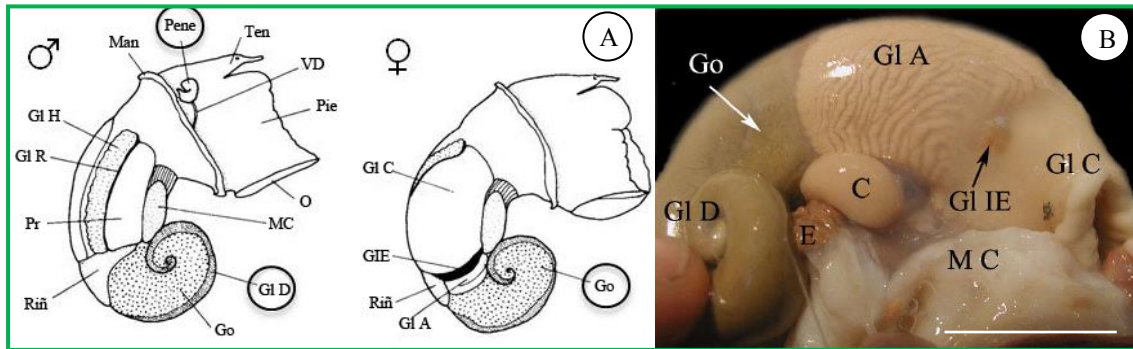


Figura 4. (A). Anatomía general de un de un neogasterópodo macho y hembra. (B) Anatomía interna de una hembra de la familia Volutidae. Abreviaturas: C: corazón; E: Estómago; GIA: glándula del albumen; GIC: glándula de la cápsula; GID: glándula digestiva; GIH: glándula hipobranquial; GIE: glándula ingestora de espermatozoides; GIR: glándula rectal; Go: gónada; Man: manto; MC: musculo columelar; O: opérculo; Pr: próstata Ten: tentáculo; VD: vaso deferente. Figura A: Adaptado de (Gibbs y Bryan 1987); Fotografía (B): tomada de Bigatti (2005). Escala 10mm.

Las tres especies de gasterópodos, *Adelomelon ancilla*, *Trophon geversianus* y *Buccinanops globulosus*, seleccionadas como objeto de estudio durante esta Tesis pertenecen a las familias Volutidae, Muricidae y Nassariidae respectivamente y han sido identificados como recurso pesquero alternativo en Argentina (Carcelles 1947; Narvarte 2006; Bigatti y Ciocco 2008, entre otros). Sin embargo no existe en la actualidad, regulación oficial sobre el manejo de pesquerías de gasterópodos marinos, aunque existen estudios que reportan tallas mínimas de captura y sugerencias para la explotación sustentable de estas especies (Narvarte 2006; Bigatti y Ciocco 2008; Averbuj y Penchaszadeh 2010a; Zabala 2012).

La ecotoxicología investiga el efecto de los compuestos químicos en el ecosistema integrado además en varios niveles biológicos. Para ello es necesario el abordaje interdisciplinario, considerando procesos químicos, biológicos y moleculares, así como mecanismos de toxicidad y procesos ecológicos (Fent 2003; Chan *et al.* 2008).

OBJETIVOS

Objetivo general

Estudiar la respuesta a la contaminación por metales y TBT en gasterópodos marinos de la zona portuaria de golfo Nuevo, mediante estudios biológicos, anatómicos, fisiológicos y bioquímicos.

Objetivos particulares

- Estudiar la ocurrencia del fenómeno de imposex en golfo Nuevo luego de la prohibición mundial de TBT, utilizando tres especies de gasterópodos presentes en la zona.
- Explorar si existen diferencias en la incidencia de imposex en relación a la época del año (estación fría-cálida).
- Determinar concentraciones de metales en gasterópodos comestibles y sedimentos de golfo Nuevo.
- Determinar el factor de bioacumulación de cada metal en gasterópodos en relación a los niveles en el sedimento o la dieta.
- Cotejar las concentraciones de metales determinadas en las partes comestibles de los gasterópodos con niveles de ingesta tolerable para humanos según regulación existente.
- Analizar los parámetros de estrés oxidativo en el gasterópodo *Buccinanops globulosus* en relación a los niveles de actividad portuaria e imposex presentes en golfo Nuevo.
- Describir la morfología de la concha del gasterópodo *Buccinanops globulosus* en seis sitios en golfo Nuevo mediante técnicas de morfometría geométrica (MG).
- Estudiar si las formas encontradas son diferentes y si se relacionan con la ocurrencia del fenómeno de imposex asociado a la contaminación por Tributilestaño (TBT) u otros compuestos tóxicos presentes en zonas portuarias.
- Realizar ensayos de toxicidad aguda en acuarios utilizando la especie *Buccinanops globulosus* con el fin de establecer la dosis letal media (DL₅₀ 96h) del TBT.
- Evaluar la fecundidad en *Buccinanops globulosus*, una especie considerada de sensibilidad media al TBT, en relación a la ocurrencia de imposex.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

Los 7 sitios seleccionados para realizar el presente trabajo se ubicaron en la ciudad de Puerto Madryn (bahía Nueva) y alrededores (en un máximo de 30km de distancia) dentro de golfo Nuevo (Figura 5) y a pocos kilómetros de la Península de Valdés, declarada Patrimonio de la Humanidad por la UNESCO (UNESCO 1999).



Figura 5. Área de estudio en golfo Nuevo. Imagen tomada de *Google Earth*

Especies estudiadas

Las especies seleccionadas fueron *Adelomelon ancilla* (Volutidae), *Trophon geversianus* (Muricidae) y *Buccinanops globulosus* (Nassariidae).

Se excluyeron de todos los análisis los especímenes de la especie *B. globulosus* de tallas menores a 36,32mm en hembras y menores 26,07mm en machos, de acuerdo a una determinación de la talla mínima de cópula observada en el campo en el presente

trabajo para el muelle Luis Piedra Buena (MLP). Para el sitio Punta Cuevas (PC) se excluyeron las hembras con tallas menores a 17,3mm y los machos menores de 15,6mm (Avaca *et al.* 2013a). En Cerro Avanzado la talla mínima de cópula observada en hembras fue de 30mm y 18mm en los machos (Averbuj *datos sin publicar*) por lo tanto también fueron excluidos del análisis los especímenes de tallas menores. Para estudiar la especie *A. ancilla*, teniendo en cuenta su baja densidad (Penchaszadeh *et al.* 2009), su baja fecundidad y su alta longevidad, sólo fueron recolectados 5 especímenes por muestreo (cuando fue posible). Se excluyeron del análisis las hembras de tallas menores a 93,5mm y los machos de tallas menores a 73,5mm (Zabala 2012) por considerarse inmaduros. Para la especie *T. geversianus* no se cuenta con este tipo de información, sin embargo se excluyeron del análisis aquellos especímenes que no pudieron ser claramente identificados como machos o hembras.

Recolección de organismos

Para el caso de la especie *A. ancilla*, la recolección de gasterópodos se realizó mediante buceo autónomo (Figura 6-A), a una profundidad no superior a los 10 metros en la zona del muelle Almirante Storni (MAS) y la playa Punta Este (PE). Para recolectar especímenes de la especie *Buccinanops globulosus*, se utilizaron trampas con forma de cono truncado forrada con una malla de nylon de 1x1cm. En su interior se colocó como cebo, carne ovina en putrefacción (Figura 6-B) debido a que los gasterópodos se alimentan de carroña y de esta manera se obtiene un gran número de individuos en poco tiempo. Las trampas fueron colocadas desde el muelle Luis Piedra Buena (MLP), en la zona portuaria, utilizando un cabo, o fueron colocadas por un buzo en los sitios Punta Cuevas (PC), Punta Este (PE), Playa Paraná (PP), Cerro Avanzado (CA) y Ambrossetti (AM), en todos los casos, las trampas fueron fondeadas, apoyadas sobre el sedimento y luego de un tiempo de espera considerable (de 1 a 4 horas), fueron retiradas del agua y los individuos recolectados.

Para la especie *T. geversianus* habitante del intermareal, se realizó una recolección manual durante las mareas bajas, en los sitios MLP, PC y CA (Figura 6-C), aunque esta especie también habita el submareal, donde fue capturada en MLP y en PE.

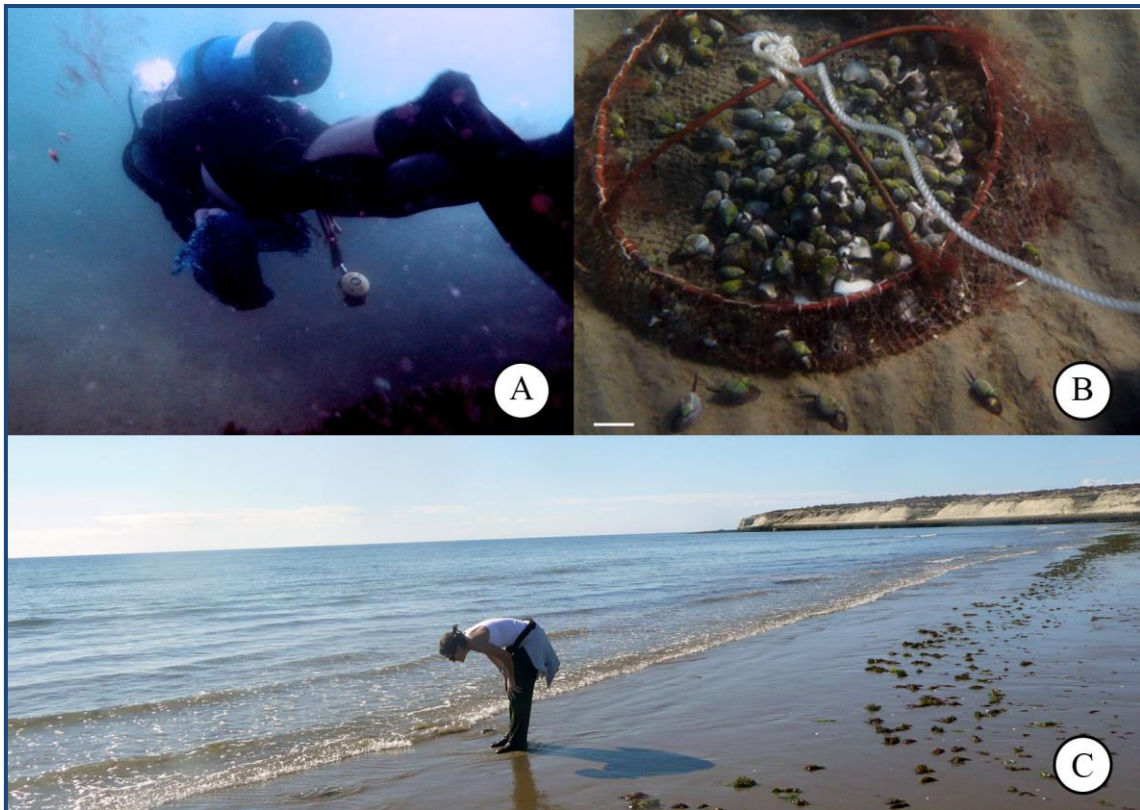


Figura 6. Recolección de gasterópodos. (A) Buceo autónomo. (B) Trampas con cebo. (C) Recolección manual. Fotografía (A): José Fernández Alfaya. Escala=5cm.

Siempre se trató de realizar la recolección en condiciones climáticas óptimas para el buceo y la navegación. Una vez obtenidas las muestras, los individuos fueron llevados a un acuario refrigerado y colocados en acuarios con agua de mar, aireación y temperatura controlada de 13°C hasta su procesamiento en el laboratorio.

Recolección de sedimentos

Las muestras de sedimentos fueron recolectadas en la misma área donde se encontraban los gasterópodos. Para cada muestra se tomaron alícuotas de la capa superficial de sedimento (los primeros 5cm) separadas al azar hasta llenar testigos de acrílico de 45mm de diámetro interno y 30cm de longitud (Figura 7); con ellos se realizó una muestra compuesta, homogeneizando todos los fragmentos obtenidos con espátula de metal (para analizar contaminantes orgánicos) o plástica (para el análisis de compuestos metálicos). Las muestras fueron almacenadas en bolsas plásticas con cierre hermético y colocadas en heladera (4°C) y al resguardo de la luz hasta su posterior procesamiento.



Figura 7. Recolección de sedimentos utilizando testigos de acrílico.

Procesamiento de gasterópodos

El procesamiento de los gasterópodos se realizó utilizando guantes de látex e instrumentos de acero para evitar la contaminación de las muestras. Todos los gasterópodos estudiados en este trabajo fueron utilizados para evaluar las siguientes variables: Peso total de cada organismo (con balanza digital 0,01g), talla o largo total de la concha (con calibre digital 0,05mm), peso de las partes blandas sin la concha (balanza digital 0,01g), y peso de la concha (diferencia entre el peso total y el peso de las partes blandas). Para realizar comparaciones entre organismos, las variables de peso fueron relativizadas con la talla de los mismos debido a que existen variaciones en la talla entre diferentes poblaciones.

El sexo de cada espécimen se determinó a través de la identificación de glándulas sexuales accesorias como la glándula de la cápsula, glándula del albumen y glándula pedal en hembras, y la ausencia de las mismas y la presencia de pene y vaso deferente en los machos (Figura 8). Luego del procesamiento de cada individuo, se procedió a la disección de las partes blandas de acuerdo al objetivo particular para el que fueran obtenidos. De esta manera, para la determinación de TBT y sus derivados se diseccionaron diferentes órganos incluida la branquia y la glándula digestiva; para la determinación de parámetros de estrés sólo la glándula digestiva y para la determinación de metales el pie y el complejo gónada-glándula digestiva. Cada método particular será detallado en el capítulo correspondiente.

El análisis de imposex se realizó mediante la observación a simple vista o bajo lupa estereoscópica (cuando fue necesario), de la presencia de un pene, vaso deferente y/o cualquier otra anomalía en el sistema reproductivo exterior de las hembras como excrecencias o múltiples penes. En el caso de existir alguna de estas estructuras se tomó

el largo total (mm) mediante calibre o bajo lupa estereoscópica.

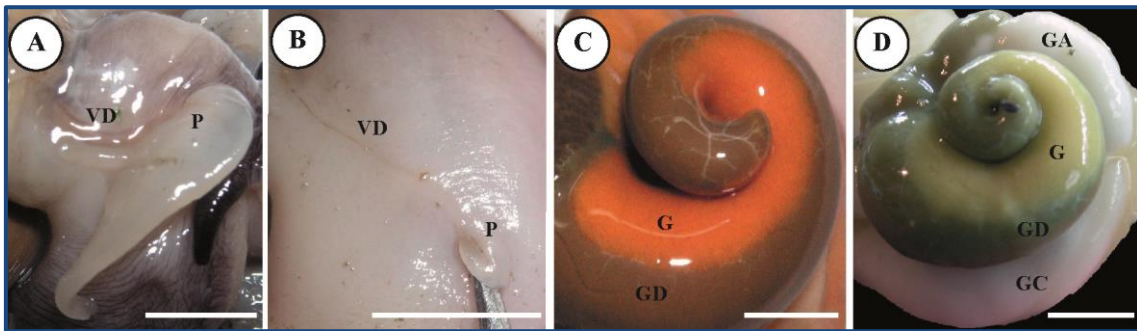


Figura 8. Determinación del sexo en gasterópodos. (A) Macho. (B) Hembra con imposex. (C) Complejo glándula digestiva-gónada en machos. (D) Complejo glándula digestiva-gónada en hembras y glándulas accesorias. Abreviaturas: GD: glándula digestiva, GA: glándula del albumen, GC: glándula de la cápsula, G: gónada, P: pene, VD: vaso deferente. Escala=10mm.

Con estas medidas se calcularon los índices de imposex (Tabla 3), representados por el porcentaje de imposex, el promedio del largo del pene de las hembras con imposex o FPL (*female penis length*, por sus siglas en inglés), el promedio del largo del pene de los machos o MPL (*male penis length*, por sus siglas en inglés), y el índice relativo del largo del pene o RPLI (*relative penis length index*, por sus siglas en inglés) (Gibbs y Bryan 1996). Cada índice calculado se corresponde con un solo valor para cada muestra analizada. Sin embargo, los valores de los largos de los penes de machos y hembras utilizados para calcular el MPL y FPL pueden ser estadísticamente comparados ya que representan un conjunto de datos a los cuales se les obtuvo el promedio.

Tabla 3. Índices de imposex calculados durante el presente trabajo.

Índice	Descripción
% imposex	$\frac{\text{Número de hembras con imposex en la muestra}}{\text{Número de hembras totales en la muestra}} * 100$
FPL	Promedio del largo del pene de las hembras con imposex de una muestra.
MPL	Promedio del largo del pene de los machos de una muestra.
RPLI	$\frac{\text{FPL}}{\text{MPL}} * 100$

Procesamiento de sedimentos

Cada muestra de sedimento obtenida en el campo se separó en seis alícuotas, tres para registrar acumulación de contaminantes (metales y organometales), una cuarta para el análisis granulométrico, una quinta para el análisis de contenido de humedad y la sexta para el análisis de contenido de materia orgánica. Dependiendo de los contaminantes a determinar, los sedimentos fueron procesados de manera diferente, como se explica a continuación.

Determinación de compuestos orgánicos de estaño en gasterópodos y sedimentos

Para determinar TBT y sus derivados (COE) en gasterópodos se procedió según la técnica de Morabito *et al.* (1995) con algunas modificaciones. Las soluciones de los patrones cromatográficos fueron preparados con una concentración de 1mg (Sn)/ml en hexano y almacenadas a -18°C en frascos de vidrio de color ámbar.

Se pesó 1g de muestra de tejido (complejo glándula digestiva-gónada, pie, branquia y resto de las partes blandas) previamente liofilizado durante 24h y triturado (Figura 9-A), y 5g en el caso de sedimentos, también liofilizados. Las muestras fueron colocadas en frascos de vidrio oscuro previamente calcinados. Se adicionaron 100µl de un patrón de recuperación (tripropil-estaño) y se esperó 30 minutos. Para la extracción se adicionaron 15ml de tropolona 0,05% en metanol y 1ml de HCl concentrado (37%). Se colocó en un ultrasonificador durante 15min a 40°C (Figura 9-B). Luego las muestras fueron centrifugadas durante 10 minutos a 3250rpm. Este procedimiento fue repetido tres veces.

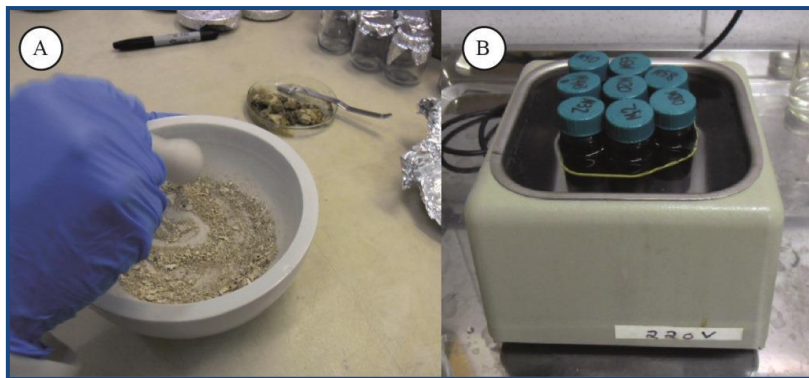


Figura 9. (A) Triturado de las muestras liofilizadas. (B) Baño en ultrasonificador.

Después de cada centrifugación, el sobrenadante fue retirado y colocado en una ampolla de decantación con 150ml de NaCl (10% en agua Milli-Q) y extraído con 20ml de diclorometano agitando vigorosamente (Figura 10-A). La fase inferior fue recogida en balones de 125ml pasando por un embudo cubierto con sulfato de sodio anhidro y agregando 5ml de hexano. Para el intercambio de solventes, se evaporó a 45°C utilizando un rotavapor, se adicionó entre 5 y 10 ml de hexano y se evaporó nuevamente hasta obtener un volumen de 1 a 2 ml aproximadamente, el cual fue transferido a un frasco de vidrio oscuro previamente calcinado (Figura 10-B y C).

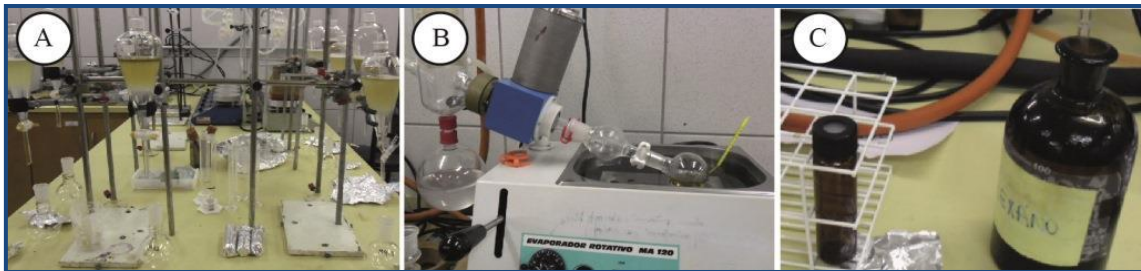


Figura 10. (A) Extracción en ampollas de decantación. (B) Evaporación e intercambio de solventes en rotavapor. (C) Extracto transferido a frascos de vidrio oscuro.

Se le extrajo el aire a la muestra mediante la utilización de un globo con nitrógeno con una aguja en el extremo, el cual fue insertado en el frasco con otra aguja que permitía la salida del aire y el ingreso de nitrógeno desde el globo. Se colocaron de la misma forma 2ml de derivatizante (bromuro de magnesio n-fenilestaño en solución 2M de dietileter) y se esperó 30 minutos (Figura 11-A y B). Para detener la reacción de derivatización, en cada muestra se colocaron 12ml de agua Milli-Q y 1ml de HCl concentrado (37%) sobre un recipiente con hielo y se agitó. La extracción líquido-líquido se realizó adicionando 5ml de hexano a cada muestra en una ampolla de decantación, se agitó y se retiró el sobrenadante de la parte superior con una pipeta Pasteur y se colocó en un tubo de ensayos graduado (25ml). El frasco oscuro que contenía la muestra fue enjuagado con 5ml de hexano 3 veces. Se evaporaron los extractos con nitrógeno hasta un volumen de 1ml. La purificación de los mismos se realizó utilizando una columna de vidrio con 3,5g de sílica (activada a 160°C durante 4h) con la mezcla de solventes hexano/tolueno en partes iguales (20ml) y se colocó 1cm de grosor de sulfato de sodio al final de la columna (Figura 11-C).

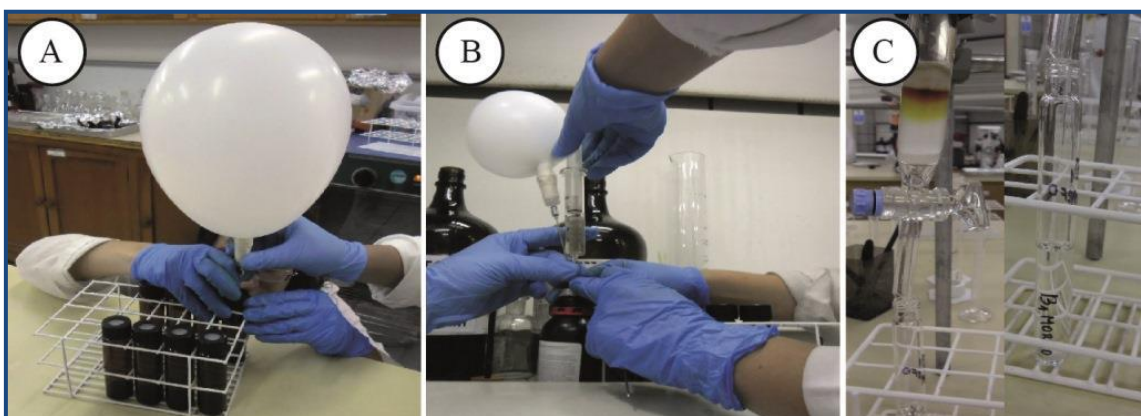


Figura 11. (A) Extracción del aire de la muestra. (B) Agregado del derivatizante. (C) Purificación de la muestra y extracto obtenido luego de la elución en la columna.

Se utilizó un volumen de 40ml de la mezcla hexano/tolueno para cada columna. La muestra se colocó en la columna con pipeta Pasteur y se dejó correr recogiendo el extracto en tubos graduados (25ml). Se dejó eluir completamente la columna y el

extracto se evaporó con nitrógeno hasta un volumen de 0,5ml (Figura 11-C). Este fue transferido a viales previamente calcinados para luego adicionarles el estándar interno (1000ng Sn ml⁻¹ de solución de tetrabutyl-estaño). Los extractos fueron analizados en un equipo de cromatografía gaseosa, Perkin Elmer Clarus 500 equipado con un espectrómetro de masas Elite-5MS (Figura 12).

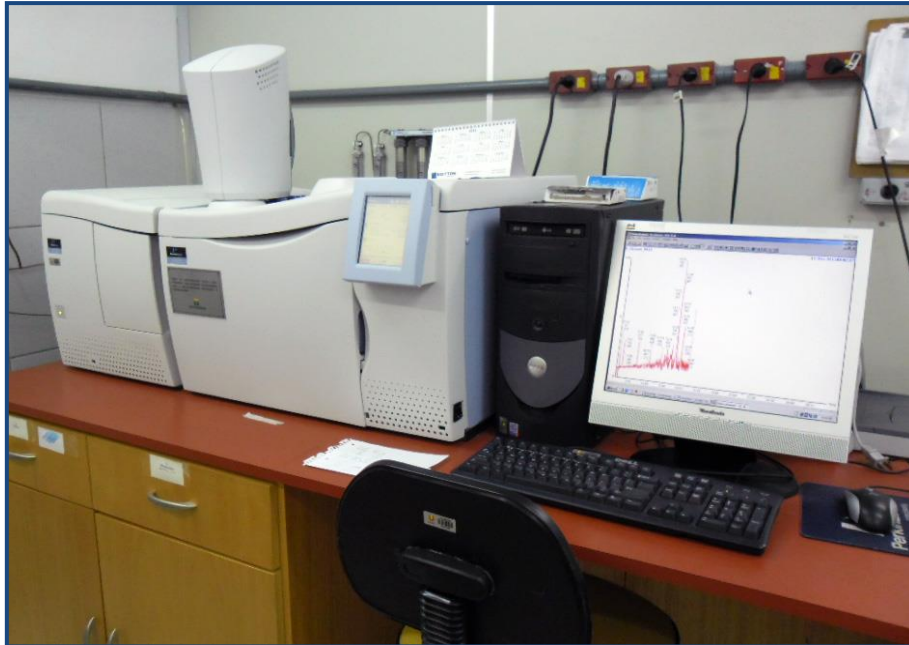


Figura 12. Equipo utilizado en la determinación de TBT y sus derivados en las muestras de sedimentos y tejidos de organismos.

El control de calidad estuvo basado en el análisis de los blancos, las matrices sembradas y el material de referencia certificado (PACS-2/National Research Council of Canadá, Ottawa, Canadá).

Los reactivos utilizados fueron obtenidos de la marca Sigma Aldrich®, excepto el cloruro de tripropilestaño, el tetrabutilestaño, el ácido clorhídrico y el cloruro de sodio fueron obtenidos de la marca Merck® (Darmstadt, Alemania). Los solventes utilizados fueron obtenidos de JT Baker (Mallinckrodt, México). El agua fue purificada mediante el sistema de purificación Direct-Q UV3® (18.2MΩ cm.-1) (Millipore, Bedford, MA, USA). Todo el material de vidrio fue lavado con agua y detergente aniónico Extran® (Merck) 5% v/v, luego sumergido en una solución 5% v/v del mismo detergente aniónico por 24 horas y enjuagado abundantemente con agua corriente. Luego se lo dejó sumergido en ácido nítrico por 24h (solución al 5% v/v), se enjuagó y secó en estufa a 35°C. Asimismo, antes de ser utilizado, el material se enjuagó 3 veces con una solución de acetona y 3 veces con hexano.

Análisis de contenido de lípidos

A todas las muestras de tejido de gasterópodos (complejo gónada-glándula digestiva, pie, branquia y resto de las partes blandas) para las cuales se determinó la concentración de TBT y sus derivados se les determinó el contenido de lípidos. Este procedimiento fue realizado para normalizar el contenido de los compuestos determinados con el contenido lipídico correspondiente a cada muestra y poder establecer comparaciones entre las mismas. El método utilizado fue la extracción sólida-líquida de Soxhlet. Se pesaron de 1 a 5g de muestra seca de tejido previamente liofilizada y se la colocó en un cartucho de vidrio. El cartucho fue colocado en el extractor Soxhlet y se conectó al sistema de refrigeración (el dispositivo completo se muestra en la Figura 13).

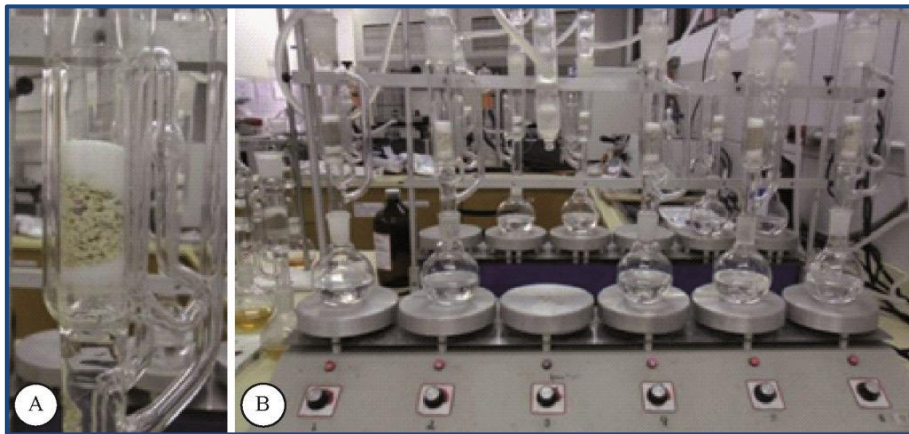


Figura 13. Extracción de lípidos. (A) Cartucho de vidrio conteniendo la muestra seca. (B) Dispositivo Soxhlet.

El solvente utilizado fue éter de petróleo. El sistema fue calentado a 60°C y se lo dejó eluir durante 6 horas. Luego de la extracción, se evaporó el solvente utilizado en rotavapor hasta reducir a un volumen de 1ml. Las muestras fueron puestas bajo campana para eliminar restos de solvente y luego en estufa a 70°C durante 3h. Antes del pesado, se las colocó en un desecador durante una hora. Se pesó cada muestra y se volvió a colocar en estufa hasta obtener un peso constante (Figura 14).

Se calculó la masa de lípidos como una proporción de la masa inicial de muestra:

$$\text{Contenido de lípidos} = \frac{\text{peso total de los lípidos obtenidos (g)}}{\text{peso total de la muestra seca inicial (g)}} * 100$$

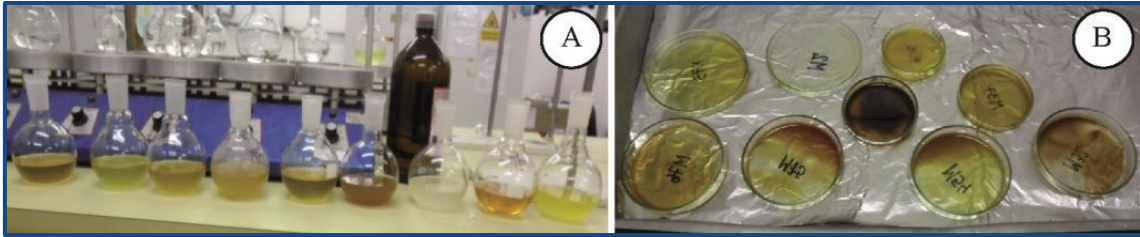


Figura 14. Determinación del contenido de lípidos. (A) Productos obtenidos luego de la extracción. (B) Muestras secas para el registro del peso final.

El procesamiento de las muestras, la determinación de los niveles de TBT y sus derivados y el contenido de lípidos de cada muestra fueron realizados como parte de una estancia de doctorado "sandwich" en el *Laboratorio de Microcontaminantes Orgánicos e Ecotoxicología Acuática de la Universidad Federal de Rio Grande (FURG), Rio Grande, Brasil*, mediante un convenio de cooperación CAPES-CONICET (2010-2011).

Análisis de granulometría

Se contó con una muestra de sedimentos de 50 a 100g (peso húmedo), que se pesó y secó en estufa a 60°C durante 48h. Una vez seca, fue tamizada en orden decreciente (Gray 1981), desde un diámetro de poro de 2000µm (grava) hasta uno de <63µm (limo). La fracción obtenida en cada tamiz fue pesada en balanza digital (0,01g) y se determinó su contribución porcentual al total de la muestra. Las fracciones se clasificaron en grano fino (<63µm), grano medio o arenas (63µm<arenas<2000µm) y grano grueso o grava (>2000µm).

Análisis de contenido de humedad y materia orgánica

Se tomó una alícuota de sedimento húmedo, se pesó, se colocó en estufa (Memmert) a 105°C hasta peso constante y se registró el peso seco (PS). La diferencia entre estos dos pesos fue considerada como el contenido de humedad de la muestra expresada como gramos de agua por gramo de sedimento. Luego se calcinó en mufla (ORL XP96) a 450°C por 4h y se registró el peso calcinado (PC). El porcentaje de materia orgánica fue calculado como: $\% \text{ Materia orgánica} = \frac{\text{PS}-\text{PC}}{\text{PS}} * 100$.

INCONVENIENTES TÉCNICOS

Durante el segundo semestre de 2011 se realizó el procesamiento de las muestras de biota y sedimentos para la posterior determinación de TBT y sus derivados. Las muestras fueron determinadas recién a mediados de 2012 por problemas técnicos del equipo GC-MS. Los resultados obtenidos de esta primera determinación no cumplieron con los niveles de calidad pertinentes (Apéndice 1). Este problema fue atribuido a fallas

en el equipo de medición el cual requeriría de una revisión por parte de personal certificado y como consecuencia de ello, las muestras deberían ser determinadas nuevamente. En septiembre de 2012 el Laboratorio de Micro-contaminantes sufrió el incendio de los laboratorios donde se encontraban los freezers de almacenamiento de muestras. En ellos se encontraban tanto los extractos obtenidos en el primer procesamiento que resultó defectuoso, como las muestras sin procesar (réplicas de las muestras determinadas) que se utilizarían para una segunda determinación con el fin de obtener resultados que cumplieran con los estándares de calidad estipulados. Se perdió la totalidad de las muestras (incluyendo los duplicados) por lo que no se pudieron volver a realizar las mediciones de TBT planteadas para cumplir con algunos de los objetivos propuestos.

Las muestras perdidas representaban el trabajo de casi 4 años de muestreo estacional en varios sitios y cuya determinación sería de gran valor para complementar los objetivos planteados en cuatro capítulos de esta Tesis. Sin embargo, se cuenta con datos previos de concentraciones de TBT y sus derivados para alguno de los sitios objeto de estudio en esta Tesis y para una especie de gasterópodo presente en la zona, *Odontocymbiola magellanica* (Bigatti *et al.* 2009; del Brío 2011) que serán tomados como referencia para la discusión de los resultados biológicos relacionados a la contaminación por TBT, obtenidos durante esta Tesis.



CAPÍTULO 1-Alteraciones reproductivas y somáticas en relación a la contaminación portuaria en gasterópodos de golfo Nuevo

Introducción

La actividad marítima implica la liberación de sustancias al ambiente que pueden resultar tóxicas para los organismos como desechos de basura, combustibles, pinturas anti-incrustantes, metales pesados, entre otros. A estos desechos se suman los que suelen encontrarse en zonas costeras de actividad antrópica y con aporte desde los ríos. Los moluscos, en especial los bivalvos y gasterópodos, han sido utilizados como indicadores de la presencia de ese tipo de compuestos (Oehlmann y Schulte-Oehlmann 2002; Burger *et al.* 2007), por características tales como su abundancia, cortos ciclos de vida y por la capacidad de responder rápidamente ante cambios ambientales. La ocurrencia del fenómeno de imposex (Gibbs y Bryan 1986), que se expresa como la neoformación de un pene o vaso deferente en hembras de gasterópodos expuestas al Tributilestaño (TBT), es el principal ejemplo de lo mencionado anteriormente y muchos países en el mundo han utilizado como bioindicador de contaminación marina la ocurrencia del fenómeno (Axiak *et al.* 2003; Ketata *et al.* 2008, entre otros).

Los índices utilizados para registrar el desarrollo de imposex se basan en la medición de las estructuras reproductivas (como un pene o un vaso deferente) de las hembras de gasterópodos que en algunos casos pueden ser comparables con las de los machos (Stroben *et al.* 1992a; Oehlmann *et al.* 1996b). Se han registrado variaciones estacionales en estas estructuras, principalmente en la longitud del pene de los machos en especies de la familia Muricidae, como *Thais clavigera* (Chan *et al.* 2008; Qiu *et al.* 2011). Es discutido aún si en los machos, las fluctuaciones están directamente relacionadas con la exposición a contaminantes con propiedades androgénicas (como el TBT). Esto último se ha postulado en relación a experimentos de laboratorio donde se han obtenido variaciones en el largo del pene de hembras con imposex y machos expuestos a concentraciones elevadas de TBT o compuestos capaces de producir efectos similares (Ramón y Amor 2001; Vasconcelos *et al.* 2011, para más detalle ver Tabla 2).

Las concentraciones de contaminantes en el ambiente pueden resultar muy variables, incluso en cortos periodos de tiempo. A pesar de la gran persistencia de los compuestos como el TBT, de varias semanas en la columna de agua y hasta 15 años en los sedimentos (Maguire *et al.* 1986; de Mora *et al.* 1989; Stewart y Mora 1992; Burton *et al.* 2004; Burton *et al.* 2006), las fluctuaciones en las concentraciones ambientales están sujetas a procesos que dependen de factores como la temperatura y el contenido de materia orgánica, entre otros (Berg *et al.* 2001). Esto puede estudiarse con mayor detalle en zonas donde la estacionalidad climática es bien marcada, aunque los procesos que

pueden ejercer influencia en la dinámica de los contaminantes en el medio son complejos de evaluar.

La evaluación de alteraciones a nivel reproductivo, como lo es el desarrollo de imposex, conlleva al interrogante de si existen efectos a un nivel más elevado en la estructura de las poblaciones afectadas. Los principales estudios sobre la ocurrencia de imposex en especies indicadoras *Nucella lapillus* y *Hexaplex trunculus*, han reportado alteraciones en el tracto reproductivo de las hembras que ocasionaron como consecuencia la esterilidad de las mismas o la disminución en la producción de gametas poniendo en riesgo la subsistencia y en algunos casos llevando a la extinción local de esas poblaciones (Gibbs y Bryan 1986; Gibbs *et al.* 1991b; El Menif *et al.* 2006). Sin embargo, es escasa la bibliografía que evalúe la fecundidad en términos de número de descendientes y los efectos sobre la progenie proveniente de poblaciones afectadas.

En el golfo Nuevo pueden encontrarse especies de gasterópodos de diversas familias, cada una viviendo en un hábitat particular y con hábitos alimenticios diferentes. A continuación se describen las principales características de las especies con las que se trabajó en el presente capítulo.

- ***Adelomelon ancilla* (Lightfoot, 1786)**

Pertenece a la familia Volutidae con algunas especies de valor económico (Carcelles 1947; Lasta *et al.* 2000), debido a que son capturadas en su mayoría, por pesquerías artesanales en Argentina y Chile y consumidas localmente (Osorio 1979; Giménez *et al.* 2005; Bigatti y Ciocco 2008). Algunos parámetros de *A. ancilla* (Figura 15-A) en poblaciones del golfo Nuevo han sido estudiados en detalle (Penchaszadeh *et al.* 2009; Zabala 2012; Zabala *et al.* 2013a; Zabala *et al.* 2013b). Estos estudios reportan marcas de crecimiento semianuales, en concordancia con la variación de la temperatura del agua; son además organismos longevos de hasta 18 años de edad, de lento crecimiento, madurez sexual tardía (a los 7 y 9 años de vida en machos y hembras respectivamente), baja fecundidad y bajas densidades poblacionales (0,022 ind/m²). Las hembras depositan ovicápsulas sobre sustratos duros (Figura 15-B), las cuales llevan dentro de 1 a 6 embriones que una vez completado el desarrollo (entre 5 y 6 meses), eclosionan como juveniles reptantes (Penchaszadeh y De Mahieu 1976; Zabala 2012).

En lo que respecta a la ocurrencia de imposex en esta especie, se ha determinado que las poblaciones presentan una alta sensibilidad a la presencia de TBT en el ambiente, ya que aún en bajas concentraciones evidencian el fenómeno (Bigatti *et al.*

2009), Figura 15-C.

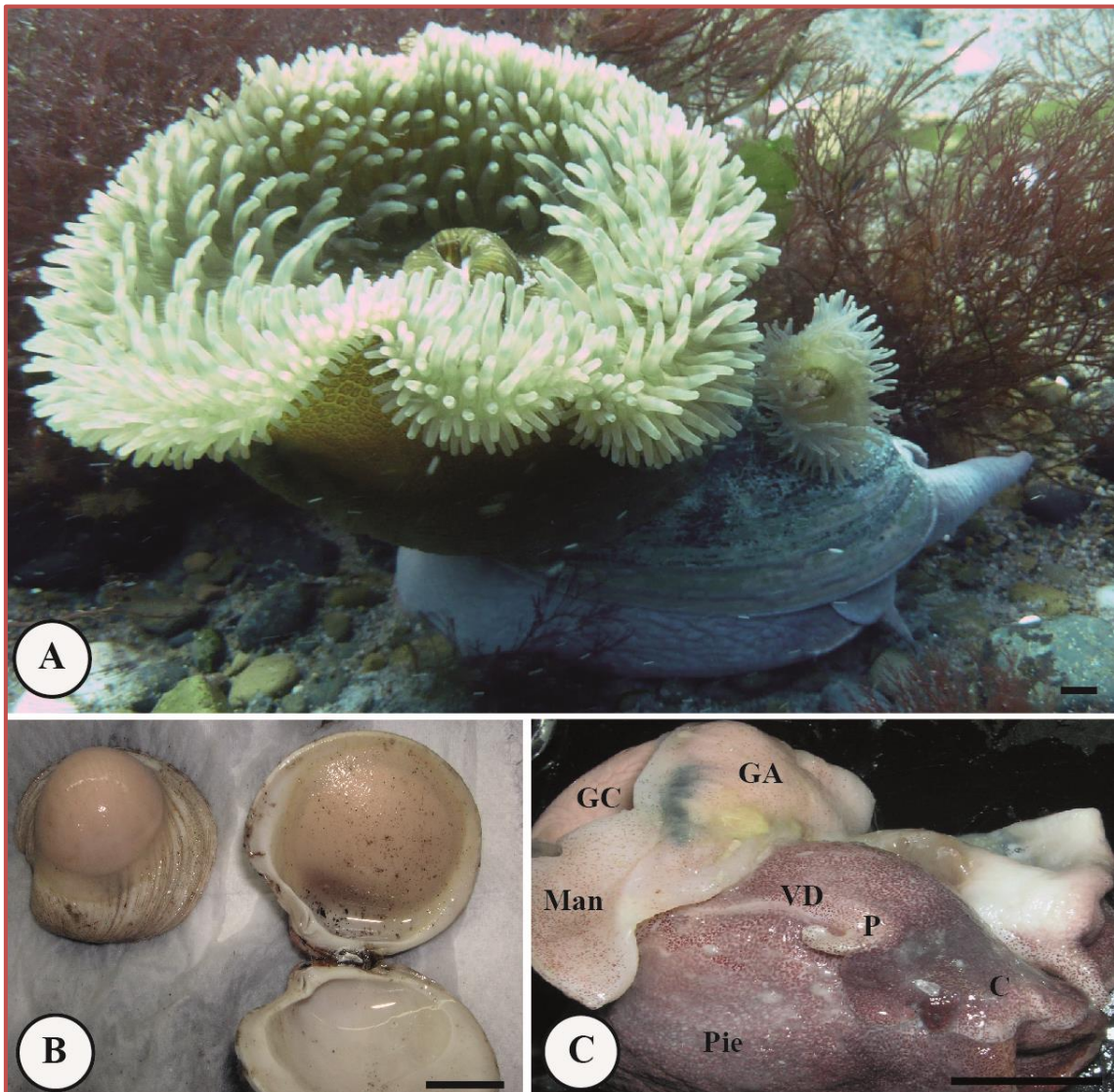


Figura 15. *Adelomelon ancilla*. (A) Especimen en el campo con anémonas epibiontes de la especie *Antholoba achates*. (B) Ovicápsulas. (C) Disección de una hembra con imposex. Abreviaturas: C: cabeza, GA: glándula del albumen, GC: glándula de la cápsula, Man: manto, P: pene, VD: vaso deferente. Fotografía (A) y (B), Soledad Zabala. Escala: 10mm.

• *Trophon geversianus* (Pallas, 1774)

Pertenece a la familia Muricidae de amplia distribución a lo largo de la costa atlántica y pacífica (Castellanos y Landoni 1993; Griffin y Pastorino 2005; Pastorino 2005). Los organismos de la especie *T. geversianus* (Figura 16-A) son depredadores, y se alimentan de bivalvos mytilidos mediante la perforación de sus valvas con un órgano perforador accesorio (*accessory boring organ* -ABO-) situado en la suela del pie (Pio 2010). En golfo Nuevo, esta especie tiene representantes en el submareal y en el intermareal, diferenciándose principalmente por su tamaño (Figura 16-B) y morfología externa de la concha (Nieto Vilela *et al.* 2012). Cumplido *et al.* (2010) han estudiado

con detalle la estacionalidad y otros aspectos reproductivos en poblaciones intermareales de esta especie en golfo Nuevo. La oviposición se da conforme al incremento de las horas de luz y las hembras ponen ovicápsulas sobre un sustrato duro (Figura 16-C) con huevos nutritivos en su interior (Penchaszadeh 1973).

En lo que respecta a los estudios sobre incidencia de imposex, aunque las especies más utilizadas como bioindicadores en otras regiones del mundo pertenecen a la familia Muricidae (Gibbs y Bryan 1987; Axiak *et al.* 1995; Oehlmann *et al.* 1996a; Davies 2000a; Quintela *et al.* 2000; Shim *et al.* 2000; Stagicic *et al.* 2008; Abidli *et al.* 2012), llamativamente, en las poblaciones de *T. geversianus* expuestas a concentraciones variables de TBT a lo largo de toda la costa patagónica, no se ha detectado la ocurrencia de imposex, excepto en sitios donde estas concentraciones en el sedimento fueron muy elevadas (Bigatti *et al.* 2009). Los resultados de estos autores permitieron clasificar a esta especie como un indicador de altas concentraciones de TBT.

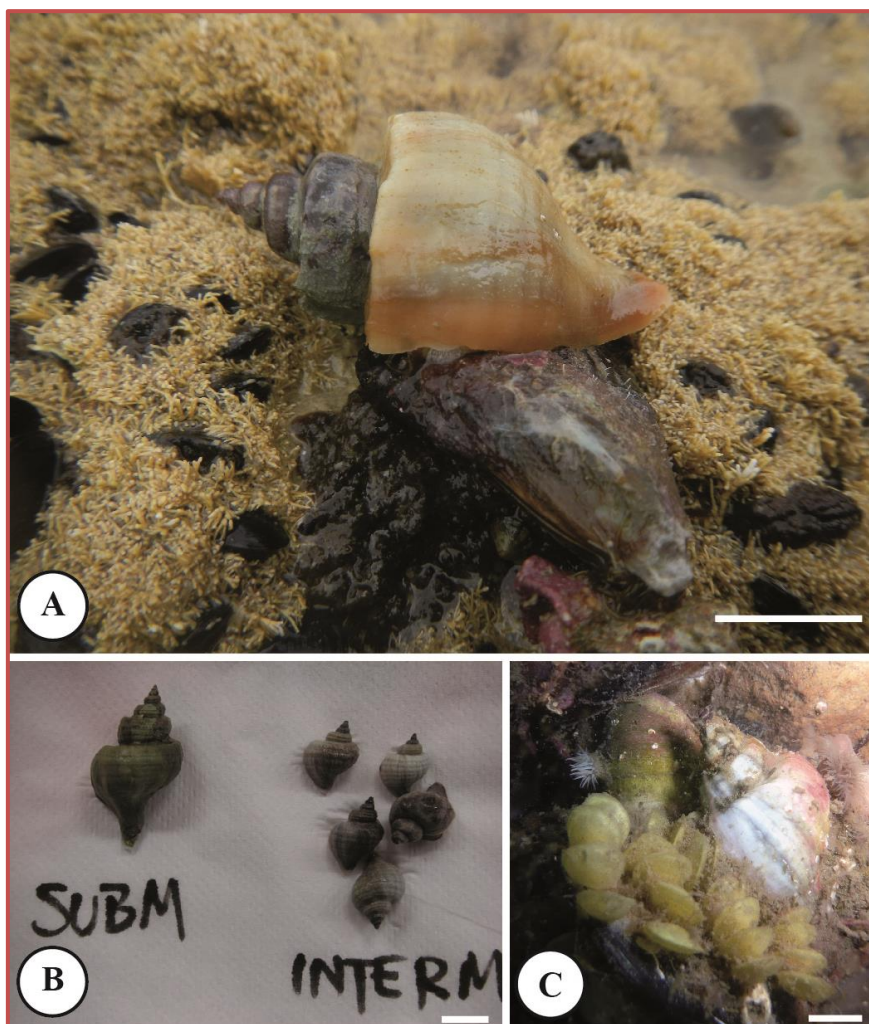


Figura 16. *Trophon geversianus*. (A) Especímenes en el campo. (B) Diferencia de tamaño entre individuos de hábitat intermareal y submareal. (C) Ovicápsulas colocadas recientemente. Escala=10mm.

- ***Buccinanops globulosus* (Kiener, 1834)**

El género *Buccinanops* (d'Orbigny, 1841) pertenece a la familia Nassariidae y es endémico del Océano Atlántico Sur Occidental. Estos organismos viven en el intermareal o en aguas poco profundas o hasta 10m (Pastorino 1993) en fondos arenosos o de fango; la mayoría del tiempo se encuentran enterrados en el sedimento (Scarabino 1977) y quedan expuestos durante las mareas bajas. Se alimentan de carroña, principalmente restos de cangrejos y bivalvos (Daleo *et al.* 2005; Narvarte 2006), aunque también se lo observó comiendo presas vivas (Avaca *et al.* 2013a). Viven en grupos numerosos (Figura 17-A), tanto cuando están enterrados, copulando, como cuando están alimentándose.

Algunos parámetros poblacionales de especies del género (*B. globulosus* y *B. cochlidium*) han sido estudiados en poblaciones de Patagonia. Entre los principales resultados de estos estudios se encuentra la variación en talla entre sexos (hembras mayores a los machos), y entre poblaciones (Averbuj 2009; Avaca *et al.* 2010; Averbuj *et al.* 2010; Averbuj y Cremonte 2010; Averbuj y Penchaszadeh 2010a; Averbuj *et al.* 2012; Avaca *et al.* 2013a). Una vez al año, entre los meses de octubre a diciembre (Averbuj *et al.* 2014), las hembras depositan sus ovicápsulas sobre la zona del callo de la concha (Penchaszadeh 1971; Averbuj y Penchaszadeh 2010a), Figura 17-B. Dentro de las mismas se depositan miles de huevos de los que, dependiendo de la especie, desarrollará uno o más embriones, mientras que el resto, denominados huevos nutritivos, les servirán de alimento. En *B. globulosus* una vez completado el desarrollo se ha observado que eclosiona un sólo juvenil reptante de entre 4mm (Narvarte 2006) a 6mm (Penchaszadeh 1971). En raras ocasiones se ha observado la presencia de más de un embrión por ovicápsula en los individuos de esta especie (Averbuj *et al.* 2014).

El fenómeno de imposex ha afectado también a varias especies del género. Un estudio realizado a lo largo de toda la costa patagónica determinó la presencia de imposex en todas las zonas portuarias y de tráfico marítimo elevado. En todos los casos se encontró a la especie *B. globulosus* y presentó imposex (Bigatti *et al.* 2009; Primost 2009), Figura 17-C. Estos autores clasificaron a la especie como buena indicadora de la presencia de TBT en el ambiente, ya que los gasterópodos desarrollan el fenómeno de imposex aún en bajas concentraciones ambientales.

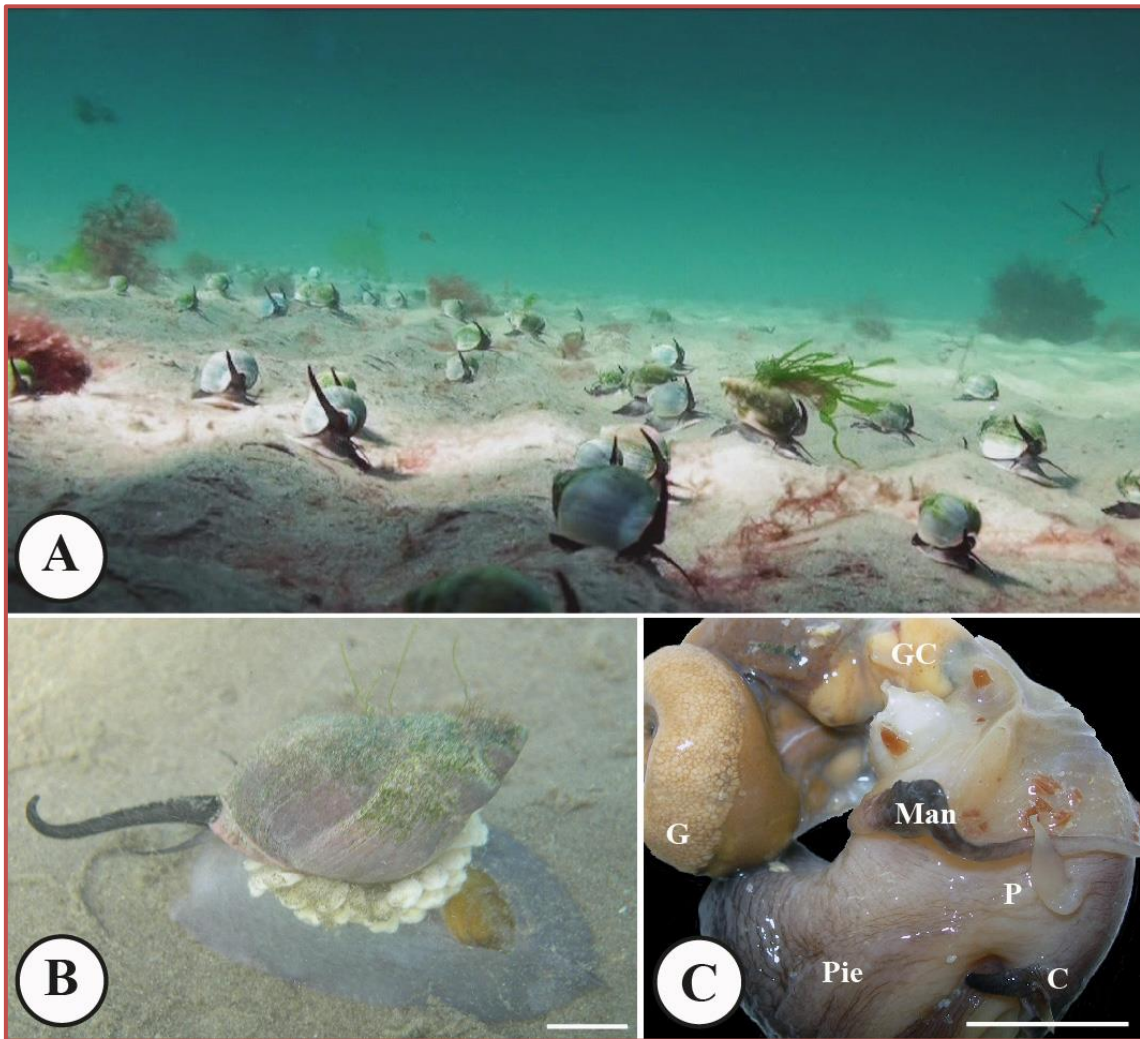


Figura 17. *Buccinanops globulosus*. (A) Especímenes en el campo dirigiéndose hacia una trampa con cebo. (B) Hembra con ovicápsulas sobre la concha. (C) Hembra con imposex. Abreviaturas: C: cabeza, G: gónada, GC: glándula de la cápsula, Man: manto, P: pene. Fotografía (B), Andrés Averbuj. Escala: 10mm.

Teniendo en cuenta que el uso de TBT fue mundialmente prohibido en 2008 (IMO 2002) y que la actividad anual de embarcaciones es variable en la zona, podrían verse cambios reflejados sobre los organismos en relación a la ocurrencia de imposex y otros efectos adversos para las especies. Conocer si existen tales variaciones es de relevancia para utilizar a estas especies como bioindicadores de contaminación y poder monitorear el área de Puerto Madryn y sus alrededores, ya que es un área utilizada tanto por embarcaciones comerciales, como por turistas y especies protegidas como aves marinas o la ballena franca austral.

Objetivos

- Estudiar la ocurrencia del fenómeno de imposex en golfo Nuevo luego de la prohibición mundial de TBT, utilizando tres especies de gasterópodos presentes en la

zona.

- Explorar si existen diferencias en la incidencia de imposex en relación a la época del año (estación fría-cálida).
- Evaluar la fecundidad en *Buccinanops globulosus*, considerada de sensibilidad media al TBT, en relación a la ocurrencia de imposex.

Materiales y métodos

Variaciones estacionales en los parámetros de imposex

Durante los años 2009 a 2012 se realizaron campañas de muestreo de gasterópodos (aproximadamente 4 campañas por cada año de muestreo) en las que se tomaron 5 ejemplares de la especie *Adelomelon ancilla* mediante buceo a una profundidad no mayor a 10m, aproximadamente 25 ejemplares por muestreo de la especie *Buccinanops globulosus* (mediante trampas con cebo o manualmente, en el intermareal durante las mareas bajas) y aproximadamente 25 ejemplares por muestreo de la especie *Trophon geversianus*. Esta última especie fue recolectada en el intermareal (durante las mareas bajas) y en el submareal (en algunos casos a una profundidad no mayor a 10m), como muestras independientes. Los organismos fueron recolectados según se detalla en los métodos generales de esta Tesis en diferentes meses del año y clasificadas como pertenecientes a la estación fría (mayo-noviembre) donde la temperatura promedio no supera los 14°C o a la estación cálida (diciembre-abril) donde la temperatura promedio es mayor a 14°C. Esta clasificación se basó en los valores promedio de temperatura superficial del agua para cada mes del año, medidos dentro del golfo Nuevo en el periodo 2007-2008 (Dellatorre *et al.* 2012) y la temperatura histórica registrada por el Servicio de Hidrografía Naval (SHN 2013).

Los sitios seleccionados para este estudio fueron el muelle Almirante Storni (MAS), el muelle Luis Piedra Buena (MLP), Punta Cuevas (PC), Punta Este (PE) y Cerro Avanzado (CA) (Figura 18). La elección de los mismos se basó principalmente en la actividad marítima y antrópica observada e información previa sobre las especies y la concentración de TBT en sedimentos, así como en los tipos de fondos en los que habita cada especie y la abundancia de los especímenes. Cabe aclarar que no todas las especies están presentes en cada sitio estudiado.

Todos los organismos fueron procesados según lo planteado en los métodos generales para el análisis de imposex (registro del % imposex, FPL, MPL y RPLI), además del registro de talla (largo total de la concha) y peso (relativo a la talla).

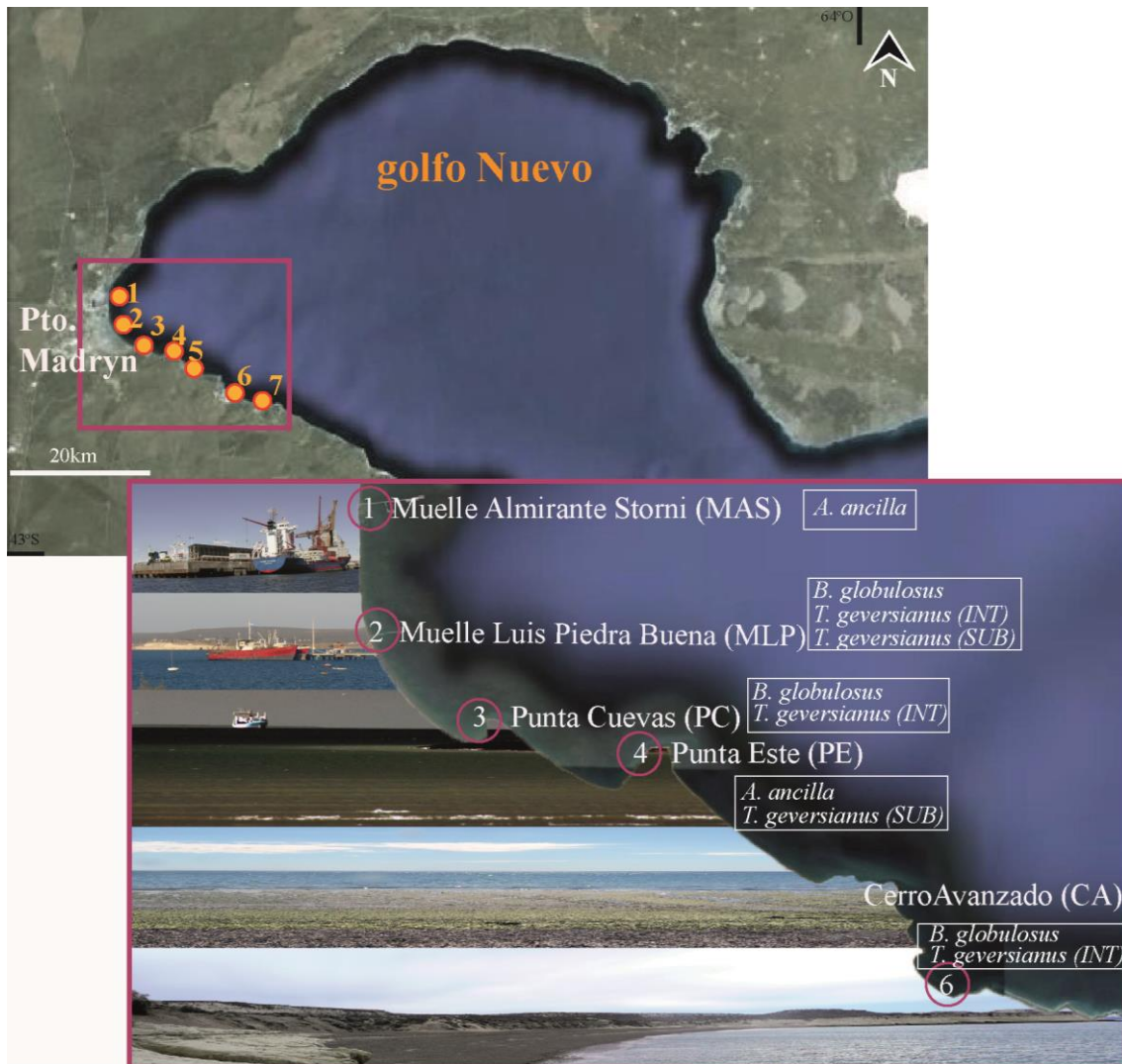


Figura 18. Sitios de estudio dentro de golfo Nuevo y especies recolectadas en cada uno de ellos.

Fecundidad en *Buccinanops globulosus*

Se estudió la fecundidad (definida en este trabajo como el número de descendientes por hembra) en la especie *B. globulosus* comparando dos sitios con incidencias de imposex máximas y mínimas (MLP y CA, respectivamente) reportadas previamente (Primost 2009). Esta especie fue elegida no sólo por su abundancia y sensibilidad, sino además porque las hembras poseen la particularidad de llevar sus ovicápsulas adheridas sobre la concha (Penchaszadeh 1971). En lo que respecta al análisis, se tiene la certeza de que las ovicápsulas y los embriones contabilizados fueron colocados por la hembra que los porta (Averbuj y Penchaszadeh 2010a). Una hembra con ovicápsulas que contienen embriones a punto de eclosionar puede identificarse rápidamente en el campo y los embriones eclosionantes pueden contabilizarse, permitiendo estimar así la fecundidad de esa hembra.

Se realizaron dos campañas de muestreo en 2012 (una por cada sitio), durante una

misma semana en el mes de febrero, época en donde las hembras llevan ovicápsulas con embriones a punto de eclosionar. Se realizó en cada sitio un buceo exhaustivo recorriendo una circunferencia de 50m de radio aproximadamente. Durante el buceo se recolectaron hembras con ovicápsulas, distinguibles a simple vista (Figura 19).

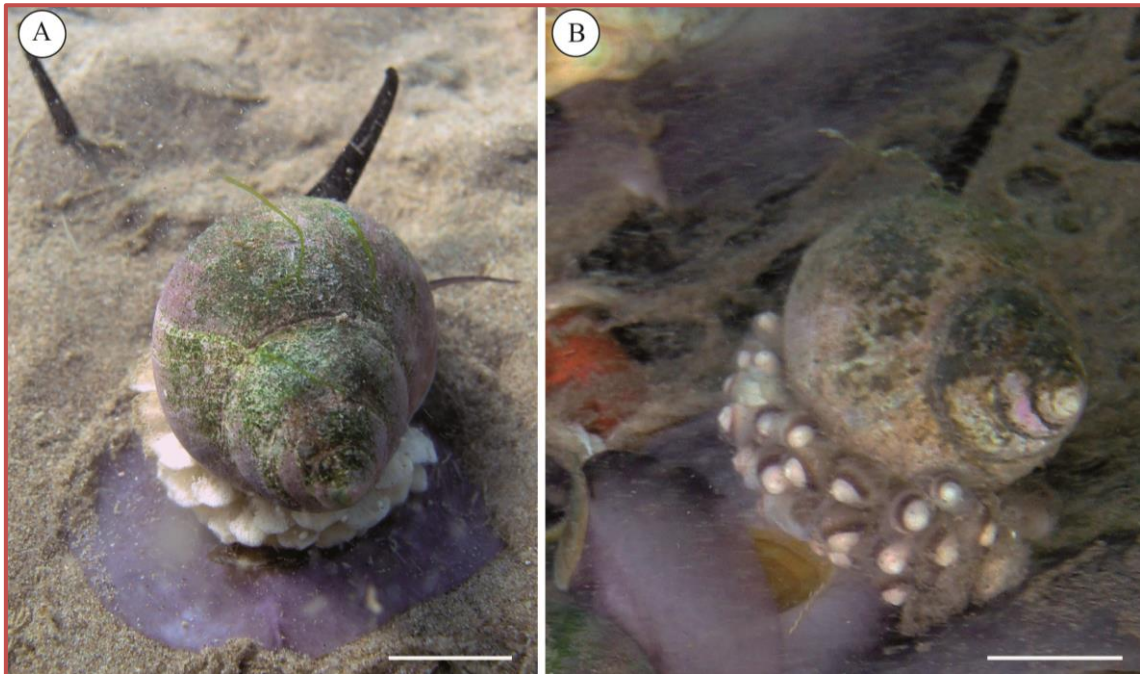


Figura 19. Hembra de *B. globulosus* con ovicápsulas. (A) Ovicápsulas en estadio temprano de desarrollo y (B) ovicápsulas con embriones en estadio eclosionante. Fotografías, Andrés Averbuj. Escala=10mm.

Para cada hembra se tomó la talla (largo total de la concha) así como el peso total y de las partes blandas relativos a la talla. Se determinó el número de ovicápsulas totales por hembra, como la suma de las ovicápsulas que contenían: a) embriones, b) huevos o embriones sin desarrollar y c) vacías o eclosionadas. De las ovicápsulas que contenían embriones, se evaluó la presencia de ovicápsulas con múltiples embriones y en el caso de encontrarse, se los contabilizó (Figura 20). Se tomó una submuestra de 10 embriones por cada hembra analizada, en los dos sitios, a los que se les midió la talla (largo total de la concha) bajo lupa estereoscópica.

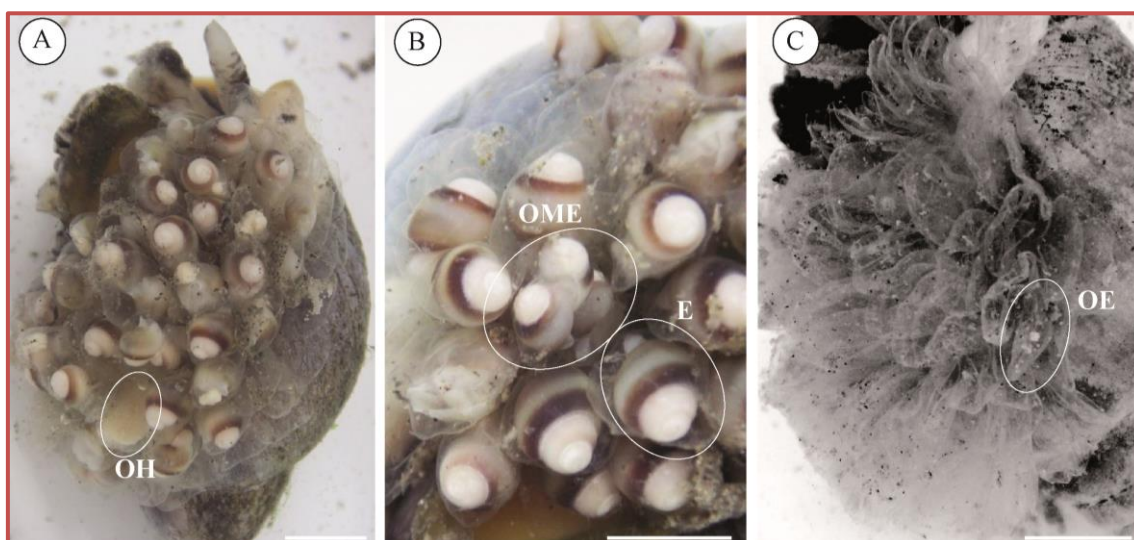


Figura 20. Hembras de la especie *B. globulosus* con ovicápsulas en estado avanzado de desarrollo adheridas a la concha (A). (B) Ovicápsulas con múltiples embriones en una puesta. (C) Puesta con todas sus ovicápsulas eclosionadas. Abreviaturas: E: embrión dentro de la ovicápsula, OE: ovicápsula eclosionada, OH: ovicápsula con huevos, OME: ovicápsula con múltiples embriones, Escala=10mm.

En el caso de registrarse hembras con presencia de capsulas con múltiples embriones, se estimó el promedio de embriones por cada ovicápsula a partir de la relación entre el total de embriones contabilizados y el número de ovicápsulas con embriones en cada hembra. Debido a que algunas puestas se encontraban en un periodo avanzado y algunos embriones ya habían emergido de las mismas dejando ovicápsulas eclosionadas, se estimó el número total de embriones por hembra, asignándole a las ovicápsulas eclosionadas en cada puesta el valor promedio calculado. Este dato fue obtenido sin tomar en cuenta las ovicápsulas que contenían solamente huevos nutritivos. Una vez procesada cada puesta, se procedió al análisis de los parámetros de imposex en las hembras según se detalla en los métodos generales.

Análisis de datos

Para realizar el análisis estadístico de los datos obtenidos en cada capítulo se validaron los supuestos de homocedacia (prueba de Levene $p < 0,05$) y normalidad (prueba Shapiro-Wilk $p < 0,05$). Ante la ausencia de normalidad, se utilizó la transformación logaritmo natural (\ln) para la variable respuesta. Las pruebas paramétricas utilizadas fueron *t-Student* ($p < 0,05$) para comparaciones entre dos medias o *ANOVA de un factor* ($p < 0,05$) y contrastes de *Tukey* para comparaciones entre más de dos medias. En el caso de no cumplir con los supuestos mencionados, se utilizaron las pruebas no paramétricas de *Mann-Whitney* ($p < 0,05$) para comparaciones entre dos variables y *Kruskal Wallis* ($p < 0,05$) con contrastes a *posteriori* de *Dunn* para

comparaciones entre más de 2 variables. En todos los casos se utilizó el software XLStat 2012[®]. En los resultados de las comparaciones estadísticas se informa la prueba utilizada, el estadístico, la probabilidad asociada al estadístico, los grados de libertad (cuando correspondiese) y el número total de observaciones.

Para cada especie en un mismo sitio, se comparó la talla entre machos y hembras, el peso total relativo a la talla (sin discriminar sexos), así como el largo del pene de machos y hembras con imposex entre estaciones fría y cálida. Entre los diferentes sitios, se comparó la talla, el peso total y el largo del pene en hembras con imposex.

En cuanto a los parámetros de fecundidad en *B. globulosus*, mediante un análisis de regresión lineal se determinó la relación entre la talla de las hembras con ovicápsulas y el número de ovicápsulas; la talla de las hembras con ovicápsulas y la talla de los embriones; el peso de las hembras con ovicápsulas y la talla de los embriones. Estas comparaciones se realizaron en cada sitio (MLP y CA). Entre los sitios MLP y CA se compararon, la talla y el peso de las hembras con ovicápsulas. Se realizó además en el sitio MLP la comparación entre el largo del pene en las hembras (con imposex) que tenían ovicápsulas y las que no tenían. Para realizar esta última comparación se consideraron solamente las hembras sin ovicápsulas correspondientes al mismo mes (hembras correspondientes al muestreo estacional de 2012) que las recolectadas para el análisis de fecundidad.

Resultados

Variaciones estacionales en los parámetros de imposex

-Adelomelon ancilla-

Se analizaron en total 85 especímenes, 46 correspondientes al muelle Almirante Storni (MAS) y 39 correspondientes a Punta Este (PE), en ambas estaciones.

En el sitio MAS no se observaron diferencias significativas en la talla entre sexos (prueba *t de Student*, $p=0,439$, $Gl=44$, $N=46$) y tampoco en el peso total/talla entre las estaciones (fría y cálida) sin discriminar sexos, (prueba *t de Student*, $p=0,556$, $Gl=44$, $N=46$).

En el sitio Punta Este (PE) se observó el mismo patrón de resultados, siendo no significativa la diferencia en talla entre sexos (prueba *t de Student*, $p=0,603$, $Gl=37$, $N=39$) y en peso total/talla entre estaciones fría y cálida (prueba *Mann Whitney U*=146,000, $p=0,508$, $N=39$).

Al no detectarse diferencias significativas en cada sitio, se realizaron

comparaciones entre los sitios MAS vs. PE, sin discriminar los sexos, y tampoco se obtuvieron diferencias significativas (talla: prueba *Mann Whitney* $U=752,000$, $p=0,202$, $N=85$; peso total/talla: prueba *t de Student*, $p=0,828$, $Gl=83$, $N=85$), Figura 21.

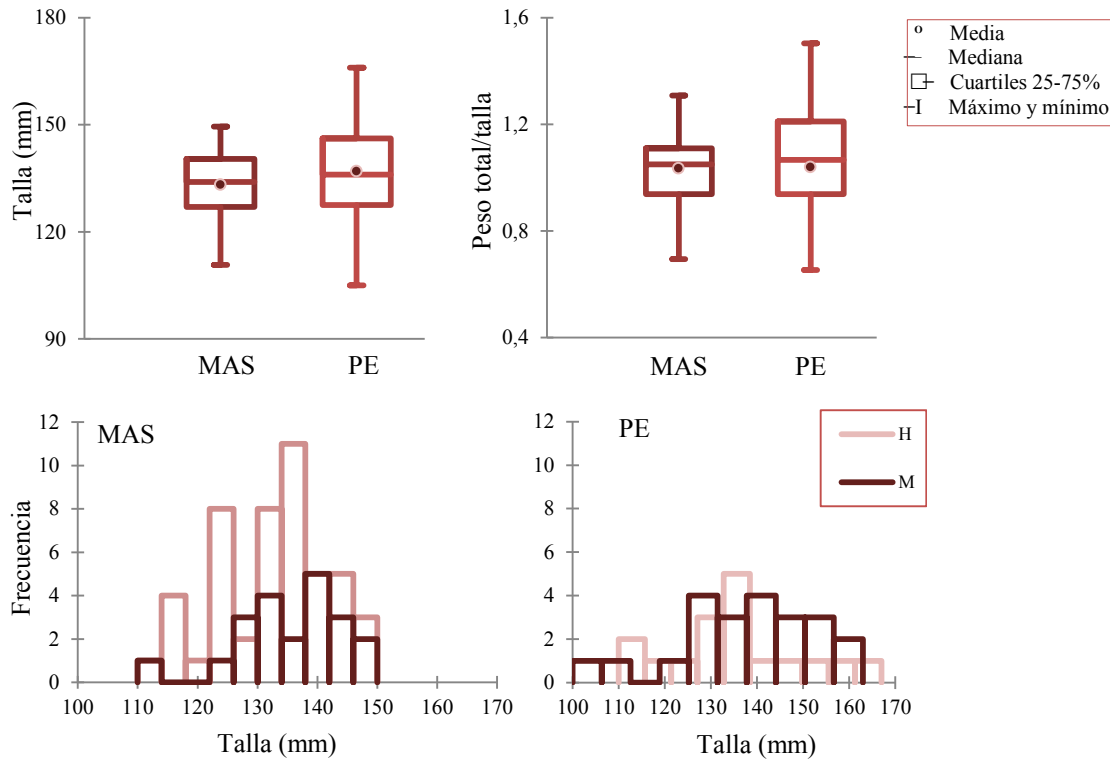


Figura 21. Estadística descriptiva para las variables talla y peso total/talla (arriba). Distribución de tallas de machos (M) y hembras (H) de *A. ancilla* en los 2 sitios de estudio (abajo). MAS: Muelle Almirante Storni; PE: Punta Este.

En un mismo sitio, no se observaron diferencias entre el largo del pene de las hembras con imposex ni tampoco en el largo del pene de los machos entre las estaciones fría y cálida (Largo pene hembras-MAS: prueba *t student*, $p=0,105$, $Gl=13$, $N=15$; largo pene machos-MAS: prueba *Mann Whitney* $U=118,000$, $p=0,983$, $N=31$ y largo pene machos-PE: prueba *Mann Whitney* $U=70,500$, $p=0,215$, $N=22$), Figura 22.

No se comparó estadísticamente el largo del pene de las hembras en PE entre estaciones fría y cálida debido a la poca ocurrencia de hembras con imposex en las muestras de cada estación. En lo que respecta a esta variable (largo del pene de las hembras), como no se pudo corroborar si existieron o no diferencias estacionales, no se agruparon los datos de un mismo sitio (PE) para ser comparados con el otro sitio (MAS).

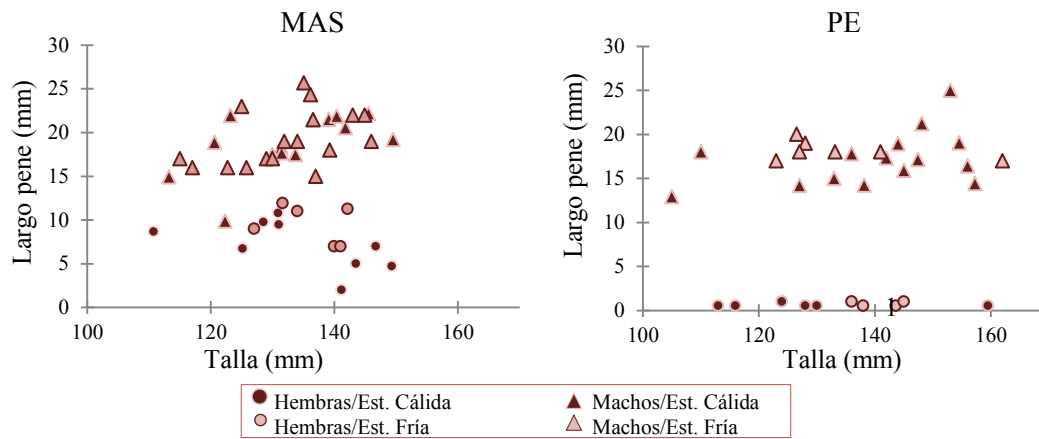


Figura 22. Largo del pene de machos y hembras con imposex de *A. ancilla* en función de la talla para la estación fría y cálida en los sitios de estudio. Abreviaturas: MAS: Muelle Almirante Storni, PE: Punta Este.

De los índices de imposex calculados, el RPLI, % de imposex y FPL fueron mayores en el sitio MAS (Tabla 4).

Tabla 4. Índices de imposex en *A. ancilla*. Abreviaturas: FPL: promedio del largo del pene de las hembras con imposex, MPL: promedio del largo del pene de los machos, RPLI: índice relativo del largo del pene entre machos y hembras con imposex.

Sitio	% imposex	FPL (mm) y número de hembras (n)	MPL (mm) y número de machos (n)	RPLI
Muelle Almirante Storni (MAS)	100	8,08 (15)	19,06 (31)	42,40
Punta Este (PE)	70,58	0,66 (12)	17,47 (22)	3,81

A lo largo de todo el periodo de estudio se registró en el sitio MAS en una ocasión, una hembra con dos penes y dos hembras con desarrollo del vaso deferente hasta donde se ubica la vagina, pero sin ocluirlo (Figura 23). No se observaron excrecencias en el pene de los machos ni otras anomalías en el tracto reproductivo masculino en ningún sitio.

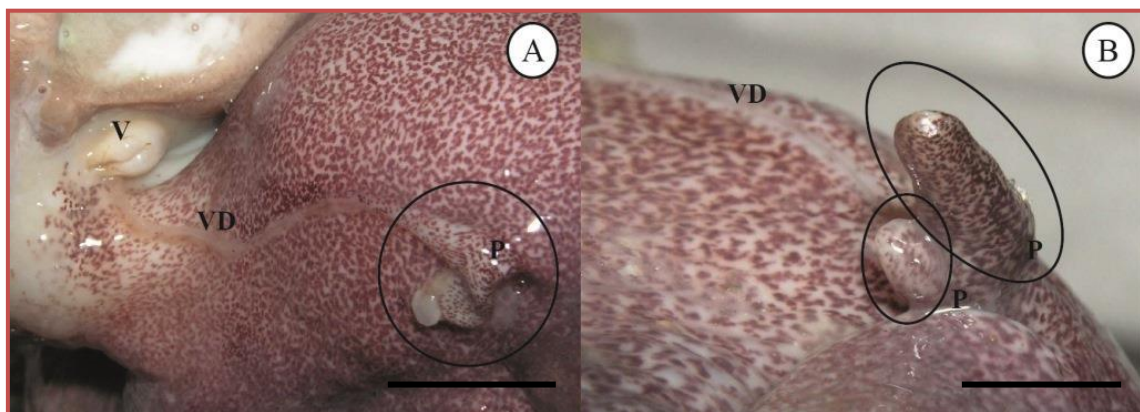


Figura 23. Hembra de *A. ancilla* con desarrollo de imposex. (A) El desarrollo del vaso deferente llega hasta la vagina, sin ocluirlo. (B) Presencia de 2 penes en una hembra con imposex. Abreviaturas: P: pene, V: vagina, VD: vaso deferente. Escala=10mm.

-Trophon geversianus

Hábitat submareal

Se analizaron en total 411 especímenes, 253 correspondientes al Muelle Luis Piedra Buena (MLP) y 158 correspondientes a Punta Este (PE), en ambas estaciones. En el sitio MLP, se observaron diferencias significativas en talla entre sexos (prueba *Mann Whitney* $U=6940,500$, $p=0,002$, $N=225$), siendo mayores las hembras. No se observaron diferencias significativas entre las estaciones fría y cálida en el peso total/talla sin distinción de sexos (prueba *Mann Whitney* $U=5978,000$, $p=0,054$, $N=217$). En el sitio PE, no se observaron diferencias en la talla (prueba *Mann Whitney* $U=2630,000$, $p=0,446$, $N=158$) entre sexos ni en el peso total/talla (prueba *Mann Whitney* $U=2299,500$, $p=0,054$, $N=154$).

Se agruparon todos los datos de talla y peso total para realizar comparaciones entre sitios MLP vs. PE. Estas comparaciones mostraron diferencias significativas en la talla (prueba *Mann Whitney* $p<0,0001$, $U=23772,500$, $N=383$) y el peso total/talla (prueba *Mann Whitney* $p=0,004$, $U=8090,500$, $N=278$) siendo en los dos casos mayores los valores para el sitio MLP (Figura 24).

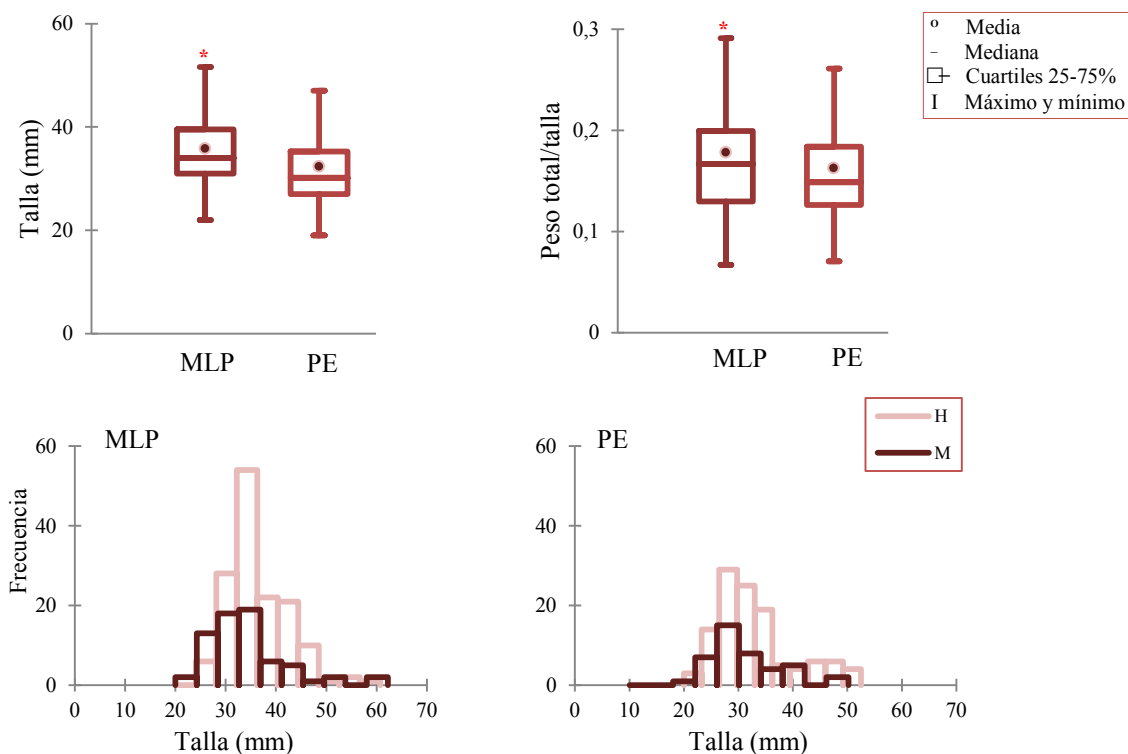


Figura 24. Estadística descriptiva para las variables talla y peso total/talla (arriba). Distribución de la talla de machos (M) y hembras (H) de *T. geversianus* de hábitat submareal (abajo).

Abreviaturas: MLP: Muelle Luis Piedra Buena, PE: Punta Este. El asterisco (*) indica diferencias estadísticas significativas entre las muestras.

El largo del pene de los machos no varió entre las estaciones fría y cálida (MLP: Prueba de *Mann-Whitney* $U=1171,000$, $p=0,236$, $N=94$ y PE: Prueba de *Mann-Whitney* $U=266,000$, $p=0,052$, $N=42$). El largo del pene de las hembras con imposex no pudo ser estadísticamente comparado entre sitios debido a que se registraron hembras con imposex sólo en casos aislados. Como consecuencia de ello, tampoco pudieron calcularse los índices que involucran esta variable como son el FPL y el RPLI. En el sitio MLP se observaron tres hembras con imposex (longitud del pene de 5; 5 y 5,5 mm) (1,88% de imposex), Tabla 5.

Tabla 5. Índices de imposex en *T. geversianus* (hábitat submareal). Abreviaturas: FPL: promedio del largo del pene de las hembras con imposex, MPL: promedio del largo del pene de los machos, RPLI: índice relativo del largo del pene entre machos y hembras con imposex.

Sitio	% imposex y número de hembras con imposex (n)	FPL(mm)	MPL(mm) y número de machos (n)	RPLI
Muelle Luis Piedra Buena (MLP)	1,88 (3)	-	12,33 (94)	-
Punta Este (PE)	0	-	12,68 (42)	-

Hábitat intermareal

Se analizaron en total 560 especímenes, 140 correspondientes al Muelle Luis Piedra Buena (MLP), 215 correspondientes a Punta Cuevas (PC) y 205 correspondientes a Cerro Avanzado (CA), para ambas estaciones.

En cada sitio se observó el mismo patrón de diferencias en la talla entre hembras y machos y en los tres casos, las hembras fueron mayores que los machos (talla MLP: prueba *t de Student*, $p<0,0001$, $Gf=133$, $N=133$; talla PC: prueba *t de Student*, $p<0,0001$, $Gf=213$, $N=215$ y CA: prueba *t de Student*, $p<0,0001$, $Gf=203$, $N=205$).

Se observaron diferencias significativas entre las estaciones fría y cálida en el peso total/talla en los sitios MLP y PC (MLP: prueba de *Mann-Whitney* $U=2030,500$, $p=0,031$, $N=140$ y PC: prueba *t de Student*, $p=0,0020$, $Gf=212$, $N=214$) siendo mayores los valores en la estación cálida.

Las comparaciones entre los sitios (MLP vs. PC vs. CA) detectaron diferencias significativas en talla (prueba de *Kruskal-Wallis* $K=163,226$, $p<0,0001$, $Gf=2$, $N=560$) y peso total/talla (prueba de *Kruskal-Wallis* $K=147,822$, $p<0,0001$, $Gf=2$, $N=559$). En los dos casos, los valores promedio fueron significativamente mayores en el sitio MLP (Figura 25).

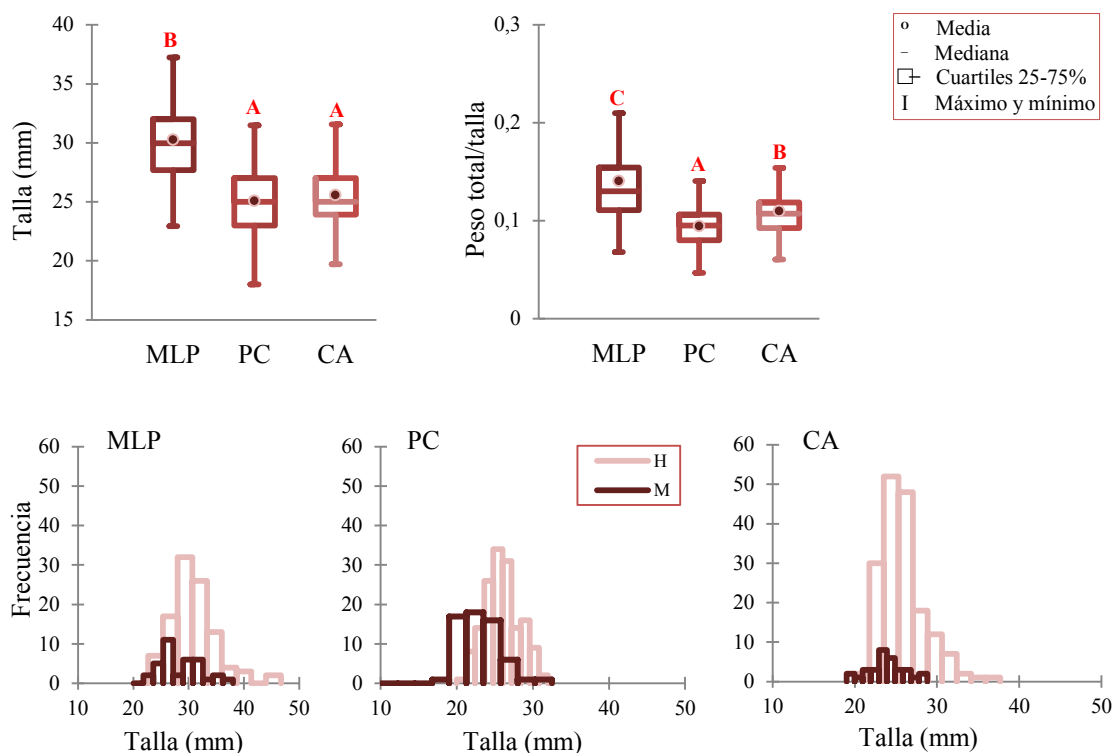


Figura 25. Estadística descriptiva para las variables talla y peso total/talla (arriba). Distribución de tallas de machos (M) y hembras (H) de *T. geversianus* de hábitat intermareal (abajo). Abreviaturas: CA: Cerro Avanzado, MLP: Muelle Luis Piedra Buena, PC: Punta Cuevas. Las letras indican grupos de asociación entre las medias de las variables según los contrastes *a posteriori*.

Los índices de imposex FPL y RPLI no fueron calculados debido a que se registraron hembras con imposex sólo en casos aislados (Tabla 6). En el sitio MLP se registró una hembra con imposex y longitud del pene de 3,56mm y en el sitio PC una hembra con imposex y largo de pene de 2,93mm (Figura 26).

Tabla 6. Índices de imposex en *T. geversianus* (hábitat intermareal). Abreviaturas: FPL: promedio del largo del pene de las hembras con imposex, MPL: promedio del largo del pene de los machos, RPLI: índice relativo del largo del pene entre machos y hembras con imposex.

Sitio	% imposex y número de hembras con imposex (n)	FPL(mm)	MPL(mm) y número de machos(n)	RPLI
Muelle Luis Piedra Buena (MLP)	0,96 (1)	-	12,37 (36)	-
Punta Cuevas (PC)	0,62 (1)	-	9,56 (60)	-
Cerro Avanzado (CA)	0	-	10,40 (33)	-

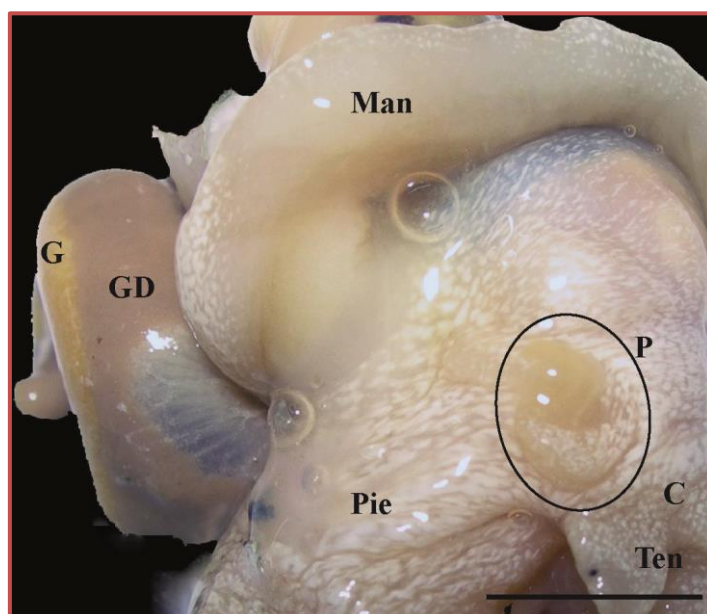


Figura 26. Hembra de *T. geversianus* con desarrollo de imposex en Punta Cuevas. Abreviaturas: C: cabeza, G: gónada, GD: glándula digestiva, Man: manto, P: pene, Ten: tentáculo derecho. Escala=5mm.

-*Buccinanops globulosus*-

Se analizaron en total 830 especímenes, 273 del sitio MLP, 309 del sitio PC y 248 del sitio CA.

En el sitio MLP, se observaron diferencias significativas en la talla entre sexos (prueba de *Mann-Whitney* $U=1895,000$, $p<0,0001$, $N=273$), siendo mayor la media de la talla en las hembras, sin embargo la ocurrencia de machos en las muestras analizadas fue baja (8 individuos macho de 273 especímenes analizados). Se observaron diferencias entre las estaciones fría y cálida en el peso total/talla sin distinción de sexos (prueba *t de Student*, $p<0,0001$, $Gf=268$, $N=270$), siendo mayor la media del peso total/talla en la estación fría. En el sitio PC, se observaron las mismas diferencias que en MLP en la talla entre sexos (prueba de *Mann-Whitney* $U=12591,000$, $p<0,0001$, $N=309$), siendo mayor la media de la talla en las hembras. El mismo patrón de significancia estadística fue obtenido para el sitio CA donde las hembras presentaron tallas mayores que los machos (prueba de *Mann-Whitney* $U=2897,000$, $p<0,0001$, $N=248$), aunque con una baja ocurrencia de machos en las muestras analizadas (13 machos de 248 especímenes analizados) y se observaron diferencias en el peso total/talla de los organismos entre las estaciones fría y cálida (prueba de *Mann-Whitney* $U=3005,500$, $p<0,0001$, $N=248$) siendo mayor la media del peso total/talla en la estación fría.

A pesar de las diferencias entre machos y hembras en cuanto a la talla, las

comparaciones entre los sitios (MLP vs. PC vs. CA) agrupando los dos sexos, detectaron diferencias significativas en la variable talla (prueba de *Kruskal-Wallis* $K=398,092$, $p<0,0001$, $Gf=2$, $N=828$) y peso total/talla sin distinción de sexos y estaciones del año (prueba de *Kruskal-Wallis* $K=398,042$, $p<0,0001$, $Gf=2$, $N=822$). En los dos casos, el sitio PC presentó los menores valores promedio (Figura 27).

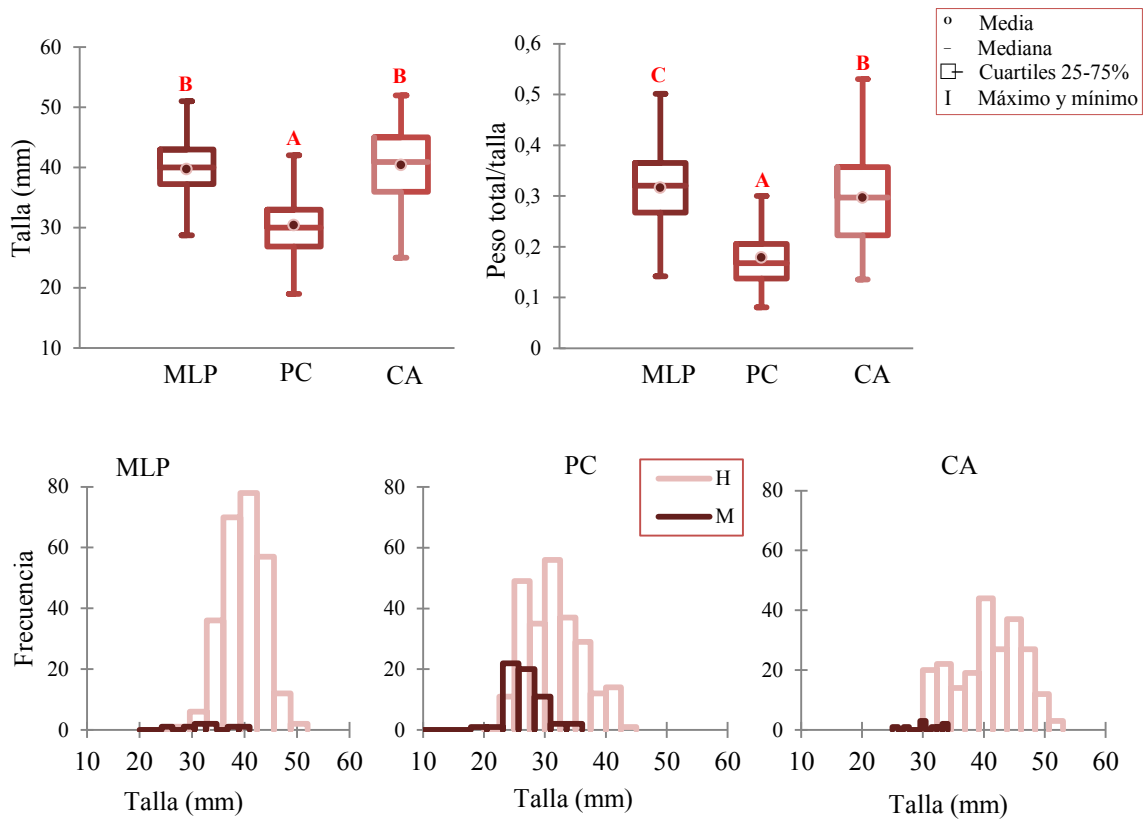


Figura 27. Estadística descriptiva para las variables talla y peso total/talla (arriba). Frecuencia de tallas en hembras (H) y machos (M) de la especie *B. globulosus* (abajo). Abreviaturas: CA: Cerro Avanzado, MLP: Muelle Luis Piedra Buena, PC: Punta Cuevas. Las letras indican grupos de asociación según los contrastes *a posteriori*.

No se encontraron diferencias significativas entre las estaciones fría y cálida en el largo del pene de las hembras con imposex (MLP: prueba de *Mann-Whitney* $U=9859,500$, $p=0,070$, $N=265$ y PC: prueba de *Mann-Whitney* $U=6496,000$, $p=0,214$, $N=224$), (Figura 28). En el caso del largo del pene de los machos, estas diferencias no fueron analizadas estadísticamente debido a la baja ocurrencia de machos en las muestras de los sitios MLP y CA. Las hembras del sitio CA no fueron analizadas en términos de imposex debido a que la ocurrencia del fenómeno fue mínima, 7 hembras con imposex (2,97%) de las cuales 6 presentaron sólo un vaso deferente y una de ellas un primordio de pene rudimentario de 2,3mm.

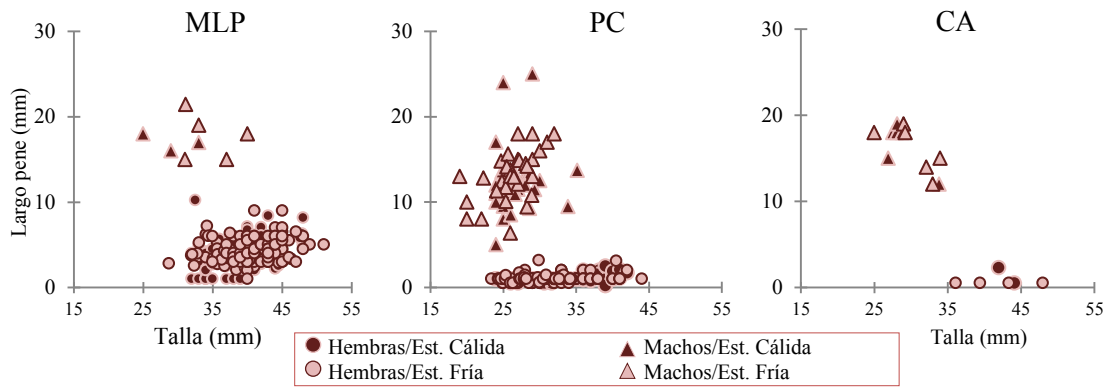


Figura 28. Largo del pene de machos y hembras con imposex de *B. globulosus* para la estación fría y cálida en cada sitio. Abreviaturas: CA: Cerro Avanzado, MLP: Muelle Luis Piedra Buena, PC: Punta Cuevas.

Entre los sitios las comparaciones en el largo del pene de las hembras (MLP vs. PC) resultaron significativamente mayores en MLP (prueba de *Mann-Whitney* $U=58016,000$, $p<0,0001$, $N=489$). Los índices de imposex calculados (% imposex, FPL y RPLI) resultaron mayores en el sitio MLP en comparación con PC (Tabla 7).

Tabla 7. Índices de imposex en *B. globulosus*. Abreviaturas: FPL: promedio del largo del pene de las hembras con imposex, MPL: promedio del largo del pene de los machos, RPLI: índice relativo del largo del pene entre machos y hembras con imposex.

Sitio	% imposex	FPL(mm) y número de hembras con imposex (n)	MPL (mm) y número de machos (n)	RPLI
Muelle Luis Piedra Buena (MLP)	100	4,26 (265)	17,43(8)	24,44
Punta Cuevas (PC)	91,05	1,12 (224)	12,70(63)	8,81
Cerro Avanzado (CA)	2,97	-	15,12(13)	-

Durante el análisis de estos especímenes, se observó en una ocasión una hembra con una excrecencia o prolongación del pene, hembras con desarrollo de penes que no presentaron formas semejantes al pene de los machos, y en hembras de CA, un primordio de pene incipiente (Figura 29). Asimismo, durante el periodo de muestreo y utilizando la técnica de captura mediante trampas cebadas sólo en casos aislados se capturaron hembras con ovicápsulas.

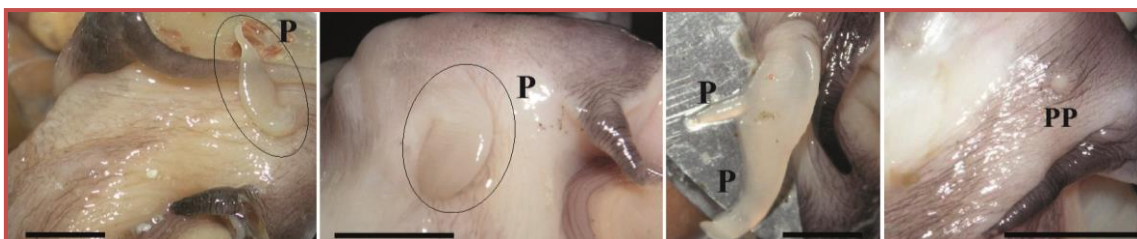


Figura 29. Diferentes formas de los penes desarrollados en hembras de *B. globulosus* con imposex. Abreviaturas: P: pene, PP: primordio de pene. Escala=5mm.

Fecundidad en Buccinanops globulosus

Se analizaron en total 43 hembras con ovicápsulas, 22 pertenecientes al muelle Luis Piedra Buena (MLP) y 21 pertenecientes a Cerro Avanzado (CA).

Se detectaron diferencias significativas en la talla de las hembras con ovicápsulas entre la zona del muelle (MLP) y la zona con bajo tráfico marítimo (CA) (prueba de *Mann-Whitney* $U=118,500$, $p=0,011$, $N=42$), pero estas diferencias no fueron significativas en la variable peso total/talla (prueba de *Mann-Whitney* $U=190,000$, $p=0,611$, $N=41$). Se discriminó el peso total en peso de la concha y peso de las partes blandas (respecto de la talla) encontrándose para este último diferencias significativas (prueba de *Mann-Whitney* $U=96,000$, $p=0,004$, $N=41$). En los tres casos fueron mayores los valores medios en el sitio CA (Figura 30).

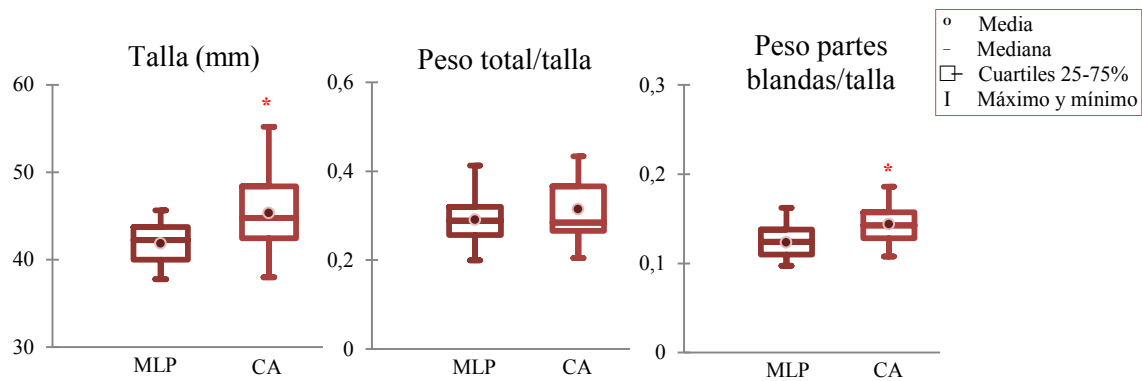


Figura 30. Estadística descriptiva de las variables talla y peso para las hembras de *B. globulosus* con ovicápsulas en los dos sitios de estudio. Abreviaturas: CA: Cerro Avanzado, MLP: Muelle Luis Piedra Buena. El asterisco (*) indica diferencias estadísticamente significativas entre los sitios.

La talla mínima de una hembra con ovicápsulas fue de 37,78mm en el sitio MLP y de 37,99mm en CA. No se registraron diferencias significativas entre los sitios (MLP vs. CA) en el número total de ovicápsulas por hembra (prueba *t de Student*, $p=0,286$, $G1=41$, $N=43$), (Tabla 8). Tampoco se registraron diferencias significativas en el número de embriones por hembra (prueba de *Mann-Whitney* $U=146,000$, $p=0,201$, $N=31$), esta última comparación se realizó con aquellas hembras que tuvieran más de 10 embriones en toda la puesta. La estimación del número de embriones por hembra varió entre 34 a 105 embriones en el sitio MLP y entre 37 a 58 embriones en CA. Se detectaron diferencias significativas al comparar el número promedio de embriones por ovicápsula (prueba de *Mann-Whitney* $U=156,000$, $p=0,041$, $N=31$), mayor en MLP, así como en la talla de los embriones (prueba *t de Student*, $p=0,012$, $G1=32$, $N=34$). Este último resultado se realizó sobre un total de 34 hembras con ovicápsulas, 18 de MLP (se midió la talla de 180 embriones) y 16 de CA (se midió la talla de 160 embriones) siendo

la media de la talla de los embriones de CA mayor que la de los embriones de MLP (Tabla 8).

Tabla 8. Parámetros de fecundidad (valores promedio± desvío estándar) en hembras de *B. globulosus*. Abreviaturas: CA: Cerro Avanzado, MLP: Muelle Luis Piedra Buena. El asterisco (*) indica significancia estadística para esa variable entre los sitios.

Sitio	Ovicápsulas totales y número de hembras (n)	Promedio de embriones por ovicápsula	Promedio de embriones por hembra	Talla embriones (mm) y número de embriones (n)
MLP	47,89±2,6 (22)	1,19±0,29*	56,72±4,3	4,96±0,05 (180)
CA	46,5±1,8 (21)	1,04±0,05	48,19±1,96	5,48±0,07 (160)*

No se observó un buen ajuste en la relación lineal entre la talla de las hembras y el número de ovicápsulas por hembra para ninguno de los dos sitios ($F=0,481$, $p=0,496$, $R^2=0,023$, $G1=1$, $N=22$ en MLP y $F=0,171$, $p=0,684$, $R^2=0,009$, $G1=1$, $N=21$ en CA). Tampoco se observó un buen ajuste en: a) la relación lineal entre la talla de las hembras con ovicápsulas y la talla de los embriones ($F<0,0001$, $p=0,989$, $R^2=1,3352E^{-05}$, $G1=1$, $N=18$ en MLP y $F=13,168$, $p=0,003$, $R^2=0,485$, $G1=1$, $N=16$ en CA), b) el peso de las partes blandas de las hembras con ovicápsulas y la talla de los embriones ($F=0,445$, $p=0,514$, $R^2=0,027$, $G1=1$, $N=18$ en MLP y $F=10,287$, $p=0,008$, $R^2=0,462$, $G1=1$, $N=16$ en CA). Del total de ovicápsulas contabilizadas en cada sitio (741 ovicápsulas en MLP y 352 ovicápsulas en CA), se registró una mayor proporción de ovicápsulas con más de un embrión en el sitio MLP (16%) en comparación con el sitio CA (3,4%).

En relación a los parámetros de imposex (% imposex y FPL) medidos sobre las hembras con ovicápsulas, se registró en el sitio MLP un 95% de ocurrencia de imposex, observándose por primera vez la presencia de hembras sin pene o vaso deferente en el sitio. El FPL fue de 1,62mm. Estos valores no pudieron ser obtenidos para las hembras del sitio CA debido a la ausencia de hembras con imposex en las muestras analizadas. Al comparar los parámetros de imposex entre hembras sin ovicápsulas (resultados Tabla 7) y las hembras con ovicápsulas en el sitio MLP, se obtuvieron diferencias significativas en el largo del pene ($p<0,0001$). Las hembras sin ovicápsulas presentaron mayores valores en la longitud del pene (Figura 31).

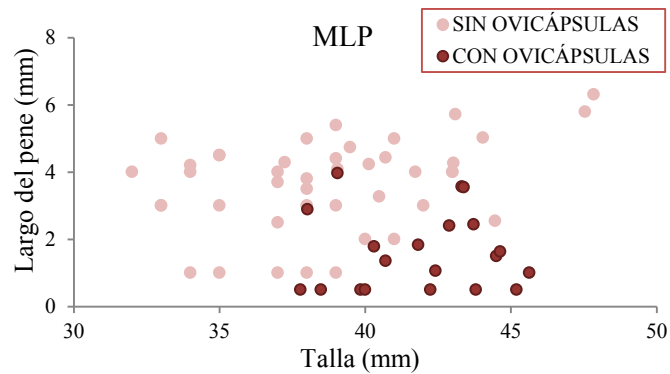


Figura 31. Distribución del largo del pene en relación a la talla en hembras de *B. globulosus* con y sin ovicápsulas. Abreviaturas: MLP: Muelle Luis Piedra Buena.

Discusión

Las diferencias detectadas en las tallas entre machos y hembras han sido concordantes con lo reportado por otros autores para la especie *Buccinanops globulosus* (Narvarte 2006; Avaca *et al.* 2012) y *Trophon geversianus* (Cumplido *et al.* 2010), en estudios previos. En los dos casos las hembras evidenciaron tallas mayores que los machos. En el caso de la especie *Adelomelon ancilla*, estas diferencias no fueron observadas y esto también coincidió con lo reportado en un estudio previo (Zabala 2012). Si se consideran todos los individuos sin distinción de sexos, se observó una marcada disminución en la talla de los individuos de la especie *B. globulosus* del sitio Punta Cuevas en comparación con MLP y CA, siendo todos los individuos maduros sexualmente. De acuerdo a observaciones realizadas en la zona de estudio y a las diferencias obtenidas en el presente trabajo, las diferencias en la talla de los organismos del sitio PC podrían estar asociadas al efecto antrópico debido al uso turístico de ese sitio. Allí se ha observado una elevada tasa de extracción de especímenes de gasterópodos de esta especie con fines recreativos, ejerciendo una presión por extracción que no se ha observado en los otros sitios. Esta presión podría ocasionar como respuesta una disminución en la edad a la cual los organismos alcanzan la madurez sexual y esto verse reflejado en las tallas. Este tipo de tendencia a nivel poblacional ha sido observado en el bivalvo *Donax hanleyanus*, que sufre el impacto del hombre durante los meses de mayor actividad turística en playas utilizadas con fines recreativos al sur de la provincia de Buenos Aires (Herrmann *et al.* 2009). Aunque en el presente trabajo no se realizaron estudios específicos de estructura poblacional ni se tiene una cifra certera sobre cuantos individuos son extraídos, un patrón similar de variación en la talla podría estar ocurriendo en PC.

Las diferencias encontradas en este estudio en cuanto al peso total de los

organismos en algunos sitios para las especies *T. geversianus* (intermareal) y *B. globulosus*, entre estaciones cálida y fría, podrían estar en relación con el ciclo reproductivo y la liberación de gametas que difiere entre especies y entre sexos, tal y como fue observado en estudios con las mismas especies o pertenecientes a la misma familia (Penchaszadeh *et al.* 2009; Averbuj *et al.* 2010; Cumplido *et al.* 2010; Zabala 2012). Son muchos los factores que pueden afectar el peso de los organismos y aunque se han reportado fluctuaciones que podrían estar asociadas a la presencia de contaminantes en la zona (Bigatti y Carranza 2007; Márquez *et al.* 2011), en el presente trabajo no se observó un patrón definido relacionado con el desarrollo de imposex. Para poder establecer comparaciones que involucren la variable peso de los organismos, se deberían tomar datos mensuales y evaluar ambos sexos por separado, además de registrar variables como la disponibilidad y tipo de presas en cada sitio.

En relación a los parámetros de imposex, no se detectaron variaciones en el largo del pene de las hembras en poblaciones de gasterópodos afectadas por imposex en las estaciones fría y cálida. Esto favorecería la utilización de especies como *A. ancilla* y *B. globulosus* en estudios de monitoreo en cualquier periodo del año. Como se expresó en la introducción de este capítulo, algunas especies presentan una variación estacional en el largo del pene, principalmente de los machos, que afecta el cálculo de los índices de imposex como el RPLI (Gibbs y Bryan 1987; Oehlmann *et al.* 1998b; Vasconcelos *et al.* 2006; Van den Broeck *et al.* 2007; Galante-Oliveira *et al.* 2010). En este trabajo, se han calculado cuatro índices, dos de los cuales involucran solamente a las hembras (% imposex y FPL), uno que contempla solamente a los machos (MPL) y uno que involucra a machos y hembras (RPLI); En ninguno de los casos se obtuvieron diferencias estacionales. Lo mismo ocurrió con especies de otras partes del mundo (como *Hexaplex trunculus* y *Thais clavigera*), muy utilizadas como biomonitores, en las que no se registran cambios estacionales en los índices medidos sobre las hembras (Li 2005; Chan *et al.* 2008; Lahbib *et al.* 2009). Esto permite obtener una estimación confiable al utilizar las estructuras anatómicas como variable indicadora (Vasconcelos *et al.* 2011).

En las diferentes poblaciones de la especie *T. geversianus* a lo largo de un periodo de tiempo extenso (4 años) se registraron sólo casos aislados de desarrollo de imposex en las hembras (1,88% en MPL y 0,62% en PC), en sitios donde otra especie como *B. globulosus* presentó valores de los mismos índices de 100% y FPL de hasta 4,26mm. Los integrantes de esta familia de gasterópodos (Muricidae) han sido los más utilizados

en estudios de imposex debido a su gran sensibilidad a la presencia de TBT en el medio (Gibbs y Bryan 1986; Oehlmann *et al.* 1992; Deutsch y Brick 1993). Sin embargo, aunque representan la minoría de los casos, algunos estudios no han registrado la incidencia de imposex (ver lista de especies en Titley-O'Neal *et al.* 2011). Los resultados observados concuerdan con lo reportado por otros autores en estudios previos (Bigatti *et al.* 2009; Primost 2009) en relación a la baja respuesta de los organismos ante la presencia de TBT en el medio. Esta baja sensibilidad podría estar relacionada con el mecanismo de acción del compuesto una vez que ingresa al organismo y la capacidad de metabolizar el contaminante, minimizando su toxicidad (Meador *et al.* 1993; Escher *et al.* 2010). Por otro lado, *T. geversianus* habita sobre fondos duros, se alimenta de especies de bivalvos (familia Mytilidae) y experimenta poco contacto con el sedimento que lo rodea, por lo que el TBT estaría menos disponible para su incorporación por contacto directo. A su vez, los gasterópodos de hábitat submareal, a pesar del escaso registro de hembras con imposex, presentaron mayores valores de los índices en comparación con los de hábitat intermareal y esto podría estar relacionado a la biodisponibilidad y el tiempo de exposición continuo de los organismos *versus* mayor degradación del TBT por radiación UV, exposición de los organismos a elevadas temperaturas y nivel de marea variable durante la mitad del día (en el caso de los gasterópodos del intermareal). Estos factores podrían influenciar en el metabolismo de los organismos y su condición física y a su vez alterar la incorporación y la acción de contaminantes. Se ha demostrado la asociación entre niveles de imposex en gasterópodos y concentraciones en el sedimento para especies de murícidos (Gibbs y Bryan 1994; Axiak *et al.* 1995; Davies *et al.* 1998), todas ellas, habitantes de fondos blandos, donde el TBT puede persistir hasta 15 años (de Mora *et al.* 1989; Stewart y Mora 1990), ejerciendo su toxicidad. Cabe destacar que en el sitio MLP, donde habitan las especies en estudio, se han registrado valores de hasta 170ng.g^{-1} de TBT en sedimentos de arena y fango (del Brío 2011). Un estudio reciente realizado con poblaciones de *T. geversianus* del golfo San José junto con otras especies de moluscos bivalvos y gasterópodos, determinó que el gasterópodo no presenta concentraciones de toxina paralizante de moluscos (TPM) en sus partes blandas cuando si se registraron en integrantes de otras familias (Cumplido *et al.* 2011). Esto fue atribuido a los diferentes mecanismos de alimentación así como al hábitat en el que se encuentran (Nieto Vilela *et al.* 2013). Un fenómeno similar podría estar ocurriendo con el TBT y su incorporación por parte de *T. geversianus*. Los resultados de este trabajo son un primer paso para

poder comprender el comportamiento del TBT en la especie *T. geversianus*, que al parecer sería diferente al comportamiento en las otras dos especies estudiadas, donde el fenómeno de imposex se expresa en las hembras de gasterópodos en alta proporción.

Las especies *B. globulosus* y *A. ancilla* resultaron ser las más sensibles a la contaminación, y esto puede verse reflejado en los valores de todos los índices de imposex medidos, aún en sitios alejados de la zona de intensa actividad marítima (como Punta Cuevas -PC- y Punta Este -PE-). En estas especies no se observó una disminución en los parámetros de imposex a través de los años, lo que podría estar indicando que el TBT sigue presente en los sedimentos (174,81 ng (Sn) g⁻¹ de sedimento seco (del Brío 2011)) o que sigue liberándose desde las pinturas colocadas en las embarcaciones cuyo número y frecuencia se ha ido incrementando desde 2009. Esto hubiera podido corroborarse a través de la comparación entre las concentraciones de TBT y los productos de su metabolismo (DBT y MBT) los cuales evidencian la antigüedad del compuesto en el medio (Okoro *et al.* 2011). Sin embargo, un estudio reciente realizado con la especie *Odontocymbiola magellanica* de la familia Volutidae, en MLP reportó que tanto en tejidos como en sedimentos donde habita, las mayores concentraciones eran del compuesto TBT. En menor proporción, se determinaron los productos de su degradación (DBT y MBT), indicando ingresos recientes (del Brío 2011) de TBT. Al mismo tiempo, este último estudio determinó niveles no detectables de anti-incrustantes alternativos al TBT como Diuron e Irgarol en la misma zona de estudio que la presente Tesis, indicando ingresos recientes de TBT en el ambiente, así como las deficiencias en el cumplimiento de la prohibición mundial existente (IMO 2002).

En la bibliografía se han reportado casos en los que la exposición prolongada de los organismos a sustancias tóxicas como el TBT resultó en el desarrollo no sólo de imposex, sino de múltiples excrecencias en el último tramo del sistema reproductivo de hembras y machos (Staglicic *et al.* 2008; Abidli *et al.* 2009; Bigatti *et al.* 2009; Penchaszadeh *et al.* 2009). En casos extremos, resultó en la esterilidad de las hembras por oclusión de la vagina (Gibbs y Bryan 1987; Axiak *et al.* 1995; Oehlmann *et al.* 1996a). En el presente trabajo se observó, aunque ocasionalmente, la presencia de más de un pene así como el desarrollo de un vaso deferente próximo a la vagina, que podría estar indicando similares condiciones de exposición continua y prolongada, en las especies que se encuentran en la zona donde se desarrolla la actividad marítima desde hace más de 30 años. *A. ancilla* es una especie cuyos organismos presentan una longevidad elevada (hasta 18 años) y viven la mayor parte del tiempo enterrados en el

sedimento (Zabala *et al.* 2013b).

La presencia de múltiples embriones por ovicápsula en Nassariidos del género *Buccinanops* de Patagonia, había sido documentada solamente en la especie *B. cochlidium* (Penchaszadeh 1971; Averbuj 2009; Averbuj y Penchaszadeh 2010a). En este trabajo se reporta la ocurrencia de una alta proporción (16%) de ovicápsulas conteniendo múltiples embriones sobre el total contabilizado en la zona portuaria (MLP) en hembras de *B. globulosus*, mientras que fue menor (3,4%) en CA. Las diferencias en relación a la proporción de múltiples embriones es lo que dio como resultado, en promedio, un mayor número de embriones por hembra en el sitio MLP (con un valor máximo de 105 embriones en una hembra) y estos fueron significativamente menores en tallas que los del sitio CA. Esto podría interpretarse como una mayor fecundidad en las hembras del puerto en comparación con las del sitio menos contaminado. Sin embargo, numerosos estudios han probado que cuanto mayor es la talla de los embriones al momento de eclosión, mayor es la probabilidad de supervivencia (Spight 1976; Marshall *et al.* 2008, entre otros), mientras que un mayor número de embriones supone una mayor variabilidad genética que se traduciría en una mayor respuesta adaptativa (Marshall *et al.* 2008).

Si bien se observó que en MLP, las hembras de *B. globulosus* con ovicápsulas presentaron en promedio menor peso y talla, estas variables fueron puestas a prueba sobre un número pequeño de organismos (con ovicápsulas) y estos resultados fueron opuestos a los obtenidos cuando se compararon solo hembras sin ovicápsulas (donde los organismos del sitio MLP fueron levemente de mayores pesos y tallas que los del sitio CA). Un mayor tamaño muestral y un diseño experimental que permita la realización de pruebas con mayor potencia estadística podrían ayudar a esclarecer estas diferencias observadas.

Las diferencias y tendencias en los parámetros de fecundidad para *B. globulosus* observadas en cada sitio del presente trabajo podrían estar relacionadas a inversiones energéticas diferenciales en la reproducción (producción de ovicápsulas y embriones) (Kamel *et al.* 2010) debido a contaminación en la zona de alto tráfico marítimo. Por un lado, las hembras de CA depositando ovicápsulas con una menor proporción de múltiples embriones pero de tallas mayores y por otro, las hembras del sitio MLP afectadas por imposex depositando ovicápsulas con una mayor proporción de múltiples embriones pero de menores tallas. Teniendo en cuenta esto, una mayor mortalidad a nivel poblacional podría producirse en la descendencia de las hembras del sitio MLP, en

el periodo posterior a la eclosión, o podría ser una estrategia en la cual predomina la variabilidad genética de la descendencia que contrarrestaría las condiciones adversas en el ambiente que los rodea (Ramirez Llodra 2002; Plejdrup *et al.* 2006; Marshall *et al.* 2008; Kamel *et al.* 2010; Collin y Spangler 2012).

En el caso de *B. globulosus* la talla de las hembras con ovicápsulas no se relacionó linealmente con el número de embriones totales ni con la talla de los mismos. A su vez, las tallas mínimas de hembras con ovicápsulas en cada sitio fueron similares entre sí (37,78mm en el sitio MLP y 37,99mm en CA). Algunos de estos resultados fueron concordantes con lo reportado para la especie *B. globulosus* en golfo Nuevo (Avaca *et al.* 2012), *B. cochlidium* en golfo San José (Averbuj y Penchaszadeh 2010a) y en *Hexaplex trunculus* de dos poblaciones con diferente grado de contaminación en las costas del Mediterráneo (Lahbib *et al.* 2009). Los resultados en relación a la talla de las hembras con ovicápsulas se condicen con la talla de primera madurez en la especie que ronda los 4cm como fue reportado por Narvarte *et al.* (2008) aunque en un estudio previo realizado sobre la misma población se observaron hembras con ovicápsulas de 2,3cm en adelante (Avaca *et al.* 2012). Estudios histológicos de la gónada, isótopos estables y marcas de crecimiento de la concha para determinar la edad de madurez están siendo llevados a cabo para complementar este tipo de afirmación (Bökenhans *et al.* 2013).

Al comparar los parámetros de imposex entre hembras de *B. globulosus* con y sin ovicápsulas, se observó que las hembras con ovicápsulas presentaron penes significativamente menores que las hembras sin ovicápsulas, estas comparaciones se realizaron en el mismo sitio y sobre el mismo rango de tallas y pesos, indicando que las diferencias estarían asociadas a condiciones ambientales que incluyen la contaminación portuaria, donde están presentes compuestos como TBT (Bigatti *et al.* 2009; del Brío 2011), hidrocarburos poliaromáticos (Commendatore y Esteves 2007; Torres *et al.* 2013), metales pesados (Gil *et al.* 2006; Giarratano *et al.* 2013), entre otros. Este patrón de variación entre los parámetros de imposex en hembras con y sin ovicápsulas ha sido observado en otra especie perteneciente a la misma familia, *Buccinanops monilifer* (Averbuj y Penchaszadeh 2010b) en Mar del Plata. Aunque no se han realizado estudios específicos, las variaciones en el desarrollo del pene en hembras de una misma población con diferente capacidad reproductiva, podrían estar relacionadas con el modo de acción del TBT dentro de los organismos. Los disruptores endocrinos se caracterizan por alterar tanto el funcionamiento del sistema reproductivo como la fisiología de los

individuos (Oehlmann y Schulte-Oehlmann 2003) y tal vez estas alteraciones en estadios tempranos del desarrollo den como resultado diferencias en la proporción de hembras con capacidad reproductiva en la población y que aquellas más afectadas (evidenciando un mayor desarrollo de imposex) no puedan reproducirse normalmente. Se desconoce si lo mencionado anteriormente se debe a diferencias genéticas, fisiológicas u ontogénicas. El efecto de la presencia de contaminantes (en especial TBT) sobre la fecundidad de los gasterópodos ha sido relacionada con alteraciones histológicas en las gónadas, así como el desarrollo de espermatogénesis en la gónada de las hembras y la presencia de cápsulas abortadas dentro del tracto femenino (Gibbs *et al.* 1991b; Axiak *et al.* 1995; Axiak *et al.* 2003). En individuos de la especie *O. magellanica*, provenientes del golfo Nuevo, se ha determinado que el TBT y sus derivados están presentes en la gónada (del Brío 2011), y podrían ser transferidos luego a la descendencia. Por otro lado, se han reportado niveles elevados de este compuesto (hasta 1860ng de TBT por ovi-cápsula) en el contenido de las ovi-cápsulas de *Adelomelon brasiliana* (Goldberg *et al.* 2004), en el área portuaria de Mar del Plata.

Los parámetros de fecundidad en la zona de actividad portuaria no habían sido nunca determinados en las poblaciones de *B. globulosus*, en relación a los niveles de imposex y presencia de contaminantes. Se podrían obtener resultados con mayor detalle al comparar estadios tempranos del desarrollo de las ovi-cápsulas, como el número de huevos y la proporción de hembras reproductoras, así como la evaluación histológica de la gónada de las hembras de ambos sitios. Asimismo, es imperioso determinar las concentraciones de TBT en gónadas y otros tejidos en hembras de *B. globulosus* con y sin ovi-cápsulas para poner estos resultados en perspectiva y poder obtener una mayor comprensión del fenómeno de imposex. Todo esto permitiría establecer si existe algún efecto a nivel poblacional y que riesgos implicaría en términos ecológicos.



CAPÍTULO 2-Determinación de metales en gasterópodos comestibles y sedimentos

Introducción

Un elemento químico es considerado esencial para un organismo cuando un descenso de su concentración produce la reducción de una función fisiológicamente importante o cuando el elemento es una parte integral de la estructura orgánica que constituye una función vital en el organismo (Mason 2013). Los elementos metálicos esenciales para los organismos acuáticos incluyen al hierro (Fe), manganeso (Mn), cobre (Cu), cobalto (Co), zinc (Zn) y la mayoría forma parte de enzimas necesarias para reacciones celulares (Bjerregaard y Andersen 2007). Todos los animales y plantas acuáticas incorporan metales, sean esenciales o no, principalmente desde el agua o desde la comida que ingieren (Bryan *et al.* 1979). Asimismo, existe una gran variación en los niveles que cada organismo puede acumular en sus tejidos (Rainbow 2002).

A pesar de su gran abundancia en el ambiente, no todas las formas de un metal pueden ser asimiladas dentro de los organismos, lo cual depende principalmente de la fisiología (Blackmore 2000) y de la función del elemento dentro del organismo (Rainbow 2007). Algunos elementos pueden ejercer toxicidad sobre los individuos a concentraciones elevadas, provocando daño celular y alteraciones en las funciones metabólicas. Sin embargo, el mecanismo por el cual los metales ejercen toxicidad es diverso, especialmente cuando estos están involucrados en reacciones oxidativas (Viarengo y Nott 1993). En el ambiente marino, factores como el pH, el material suspendido y el contenido de carbono orgánico disuelto y particulado pueden alterar la especiación de los metales favoreciendo o no su biodisponibilidad hacia la biota (Bjerregaard y Andersen 2007).

El Fe, Cu y Zn son elementos esenciales para los organismos y constituyen componentes necesarios en procesos enzimáticos y metabólicos, como la formación de pigmentos respiratorios en moluscos y crustáceos. Sin embargo, metales como el Cu y Zn suelen ser tóxicos en elevadas concentraciones (Cheung *et al.* 2002). Además de su presencia natural en el ambiente, la concentración de estos metales puede incrementarse debido a la actividad industrial. Si bien el aluminio (Al) es uno de los elementos más abundantes en la corteza terrestre ha resultado perjudicial sobre organismos acuáticos y sería potencialmente tóxico en elevadas concentraciones (Fernández-Dávila *et al.* 2012; ATSDR 2013).

El Cd es un componente natural en suelos, rocas y sedimentos, pero también es utilizado por el hombre en la minería, en la creación de baterías y en componentes electrónicos, lo que incrementa su concentración en el ambiente. El Cd es altamente

soluble en ambientes acuáticos oxidados y presenta un alto potencial de toxicidad sobre muchos organismos (Khati *et al.* 2012) e inclusive se ha demostrado su carcinogenicidad (Apeti *et al.* 2009; ATSDR 2013).

El plomo (Pb), existe naturalmente en la corteza terrestre en proporciones relativamente bajas en comparación con otros elementos, pero las actividades del hombre, en particular la extracción de petróleo hace que estas proporciones cambien de tal manera que puede encontrarse abundantemente en muchos sistemas y ser altamente tóxico para organismos (IPCS 1989; ATSDR 2013).

La contaminación por metales ha sido muy estudiada en moluscos bivalvos y el órgano más evaluado es la glándula digestiva, debido a su participación en procesos de regulación metabólica así como su función detoxificante (Regoli y Orlando 1994; Marigomez *et al.* 2002; Wang y Ke 2002). Los estudios realizados con gasterópodos (*Nucella lapillus*, *Thais clavigera*, *Hinia reticulata*, entre otras) se centran en la determinación de metales en diferentes órganos y tejidos con el fin de explorar las vías de incorporación y efectos (Bryan *et al.* 1987; Blackmore 2000; Blackmore y Morton 2002; Wang y Ke 2002; Gust *et al.* 2011), así como la evaluación de riesgo en especies de consumo humano (Fang *et al.* 2001; Tanhan *et al.* 2005; Yüzereroğlu *et al.* 2010; Yusoff y Long 2011; Conti *et al.* 2012a).

En Argentina existen escasos antecedentes sobre niveles de metales en gasterópodos marinos, excepto para una especie de lapa (*Nacella magellanica*), en el Canal de Beagle (Conti *et al.* 2012b). La información sobre concentraciones de metales en sedimentos y biota a lo largo de la zona costera patagónica incluye algas, invertebrados y vertebrados (Gil *et al.* 1988; Harvey y Gil 1988; Gil *et al.* 1989; Muse *et al.* 1995; Gil *et al.* 1996; Gil *et al.* 1999; Gaiero *et al.* 2002; Pérez *et al.* 2005; Gil *et al.* 2006; Pérez *et al.* 2007; Vázquez *et al.* 2007; Mohamed 2008; Giarratano y Amin 2010; Conti *et al.* 2011; Duarte *et al.* 2011; Gil *et al.* 2011; Frias *et al.* 2012; Rosas *et al.* 2012; Giarratano *et al.* 2013; Marinho *et al.* 2013).

Si bien los ingresos de metales desde actividades humanas son difíciles de evaluar debido al aporte natural desde la erosión de rocas y zonas de surgencia (Valavanidis y Vlachogianni 2010), el potencial tóxico de muchos de ellos, ha logrado que se establezcan regulaciones o recomendaciones sobre niveles máximos de metales tolerables para consumo humano (WHO/FAO 2004; EFSA 2009) y concentraciones de ciertos metales permitidas en productos de la pesca como moluscos gasterópodos, bivalvos y cefalópodos que son consumidas por el hombre (SENASA 2000;

MERCOSUR/GMC 2011), así como niveles máximos en sedimentos para la protección de la biota (USEPA 1977; CCME 2002). En Argentina existe el Reglamento de Inspección de Productos, Subproductos y Derivados de origen Animal mediante un decreto provisto por El Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA 2000). En el mismo, se establecen niveles máximos de cadmio, plomo y mercurio para muestras de moluscos bivalvos, gasterópodos marinos, equinodermos, tunicados y otros organismos en zonas de producción. Asimismo, Argentina adoptó la resolución N°12/11 del Grupo Mercado Común/MERCOSUR que establece límites permitidos de algunos metales (arsénico, plomo, cadmio y mercurio) en productos de la pesca para consumo humano como peces, moluscos bivalvos y cefalópodos. Esta última disposición no deja en claro los niveles de ingesta tolerable semanales, haciendo referencia a concentraciones de metales permitidas por unidad de peso fresco en productos elaborados con fines comestibles. El aporte de información acerca de niveles de metales en gasterópodos y sedimentos en la zona de estudio puede ser de utilidad en aspectos de seguridad alimentaria, ya que el recurso caracol es consumido y comercializado localmente (Bigatti y Ciocco 2008) así como explotado incipientemente con comercialización en Buenos Aires, pero sin controles oficiales sobre su manejo.

Objetivos

- Determinar concentraciones de metales en gasterópodos comestibles y sedimentos de golfo Nuevo.
- Determinar el factor de bioacumulación de cada metal en gasterópodos en relación a los niveles en el sedimento o la dieta.
- Cotejar las concentraciones determinadas en las partes comestibles de los gasterópodos con niveles de ingesta tolerable para humanos según regulación existente.

Materiales y métodos

Durante el año 2011 se recolectaron en un único muestreo 5 especímenes de *A. ancilla* y aproximadamente 30 individuos de las especies *T. geversianus* y *B. globulosus* en la estación fría (mayo-noviembre). La recolección de organismos se realizó según fue indicado en los materiales y métodos generales.

Los sitios seleccionados fueron el muelle Almirante Storni (MAS), el muelle Luis Piedra Buena (MLP), Punta Cuevas (PC) y Cerro Avanzado (CA). Se recolectaron

muestras de sedimentos en el sitio donde se encuentran habitualmente los organismos de las especies *A. ancilla* (MAS) y *B. globulosus* (MLP, PC y CA) ya que viven enterrados gran parte del tiempo. También se recolectaron aproximadamente 20 especímenes del complejo de bivalvos de las especies *Brachidontes rodriguezii* y *Brachidontes purpuratus* (Rechimont *et al.* 2013) en donde comúnmente se encuentra a los organismos de la especie *T. geversianus* (MLP y PC). Los gasterópodos de esta especie se alimentan de este complejo de bivalvos y se encuentran la mayor parte del tiempo sobre o entre ellos y no sobre el sedimento. En el sitio MLP, la especie *T. geversianus* se encuentra sobre los pilotes del muelle, distantes a más de 1m del sedimento del fondo. La recolección de organismos y sedimentos se realizó según se detalla en los materiales y métodos generales.

Se utilizó material de acero inoxidable, material volumétrico de vidrio y envolturas de plástico para evitar la contaminación de las muestras. Todo el material utilizado se lavó previamente con detergente una vez, luego se enjuagó con agua corriente tres veces y a continuación se enjuagó con agua desionizada tres veces. A continuación se enjuagó con HCl 0,5N, seguido de tres enjuagues con agua corriente y otros tres con agua desionizada. Se dejó el material sumergido en HNO₃ 15% durante 24 horas y por último, se lo enjuagó nuevamente con agua corriente (tres veces) y luego con agua desionizada (tres veces).

Procesamiento de sedimentos para la determinación de metales

Los sedimentos recolectados en el campo fueron procesados según el método de extracción con agua regia en caliente (Agemian y Chau 1976), obteniéndose aquellas fracciones de metales que se encuentran precipitadas, adsorbidas y en relación a la materia orgánica (Loring y Rantala 1992). Para la extracción se secaron los sedimentos en estufa (Memmert 854) a 40°C hasta peso constante. Se pesó 1g de muestra (utilizando una balanza analítica Mettler H10W) en un crisol previamente lavado y pesado, se agregaron 5ml de agua regia (compuesta por HCl:HNO₃ en proporción 3:1). Se evaporó en plancha calefactora (ThermolineType 2200) a 85°C, manteniendo una ebullición suave, hasta que cada muestra quedara seca. El residuo alojado en el crisol se disolvió con 10ml de HNO₃ al 5%. Luego se centrifugó a 8000 rpm (centrífuga Sorwall Instrument RC5C) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se recuperó el sobrenadante en un matraz de 25ml. El tubo que contenía el sobrenadante fue enjuagado tres veces con un volumen total de 10ml de HNO₃ al 5%. Se centrifugó una vez más en

las mismas condiciones. El sobrenadante obtenido fue recolectado y adicionado al sobrenadante recuperado en la primera centrifugación. El extracto se llevó a volumen final de 25ml con una solución de HNO₃ al 5%. Se trasvasó cada muestra a envases de plástico enjuagados con ácido y provistos de tapa y contratapa. Se conservaron en heladera a 4°C hasta su determinación.

Los metales contenidos en las muestras de sedimentos y biota fueron determinados mediante la técnica de Espectrofotometría de Absorción Atómica (EAA) por el Servicio de Química del Centro Nacional Patagónico como servicios a terceros, y el análisis de los datos se realizó en colaboración con la Dra. Mónica Gil del Laboratorio de Oceanografía Química y Contaminación de Agua (LOQCA) del Centro Nacional Patagónico.

El análisis de granulometría y el contenido de materia orgánica se realizó según se detalla en los métodos generales.

Procesamiento de organismos para la determinación de metales

Los gasterópodos fueron procesados determinando la talla y el peso de las partes blandas. Se diseccionó y pesó en cada espécimen el complejo glándula digestiva-gónada y el pie. Estos órganos fueron seleccionados según su capacidad para acumular contaminantes (Blackmore 2000; Cheung *et al.* 2006) y la función detoxificadora en el caso de la glándula digestiva (Viarengo y Nott 1993), y por su valor comestible en el caso del pie. Para el análisis de metales en bivalvos, se utilizó el contenido total de los tejidos blandos, ya que *T. geversianus* los ingiere en su totalidad luego de disolver su valva con el órgano perforador accesorio (ABO) (Pio 2010). Se agruparon todos los individuos del mismo sitio (sin distinción entre sexos) para la determinación de metales en los diferentes tejidos (glándula digestiva-gónada, el pie y los bivalvos); todas las muestras fueron analizadas por duplicado. Se procesó cada muestra por especie y por tejido mediante un homogenizador plástico con cuchillas de acero inoxidable. El agrupamiento para formar una muestra compuesta se realizó debido a que la extracción de fracciones requiere una cantidad de tejido húmedo considerable (más de 5g) que representó un número entre 5 a 30 gasterópodos por cada muestra de tejido a determinar. Del homogenato se pesaron alícuotas de aproximadamente 5g en crisoles de porcelana pesados previamente, se los dejó en estufa a 80°C durante un día y se registró nuevamente el peso. Se llevó a una mufla (Fisher 186) y se fue aumentando la temperatura lentamente hasta alcanzar 400°C. Una vez alcanzada la temperatura

deseada, las muestras fueron mantenidas a esa temperatura durante 6 horas. Al día siguiente (con las muestras a temperatura ambiente), se les agregó a cada una 2ml de ácido nítrico (HNO₃) concentrado y se dejó evaporando hasta sequedad sobre una plancha calefactora (ThermolineType 2200) a 80°C. Este procedimiento se repitió con cada muestra hasta obtener cenizas blancas. Luego estas cenizas se disolvieron con 4 ml de solución de HNO₃ (3%v/v) y ácido clorhídrico (6%v/v). Se llevó el contenido a un volumen final de 10ml en matraz aforado con la misma solución utilizada para disolver las cenizas. Cada muestra fue trasvasada y conservada en envases plásticos (previamente sometidos a lavado ácido) a 4°C hasta su determinación.

Se determinó la concentración de cobre (Cu), hierro (Fe), zinc (Zn), cadmio (Cd), plomo (Pb) y aluminio (Al) en gasterópodos, bivalvos y sedimentos. Las determinaciones se expresaron como el promedio de los valores obtenidos por duplicado para cada muestra en unidades de $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de tejido en peso seco o $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de sedimento en peso seco. Cada grupo de muestras procesadas (biota y sedimentos) se acompañó por dos blancos de reactivos tratados de igual forma que éstas. Asimismo, se usó como material de referencia el tejido de ostra NIST-SRM 1566^a para el control de calidad del análisis de metales. La precisión (coeficiente de variación) se encontró entre 0,8 y 6,6%. La exactitud (porcentaje de recuperación) estuvo entre 89 y 102% para todos los metales cuantificados. Los límites de detección fueron Fe 2,5, Al 2,5, Zn 0,25, Cu 0,64, Cd 0,25 y Pb 5,0 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$.

Análisis de datos

A partir de las determinaciones de metales en el pie y el complejo glándula digestiva+gónada (D+G, de aquí en adelante) de los gasterópodos se calculó el Factor de Bioacumulación (EPA 2000) para cada metal en relación a la concentración de metal (CM) en el sedimento, en las especies *A. ancilla* y *B. globulosus*. También se calculó el factor de bioacumulación desde la dieta (bivalvos) en la especie *T. geversianus*.

La concentración total de un metal (CTM) en la biota fue calculada como:

$$\text{CTM } (\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}) = [\text{M}] (\text{pie}) * \frac{\text{peso pie}}{\text{peso total gasterópodo}} + [\text{M}](\text{D+G}) * \frac{\text{peso (D+G)}}{\text{peso total gasterópodo}}$$

donde [M] es la concentración de cada metal determinado en cada tejido; D+G: complejo glándula digestiva-gónada.

El factor de bioacumulación (FBA) fue calculado como:

$$FBA = \frac{\text{CTM en gasterópodo}}{\text{CM en el sedimento}}$$

o como, en el caso de *T. geversianus*:

$$FBA = \frac{\text{CTM en gasterópodo}}{\text{CM en el complejo de bivalvos}}$$

Valores de FBA mayores a 1 indican que el elemento se bioacumula en los gasterópodos, y valores menores a 1 indican que si bien existen niveles del metal en los organismos, la concentración no supera la de la fuente con la cual se lo relacionó, en este caso, los sedimentos o los bivalvos.

En base a la regulación vigente (WHO/FAO 2004; EFSA 2011) se calculó, cuando fue posible, la tasa de ingesta semanal de gasterópodos de cada especie permitida para consumo humano y se cotejó el contenido de metales obtenido en cada muestra con las concentraciones máximas permitidas en muestras de gasterópodos provenientes de zonas de producción y aptas para consumo humano (SENASA 2000; MERCOSUR/GMC 2011).

Resultados

La Tabla 9 resume las variables obtenidas durante el procesamiento de los organismos para la determinación de metales que serán utilizadas en cálculos posteriores.

Tabla 9. Peso promedio (\pm DE) de los tejidos de gasterópodos procesados para la determinación de metales. Todos los valores se expresan en gramos (g) de tejido húmedo. Abreviaturas: CA: Cerro Avanzado, D+G: complejo glándula digestiva-gónada, MAS: Muelle Almirante Storni, MLP: Muelle Luis Piedra Buena, PC: Punta Cuevas.

Especie/Sitio	Peso total de las partes blandas (g)	Peso pie (g)	% del peso de las partes blandas	Peso D+G (g)	% del peso de las partes blandas
<i>A. ancilla</i> -MAS	66,93 \pm 3,3	13,94 \pm 3,7	21	15,1 \pm 2,6	23
<i>B. globulosus</i> -MLP	6,16 \pm 0,3	2,2 \pm 0,1	35	1,8 \pm 0,1	29
<i>B. globulosus</i> -PC	2,93 \pm 0,1	1 \pm 0,04	34	0,67 \pm 0,4	23
<i>B. globulosus</i> -CA	5,45 \pm 0,4	1,91 \pm 0,1	35	1,45 \pm 0,08	27
<i>T. geversianus</i> -MLP (submareal)	1,7 \pm 0,08	0,39 \pm 0,02	23	0,37 \pm 0,03	22
<i>T. geversianus</i> -PC (intermareal)	0,89 \pm 0,04	0,17 \pm 0,01	19	0,12 \pm 0,07	13
<i>T. geversianus</i> -CA (intermareal)	0,94 \pm 0,05	0,26 \pm 0,02	28	0,15 \pm 0,02	16

No se encontró un patrón en relación a la concentración de metales en los sedimentos de cada sitio de estudio (Tabla 10), aunque los mayores valores para todos los metales en sedimentos fueron registrados en el muelle LP; en todos los sitios el Cd no se pudo detectar con el método utilizado. Asimismo, todos los metales determinados se encontraron por debajo del límite establecido por organismos internacionales (USEPA 1977; CCME 2002) para la protección de la biota.

Tabla 10. Concentración de metales en sedimentos. Los valores se expresan en $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ peso seco. En negrita y recuadro las concentraciones no detectables (ND) para ese metal.

Sitio	Al	Fe	Zn	Cu	Cd	Pb
Muelle Almirante Storni (MAS)	5633,62	12179,01	19,36	2,50	ND	5,00
Muelle Luis Piedra Buena (MLP)	12958,71	13581,05	32,99	6,10	ND	7,47
Punta Cuevas (PC)	8664,57	12175,61	18,92	2,74	ND	ND
Cerro Avanzado (CA)	10541,85	10492,03	16,84	2,99	ND	ND

El sitio MAS presentó niveles de metales similares a los registrados en los sitios más alejados de la zona portuaria (PC y CA), excepto para el Al en donde las concentraciones fueron aproximadamente la mitad. El sitio MLP presentó una mayor proporción de grano fino (80%) en comparación con MAS, PC y CA, de valores similares entre sí (36%, 30% y 29% respectivamente). El sitio PC fue el de mayor contenido de materia orgánica (MO) con 10,48g de MO en 100g de sedimento, aproximadamente 10 veces mayor, en comparación con MLP y CA, que presentaron valores similares entre sí (1,74g y 1,09g respectivamente), (Figura 32).

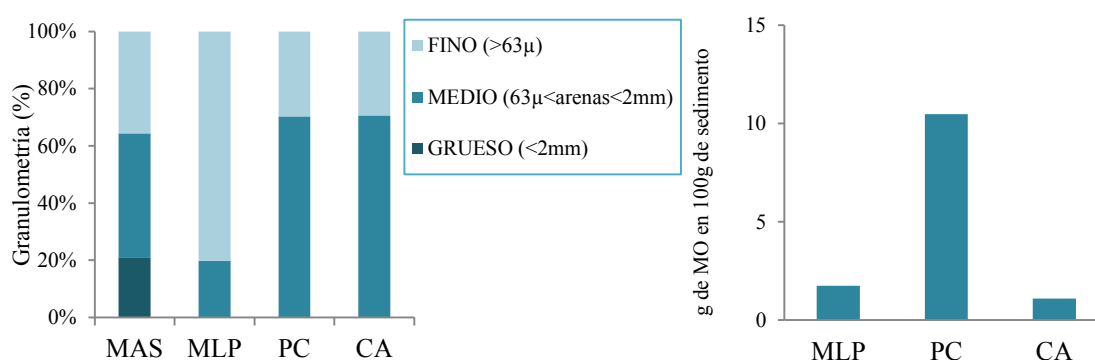


Figura 32. Caracterización de los sedimentos. Granulometría (izquierda) y contenido de materia orgánica (MO), (derecha) para cada sitio estudiado. Abreviaturas: CA: Cerro Avanzado, MAS: Muelle Almirante Storni, MLP: Muelle Luis Piedra Buena y PC: Punta Cuevas.

En relación a la concentración de metales en gasterópodos para la estación fría (Tabla 11), en general, en todas las especies, los mayores valores se encontraron en el complejo glándula digestiva-gónada en comparación con el pie, excepto para el Al en la

especie *B. globulosus* y *T. geversianus*. En cuanto a los bivalvos ingeridos por *T. geversianus*, las concentraciones de todos los metales fueron similares en los tres sitios estudiados excepto para Al y Fe, que presentaron menores valores en el sitio MLP (Tabla 11). En las especies *A. ancilla* y *T. geversianus*, el patrón de concentración total de metales (CMT) considerando la suma de concentraciones en cada tejido fue Zn>Fe>Cu>Cd>Al>Pb y en la especie *B. globulosus* el patrón fue Zn>Fe>Cu>Al>Cd>Pb.

Tabla 11. Concentraciones de metales por especie y por sitio en los tejidos analizados. Las concentraciones se expresan en $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ peso seco. Abreviaturas: CA: Cerro Avanzado, D+G: glándula digestiva+gónada, MAS: Muelle Almirante Storni, MLP: Muelle Luis Piedra Buena, P: pie, PC: Punta Cuevas; Los valores en negrita y recuadro indican valores no detectables (ND) para ese metal.

Especie: <i>Adelomelon ancilla</i>												
Sitio	Al		Fe		Zn		Cu		Cd		Pb	
	P	D+G	P	D+G	P	D+G	P	D+G	P	D+G	P	D+G
MAS	ND	ND	5,80	335,65	11,25	364,06	4,09	272,85	0,03	3,73	ND	0,84
Especie: <i>Buccinanops globulosus</i>												
MLP	9,67	7,01	120,94	283,25	29,31	586,56	10,40	32,12	0,15	28,57	0,68	1,40
PC	41,85	6,76	99,24	241,88	23,94	486,73	6,68	22,93	0,08	19,72	ND	0,99
CA	9,16	8,05	33,43	290,55	31,16	367,08	6,96	26,20	0,12	88,91	ND	0,93
Especie: <i>Trophon geversianus</i>												
MLP	8,56	ND	73,73	168,21	79,80	279,21	8,60	32,97	0,30	28,15	0,50	4,96
PC	28,63	ND	72,47	199,39	72,91	250,98	11,85	37,52	0,49	51,86	ND	1,75
CA	21,89	7,33	53,37	140,58	55,12	139,67	7,90	17,63	0,32	30,56	ND	0,92
Bivalvos (<i>Brachidontes rodriguezii</i> / <i>B. purpuratus</i>)												
MLP	47,65		70,92		27,41		3,38		0,42		ND	
PC	101,56		147,29		16,26		6,31		0,68		ND	
CA	109,59		115,32		24,18		2,78		0,64		ND	

Si se consideran las concentraciones de metal por gramo de organismo total, los metales más abundantes en las tres especies de gasterópodos fueron el Zn y el Fe. En general, la especie que mayor cantidad de metales bioacumuló en sus tejidos fue *B. globulosus*. Para metales como el Zn pareciera existir un patrón de disminución de la concentración en ambos tejidos con la lejanía a la zona portuaria aunque debido al número de datos, no se pudo probar estadísticamente. Para el resto de los metales determinados no se encontró un patrón de bioacumulación en relación a la actividad marítima variable a lo largo de los sitios de estudio (Figura 33).

Las especies *T. geversianus* y *B. globulosus* en todos los sitios estudiados presentaron niveles de Cd que estuvieron por encima del límite permitido en moluscos gasterópodos para consumo humano que es de $2\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (SENASA 2000;

MERCOSUR/GMC 2011), mientras que *A. ancilla* presentó niveles de metales por debajo de este límite. Asimismo, ninguna de las tres especies superó el límite de Pb permitido en bivalvos para consumo humano (Figura 33). Los niveles de Fe, Zn, Cu y Al no fueron cotejados con ningún valor de referencia ya que no existe legislación vigente que estipule niveles aptos de estos elementos en muestras de moluscos para consumo humano.

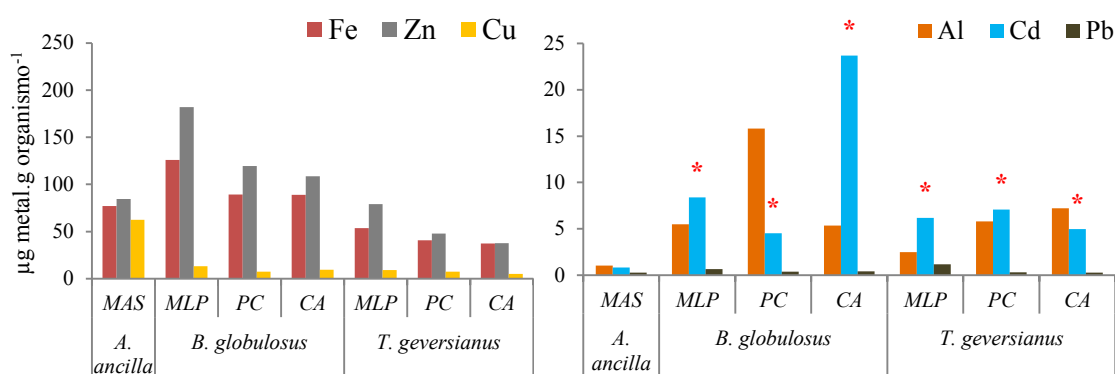


Figura 33. Concentración total de metal (CTM) en gasterópodos. *: muestras que sobrepasan el valor permitido en gasterópodos para consumo humano según el Decreto 4238/68 (SENASA 2000) y la resolución GMC 12/11 MERCOSUR (2011), $2\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ para Cd y $1,5\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ para Pb. El Fe, Zn y Cu se muestran por separado debido a la escala gráfica. Abreviaturas: CA: Cerro Avanzado, MAS: Muelle Almirante Storni, MLP: Muelle Luis Piedra Buena, PC: Punta Cuevas.

En las tres especies *T. geversianus*, *B. globulosus* y *A. ancilla*, el factor de bioacumulación (FBA) fue mayor a 1 para los metales Zn y Cu, indicando concentraciones mayores a las de la fuente (sedimentos o alimento) y fue menor a 1 para Al y Fe (Tabla 12). Sólo para la especie *T. geversianus* pudo ser calculado el FBA de Cd (que en todos los sitios fue mayor a 1), debido a que se registraron concentraciones no detectables (ND) en los sedimentos donde habitan las especies *A. ancilla* y *B. globulosus* (Tabla 12).

Tabla 12. Factores de bioacumulación (FBA) calculados para cada metal determinado. En negrita y recuadro se destacan los valores mayores a 1. El asterisco (*) indica el FBA sin calcular debido a concentraciones no detectables (ND) en las fuentes consideradas (sedimentos o bivalvos). Abreviaturas: CA: Cerro Avanzado, MAS: Muelle Almirante Storni, MLP: Muelle Luis Piedra Buena, PC: Punta Cuevas.

Especie	Sitio	Al	Fe	Zn	Cu	Cd	Pb
<i>A. ancilla</i>	MAS	0,0001	0,004	2,82	16,13	*	0,04
	MLP	0,0003	0,006	3,13	1,30	*	0,05
<i>B. globulosus</i>	PC	0,0013	0,005	3,80	1,75	*	*
	CA	0,0004	0,006	4,21	2,09	*	*
<i>T. geversianus</i>	MLP	0,0471	0,624	2,37	2,23	12,12	*
	PC	0,0386	0,255	2,76	1,09	10,97	*
	CA	0,0430	0,328	1,57	1,78	10,32	*

Discusión

La acumulación y disponibilidad de metales en el sedimento depende de un gran número de factores como la granulometría, la cantidad de materia orgánica, el potencial redox y otros (Chapman *et al.* 1998). En la naturaleza, elementos como Fe, Al, Zn, y Cu se encuentran en forma natural en niveles elevados (Rainbow 1995); en este trabajo también fueron detectados en altas concentraciones. El sitio que mayor acumulación de metales registró en los sedimentos fue MLP, sitio cuya proporción de grano fino (40% del total) fue considerablemente mayor que la de los demás sitios (aproximadamente 10%). Asimismo, los mayores niveles en MLP se relacionaron positivamente con el intenso tráfico marítimo en la zona. A pesar de ello, en el caso del Al, los niveles detectados en la zona del muelle cercano a la fábrica de aluminio (MAS) fueron menores, incluso a los de los sitios más alejados de la zona portuaria (PC y CA). Esto podría estar estrechamente relacionado con la granulometría del sedimento, que en el sitio MAS presentó una proporción similar de las tres fracciones analizadas (grano fino, medio y grueso) en comparación con el resto de los sitios, caracterizados por sedimentos con mayores proporciones de grano fino y medio. Si bien los metales fueron analizados sobre el sedimento total, las diferentes proporciones de cada tipo de grano podrían estar contribuyendo a las diferencias encontradas, que en este caso no se vieron reflejadas por el gradiente de tráfico marítimo existente en el golfo. A su vez, las muestras de MAS no fueron tomadas en la zona de descarga de alúmina y coque, sino en una zona donde no atracan barcos.

En el caso del Cd, en el presente estudio los niveles en sedimentos estuvieron por debajo del límite de detección, hecho que había sido reportado en estudios anteriores en la misma zona (Giarratano *et al.* 2013). Para el Pb, los mayores valores se encontraron en la zona del muelle turístico (MLP), lo que podría estar asociado a la quema de combustibles (IPCS 1989) que en la zona de estudio podrían emitirse principalmente de la combustión de los motores de las numerosas embarcaciones que atracan en los muelles (MLP y MAS) cada año. El Cd y Pb en sedimentos, de toxicidad para los organismos, se encontraron por debajo del límite de protección para la biota marina establecido por organismos internacionales (USEPA 1977; CCME 2002), indicando que las concentraciones reportadas no pondrían en riesgo las poblaciones de gasterópodos y otros animales de golfo Nuevo.

Si se comparan los registros de este estudio con los de otros estudios sobre concentración de metales en sedimentos realizados en la zona patagónica (Tabla 13), los

niveles fueron similares excepto para Fe y Al, que en el presente estudio presentaron valores de hasta un orden de magnitud mayor en relación al registrado por Giarratano *et al.* (2013) en la misma zona de estudio. Las diferencias encontradas podrían ser atribuibles tanto a la técnica de extracción, la fracción del sedimento sobre la cual se determinaron los metales (fina vs. sedimento total), así como a la estación del año que fueron diferentes en los dos estudios. Cabe destacar que durante la realización de los muestreos, se observaron reiteradas veces restos de estructuras metálicas de todo tipo que podrían estar contribuyendo a los altos niveles de metales determinados (en especial Fe). Salvo en el golfo San Matías donde en el caso del Cu, Cd las elevadas concentraciones determinadas fueron relacionadas con una antigua actividad minera (Vázquez *et al.* 2007), en el resto de los golfos patagónicos como San José y San Jorge las concentraciones de metales detectadas en sedimentos del presente trabajo fueron, en general, similares o mayores (Tabla 13).

Tabla 13. Valores máximos obtenidos ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ peso seco) en sedimentos en este trabajo, en diferentes golfos de Patagonia y otras partes del mundo. Principales regulaciones sobre calidad de sedimentos para protección de la biota marina.

Sitio	Fe	Al	Zn	Cu	Cd	Pb	Referencia
golfo San Matías		12835 ^b	12,5 ^a	6452 ^a	37,5 ^a	4198 ^a	^a (Vázquez <i>et al.</i> 2007); ^b (Mohamed 2008)
golfo San José		15000	38	7,6	0,15	7,4	(Harvey y Gil 1988)
golfo San Jorge		15720	44,4	6,98	<0,25 (ND)	5,48	(Marinho <i>et al.</i> 2013)
golfo Nuevo	3800 ^b	3130 ^b	54 ^a	13,95 ^b	<0,25 (ND) ^b	12,48 ^b	^a (Harvey y Gil 1988); ^b (Giarratano <i>et al.</i> 2013)
golfo Nuevo	12958,71	13581.05	32,99	6,10	ND	7,47	Este estudio
Reglamentación internacional							
ISQG (Canadá)			124	18,7	0,7	30,2	(CCME 2002)
USEPA (E.E.U.U.)			90	25	-	40	(USEPA 1977)

Los niveles de metales registrados en los gasterópodos indican una gran capacidad de las tres especies para bioacumular metales. Las mayores concentraciones de todos los metales fueron registradas en la glándula digestiva excepto para el metal Al que fue mayor en el pie de *Buccinanops globulosus* y *Trophon geversianus*; mientras que *Adelomelon ancilla* presentó valores de ese metal por debajo del límite de detección en los dos tejidos analizados. Esto podría deberse, en el caso de *B. globulosus* y *T. geversianus*, a una mayor afinidad de este metal con el tejido muscular o a su incorporación diferencial desde el medio. La mayor bioacumulación de Al en el pie se dio en el sitio PC (tanto en *T. geversianus* como en *B. globulosus*) donde la materia

orgánica en el sedimento es 10 veces mayor que en el resto de los sitios (Figura 32). Se ha demostrado en algunos casos una asociación positiva entre la materia orgánica y la adsorción de metales (Chapman *et al.* 1998), que favorecería la biodisponibilidad hacia los organismos frente a condiciones cambiantes del medio. Sin embargo, esta hipótesis no podría explicar las concentraciones mayores en el pie en relación a la glándula digestiva en la especie *T. geversianus* que no habita sobre los sedimentos. En este caso, podría tratarse como se mencionó anteriormente de una distribución diferencial de este elemento en los diferentes órganos del gasterópodo. La glándula digestiva es el principal órgano de detoxificación y actividad metabólica (Oehlmann y Schulte-Oehlmann 2002; Rainbow 2007), por lo tanto, es esperable obtener altos niveles de compuestos tóxicos en este órgano. Sin embargo, la biodisponibilidad y especiación de cada metal, puede ocasionar diferencias en la acumulación dentro de los organismos sumado a la fisiología de cada especie (Rainbow 2002; Luoma y Rainbow 2005).

Considerando la concentración total de metales (CMT) los gasterópodos de la especie *B. globulosus* fueron los que concentraron más cantidad de todos los elementos determinados, seguido por *T. geversianus* y en menor proporción *A. ancilla*.

En este trabajo se reporta por primera vez la presencia de metales en las especies *A. ancilla*, *T. geversianus* y *B. globulosus*. Debido a que no se cuenta con datos previos sobre bioacumulación de metales en estas especies, las comparaciones con niveles determinados para otros taxones es difícil de realizar en relación al modo de vida y fisiología de cada grupo de organismos. A pesar de ello, si se compararan los resultados del presente estudio y los registros anteriores en la zona de golfo Nuevo (Tabla 14), todos los niveles de metales determinados en los gasterópodos de este estudio fueron mayores, excepto para el Fe que fue mayor en las especies de bivalvos. En relación a otros golfos como San José, San Jorge y San Matías, se observó la misma tendencia, excepto en el caso del Pb con mayores niveles en el golfo San Matías, aunque relacionados con una antigua actividad minera (Vázquez *et al.* 2007).

Tabla 14. Valores máximos reportados ($\mu\text{g}\cdot\text{g}$ de organismo⁻¹ peso seco) en especies de moluscos de diferentes golfos de Patagonia, otros sitios en el mundo y la concentración total de metales (CTM) obtenida en el presente estudio.

Sitio	Al	Fe	Zn	Cu	Cd	Pb	Cita
golfo San Matías (bivalvos)		144 ^b	150 ^a	16 ^a	26,2 ^b	3,5 ^a	^a Vázquez et al. 2007; ^b Mohamed 2008
golfo San José (bivalvos)		181	216	6,9	6	1,9	(Gil <i>et al.</i> 1988)
Muelle Almirante Storni (bivalvos)	200 ^b	500 ^b	200 ^b	24 ^b	7 ^b	1,7 ^a	^a Gil et al. 1988; ^b Giarratano et al. 2013
Punta Cuevas (bivalvos)	250	600	100	25	6		(Giarratano <i>et al.</i> 2013)
golfo Nuevo (bivalvos)		2900	62,35	13,5	0,3	13,1	(Harvey y Gil 1988)
golfo San Jorge (bivalvos)		15700 ^b	46,5 ^b	7 ^b	4,02 ^a	5,5 ^b	(Pérez <i>et al.</i> 2005; Marinho <i>et al.</i> 2013)
Muelle Storni (gasterópodo)	1,04	76,93	84,48	62,41	0,85	0,29	Este estudio
Muelle L.P. (gasterópodo)	5,50	125,96	181,86	13,10	8,40	1,20	
Punta Cuevas (gasterópodo)	15,83	89,18	119,47	7,52	7,09	0,39	
Cerro Avanzado (gasterópodo)	5,79	89,02	108,58	9,41	23,70	0,42	
Canal de Beagle (gasterópodo)			96,2	15,16	8,22	1,23	(Conti <i>et al.</i> 2012b)
Portugal (gasterópodo)		1810	5500	2100	3,64	Nd	(Pessoa <i>et al.</i> 2001)
Mediterráneo (gasterópodo)		931,2	17,10	8,83	3,28	4,13	(Yüzereroğlu <i>et al.</i> 2010)
Francia (gasterópodo)					2,33	0,16	(Noël <i>et al.</i> 2011)
China (gasterópodo)			705	172,2	0,75	30,71	(Liang <i>et al.</i> 2004)

Si se comparan los resultados del presente trabajo con los del gasterópodo *Nacella magellanica* de Canal de Beagle (Tabla 14), se observan niveles que en general fueron similares a los de la zona portuaria determinadas en este estudio. En comparación con otras especies de gasterópodos en el mundo como *Patella caerulea*, *Littorina littorea*, *Buccinum undatum*, *Haliotis tuberculata* y *Murex brandaris*, los niveles determinados aquí fueron más altos para metales como Cu, Zn, Cd y Pb (Yüzereroğlu *et al.* 2010; Noël *et al.* 2011). Los reportados por Pessoa *et al.* (2001) en Portugal y Liang *et al.* (2004) en China fueron mayores a los registrados en el presente estudio y corresponden a estaciones ubicadas en la desembocadura de importantes ríos e implica un aporte significativo desde estas fuentes. El aporte desde escorrentías o desde zonas de agricultura realizada en terrenos cercanos, podría ser la explicación a las elevadas concentraciones registradas en Cerro Avanzado, o bien fuentes naturales como arroyos temporarios provenientes de la meseta y paleoacantilados que podrían estar proveyendo

de elementos como el Cd a esas playas. El Cd y el Pb no son esenciales para los organismos y pueden ejercer toxicidad en muy bajas concentraciones, sin embargo no se conocen los potenciales efectos de estos elementos para las especies analizadas en este trabajo.

Si bien en este trabajo se calculó el factor de bioacumulación desde el sedimento donde habitan los gasterópodos o la dieta, sólo se relacionaron los niveles de metales obtenidos con uno de estos dos compartimentos, considerado el de mayor influencia según la forma de vida de cada especie. Los factores de bioacumulación (FBA) en relación a los niveles de metales en los sedimentos o bivalvos fueron mayores a 1 para metales como Zn y Cu indicando una gran capacidad para concentrar estos elementos dentro de los gasterópodos. En el caso del Cd, si bien no pudo calcularse el FBA en relación al sedimento (debido a valores no detectables), se observó que las concentraciones en los gasterópodos fueron mayores. Esto mismo ha sido observado en estudios previos con especies de bivalvos en Patagonia (Vázquez *et al.* 2007; Giarratano y Amin 2010; Duarte *et al.* 2011; Giarratano *et al.* 2013), en donde se registraron altas concentraciones de metales en *Aulacomya atra*, *Mytilus edulis* y *Brachidontes rodriguezii*, cuando en el sedimento fueron no detectables o en muy bajas concentraciones. Los autores atribuyeron los resultados a que especies metálicas como el Cd, bajo determinadas condiciones del medio como pH, salinidad o el potencial redox, pueden volverse biodisponibles hacia los organismos (Rainbow 1995; Janssen *et al.* 2003; Peakall y Burger 2003; Rainbow 2007). Un caso particular de bioacumulación fue el de la especie de *B. globulosus* en el presente trabajo, donde los niveles de Cd fueron no detectables en el sedimento y la concentración máxima registrada en sus tejidos fue de $23,7\mu\text{g.g organismo}^{-1}$. Esto podría deberse a fuentes puntuales de ingreso de este metal en los sedimentos y el agua de esa zona. Este hecho favorecería su acumulación por parte de las presas comúnmente consumidas por las especies y consecuentemente su almacenamiento en la glándula digestiva de los gasterópodos analizados. *B. globulosus* ingiere presas en descomposición, y se lo ha observado alimentándose principalmente de crustáceos muertos (*Cyrtograpsus angulatus* y *Neohelice granulata*) (Daleo *et al.* 2005), así como de almejas (*Amiantis purpurata*) (Narvarte 2006). Los crustáceos y bivalvos han sido vastamente estudiados por su capacidad para bioacumular metales (White y Rainbow 1982; Wenner 1988; Edward *et al.* 2009) y podrían ser una fuente importante de metales para los gasterópodos de la especie.

Un hecho similar ocurrió en los gasterópodos de la especie *T. geversianus* en relación a los niveles registrados en bivalvos filtradores de los que se alimenta. En este caso, debido a que los organismos habitan el intermareal rocoso, la fuente más probable de ingreso de metales además de la dieta podría ser desde el agua.

A. ancilla registró los menores valores de FBA, excepto para el Cu, indicando que este elemento podría ser incorporado como un elemento necesario en procesos fisiológicos o enzimáticos. La bioacumulación de metales ocurre por vías diferentes a la de los compuestos orgánicos dependiendo de la forma química, de las propiedades del medio así como también, de los mecanismos específicos de asimilación (Wang y Fisher 1999) y los requerimientos de cada especie. Se han comprobado variaciones inter e intraespecíficas en el modo de incorporación de un mismo metal en diferentes poblaciones de gasterópodos en relación al tipo de hábitat y modo de alimentación (Wang y Ke 2002), que podrían verse también reflejados en los resultados obtenidos para las especies del presente estudio.

En invertebrados, un mecanismo muy estudiado en la detoxificación, asociado a la inmovilización o almacenamiento de metales es la inducción de metalotioneínas (Viarengo y Nott 1993; Khati *et al.* 2012), que son proteínas de unión a metales que se incrementan con la exposición a los mismos, o el almacenamiento en forma de gránulos (Cheung *et al.* 2002). Asimismo, se ha propuesto que la concha de los moluscos podría ser una vía de almacenamiento de metales como alternativa en la reducción de su toxicidad (Walsh *et al.* 1995). Esto ha sido propuesto para los moluscos en general como respuesta a la exposición a diferentes metales (Bebianno y Langston 1992; 1998; Blackmore y Wang 2004; Zhou *et al.* 2008; Khati *et al.* 2012). En el presente trabajo no se determinó la presencia de metalotioneínas o gránulos de almacenamiento, aunque esto podría ser una explicación a las grandes cantidades de metales acumuladas en la glándula digestiva en las tres especies de gasterópodos.

Para evaluar aspectos relacionados con los riesgos a la salud humana, se debe tener en cuenta la cantidad total de metal que los tejidos comestibles pueden concentrar. En este contexto, la Organización Mundial de la Salud (OMS) en conjunto con la Organización Mundial de Agricultura y Alimentos (WHO/FAO) estableció la tasa de ingesta semanal de Cd en $5,8\mu\text{g}\cdot\text{kg peso cuerpo}^{-1}$, asumiendo un peso promedio de 65kg. Por otro lado, las autoridades europeas sobre seguridad alimentaria (EFSA) indican una tasa de $2,5\mu\text{g}\cdot\text{kg peso cuerpo}^{-1}$ en pos de la protección de grupos de riesgo como los niños (EFSA 2011). Teniendo en cuenta la regulación más estricta y sabiendo

que las especies *T. geversianus* y *B. globulosus* son consumidas enteras, sin descartar la glándula digestiva, la tasa de ingesta semanal de gasterópodos en relación a la concentración de cadmio permitida sería de 23g y 7g semanales respectivamente. Sin embargo, si sólo se consumiera el pie (tejido de menor bioacumulación de Cd), una persona de 65Kg de peso promedio podría ingerir semanalmente 6kg de pie de *A. ancilla*, 1kg de pie de *B. globulosus* y 0,33kg de pie de *T. geversianus*.

Para el Pb se estableció una tasa de ingesta máxima semanal de 25µg.kg peso cuerpo⁻¹ (WHO/FAO 2004; EFSA 2010) y en base a este valor, una persona de 65kg de peso promedio podría consumir hasta 3,4kg de pie de *A. ancilla*, 2,4kg de pie de *B. globulosus* y 3,3kg de pie de *T. geversianus* por semana.

Debido a que la regulación nacional existente (SENASA 2000; MERCOSUR/GMC 2011) solo estipula niveles de ciertos metales permitidos en muestras de gasterópodos que luego serán consumidos, se consideró únicamente la regulación internacional que fija valores tolerables de metales para humanos, sin tener en cuenta qué tipo de alimento se incorpore.

En el caso de *A. ancilla*, si bien la tasa máxima de ingesta semanal de pie calculada fue alta (hasta 3,4kg), Zabala *et al.* (2013b) recomiendan no utilizar a estos gasterópodos como recurso pesquero debido a su alta longevidad, bajas densidades y baja fecundidad en golfo Nuevo.

De esta manera, no se recomienda el consumo de ninguna de las tres especies en la zona de estudio, a menos que, en el caso de *B. globulosus* y *T. geversianus*, se ingiera solamente el pie y en las cantidades expresadas en esta Tesis. Asimismo se recomienda realizar monitoreos periódicos sobre contaminantes en estos y otros recursos pesqueros consumidos en la zona.



CAPÍTULO 3-Biomarcadores
de estrés oxidativo en
Buccinanops globulosus
afectados por imposex

Introducción

La oxidación de los alimentos y la generación de energía requiere de O₂ molecular, sin embargo, en la célula se producen reducciones parciales del O₂ que originan la formación de las denominadas especies reactivas de oxígeno (ROS de aquí en adelante, por sus siglas en inglés) que son radicales libres y especies reactivas no radicales (Figura 34). Entre las ROS más estudiadas se encuentran los radicales superóxido (O₂⁻), el radical hidroxilo (OH[•]), además de especies no radicalarias como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y especies reactivas de nitrógeno (Halliwell 1999).

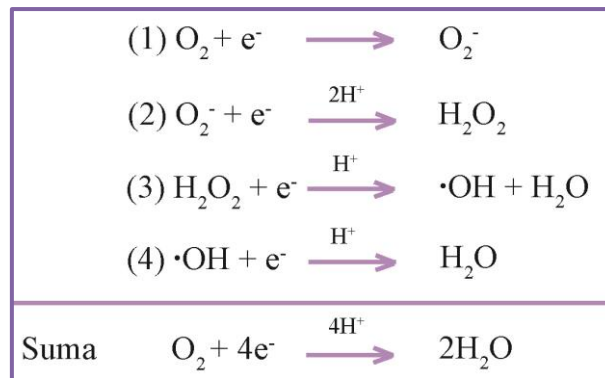


Figura 34. En el proceso de reducción de oxígeno molecular a agua, la reducción parcial del oxígeno resulta en la formación del radical superóxido (1), luego el peróxido de hidrógeno (2) y por último el radical hidroxilo (3). Adaptado de Di Giulio *et al.* (1989).

Los organismos mantienen niveles bajos de radicales libres a través de mecanismos antioxidantes (Fridovich 1995; Halliwell 1999). Si estos radicales son excedidos dentro de la célula y las defensas antioxidantes no son suficientes para neutralizarlos, puede desencadenarse dentro de la misma el estrés oxidativo (Davies 1995).

Las toxinas oxidantes, los metales pesados, la radiación UV, la salinidad y la temperatura son capaces de promover el estrés oxidativo en animales (Lesser 2006). Asimismo, muchos compuestos químicos sintetizados e introducidos por el hombre pueden inducir la formación de ROS en animales y plantas acuáticas (Winston y Di Giulio 1991; Leonard *et al.* 2004). Los contaminantes asociados a la actividad portuaria como compuestos orgánicos de estaño (TBT y sus derivados), hidrocarburos poliaromáticos, organoclorados y metales pueden inducir la formación de ROS (Cheung *et al.* 2001; Nicholson y Lam 2005). Cuando los organismos están expuestos a contaminantes los metabolizan y depuran en mayor o menor medida, pero debido a las características fisicoquímicas de muchos de ellos, el sistema antioxidante puede no ser suficiente para contrarrestar el daño, produciéndose así la oxidación de moléculas

esenciales para el correcto funcionamiento del individuo (Cheung *et al.* 2001). El daño oxidativo puede afectar a las moléculas lipídicas que constituyen las membranas celulares, a los aminoácidos que componen enzimas que controlan procesos claves y también al ADN (Kappus y Sies 1981; Sohal *et al.* 2002). El sistema antioxidante se compone de diferentes enzimas y de protectores no enzimáticos, cada uno con funciones específicas dentro del organismo (Di Giulio *et al.* 1989; de Zwart *et al.* 1999). Las principales enzimas involucradas en la defensa de un organismo son Superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión S- transferasa (GST). Otros antioxidantes de naturaleza no enzimática que juegan un rol fundamental en la defensa celular son el glutatión reducido (GSH), el ácido lipoico, la vitamina E, vitamina C, entre otros (Manduzio *et al.* 2005).

A raíz del estudio de contaminantes introducidos por el hombre, y del incremento de las concentraciones en el ambiente, se determinaron una serie de biomarcadores en los organismos que podrían evidenciar la exposición de estos a distintos contaminantes (Sarkar *et al.* 2006). Los biomarcadores son respuestas metabólicas, bioquímicas y/o fisiológicas “específicas” inducidas por la exposición a contaminantes (Boelsterli 2003). De esta manera la evaluación de la oxidación de biomoléculas, los cambios en los niveles de antioxidantes y los mecanismos de detoxificación estarían incluidos dentro de tal definición. La característica más importante es que a través de ellos puede evaluarse la magnitud del daño ocasionado a los organismos (Dahlhoff 2004) y pueden ser utilizados como alerta temprana de exposición a contaminantes.

La presencia/inducción de metalotioneínas, alteración en la estructura del ADN (Almeida *et al.* 2003) y la peroxidación de los lípidos son biomarcadores muy utilizados en ecotoxicología (Kelly *et al.* 2007). Esta última, caracterizada por la alteración en la composición de las bicapas lipídicas de las membranas celulares, que confiere cambios en la permeabilidad y rigidez de la misma y ocasiona alteraciones en el funcionamiento celular (Zhou *et al.* 2010).

La peroxidación lipídica en particular, ha sido ampliamente estudiada sobre muchos organismos como indicador de estrés oxidativo (Viarengo *et al.* 1990; Ribera *et al.* 1991; Doyotte *et al.* 1997; Pannunzio y Storey 1998; Roméo *et al.* 2000; Pampanin *et al.* 2005). La mayoría de estas investigaciones se han realizado con distintas especies de bivalvos, utilizadas como especies indicadoras de contaminación, por sus hábitos de vida y tipo de alimentación (filtradores), además de su gran capacidad para bioacumular contaminantes (Ribera *et al.* 1991; Viarengo y Canesi 1991; Cheung *et al.* 2001;

Almeida *et al.* 2005). En otros grupos de invertebrados, peces, mamíferos y aves, los parámetros de estrés también han sido estudiados (Di Giulio *et al.* 1989; Rodríguez-Ariza *et al.* 1993; Regoli *et al.* 1997; Gennari *et al.* 2000; Roméo *et al.* 2000; Manduzio *et al.* 2005; Buttemer *et al.* 2010; Donaghy *et al.* 2010; Fernández-Dávila *et al.* 2012). En los moluscos (como ya se destacó en el capítulo 2), el principal sitio de acumulación de xenobióticos a través de la dieta es la glándula digestiva y como consecuencia, es el principal blanco de disrupción oxidativa (Malanga *et al.* 2004). En gasterópodos, la peroxidación oxidativa puede ocurrir por la presencia de TBT en los organismos y este mecanismo ha sido estudiado por (Zhou *et al.* 2010). Estos autores, a través de estudios de laboratorio con el gasterópodo *Haliotis diversicolor supertexta* concluyen que el TBT afecta al metabolismo de los lípidos, produciendo cambios histopatológicos en la glándula digestiva.

En Sudamérica, los niveles de daño oxidativo y enzimas antioxidantes fueron principalmente estudiados en especies de bivalvos marinos y de agua dulce (Bainy *et al.* 2000; Almeida *et al.* 2003; Sabatini *et al.* 2009; Giarratano *et al.* 2010; Sabatini *et al.* 2011; Di Salvatore *et al.* 2013; Giarratano *et al.* 2013). No se han realizado, sin embargo, estudios de determinación de parámetros de estrés oxidativo en gasterópodos marinos de Patagonia expuestos a contaminación portuaria y es de especial interés explorar este efecto en una especie como *B. globulosus* que presenta una alta bioacumulación de compuestos tóxicos en sus tejidos.

Objetivo

- Analizar los parámetros de estrés oxidativo en el gasterópodo *Buccinanops globulosus* en relación a los niveles de actividad portuaria e imposex presentes en golfo Nuevo.

Materiales y métodos

Para la obtención de los organismos se realizó un único muestreo en marzo de 2011. El área de estudio comprendió tres sitios dentro de golfo Nuevo: el muelle Luis Piedra Buena (MLP), de actividad marítima intensa; el sitio Punta Cuevas (PC) de actividad media y el sitio Cerro Avanzado (CA) de actividad marítima baja (sitios 2, 3 y 6 respectivamente en la Figura 35).

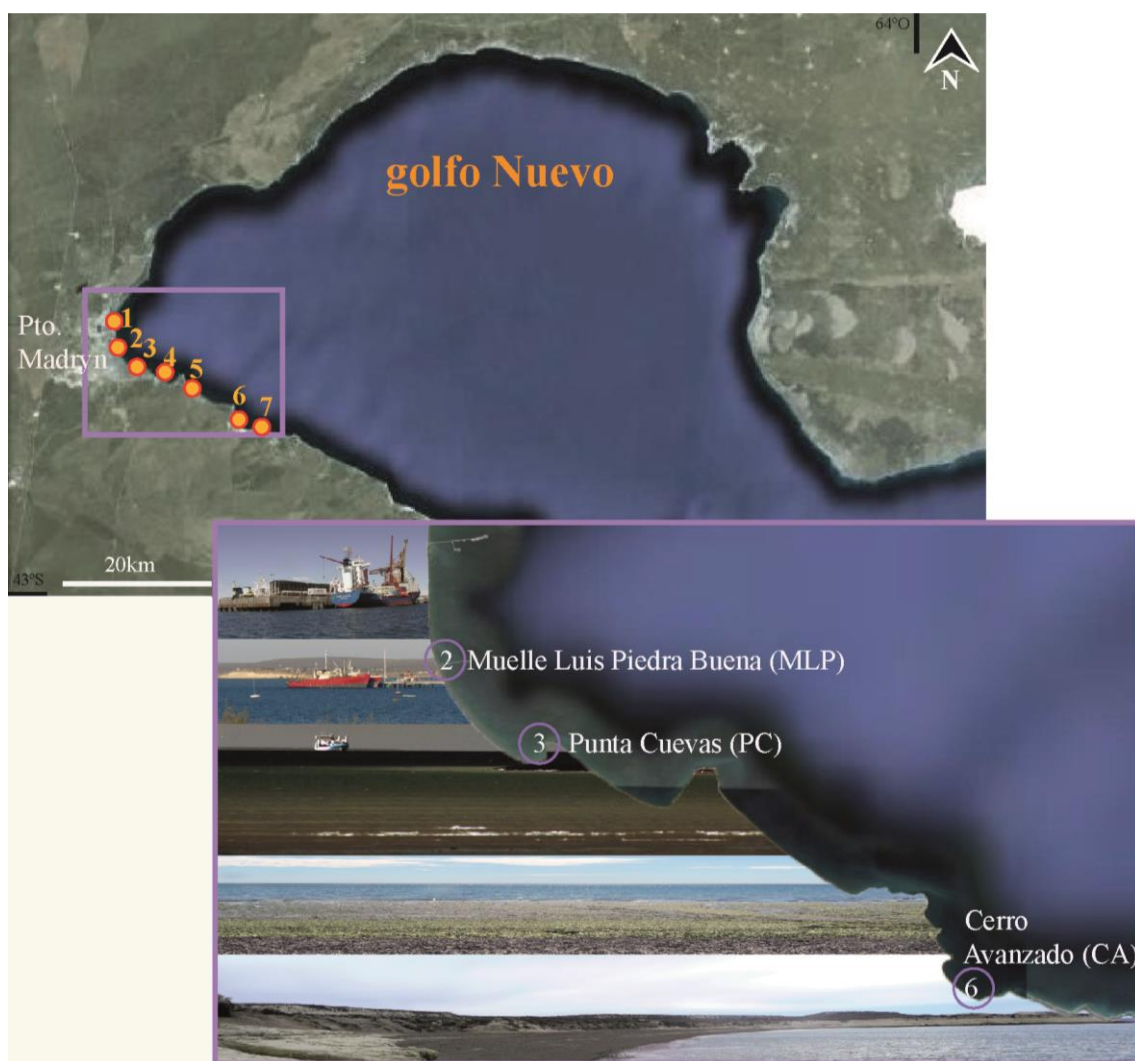


Figura 35. Sitios de muestreo de *Buccinanops globulosus* en el golfo Nuevo.

Se tomaron medidas de talla (largo total de la concha), peso total relativo a la talla y parámetros de imposex (% imposex, FPL y MPL). Se diseccionó cuidadosamente cada gasterópodo y se tomó una submuestra de 9 individuos, de los cuales se obtuvo la glándula digestiva, principal órgano blanco de estrés oxidativo. Esta fue pesada en balanza digital (0,01g), envuelta en papel aluminio y conservada en ultrafreezer a -80°C hasta su procesamiento.

Determinación de parámetros de estrés oxidativo

La determinación de los parámetros de estrés oxidativo en glándula digestiva de *B. globulosus* fue realizada en colaboración con el Dr. Sebastián Sabatini del Laboratorio de Enzimología, Estrés y Metabolismo (dirigido por la Dra. Ríos de Molina), Departamento de Química Biológica-IQUIBICEN CONICET, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, según se detalla a continuación.

Los análisis se realizaron sobre las fracciones solubles de homogenatos de la glándula digestiva en una relación peso volumen 1:5 utilizando buffer fosfato 0,154M (pH 7), conteniendo inhibidores de proteasas (benzamidina 10mM y fluoruro de fenilmetilsulfonil, PMSF, 0,5mM). Se centrifugó a 12.000 xg durante 30min a 4°C y se utilizó el sobrenadante para las sucesivas determinaciones.

El contenido de proteínas solubles fue determinado según Bradford (1976). Se determinó la actividad superóxido dismutasa (SOD) mediante la técnica de inhibición de la reducción fotoquímica del NBT (Nitrobluetetrazolium) utilizando la técnica de Beauchamp y Fridovich (1971) y monitoreando la absorbancia a 560nm.

La actividad glutatión-S-transferasa (GST) fue determinada espectrofotométricamente monitoreando la absorbancia de 340nm de acuerdo al método de Habig *et al.* (1974), utilizando como sustrato 1-cloro-2,4dinitrobenzoceno (CDNB).

Se determinó el contenido de glutatión reducido (GSH) mediante el método de Anderson (1985), monitoreando la absorbancia a 412nm. Se realizó una curva de calibración con glutatión para poder determinar el contenido de GSH presente en las muestras.

Se evaluó el daño a lípidos mediante la determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) como el malondialdehido (MDA) que es el producto mayoritario final de la peroxidación de los lípidos. Esta determinación se realizó por el método espectrofotométrico del ácido tiobarbitúrico (TBA) según Vavilin (1998).

Análisis de datos

Todos los organismos utilizados para este estudio fueron sexados y analizados para imposex según se detalla en la sección de materiales y métodos generales. Se excluyeron del análisis los machos debido a la baja proporción dentro de las muestras. Se validaron los supuestos de homocedacia (prueba de Levene $p < 0,05$) y normalidad (prueba Shapiro-Wilk $p < 0,05$). Ante la ausencia de normalidad, se utilizó la transformación logaritmo natural (ln) para la variable respuesta. Las pruebas paramétricas utilizadas fueron *t-Student* ($p < 0,05$) para comparaciones entre dos medias o *ANOVA de un factor* ($p < 0,05$) y contrastes de *Tukey* para comparaciones entre más de dos medias. En el caso de no cumplir con los supuestos mencionados, se utilizaron las pruebas no paramétricas de *Mann-Whitney* ($p < 0,05$) para comparaciones entre dos variables y *Kruskal Wallis* ($p < 0,05$) con contrastes a *posteriori* de *Dunn* para comparaciones entre más de 2 variables. En todos los casos se utilizó el software

XLStat 2012[®]. En los resultados de las comparaciones estadísticas se informa la prueba utilizada, el estadístico, la probabilidad asociada al estadístico, los grados de libertad y el número total de observaciones.

Resultados

Se analizaron en total 64 especímenes hembra de la especie *Buccinanops globulosus*, 25 correspondientes al sitio MLP, 19 al sitio PC y 20 del sitio CA. Estos especímenes fueron incluidos en los resultados del capítulo 1 de esta Tesis. La talla y el peso total de los organismos fueron significativamente diferentes entre los tres sitios MLP (talla: *ANOVA de un factor*, $F=27,306$, $p<0,0001$, $Gl=2$, $N=64$ y peso total/talla: *ANOVA de un factor*, $F=46,006$, $p<0,0001$, $Gl=2$, $N=64$), la media de la talla y el peso total del sitio MLP fue mayor y la media de ambas variables en PC fue menor (Tabla 15).

Se encontraron diferencias significativas para la variable FPL (promedio del largo del pene de las hembras) entre los sitios donde las hembras presentaron desarrollo de imposex (con pene o primordio de pene), siendo mayor el valor para el sitio MLP en relación a PC (prueba de *Mann-Whitney*, $U=450,000$, $p<0,0001$, $N=44$) (Tabla 15).

Tabla 15. Talla, peso total/talla (media±desvío estándar) e índices de imposex (% imposex y FPL) medidos en *B. globulosus*.

SITIO	N°♀	Peso total/talla	Talla (mm)	% Imposex	FPL (mm)
Muelle Luis Piedra Buena (MLP)	25	0,34±0,05	40,72±3,46	100	4,51
Punta Cuevas (PC)	19	0,20±0,04	32,84±3,42	94,74	1,11
Cerro Avanzado (CA)	20	0,24±0,05	35,64±3,93	5	0,50

No se encontraron diferencias significativas en el contenido de proteínas entre los organismos de los 3 sitios de estudio (*ANOVA de un factor*, $F=0,220$, $p=0,804$, $Gl=2$, $N=27$), Figura 36. Todas las variables de estrés oxidativo fueron normalizadas por el contenido de proteínas.

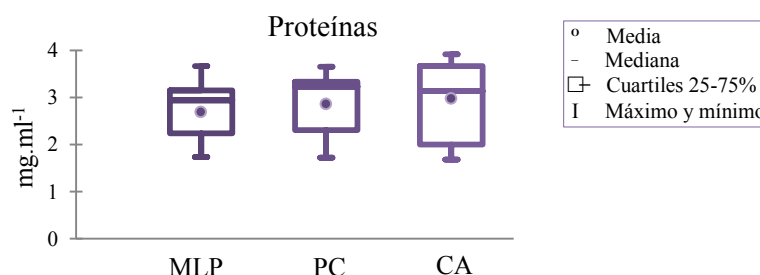


Figura 36. Contenido de proteínas en las muestras de glándula digestiva de *B. globulosus* provenientes de cada sitio. Abreviaturas: CA: Cerro Avanzado, MLP: Muelle Luis Piedra Buena, PC: Punta Cuevas.

Se obtuvieron diferencias significativas en todos los parámetros de estrés oxidativo medidos entre los especímenes de cada sitio, excepto en la actividad Glutación-S-transferasa (GST) (*ANOVA de un factor*, $F=2,342$, $p=0,118$, $Gl=2$, $N=27$). De este modo, la actividad GSH fue significativamente diferente entre los sitios (*ANOVA de un factor*, $F=8,148$, $p=0,002$, $Gl=2$, $N=27$). El mismo patrón de significancia se observó en la actividad SOD (*ANOVA de un factor*, $F=13,277$, $p=0,0001$, $Gl=2$, $N=27$) y el daño a lípidos (TBARS), (*ANOVA de un factor*, $F=6,357$, $p=0,006$, $Gl=2$, $N=27$) (Figura 37).

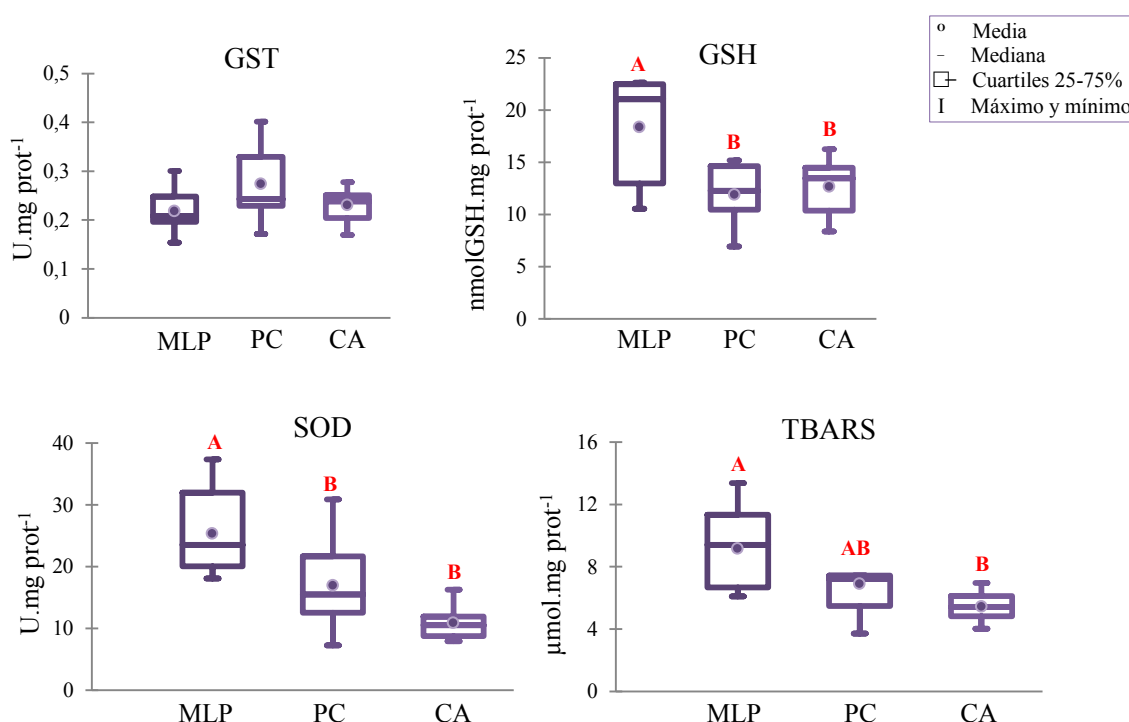


Figura 37. Parámetros de estrés oxidativo en *B. globulosus* para cada sitio estudiado. Abreviaturas: GST: glutación-s-transferasa, GSH: glutación reducido, SOD: actividad superóxido dismutasa, TBARS: niveles de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico. MLP: Muelle Luis Piedra Buena, PC: Punta Cuevas, CA: Cerro Avanzado. Las letras indican grupos de asociación significativa a partir de los contrastes realizados.

Discusión

Así como los contaminantes pueden bioacumularse en los tejidos de los organismos (Martin 1979; Dowson *et al.* 1993; Hall *et al.* 1997; Mensink *et al.* 1997; Belfroid *et al.* 2000; Strand *et al.* 2003; Borgå *et al.* 2004; Davies *et al.* 2006; DeForest *et al.* 2007), pueden también afectar los mecanismos de defensa (Regoli y Principato 1995; Cima *et al.* 1999; Chandran *et al.* 2005; Wang *et al.* 2005; Chen *et al.* 2011).

Recientemente se ha determinado la concentración de TBT en el gasterópodo *Odontocymbiola magellanica* que habita la misma zona de muestreo que la estudiada en

esta Tesis (del Brío 2011). Asimismo, se han detectado metales traza (ver capítulo 2) e hidrocarburos poliaromáticos (Torres *et al.* 2013) en *Buccinanops globulosus* en la misma zona de estudio, que evidencian la capacidad de los gasterópodos para bioacumular contaminantes de variada composición. Los biomarcadores de estrés oxidativo determinados en este trabajo indican que los organismos presentes en el sitio de mayor actividad portuaria (MLP), si bien presentan aumentadas sus defensas antioxidantes (mayor actividad SOD y niveles de GSH) no son suficientes para contrarrestar el daño oxidativo observado en lípidos (Figura 37).

Los organismos del sitio con tráfico marítimo intermedio (PC) aunque no presentan diferencias estadísticas con los del sitio de menor actividad portuaria (CA), muestran una tendencia hacia valores mayores en todas las variables medidas (excepto GST). Debido a que no existen trabajos en la zona de estudio con gasterópodos, se realizarán comparaciones con datos previos en bivalvos. Los autores de dos estudios recientes realizados en sitios dentro del golfo Nuevo con el bivalvo *Aulacomya atra* (Di Salvatore *et al.* 2013; Giarratano *et al.* 2013), utilizaron al sitio PC como sitio control, encontrando diferencias estacionales entre los parámetros de estrés oxidativo, así como una fuerte correlación con los parámetros ambientales más que con los metales medidos (Cu, Cd, Zn, Fe, entre otros). Esta asociación entre los parámetros ambientales y los indicadores de estrés fue reportada además en experimentos con especies de gasterópodos marinos expuestos a diferentes condiciones de temperatura y salinidad (Deschaseaux *et al.* 2011) y condiciones de anoxia (Pannunzio y Storey 1998) en especies de otros países.

En este trabajo, los parámetros de imposex se correspondieron con el tráfico marítimo y la presencia de contaminantes como TBT, metales e hidrocarburos medidos en la zona en los últimos años (Gil *et al.* 1996; Commendatore y Esteves 2007; Massara Paletto *et al.* 2008; Bigatti *et al.* 2009; del Brío 2011; Torres *et al.* 2013, y el presente trabajo). A su vez la presencia de estos contaminantes podría ser la responsable del estrés oxidativo, registrado aquí en *B. globulosus* mediante la actividad de las principales enzimas involucradas en la detoxificación de compuestos nocivos. Del mismo modo se observó la asociación negativa con el daño producido en las células, medido a través del daño a los lípidos. Las hembras de *B. globulosus* de la zona de mayor tráfico marítimo registraron 100% de imposex con valores de FPL significativamente mayores que las hembras de PC y CA así como una actividad enzimática antioxidante alta, mientras que las pertenecientes a las zonas de impacto

medio (PC) y bajo (CA) registraron menores valores tanto de imposex como de actividad enzimática. La respuesta antioxidante ante la exposición a contaminantes es dificultosa de predecir (Regoli 2000) ya que se han reportado grandes variaciones dependiendo de la clase de químico, el tipo de exposición y la fase del ciclo biológico de los organismos estudiados (Livingstone 2001). Por esto es que no se pueden atribuir los cambios observados en las respuestas oxidativas medidas en la glándula digestiva de hembras de *B. globulosus* únicamente a la presencia de TBT (inferida a través de la ocurrencia de imposex, el tráfico marítimo y datos recientes medidos en la zona), ya que los distintos contaminantes registrados en la zona del MLP podrían estar influyendo en el balance oxidativo y los parámetros de imposex registrados para *B. globulosus* durante este trabajo.

Los resultados obtenidos para la población de CA podrían utilizarse como valores de referencia para futuras comparaciones, teniendo en cuenta además la baja ocurrencia de imposex y el bajo tráfico marítimo observado en ese sitio.

En otros estudios realizados con gasterópodos marinos, con incidencia de imposex o expuestos a concentraciones de metales como Cd, Zn y Cu, se ha observado una pérdida de peso en los animales, la cual podría estar asociada al costo metabólico requerido en los procesos de detoxificación además de los de producción de antioxidantes (Leung y Furness 1999; Bigatti y Carranza 2007; Márquez *et al.* 2011). Las diferencias observadas en el peso y la talla en este estudio muestran un patrón inverso, indicando que estos parámetros por sí solo no estarían afectados por los niveles de estrés oxidativo. Asimismo, los resultados del capítulo 1, indicaron que los especímenes de la zona de alto tráfico marítimo (MLP) con las del sitio de menor tráfico marítimo (CA) son similares en talla y peso a pesar de presentar indicadores de estrés y parámetros de imposex máximos y mínimos respectivamente. El mismo patrón se observó a través del nivel de proteínas, que fue similar en los gasterópodos de los tres sitios (Figura 37).

La única enzima que no mostró un claro patrón de variación con el incremento del imposex y el tráfico marítimo fue GST. Esta enzima, ha sido estudiada en moluscos bivalvos, y se ha observado que los niveles se incrementan en función de la actividad detoxificante del organismo (Almeida *et al.* 2005; Huang *et al.* 2005), pero también su comportamiento es el más conservado entre todos los parámetros comúnmente utilizados como biomarcadores de contaminación (Livingstone 1988). Esto podría deberse al efecto que la exposición crónica de los gasterópodos a contaminantes ejerce

sobre el comportamiento de la enzima, reduciendo su actividad con el tiempo y la edad de los individuos. En algunos casos, se ha observado un aumento de la actividad metabólica relacionada con la biodisponibilidad de alimento o la detoxificación, así como el mejoramiento de las defensas en respuesta a la exposición prolongada a compuestos como el cobre (Sabatini *et al.* 2011).

La peroxidación de lípidos ha sido reportada como la mayor contribución a la pérdida de la función celular bajo condiciones de estrés oxidativo (Valavanidis *et al.* 2006). La peroxidación de los lípidos de las membranas microsomales, que afecta a la permeabilidad de la célula, puede llevar a la liberación de calcio y a una activación descontrolada de proteasas y lipasas dependientes del mismo (Storey 1996). Estas alteraciones en la membrana han sido estudiadas en bivalvos como resultado de la exposición a metales y otros compuestos tóxicos (Viarengo *et al.* 1990; Viarengo *et al.* 1991). En el presente trabajo, *B. globulosus* presentó daño a lípidos significativamente mayor en la zona portuaria en comparación con el sitio de menor actividad de embarcaciones, que podría ser atribuible a la presencia de contaminantes en el área. Se ha registrado una gran producción de ROS en el proceso de acumulación y metabolismo de TBT en bivalvos expuestos (Huang *et al.* 2005), así como diferente actividad de las enzimas antioxidantes y producción de compuestos no deseados en las células (Jia *et al.* 2009).

Este es el primer estudio de evaluación de biomarcadores de estrés oxidativo en presencia de contaminantes asociados a una zona de tráfico marítimo para una especie de gasterópodo en Argentina. Es necesario realizar un estudio integrado considerando otros biomarcadores que ayuden a entender los procesos ecotoxicológicos en relación a los efectos que se observan sobre los gasterópodos marinos de la zona.



CAPÍTULO 4-Variación en la
forma de la concha de
Buccinanops globulosus,
asociada a un gradiente de
imposex

Introducción

La morfometría geométrica (MG) se define como la fusión entre la geometría y la biología (Bookstein 1982), a través del estudio de la forma en un espacio bi o tridimensional y su covariación con otras variables. Este tipo de enfoque permite describir y comparar formas de organismos o estructuras particulares (Rohlf y Marcus 1993) ofreciendo la ventaja de poder analizar el tamaño y la forma de manera separada, así como una mejor visualización e interpretación de los resultados (Zelditch *et al.* 2004). En reemplazo de variables lineales como largo y ancho, los métodos de morfometría, utilizan un conjunto de puntos o coordenadas morfométricas en 2 y 3 dimensiones. A estos puntos se los ha denominado *landmarks* y se definen como caracteres basados en coordenadas, de los cuales se puede deducir la forma de los organismos y luego compararla mediante la utilización de estadística multivariada. La forma es toda la información geométrica que permanece una vez eliminados del objeto los efectos de traslación, rotación y escala (Bookstein 1991), y es por esto que forma y tamaño son estudiadas de manera independiente. Existen tres tipos de *landmarks* (Bookstein 1991): *landmarks* de tipo I, tradicionales o anatómicos que son puntos matemáticos cuya supuesta homología de un individuo a otro es respaldada por una evidencia o significancia biológica, *landmarks* de tipo II, *fuzzy* o matemáticos que son puntos matemáticos cuya supuesta homología de un individuo a otro es respaldada únicamente por la geometría y no por evidencia anatómica y *landmarks* de tipo III, *semilandmarks* que son puntos localizados en cualquier lugar a lo largo de un contorno o entre dos *landmarks* anatómicos o matemáticos.

Estudios realizados con morfometría clásica han demostrado que factores ambientales como el nivel de marea, la exposición al oleaje, la disponibilidad de comida y la presencia de depredadores pueden causar efecto sobre los organismos alterando su forma (Vermeij 1972; Johannesson 1986, entre otros). Por otro lado, la presencia de sustancias tóxicas como metales pesados, TBT e hidrocarburos han sido también evaluadas por su potencial para producir cambios en la morfología y el funcionamiento fisiológico de los organismos (Márquez *et al.* 2011; Smolarz y Bradtke 2011, entre otros).

El estudio de la variación en la forma en especies de moluscos a partir de parámetros morfogeométricos ha sido empleado con diversos fines (ver revisión completa en Rufino *et al.* 2013). Los más reportados son aquellos en los cuales estas técnicas permiten detectar diferencias entre poblaciones de la misma especie (Conde-

Padín *et al.* 2007) o ecotipos, diferenciación entre especies (Urrea *et al.* 2007), así como la utilización de patrones de variación morfométricos como indicador de contaminación o cambios en el ambiente (Márquez *et al.* 2011).

La mayoría de los compuestos que resultaron ser tóxicos para los organismos han sido prohibidos luego de determinarse los efectos deletéreos que estos producían sobre los organismos. En este contexto, la prohibición del TBT en las pinturas anti-incrustantes surge después de registrarse deformaciones en las valvas de *Crassostrea gigas*, una especie de molusco bivalvo de alto valor económico (Alzieu *et al.* 1986). A través de una serie de experimentos se comprobó que el TBT utilizado en las pinturas de las embarcaciones era la sustancia responsable de tales deformidades (Waldock y Thain 1983; Alzieu 1986; Alzieu *et al.* 1986; Scammell *et al.* 1991; Dyrinda 1992; Waldock *et al.* 1996). En consecuencia, hoy se sabe que los compuestos orgánicos de estaño no sólo producen alteraciones en aspectos reproductivos como el desarrollo del fenómeno de imposex (Gibbs y Bryan 1987) e intersex en gasterópodos y bivalvos (Oehlmann *et al.* 1998a; Chesman y Langston 2006) sino que también han resultado perjudiciales en el desarrollo de las valvas (Chagot *et al.* 1990; Ruiz *et al.* 1994).

En Argentina, algunos estudios han evaluado la relación entre la forma de los organismos y parámetros ambientales tales como el oleaje, la salinidad, entre otros (Tablado y López Gappa 2001; Nieto Vilela *et al.* 2012) así como en relación al imposex (Bigatti y Carranza, 2007) y contaminantes portuarios en gasterópodos (Márquez *et al.* 2011; Núñez *et al.* 2012; Laitano *et al.* 2013).

Como se dijo anteriormente, *Buccinanops globulosus* es una especie de sensibilidad considerable a la presencia de contaminantes en el ambiente (Bigatti *et al.* 2009, y resultados de esta Tesis). Por esta razón resulta interesante evaluar el efecto de parámetros ambientales como la contaminación portuaria sobre la forma de los organismos expuestos.

Objetivos

- Describir la morfología de la concha del gasterópodo *Buccinanops globulosus* en seis sitios en golfo Nuevo mediante técnicas de morfometría geométrica (MG).
- Estudiar si las formas encontradas son diferentes y si se relacionan con la ocurrencia del fenómeno de imposex asociado a la contaminación por Tributilestaño (TBT) u otros compuestos tóxicos presentes en zonas portuarias.

Materiales y métodos

El muestreo de *Buccinanops globulosus* incluyó seis sitios dentro de golfo Nuevo. Dos zonas de alto tráfico marítimo ubicadas dentro de la ciudad de Puerto Madryn (Muelle Luis Piedra Buena y Punta Cuevas), dos de tráfico intermedio a bajo (Punta Este y Playa Paraná) y dos de tráfico de embarcaciones bajo (Cerro Avanzado y Ambrossetti) (sitios 2 a 7 en la Figura 38). Se recolectaron los especímenes en cada sitio de estudio mediante trampas cebadas con carne ovina en descomposición, que fueron colocadas durante las mareas bajas según se indicó en los materiales y métodos generales de esta Tesis. Todas las muestras fueron obtenidas en el mes de marzo de 2010.

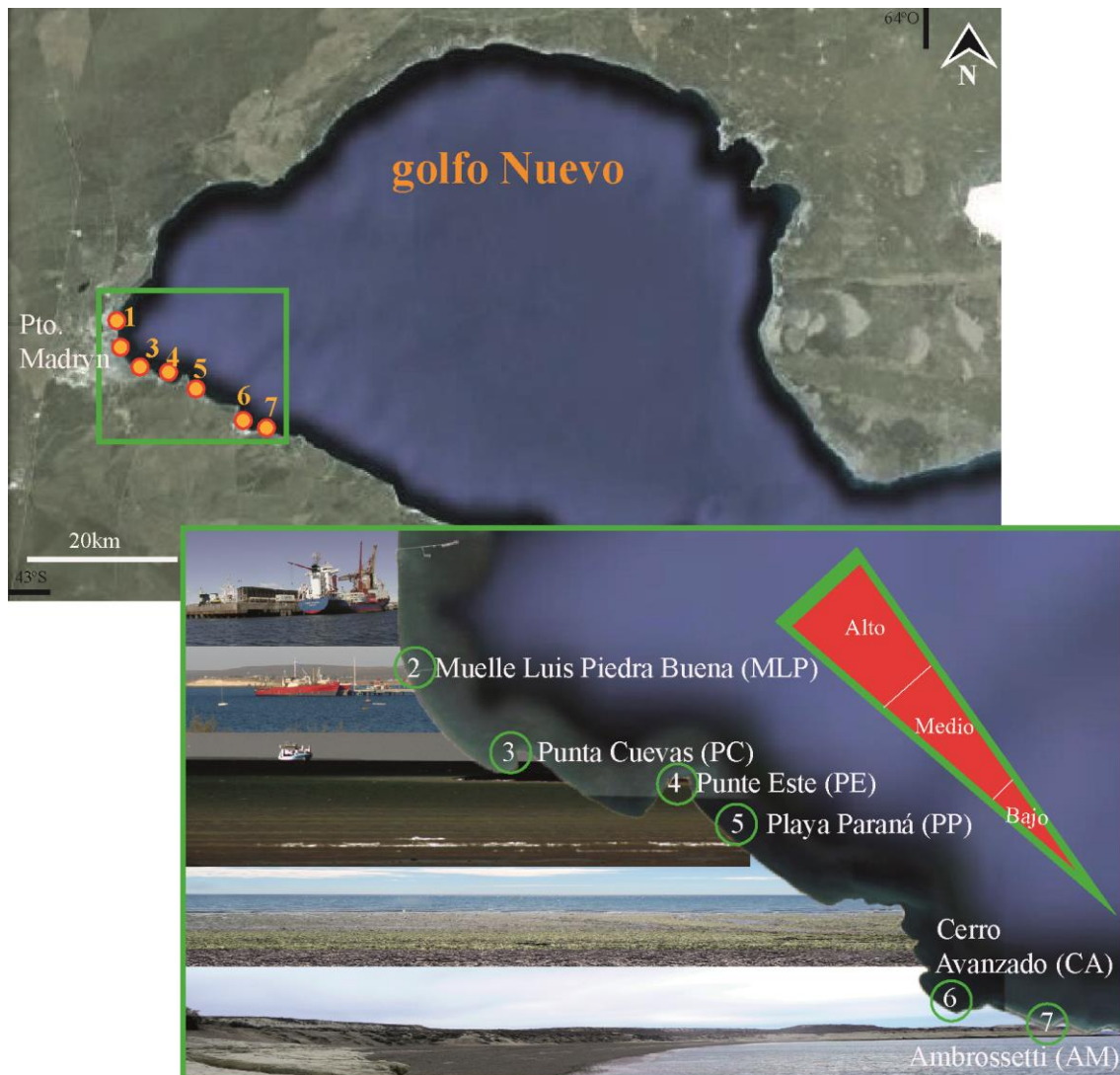


Figura 38. Sitios de muestreo dentro del golfo Nuevo. En rojo se muestra el gradiente de imposex y de actividad marítima en la zona.

El análisis morfogeométrico se basó en la obtención de una fotografía de la concha de cada espécimen recolectado (Figura 39). Cada individuo fue fijado sobre una

base de plastilina para evitar el cabeceo (movimiento en la dirección anterior-posterior según el eje transversal) y el roloido (rotación según el eje longitudinal en sentido dorsal-ventral). Se tomó una fotografía en la vista abapertural utilizando una escala como referencia. Luego cada individuo fue analizado en laboratorio para los cuales se registraron el peso y la talla, se determinó el sexo y se calcularon los índices de imposex (% imposex, FPL).

Se creó un archivo a partir de las imágenes utilizando el software TPS util (Rohlf 2004c). Sobre cada imagen se definieron 11 *landmarks* y 11 *semilandmarks* que capturan la forma de la concha de *B. globulosus* según muestra la Figura 39. Para esto se utilizó el software TPS dig2 (Rohlf 2004a).

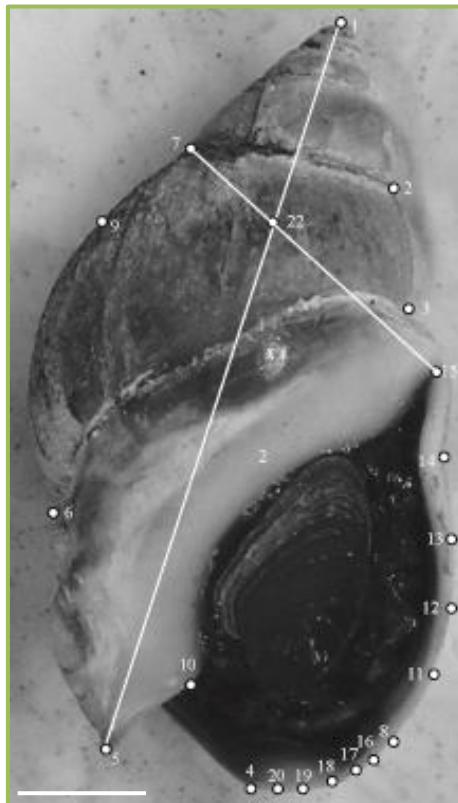


Figura 39. Fotografía de la vista abapertural de la concha de un individuo de *B. globulosus* digitalizada con 11 *landmarks* y 11 *semilandmarks*. 1: ápice; 2 y 7: marcas de sutura de la anteúltima vuelta del anfracto; 3 y 6: marcas de sutura de la última vuelta del anfracto. 4: extremo final del labio externo; 5: final del canal sifonal; 8 y 9: puntos tangenciales a la apertura de la concha ubicados sobre los laterales; 10: inicio del canal sifonal; 11-14 y 16-21: *semilandmarks* ubicados sobre la apertura y el canal sifonal; 15: inicio de la apertura de la concha; 22: intersección entre la línea que forman los *landmarks* 1 con 5 y 15 con 7. Escala=5mm.

Análisis de datos

Todos los organismos utilizados para este estudio fueron sexados y analizados para imposex según se detalla en la sección de materiales y métodos generales. Se excluyeron del análisis los machos debido a la baja proporción dentro de las muestras.

Se validaron los supuestos de homocedacia (prueba de Levene $p < 0,05$) y normalidad (prueba Shapiro-Wilk $p < 0,05$). Ante la ausencia de normalidad, se utilizó la transformación logaritmo natural (\ln) para la variable respuesta. Las pruebas paramétricas utilizadas fueron *t-Student* ($p < 0,05$) para comparaciones entre dos medias o *ANOVA de un factor* ($p < 0,05$) y contrastes de *Tukey* para comparaciones entre más de dos medias. En el caso de no cumplir con los supuestos mencionados, se utilizaron las pruebas no paramétricas de *Mann-Whitney* ($p < 0,05$) para comparaciones entre dos variables y *Kruskal Wallis* ($p < 0,05$) con contrastes a *posteriori* de Dunn para comparaciones entre más de 2 variables. En todos los casos se utilizó el software XLStat 2012[®]. En los resultados de las comparaciones estadísticas se informa la prueba utilizada, el estadístico, la probabilidad asociada al estadístico, los grados de libertad y el número total de observaciones. Sólo se analizaron los datos y las fotografías correspondientes a individuos hembra adultos, debido a la baja proporción de machos en las muestras obtenidas.

Se utilizó la serie de programas TPS para el análisis de los datos morfogeométricos (Rohlf 2004a; b). Una vez obtenidas las coordenadas de landmarks y semilandmarks se eliminaron los efectos de rotación, traslación y escala, mediante el análisis de Procrustes (Rohlf y Slice 1990) con el programa TPS Relw (Rohlf 2004b). Este programa, a su vez, contiene una función que permite “relajar” los *semilandmarks* a lo largo de las tangentes al contorno para minimizar la energía de torcimiento (*bending energy*, en inglés) hasta acordar con una configuración de referencia (Bookstein 1997).

Las coordenadas de Procrustes de los especímenes alineados se utilizaron como variables de forma para realizar los análisis estadísticos multivariantes mediante el software MorphoJ (Klingenberg 2011). Se calculó un estimador de tamaño denominado en MG como *Centroid Size* (CS), que se obtiene aplicando la raíz cuadrada a la suma de las distancias al cuadrado desde un conjunto de *landmarks* al centroide que definen (Zelditch *et al.* 2004). El CS retiene toda la información de tamaño y en ausencia de alometría es el único estimador de tamaño que no está correlacionado con la forma (Bookstein 1991). A este último parámetro se lo utilizó para comparar el tamaño de los gasterópodos a lo largo del gradiente representado por los seis sitios de estudio. La alometría (variación en la forma asociada al tamaño) se puso a prueba mediante un análisis de regresión multivariada ($p < 0,05$), con 10000 iteraciones, entre la forma como variable dependiente (coordenadas de Procrustes alineadas) y el tamaño como variable

independiente (*centroid size*).

Para la descripción de las diferencias en la forma de la concha entre los sitios se realizó además un análisis de conglomerado jerárquico con inferencia estadística ($p < 0,05$) y encadenamiento simple así como un Análisis Canónico para maximizar las diferencias de forma entre los grupos. Por último, se realizó una regresión multivariada entre las coordenadas de Procrustes como variable independiente y el % de imposex como variable dependiente utilizando el software MorphoJ (Klingenberg 2011).

Resultados

Se analizaron en total 321 individuos hembra de la especie *Buccinanops globulosus* correspondientes a los seis sitios de estudio. Los individuos analizados en el presente capítulo pertenecientes a los sitios MLP, PC y CA fueron incluidos en los resultados del capítulo 1 de esta Tesis. La Tabla 16 muestra el resultado de los índices de imposex calculados en las hembras. En general, las de la zona del MLP presentaron los mayores valores de imposex, disminuyendo hasta valores mínimos en la zona de Cerro Avanzado y Ambrossetti. Se encontraron diferencias significativas en el largo del pene de las hembras entre los sitios de estudio (prueba de *Kruskal-Wallis*, $K=117,197$, $p < 0,0001$, $N=191$), siendo las hembras de la zona del MLP las que registraron los penes más desarrollados (6,31mm valor máximo observado en la muestra analizada). El largo del pene de las hembras resultó significativamente diferente en MLP en relación al de los otros tres sitios donde las hembras presentaron al menos un primordio de pene. En el sitio Cerro Avanzado el índice FPL no fue calculado debido a la ocurrencia de una única hembra con desarrollo de un vaso deferente.

Tabla 16. Índices de imposex (FPL y % imposex) en hembras de *B. globulosus* para cada sitio. Abreviaturas: FPL: promedio del largo del pene de las hembras con imposex.

Sitio	N♀	% imposex	FPL (mm)
Muelle Luis Piedra Buena (MLP)	56	100	3,4
Punta Cuevas (PC)	63	92	1,12
Punta Este (PE)	65	93,8	1
Playa Paraná (PP)	49	32,6	1
Cerro Avanzado (CA)	61	1,6	-
Ambrossetti (AM)	27	0	-

Se registraron diferencias significativas en el estimador de tamaño o *centroid size* (CS) (prueba de *Kruskal-Wallis*, $K=191,915$, $p < 0,0001$, $N=321$), y el peso de la concha entre todos los sitios de estudio (prueba de *Kruskal-Wallis*, $K=125,376$, $p < 0,0001$,

N=321), (Figura 40).

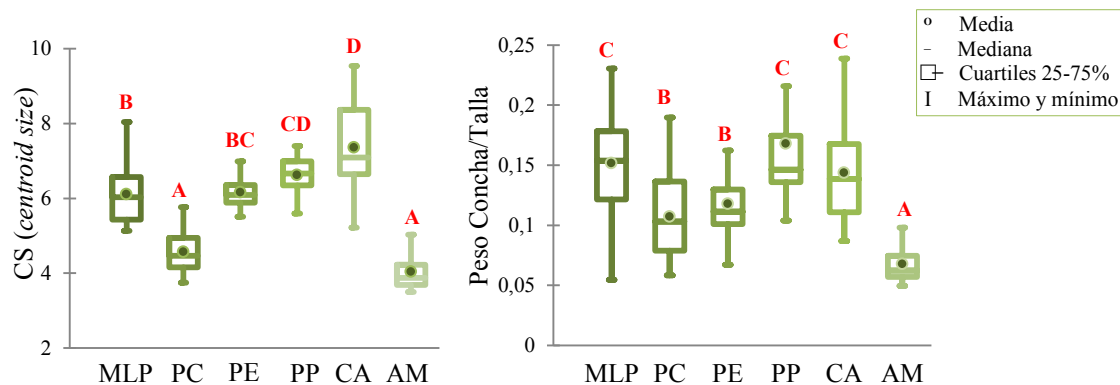


Figura 40. Estadística descriptiva para el estimador de tamaño CS (*centroid size*) y el peso de la concha relativo a la talla de *B. globulosus* en cada sitio. Abreviaturas: AM: ambrossetti, CA: Cerro Avanzado, MLP: Muelle Luis Piedra Buena, PC: Punta Cuevas, PE: Punta Este, PP: Playa Paraná. Las letras indican grupos de significancia estadística según contrastes *a posteriori*.

Se detectó un 13,08% de alometría en las muestras analizadas ($p < 0,0001$) y a continuación se trabajó sobre los residuales de la regresión para independizar los resultados del tamaño de los especímenes. Se observó una forma de la concha particular y significativa para cada sitio a través del análisis de conglomerado ($p < 0,05$) (Figura 41). La forma de la concha en los sitios Ambrossetti y Cerro Avanzado, (cuyos organismos presentan menor incidencia de imposex) fue más próxima entre sí, y esta a su vez estuvo más próxima a la forma de los organismos de Playa Paraná, siguiendo Punta Este y Punta Cuevas. Por último, los gasterópodos del sitio MLP (con mayor incidencia de imposex) fueron los más distantes en cuanto a la forma promedio del resto de los sitios.

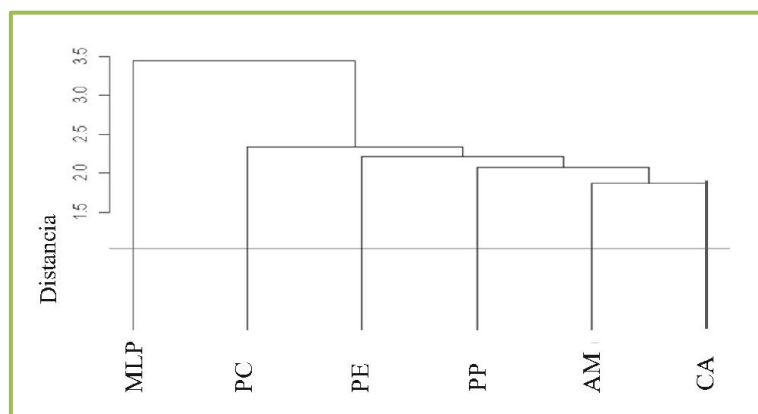


Figura 41. Análisis de conglomerado jerárquico con encadenamiento simple mostrando las relaciones entre la forma media de la concha de acuerdo a la mayor similitud entre ellas. El criterio de corte obtenido a partir de la prueba estadística está representado con una línea horizontal ($p < 0,05$).

Los tres primeros ejes del análisis discriminante canónico resumen el 90,23% de la variación total de la muestra en relación a la forma de la concha de *B. globulosus*. Los individuos de la zona con mayor incidencia de imposex (MLP) en un extremo (Figura 42, Vc1-extremo negativo) presentaron conchas redondeadas con ápices acortados separándose a lo largo del eje de los individuos que presentaron baja ocurrencia de imposex con formas ahusadas y ápices alejados del labro. Los cambios pueden observarse en la zona del canal sifonal (donde se ubicaron los *landmarks* 4, 5, 21 y 10-Figura 39), el labro (*landmarks* 10 a 20-Figura 39) y la zona del ápice (*landmark* 1-Figura 39).

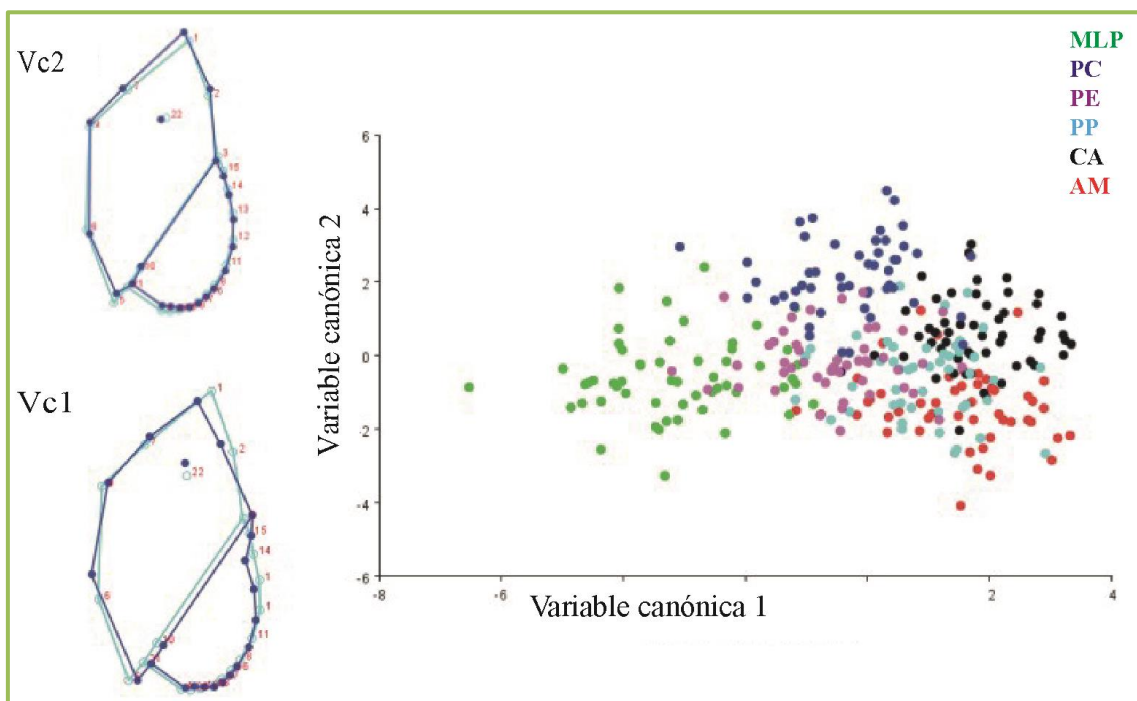


Figura 42. Análisis discriminante Canónico sobre la variación de la forma de la concha de *B. globulosus* a lo largo de los dos primeros ejes canónicos. Abreviaturas: Vc1: Variable canónica 1 (extremo -8); Vc2: variable canónica 2 (extremo +6). Abreviaturas: AM: ambrossetti, CA: Cerro Avanzado, MLP: Muelle Luis Piedra Buena, PC: Punta Cuevas, PE: Punta Este, PP: Playa Paraná.

A través del análisis de regresión multivariada, se observó una relación significativa entre la forma promedio de la concha y el incremento de imposex (Figura 43), a su vez, en la figura puede observarse la variación de la forma promedio y los extremos con mayor y menor incidencia de imposex (0% y 100% respectivamente). Los extremos de mayor variación se correspondieron con formas ahusadas y formas redondeadas respectivamente.

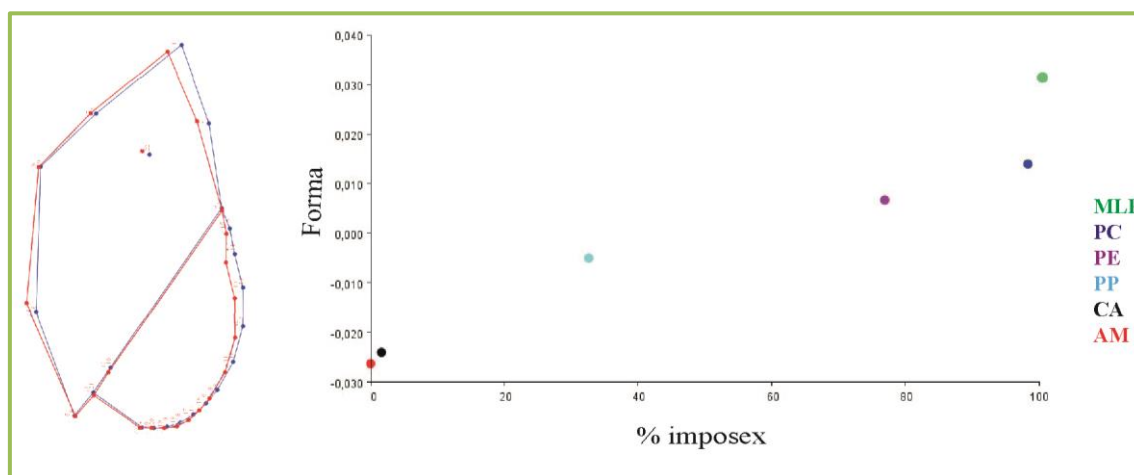


Figura 43. Regresión multivariada entre el porcentaje de imposex y la forma promedio (regression score) de la concha de *B. globulosus*. A la izquierda se muestran las diferencias entre la forma de la concha de los gasterópodos sin incidencia de imposex (azul) y con 100% imposex (rojo).

Abreviaturas: AM: Ambrossetti, CA: Cerro Avanzado, MLP: Muelle Luis Piedra Buena, PC: Punta Cuevas, PE: Punta Este, PP: Playa Paraná.

Discusión

En moluscos, las diferencias en la tasa de crecimiento han sido relacionadas con estresores ambientales, entre ellos el TBT y metales pesados (Waldock y Thain 1983; Ruiz *et al.* 1994; Almeida *et al.* 1998; Tablado y López Gappa 2001; Coelho *et al.* 2006; Sokołowski *et al.* 2008; Smolarz y Bradtke 2011), mientras que los gradientes ambientales conforman una fuente de variación tal que pueden ejercer su influencia en la forma de los organismos (Caravajal-Rodríguez *et al.* 2005; Conde-Padín *et al.* 2007; Cuña *et al.* 2011). Si bien estos gradientes se asocian a grandes variaciones latitudinales (Sepúlveda y Ibáñez 2012), gradientes muy marcados a una micro-escala geográfica (intermareal-submareal) pueden también ejercer influencia sobre la forma de la concha de los gasterópodos respondiendo a una variación local y destacando su capacidad de adaptación a las condiciones del medio (Palmer 1990; Nieto Vilela *et al.* 2012).

En el presente trabajo se encontraron diferencias en la talla de *Buccinanops globulosus* entre sitios, a través del estimador de tamaño (*centroid size*) utilizado en MG, siendo los de Ambrossetti y los de Punta Cuevas más pequeños en comparación con los del resto de los sitios (Figura 40). A pesar de las diferencias encontradas y tal como se concluyó en capítulos anteriores, no se detectó un patrón de variación que pueda ser asociado a los niveles de imposex determinados. Para el gasterópodo de interés comercial *Nucella lapillus*, especie muy utilizada en estudios de monitoreo de contaminación por TBT (Gibbs y Bryan 1987; 1996; Evans *et al.* 2000; OSPAR 2009), se intentó relacionar la talla de los individuos con los niveles de imposex, argumentando que los organismos más afectados por el fenómeno, utilizarían la energía disponible en

el crecimiento somático, incrementando el tamaño, en lugar de invertirlo en la reproducción (Son y Hughes 2000). Sin embargo, los mismos autores destacan la utilización de técnicas multivariadas para el estudio de estas diferencias debido a que la talla por si sola es un parámetro sujeto a mucha variabilidad (Son y Hughes 2000). Las diferencias detectadas en cuanto al tamaño entre los sitios podrían deberse a factores como disponibilidad de alimento, la variación de las condiciones del intermareal, la fuerza de las olas o la presencia de depredadores (Johannesson 1986; Conde-Padín *et al.* 2007), aunque son características propias de cada sitio que no han sido específicamente estudiadas durante esta Tesis y como ya ha sido expresado, estudios de crecimiento y determinación de la edad serían de gran aporte para responder este tipo de interrogante.

La pérdida de peso en respuesta a estresores es un factor común en muchas especies estudiadas y esto fue registrado en golfo Nuevo en donde el peso de las partes blandas y de la concha resultó menor en el gasterópodo *Odontocymbiola magellanica* de zonas contaminadas (Bigatti y Carranza 2007; Márquez *et al.* 2011). En el presente trabajo, el peso de la concha de las hembras analizadas presentó el mismo patrón de variación que la talla. Para estas dos variables no se observó una asociación con el gradiente de imposex y los niveles de contaminación reportados para la zona. Tanto la variable talla como peso de los organismos son influenciados por múltiples factores. Un abordaje más certero de los cambios en estas variables como respuesta a la presencia de contaminantes podría obtenerse a través de estudios en condiciones controladas de laboratorio para reducir el número de factores que podrían estar influyendo sobre el peso de los individuos.

Una de las ventajas del uso de técnicas de MG es que la forma y el tamaño pueden ser analizados de manera separada. En el presente estudio, se encontraron diferencias significativas en cuanto a la forma de la concha de *B. globulosus* asociadas a un gradiente de imposex a lo largo de seis sitios en golfo Nuevo. En un extremo se situaron los individuos con mayor % de imposex y FPL, de conchas con apariencia redondeada con ápices acortados y en otro los que no presentaron imposex con formas ahusadas con ápices alejados del labro (Figura 43). En la misma zona de estudio y época del año, Márquez *et al.* (2011) registraron un patrón similar de cambio en la forma concha del volúcido *O. magellanica* con formas de apariencia redondeada en la zona de actividad marítima *versus* conchas fusiformes cuyos ápices se encontraban próximos a la superficie de contacto con el sedimento en los sitios menos afectados por contaminación. Una publicación reciente reportó variaciones en la concha de *B.*

globulosus comparando dos sitios en el golfo San Matías (Bahía San Antonio y Playa Villarino) y uno en golfo Nuevo (Punta Cuevas) utilizando una configuración de *landmarks* similar a la del presente trabajo (Avaca *et al.* 2013b). Los resultados de este último estudio indican diferencias entre sexos y entre poblaciones con algunas similitudes en los parámetros que describen la forma entre los individuos de Bahía San Antonio y Punta Cuevas y diferencias con los de Playa Villarino (golfo San Matías), a pesar de encontrarse latitudinalmente alejados. Los autores argumentan que las diferencias encontradas no estarían influenciadas por la ocurrencia del fenómeno de imposex. Sin embargo, si se analiza en detalle el patrón de cambios entre las poblaciones, las diferencias observadas para Bahía Nueva y Bahía San Antonio podrían ser congruentes con los resultados obtenidos en esta Tesis, en donde las formas más acortadas se corresponden con la de los sitios contaminados en comparación con formas más alargadas pertenecientes a los organismos menos afectados por imposex. Todo lo dicho anteriormente podría verse reflejado en la relación obtenida entre la forma promedio y el % de imposex que muestra una asociación entre estos dos parámetros (Figura 43), aunque no deben desestimarse otras variables propias de cada sitio.

Cabe destacar que el presente trabajo es el primer estudio realizado en donde se relaciona la morfología de la concha de los gasterópodos y la incidencia de imposex a lo largo de un gradiente ambiental, mientras que estudios previos de MG en gasterópodos se relacionaron principalmente con la diferenciación de ecotipos así como diferencias entre sitios distantes geográficamente o extremos en relación a condiciones ambientales.

El gradiente de imposex encontrado en *B. globulosus*, es concordante con las concentraciones de TBT reportadas previamente para los sedimentos de la zona de estudio (Bigatti *et al.* 2009; del Brío 2011). Como ya se ha mencionado, estas concentraciones fueron decrecientes desde la zona portuaria (donde se reportó una concentración de 174,81ng TBT.g⁻¹ de sedimento seco) hacia sitios como Cerro Avanzado donde las concentraciones fueron no detectables. Sumado a esto, las concentraciones de TBT y sus derivados medidas en las partes blandas del gasterópodo *Odontocymbiola magellanica* (hasta 345,27ng TBT.g⁻¹ tejido seco en MLP) también resultaron congruentes con los niveles de imposex registrados. *Buccinanops globulosus*, si bien habita los fondos de arena y fango de la zona intermareal, comparte los ambientes en lo que refiere al grado de exposición y posibles vías de ingreso del contaminante con *O. magellanica*, por lo que los niveles de TBT hallados podrían estar afectando también al nassarido.

Otros compuestos como hidrocarburos poliaromáticos (PAHs) (Torres *et al.* 2013) y metales pesados como Cd y Pb, reportados en esta Tesis (Capítulo 2), también están presentes en la zona de estudio, dentro de los tejidos de la especie estudiada y con mayores niveles en la zona portuaria. Este sitio, por su intensa actividad marítima, es entonces un área donde el ingreso de contaminantes es mucho más frecuente y puntual que en el resto de los sitios.

Los patrones de variación en la forma de la concha de gasterópodos registrados en la bibliografía, dan cuenta de cambios morfométricos en relación a variables ambientales marcadas como la temperatura o la salinidad (Sokołowski *et al.* 2008) y destacan la capacidad de los organismos para adaptarse a esas condiciones (Brookes y Rochette 2007; Conde-Padín *et al.* 2009). Asimismo, en poblaciones donde los gasterópodos son altamente depredados por cangrejos, se han encontrado formas de la concha más engrosadas y aperturas más estrechas lo que evitaría o contrarrestaría el ataque (Johannesson 1986; Bourdeau 2009; 2012; Saura *et al.* 2012). Frente a condiciones adversas o ambientes heterogéneos los organismos pueden adoptar tres estrategias para vivir: la plasticidad fenotípica, la variación genética y la adopción de un fenotipo acorde a un amplio rango de condiciones ambientales (Hollander *et al.* 2006).

El nassarido *B. globulosus* presenta una capacidad de supervivencia ante diferentes condiciones en el ambiente que incluyen la exposición crónica a diferentes sustancias tóxicas. Los efectos sobre el crecimiento y la forma de la concha en esta especie podrían ser una consecuencia esperable de la plasticidad fenotípica. Esta última es ampliamente reconocida como un importante mecanismo evolutivo que regula las diferencias intrínsecas de los organismos.



CAPÍTULO 5-Ensayos de
toxicidad aguda con
individuos de *Buccinanops
globulosus* expuestos a TBT

Introducción

Todos los compuestos químicos que se liberan al ambiente impactan de alguna manera sobre los organismos y los efectos que en ellos se producen son estudiados por la ecotoxicología (Butler 1978). Una de las maneras de abordar el efecto de sustancias tóxicas es a través de la realización de bioensayos (Chapman 1995). De acuerdo al tipo de evento que registren, los ensayos de toxicidad se clasifican en agudos (cuando el evento medido es la mortalidad o la supervivencia en un periodo corto de tiempo) o crónicos (cuando se registran eventos que necesitan mayor tiempo de desarrollo como puede ser la alteración en el crecimiento o disminución de la fecundidad) y pueden ser empleados en control de calidad de efluentes, evaluación de compuestos específicos, toxicidad relativa, sensibilidad relativa, entre otros propósitos (Ronco *et al.* 2004).

Entre los ensayos clasificados como de toxicidad aguda, los ensayos de dosis letal media para un tiempo dado son ampliamente utilizados y permiten conocer para un compuesto determinado, o una mezcla de compuestos, la dosis a la cual el 50% de los organismos puestos a prueba muere en un periodo de tiempo preciso. Este bioensayo, recibe diferentes nombres de acuerdo a si se realiza inyectando o proveyendo oralmente el compuesto a cada organismo (dosis letal 50% -DL₅₀-) o si el compuesto es disuelto en agua o agregado a los sedimentos (concentración letal 50% -CL₅₀-) (Brown 1978).

Como regla general, los tóxicos son puestos a prueba utilizando especies de fácil recolección, alta sensibilidad o rápida respuesta, que puedan ser criadas y mantenidas en condiciones de laboratorio. Los bioensayos pueden evaluar los efectos biológicos adversos de químicos y también pueden medir cuantitativamente la toxicidad en ambientes y organismos (Lee *et al.* 2005). Los resultados de este tipo de ensayos han servido como herramienta para la evaluación y el establecimiento de concentraciones de riesgo para humanos y el ambiente en general (USEPA 2003).

El Tributilestaño (TBT) es un compuesto de alta toxicidad para organismos (Thain *et al.* 1987; Meador 2000). El análisis de este compuesto y sus derivados se ha enfocado mayormente en los efectos crónicos, ocasionados por la exposición prolongada a concentraciones en el ambiente (Moore *et al.* 1991; Foale 1993; Ruiz *et al.* 1994; Pessoa *et al.* 2001; Antizar-Ladislao 2008). En invertebrados marinos, particularmente en moluscos, la toxicidad del TBT ha sido reportada en términos de efectos subletales como el desarrollo de imposex o el engrosamiento de las valvas, en especies de gasterópodos y bivalvos de interés comercial (Eisler 1989; Ruiz *et al.* 1995a; b; Horiguchi *et al.* 1997; Horiguchi *et al.* 1998; Bandow y Weltje 2012, entre

otros).

Las concentraciones de TBT reportadas mundialmente en agua y sedimentos, alcanzan valores en la escala de los $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Titley-O'Neal *et al.* 2011). Teniendo como referencia estos valores, algunos estudios han determinado niveles de toxicidad aguda desde magnitudes menores, en la escala de los ng.l^{-1} en larvas de bivalvos y equinodermos (Ruiz *et al.* 1995b; Hutchinson 2002; Bellas 2006; Romano 2007). Estos autores enfatizaron sobre el riesgo que implica para ciertos organismos la presencia de este compuesto en el medio.

Otros contaminantes como metales pesados (Cu y Cd), pesticidas organofosforados, herbicidas, fungicidas y anti-incrustantes alternativos al TBT, como Irgarol 1051[®], Diuron y Clorotalonil, han sido evaluados por su toxicidad en relación a los niveles ambientales crecientes (Davies *et al.* 1994; Bellas *et al.* 2005; Lee *et al.* 2005; Finnegan *et al.* 2009; Macken *et al.* 2009; Bao *et al.* 2011) como parte del abordaje ecotoxicológico que se realiza cuando una nueva sustancia es sintetizada. En algunos países, se han establecido protocolos para la evaluación de la toxicidad de ciertos contaminantes que incluyen al TBT y sus derivados y se incluyen los métodos, condiciones de laboratorio y herramientas más utilizadas para la realización de bioensayos así como el análisis de los resultados (USEPA 2003).

En Argentina, no se han realizado hasta el momento ensayos de toxicidad en gasterópodos marinos, a pesar del valor comercial y potencial pesquero de algunas especies (Giménez *et al.* 2005; Narvarte 2006; Bigatti y Ciocco 2008; Averbuj *et al.* 2010, entre otros), que podrían verse afectadas por la liberación masiva de ciertas sustancias tóxicas. Teniendo en cuenta que si bien las concentraciones halladas años antes en la zona de estudio no han sido alarmantes ((hasta $174,81 \text{ ng.g}^{-1}$ en sedimentos de la zona portuaria de golfo Nuevo (del Brío 2011)), siguen registrándose nuevos aportes de TBT y sus derivados en las zonas de actividad marítima (Bigatti *et al.* 2009; del Brío 2011), a pesar de la prohibición mundial del uso de TBT. Conociendo la utilización de moluscos como indicadores debido a su gran capacidad de bioacumular contaminantes, es necesario el abordaje ecotoxicológico desde múltiples aspectos. A través de ensayos de toxicidad aguda podría ser posible evaluar si las concentraciones de TBT registradas en la zona donde vive la especie estudiada, representan un riesgo de extinción local en zonas portuarias y de alto tráfico marítimo.

Objetivo

- Realizar ensayos de toxicidad aguda en acuarios utilizando la especie *Buccinanops globulosus* con el fin de establecer la dosis letal media (DL₅₀ 96h) del TBT.

Materiales y métodos

El agua y los gasterópodos utilizados fueron recolectados de una zona cuya incidencia de imposex es mínima (Cerro Avanzado, ver capítulo 1) y donde la presencia de TBT en sedimentos no fue detectada según datos registrados previamente por Bigatti *et al.* (2009) y del Brío (2011). Sólo se recolectaron individuos mayores a la talla mínima de cópula observada en el campo, hembras mayores a 30mm y machos de tallas mayores a 18mm como un indicador de la madurez sexual de los individuos dado que no se conoce para ese sitio la talla de primera madurez sexual (*Averbuj com. pers.*).

Los estudios se realizaron en la sala de ecotoxicología del Centro Nacional Patagónico, diseñada especialmente para trabajos con sustancias tóxicas. Para este estudio se utilizaron acuarios de vidrio cuya capacidad fue de 18 litros (dimensiones: 20x30x20cm). La temperatura y salinidad del agua de mar en la que se colocaron los organismos puestos a prueba fue controlada durante todo el experimento. Los gasterópodos fueron recolectados en el mes de mayo, donde el promedio de temperatura superficial del agua es de 13,2°C. La temperatura de la sala de experimentos se fijó en 12°C para poder mantener la temperatura del agua de los acuarios en 14°C y se controló la salinidad de cada acuario de modo que esta se mantuviera en el rango de las 35-40ppm. Además, se reguló un fotoperiodo de 12h de luz/12h de oscuridad. Cada acuario contó con una bomba de circulación interna de agua y aireación constante para garantizar la supervivencia de los organismos, pero sin recirculación entre los distintos acuarios. Antes de comenzar el experimento se registró en cada acuario el pH y el oxígeno disuelto mediante un equipo de medición multiparámetro (OAKTON 600 series, waterproof portable meter kit) para garantizar la calidad del agua en la cual posteriormente se colocarían los organismos.

No se observaron diferencias significativas en talla y peso de las partes blandas entre tratamientos (talla: prueba de *Kruskal-Wallis*, $K=5,843$, $p=0,558$, $G1=7$, $N=80$ y peso de las partes blandas: prueba de *Kruskal-Wallis*, $K=3,802$, $p=0,802$, $G1=7$, $N=80$).

Previo al experimento, utilizando los datos de la variable peso total y peso de las partes blandas obtenidos en el capítulo 1 para esta especie (pertenecientes al sitio Cerro Avanzado), se calculó mediante un análisis de regresión lineal ($F=5258,255$, $R^2=0,937$,

$p < 0,0001$, $GI=351$, $N=353$) el peso de las partes blandas a exponer al ensayo de DL_{50} . Este dato fue fundamental para calcular qué volumen de cada concentración deseada debía ser inyectado por gramo de organismo. La ecuación de la recta de regresión y el ajuste entre las variables de peso para *B. globulosus* se muestran en la Figura 44.

Se trabajó con dosis inyectables y no con concentraciones diluidas en el agua de los acuarios debido a que por ensayos previos, se observó que las concentraciones necesarias para producir algún efecto notable eran demasiado elevadas y dadas las dimensiones de los acuarios, se requería agregar cantidades muy grandes del compuesto del orden de los $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Conociendo el nivel de toxicidad del compuesto con el que se iba a trabajar, lo más indicado fue inyectar a los organismos con concentraciones conocidas lo que facilitó la manipulación y posterior descarte de los mismos.

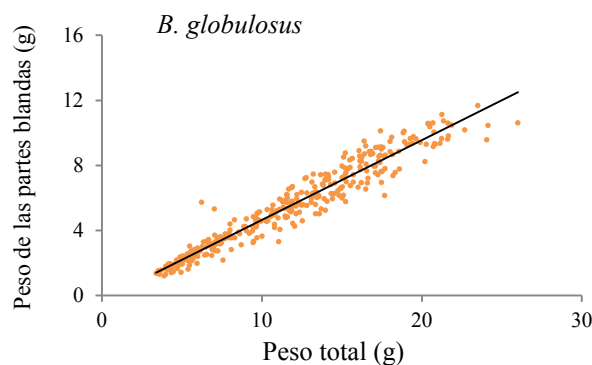


Figura 44. Relación entre el peso de las partes blandas y el peso total de *B. globulosus* en Cerro Avanzado (CA).

La solución utilizada en este experimento de toxicidad aguda fue Cloruro de Tributilestano (TBTCl, Sigma Aldrich®) indicada para este tipo de ensayos en organismos acuáticos (Antizar-Ladislao 2008). Esta solución fue preparada con etanol al 96%.

Un trabajo de inducción de imposex (utilizando la misma solución) basado en la inyección diaria de gasterópodos de la especie *Ilyanassa obsoleta*, demostró que $5\mu\text{l}\cdot\text{organismo}\cdot\text{día}^{-1}$ era el volumen tolerable para inyecciones (Oberdörster y McClellan-Green 2000) y ese valor fue tomado como referencia en el presente trabajo.

Se partió de una solución stock de TBT de $960\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ de concentración y se realizaron las diluciones necesarias para obtener concentraciones aplicables en un volumen de inyección que no superara los $10\mu\text{l}$ por individuo (única inyección). Asimismo, las dosis fueron preparadas consultando la bibliografía publicada para experimentos con este tipo de organismos (Oberdörster y McClellan-Green 2000; 2002; Santos *et al.* 2005; Horiguchi *et al.* 2007; Garaventa *et al.* 2008) y en base a pruebas

preliminares.

El agua de mar fue colocada en cada acuario experimental un día antes de colocar los organismos, para estabilizar el sistema. Al día siguiente se colocaron los gasterópodos y se aclimataron durante 5 días. No fueron alimentados durante esta etapa y tampoco durante el experimento.

Luego de los cálculos del peso de las partes blandas, la aclimatación y el preparado de las soluciones, los gasterópodos fueron divididos al azar en 8 grupos de 10 individuos cada uno. Se realizaron 6 tratamientos y dos controles detallados en la Tabla 17.

Tabla 17. Esquema de los tratamientos realizados en el bioensayo DL₅₀ (96h).

Tratamiento
Control 1: Organismos sin inyectar
Control 2: Inyección de 7µl de Etanol 96%
Inyección de 1µg de TBT.g organismo ⁻¹
Inyección de 5µg de TBT.g organismo ⁻¹
Inyección de 8µg de TBT.g organismo ⁻¹
Inyección de 10µg de TBT.g organismo ⁻¹
Inyección de 15µg de TBT.g organismo ⁻¹
Inyección de 20µg de TBT.g organismo ⁻¹

Los organismos fueron relajados con MgCl₂ (7%) durante una hora para facilitar la inyección (Templado *et al.* 2010). Se utilizó una micro jeringa de vidrio Hamilton de 10µl (Figura 45). Cada individuo fue inyectado en la región pedal con la dosis correspondiente al tratamiento asignado, comenzando desde el grupo control y terminando con el grupo de mayor dosis. La jeringa fue enjuagada 20 veces con etanol 96% entre cada tratamiento.



Figura 45. Jeringa Hamilton (10µl) utilizada para la inyección de los organismos en la zona pedal. Escala=10mm.

Una vez inyectados, los gasterópodos fueron colocados en los acuarios correspondientes (Figura 46) y controlados periódicamente para extraer los organismos

mueritos (debido a que podrían afectar a la supervivencia de los restantes y para garantizar las condiciones del agua en el que estaban inmersos). Pasadas las 96 horas se dio por finalizado el experimento y se contabilizó el número total de individuos muertos en cada tratamiento.

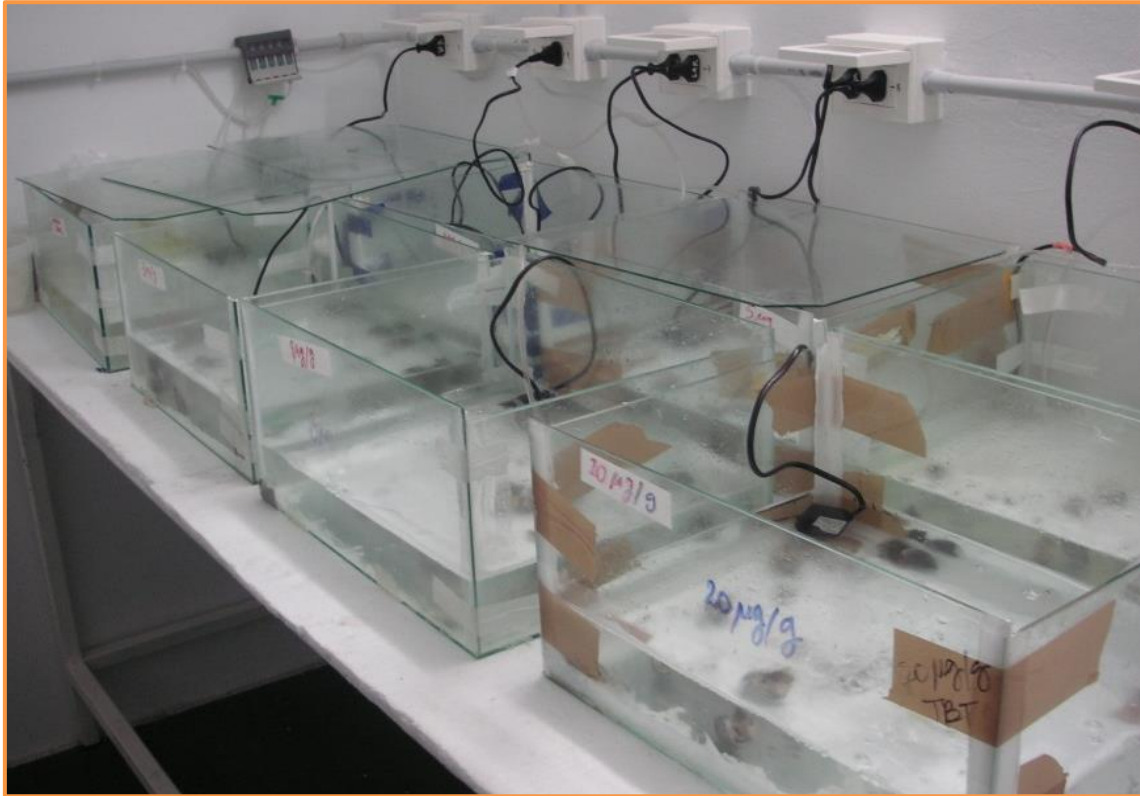


Figura 46. Disposición de los acuarios durante el experimento de toxicidad aguda en *B. globulosus*.

Análisis de datos

Para realizar el análisis estadístico de los datos obtenidos se validaron los supuestos de homocedacia (prueba de Levene $p < 0,05$) y normalidad (prueba Shapiro-Wilk $p < 0,05$). Ante la ausencia de normalidad, se utilizó la transformación logaritmo natural (\ln) para la variable respuesta. Las pruebas paramétricas utilizadas fueron *t-Student* ($p < 0,05$) para comparaciones entre dos medias o *ANOVA de un factor* ($p < 0,05$) y contrastes de *Tukey* para comparaciones entre más de dos medias. En el caso de no cumplir con los supuestos mencionados, se utilizaron las pruebas no paramétricas de *Mann-Whitney* ($p < 0,05$) para comparaciones entre dos variables y *Kruskal Wallis* ($p < 0,05$) con contrastes *a posteriori* de *Dunn* para comparaciones entre más de 2 variables. En todos los casos se utilizó el software XLStat 2012[®]. En los resultados de las comparaciones estadísticas se informa la prueba utilizada, el estadístico, la probabilidad asociada al estadístico, los grados de libertad (cuando correspondiese) y el número total de observaciones.

Se calculó la DL₅₀ utilizando el software XLStat 2012[®], paquete *XLSTAT-Dose* que es un complemento de análisis estadístico para MS-Excel[®] que se ha desarrollado para el análisis de dosis en los sectores químico y farmacéutico (<http://www.xlstat.com>). Las funciones principales del software son el análisis de los efectos de dosis mediante modelos Logit, Probit, Gompertz, Log-Log. Se calculó la DL₅₀ (96h) y los intervalos de confianza 95% mediante el método Probit (Finney 1971) con 100 iteraciones y convergencia de 0,000001. La función de verosimilitud fue maximizada con el algoritmo de Newton-Raphson.

Resultados

Las variables fisicoquímicas se mantuvieron constantes a lo largo del experimento (Tabla 18).

Tabla 18. Resumen de las variables fisicoquímicas, de talla y peso obtenidas para *Buccinanops globulosus* en cada tratamiento. Abreviaturas: OD: oxígeno disuelto, T: temperatura, S: salinidad.

Tratamiento	T (°C)	S (%.)	pH	OD (mg.L ⁻¹)	Talla (mm)	Peso de las partes blandas (g)
Organismos sin inyectar	14	34	7,63	6,87	36,99±4,26	6,32±2,28
7µl etanol	14	35	7,65	7,16	41,92±2,64	5,64±1,15
1µg TBT.g ⁻¹	14	36	7,55	6,78	38,72± 6,63	4,93±2,38
3µg TBT.g ⁻¹	14	35	7,53	6,66	40,39±5,62	4,05±1,53
5µg TBT.g ⁻¹	14	36	7,48	7,08	42,05±5,85	4,11±1,48
8µg TBT.g ⁻¹	14	35	7,44	6,68	39,14±5,49	5,02±1,79
10µg TBT.g ⁻¹	14	35	7,35	6,49	39,91±5,37	7,13±2,57
20µg TBT.g ⁻¹	14	35	7,32	7,13	39,27±5,12	7,35±2,49

No se observó mortalidad en el tratamiento control con etanol 96% y tampoco en el control de organismos sin inyectar. Para el resto de los tratamientos, la mortalidad se incrementó durante el transcurso de las horas alcanzando el 100% de muertes sólo en el tratamiento de mayor dosis (20µg.g organismo⁻¹), Figura 47.

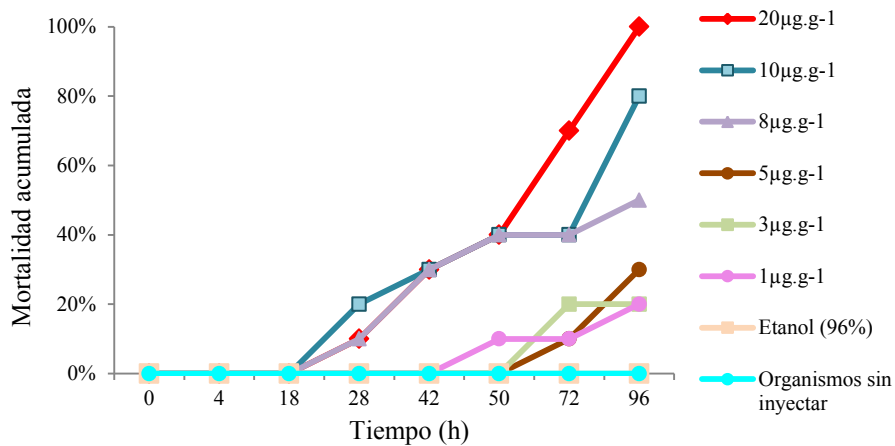


Figura 47. Mortalidad acumulada para *B. globulosus* en cada tratamiento de inyección con dosis crecientes de TBT.

La DL_{50} calculada fue $5,41\mu\text{g TBT.g organismo}^{-1}$ con intervalos de confianza del 95% entre $3,37$ y $8,60\mu\text{g TBT.g organismo}^{-1}$. La estadística asociada al ajuste del modelo provisto por el programa dio como resultado un buen ajuste mediante la utilización de distintos coeficientes (R^2 McFadden, R^2 Cox y Snell; R^2 Nagelkerke) que varían entre 0 y 1 e indican la bondad del ajuste realizado. Cuanto menor es su valor, mejor es el ajuste obtenido y esto puede verse en la Tabla 19.

Tabla 19. Estadística asociada al ajuste del modelo. Los controles no fueron utilizados por el modelo ya que se registró mortalidad cero. Abreviaturas: GDL: Grados de libertad, -2Log(verosimilitud): El logaritmo de la función de probabilidad asociada al modelo.

	Estadística
Observaciones	60
GDL	59
-2Log (Verosimilitud)	83,178
R^2 (McFadden)	<0,0001
R^2 (Cox and Snell)	<0,0001
R^2 (Nagelkerke)	<0,0001

La prueba de hipótesis realizada con el fin de evaluar si los parámetros del modelo son significativamente distintos de cero dio como resultado diferencias significativas ($p < 0,0001$) a través de la utilización de diferentes pruebas como: la prueba de razón verosimilitud (-2Log (verosimilitud)), la prueba de puntuación (Score) y la prueba de Wald con estadísticos que siguen una distribución Chi^2 (Tabla 20).

Tabla 20. Prueba de hipótesis sobre la diferencia entre los parámetros del modelo.

Prueba de la hipótesis nula $H_0: Y=0,500$			
Estadística	GDL	Chi-cuadrado	Pr > Chi^2
-2 Log (Verosimilitud)	1	19,580	< 0,0001
Score	1	17,362	< 0,0001
Wald	1	15,803	< 0,0001

En la Figura 48 se muestra la curva de regresión del modelo y los intervalos de confianza provistos por el programa.

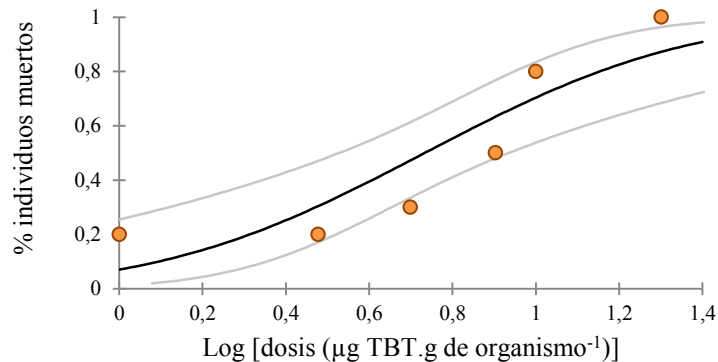


Figura 48. Regresión logística resultado de la estimación de la DL_{50} en *B. globulosus* por el método probit utilizando XLStat 2012®. La figura muestra la proporción de mortalidades obtenidas, el ajuste del modelo y los intervalos de confianza.

Discusión

Es escasa la bibliografía que documente dosis letales de TBT en gasterópodos y bivalvos marinos. Los escasos registros pertenecen a la década del 1980 cuando el uso de este compuesto fue masivo (Morris 1987; Thain *et al.* 1987; Waldock *et al.* 1987; Bushong *et al.* 1988) y se realizaron como parte del abordaje toxicológico necesario cuando una sustancia nueva ingresa en el ambiente. Los resultados obtenidos en los trabajos antes mencionados han sido variables. Un estudio realizado por la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (USEPA 2003) en el cual se recopila información de experimentos de toxicidad aguda y crónica con organismos y sedimentos, reportó la toxicidad aguda del TBT en especies marinas residentes de América del Norte (26 especies de invertebrados, incluido el gasterópodo *Nucella lapillus* y 7 de peces). El rango de valores agudos fue desde $0,24\mu\text{g.L}^{-1}$ para juveniles del copépodo *Acartia tonsa* hasta $282,2\mu\text{g.L}^{-1}$ para adultos de la ostra del Pacífico, *Crassostrea gigas* (USEPA 2003). Las larvas de moluscos bivalvos y los estadios juveniles de crustáceos demostraron ser mucho más sensibles que los adultos durante la exposición aguda. En organismos como erizos, ascidias y crustáceos, la toxicidad del TBT ha resultado mucho mayor que la de otros compuestos como pesticidas, surfactantes y anti-incrustantes alternativos al TBT (Bellas *et al.* 2005; Bellas 2006). A partir de esta recopilación de resultados, se estableció el criterio de máxima concentración en agua de mar siendo $0,4175\mu\text{g.L}^{-1}$ (USEPA 2003).

Los resultados obtenidos en el presente estudio indican que los organismos de la especie *Buccinanops globulosus* presentan una baja toxicidad aguda al TBT. Teniendo

en cuenta la alta sensibilidad de muchos gasterópodos en relación al desarrollo de imposex, las dosis inyectadas necesarias para producir la muerte de los organismos fueron elevadas. A pesar de ello, en la bibliografía citada anteriormente en el presente capítulo, solo se reportan valores de concentraciones diluidas en el agua, lo que dificulta establecer comparaciones. El nivel de respuesta obtenido en el presente estudio puede estar relacionado con las vías de ingreso del contaminante, aunque, estudios de inducción del fenómeno de imposex y otros ensayos de inducción han sido realizados mediante la inyección en la región pedal (Oberdörster y McClellan-Green 2002; Santos *et al.* 2005) e inclusive, se ha propuesto que el ganglio pedal (ubicado cercano al pene y a la región pedal) contiene un factor morfogénico del pene (*Penis Morphogenic Factor*), que puede interactuar directamente con el TBT para desencadenar la expresión del fenómeno de imposex (Oberdörster y McClellan-Green 2000; Oberdörster *et al.* 2005).

Si bien los ensayos de toxicidad aguda son realizados en condiciones controladas de laboratorio, sirven para explorar cual sería la peor situación de exposición de los organismos en el campo. Sin embargo, la mayoría de los ensayos realizados no contempla la interacción que naturalmente ocurre entre compuestos de similares características en el ambiente y dentro de los organismos, pudiendo en algunos casos, magnificar el efecto que se está poniendo a prueba (Bellas 2008). Teniendo en cuenta la bioacumulación de metales en *B. globulosus* (esta Tesis) así como los resultados obtenidos por Torres *et al.* (2013), en donde se determinaron niveles de PAH (hasta 270ng.g⁻¹ peso seco de hidrocarburos totales en los gasterópodos) en la misma zona y especie, podría decirse que los organismos presentan una gran capacidad para vivir en ambientes contaminados y para bioacumular compuestos tóxicos. Todos ellos ejercen toxicidad crónica a lo largo de toda la vida del gasterópodo aun así, subsiste en altas densidades (Avaca *et al.* 2013a) en zonas de actividad marítima.

En el caso particular del TBT, según estudios de inducción en laboratorio con la especie *N. lapillus*, se requieren unos pocos nanogramos en el agua para observar el desarrollo de imposex en hembras (Gibbs *et al.* 1991a; Stroben *et al.* 1992b; Gibbs y Bryan 1996) y en contraposición, se requieren tres órdenes de magnitud mayores de concentración para observar la muerte de los organismos de la misma especie (Harding *et al.* 1996). La misma tendencia parecería observarse en *B. globulosus* lo cual está en acuerdo con lo propuesto por otros autores (Gibbs y Bryan 1986; Stromgren y Bongard 1987; Ruiz *et al.* 1995b; Le Blanc y Bain 1997; Alzieu 1998; Meador 2000; Shi *et al.* 2005; Valenti *et al.* 2005; El Menif *et al.* 2006; Lau *et al.* 2007) quienes destacan la

importancia de estudios de toxicidad crónica a largo plazo más que los efectos letales como la muerte de los individuos.

Las concentraciones obtenidas en los ensayos de toxicidad en agua deben ser analizadas con precaución debido a que aún en condiciones controladas, factores como la bioacumulación y biodisponibilidad del compuesto para los organismos así como la adsorción sobre las paredes de los acuarios pueden afectar mucho el resultado (Laughlin *et al.* 1996; Panagoula *et al.* 2002). En el presente trabajo, el compuesto fue inyectado en la región pedal de la misma manera que en estudios de inducción realizados con otras especies de gasterópodos (Spooner *et al.* 1991; Oehlmann *et al.* 2000; McClellan-Green *et al.* 2006), asumiendo que la totalidad del compuesto ingresó en los tejidos. Sin embargo, deberían realizarse determinaciones del contaminante (en este caso el TBT) una vez inyectados los organismos para corroborar que las dosis inyectadas se encuentren efectivamente en los tejidos.

La edad, el sexo o el estadio en el que se encuentra la especie a probar pueden ser factores influyentes (Meador *et al.* 1997) y la toxicidad resultante es la combinación entre la sustancia y el organismo, por eso es difícil establecer un método único de evaluación de la toxicidad para diferentes compuestos, aunque es necesario al momento de establecer criterios de riesgo ambiental (Matthiessen 2013). En el presente estudio, los ensayos fueron realizados con especímenes adultos que se sabe que alcanzaron la madurez sexual, sin embargo, se conoce que para estadios tempranos como larvas o juveniles, la toxicidad puede ser mayor debido a una mayor sensibilidad de los organismos. Este sería un aspecto a poner a prueba en futuros estudios con la especie *B. globulosus* y con otras especies cuya sensibilidad es menor como *T. geversianus* (ver resultados capítulo 1).

Los estudios de biomonitoreo de un contaminante utilizando una especie de sensibilidad alta y de fácil examinación y/o ubicuidad, son importantes en la evaluación ambiental porque pueden establecerse relaciones entre la exposición a compuestos tóxicos y los efectos biológicos (Horiguchi *et al.* 1998; Meador 2000; Raimondo *et al.* 2009). Si bien en los sedimentos de la zona del presente estudio no se han reportado dosis alarmantes de TBT (hasta 174,81 ng.g⁻¹ peso seco) (del Brío 2011), sería necesario evaluar la toxicidad del TBT en estadios más tempranos en el desarrollo. En vista de la gran capacidad que tienen los organismos de esta especie para bioacumular compuestos tóxicos también es necesario evaluar la exposición prolongada de los gasterópodos de la zona al TBT y otros contaminantes.

DISCUSIÓN FINAL

El golfo Nuevo exhibe un gradiente de actividad marítima, que se relaciona con la presencia de compuestos tóxicos como el Tributilestaño (TBT), metales e hidrocarburos poliaromáticos en diferentes organismos y sedimentos (Harvey y Gil 1988; Commendatore *et al.* 2000; Gil *et al.* 2006; Massara Paletto *et al.* 2008; Bigatti *et al.* 2009; del Brío 2011; Giarratano *et al.* 2013; Torres *et al.* 2013, este trabajo). La creciente actividad portuaria y turística de la ciudad de Puerto Madryn provee además a la zona costera de todo tipo de contaminantes.

Los moluscos gasterópodos representan una parte considerable de la biodiversidad y juegan un rol importante en muchos ecosistemas (Bayne *et al.* 1981; Eisler 2010) además de su particular sensibilidad ante la presencia de compuestos tóxicos en el ambiente. En base a los resultados obtenidos en esta Tesis se corroboró que el volútido *Adelomelon ancilla* es una especie muy sensible a la presencia de TBT, hecho que había sido reportado en estudios anteriores (Bigatti *et al.* 2009; Penchaszadeh *et al.* 2009; Primost 2009). Los parámetros relacionados con el desarrollo de imposex en esta especie no presentaron fluctuaciones con las épocas del año (fría o cálida). A pesar de su alta sensibilidad, se observó sólo un espécimen de *A. ancilla* con desarrollo muy avanzado del vaso deferente. En otras especies, con vasos deferentes muy desarrollados, se registró esterilidad como consecuencia de la oclusión de la vagina (Wolf *et al.* 2001; Barroso *et al.* 2002; Rodríguez *et al.* 2009). En el caso de *A. ancilla* y a pesar de la exposición prolongada a contaminantes en la zona portuaria, no se vio tal consecuencia y las hembras continúan colocando ovicápsulas (Penchaszadeh *et al.* 2009); esto podría estar relacionado con la fisiología del desarrollo de imposex en esta especie.

Por otro lado, la concentración de metales en los tejidos de *A. ancilla* en la zona portuaria fue variable, bioacumulando elementos esenciales como Zn, Fe y Cu, mientras que metales de alta toxicidad para organismos como Pb y Cd no superaron los límites de consumo establecidos según la regulación vigente (SENASA 2000; MERCOSUR/GMC 2011). La concentración de Al, reportada por primera vez para gasterópodos en Argentina, fue variable en la zona. Para este metal no se encontró un patrón de acumulación ni en los organismos ni en el sedimento en relación a la cercanía a uno de los muelles cuya principal actividad es la carga y descarga de materias primas o productos derivados del aluminio. *A. ancilla* resultó la especie más sensible al desarrollo de imposex y al mismo tiempo, la que menor cantidad de metales bioacumuló en relación a las otras dos especies estudiadas. El tiempo de vida medio de hasta 20 años en *A. ancilla* pareciera ser mayor que el de *T. geversianus* (Bigatti *com. pers*) y

efectivamente lo es en comparación con *B. globulosus* (Avaca *et al.* 2013a; Bökenhans *et al.* 2013). La longevidad de *A. ancilla* podría ser un factor influyente sobre la toxicidad de compuestos como el TBT. Aspectos como la estabilidad en los índices de imposex son requeridos para poder utilizar a una especie como bioindicadora de contaminación por TBT (Gibbs y Bryan 1994; Axiak *et al.* 2003) y la baja bioacumulación de elementos metálicos de alta toxicidad es un factor importante en aspectos de seguridad alimentaria. Sin embargo, la biología reproductiva de esta especie, su lento crecimiento y baja fecundidad son parámetros que no favorecen su utilización como recurso pesquero. Por esta razón, a pesar de que puedan ser consumidas las partes blandas (en particular el pie) de *A. ancilla* y que no presenten variaciones estacionales en los índices de imposex, se recomienda no utilizar a esta especie como recurso pesquero (Zabala *et al.* 2013b) o como biomonitor de la presencia de contaminantes.

La especie *Trophon geversianus* (Muricidae) tanto en el hábitat intermareal como submareal desarrolló el fenómeno de imposex sólo en casos aislados. Esto corrobora lo reportado en estudios anteriores, en donde se la clasificó como indicadora de elevadas concentraciones de TBT, con desarrollo de imposex en sitios donde la concentración en sedimentos alcanzó niveles de $1370\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ (Bigatti *et al.* 2009; Primost y Bigatti 2011). Cabe destacar, que el fenómeno de imposex fue registrado por primera vez en *Nucella lapillus* de la familia Muricidae (Gibbs y Bryan 1986), y que a partir de sucesivas investigaciones se determinó que el nivel mínimo necesario para la inducción del fenómeno era de $2\text{ng TBT}\cdot\text{L}^{-1}$. La ausencia de respuesta en el murícido *T. geversianus* podría estar asociada a la forma de vida de estos organismos así como a una respuesta adaptativa a la presencia de compuestos tóxicos como el TBT en el medio, como se ha reportado para otras especies en el mundo (Titley-O'Neal *et al.* 2011). Además de la exposición a contaminantes, la especie *T. geversianus* está expuesta a condiciones ambientales adversas (estrés físico) como los cambios en el nivel de marea, los fuertes vientos y la variación de temperatura (Nieto Vilela *et al.* 2012; Rechimont *et al.* 2013) que podrían afectar la condición fisiológica de los gasterópodos, favoreciendo el ingreso y acción de los contaminantes. Durante el presente trabajo, no se pudo determinar si *T. geversianus* bioacumula TBT, pero se registró la concentración de metales esenciales y no esenciales en el complejo glándula digestiva+gónada (G+D) y el pie. Los mecanismos de incorporación de sustancias tóxicas son variados y se encuentran en estrecha relación con el tipo de compuesto, su biodisponibilidad hacia los organismos,

la fisiología y el modo de vida de cada especie (Janssen *et al.* 2003; Liu y Kueh 2005; Nesto *et al.* 2007; Eisler 2010). Así, se demostró, que *T. geversianus* que se alimenta de bivalvos filtradores de plancton, no presenta en sus tejidos niveles de toxina paralizante de moluscos, en la misma zona donde especies como el gasterópodo *Odontocymbiola magellanica* sobrepasó los máximos permitidos de esta toxina para consumo humano (Nieto Vilela *et al.* 2013). En contraposición, en el presente trabajo se demostró que *T. geversianus* es capaz de concentrar, en una alta proporción, elementos metálicos provenientes del alimento que consumen (bivalvos). El pie y el complejo gónada-glándula digestiva (en mayor proporción) presentaron niveles de metales tóxicos para consumo humano como Cd y Pb; sin embargo, si sólo se consumiera el pie, la ingesta semanal de *T. geversianus* podría ser solamente de 330g. En esta especie resta explorar además de la bioacumulación de TBT, el comportamiento del mismo dentro de los tejidos que explique el bajo nivel de desarrollo de imposex observado en esta especie.

Buccinanops globulosus fue elegida para el estudio de diferentes efectos ocasionados por la exposición a zonas de actividad marítima debido a su sensibilidad, alta densidad y rápida respuesta. La utilización de esta especie en estudios de monitoreo de contaminantes como el TBT resultaría óptima ya que no se observaron variaciones estacionales en los parámetros de imposex medidos sobre los organismos. Algunos estudios han demostrado la variación en el largo del pene de los machos en asociación con la presencia de compuestos masculinizantes como el TBT (Li 2005; Qiu *et al.* 2011). Sin embargo, el nivel de parasitismo en los animales es otro factor influyente en el largo del pene (Morley 2006; Rató *et al.* 2009), y se ha detectado en especies que comúnmente son utilizadas para monitorear la contaminación por TBT, a través del fenómeno de imposex. En la zona de golfo Nuevo, la especie *B. globulosus* presenta la menor prevalencia de parásitos digeneos (0,15%), en relación a otras especies de gasterópodos (Gilardoni *et al.* 2011), mientras que poblaciones de *Buccinanops cochlidium* en el golfo San José presentan una prevalencia del 15,5%, con variación estacional y como consecuencia de ello, la presencia de machos sin pene (Averbuj y Cremonte 2010). De esta manera, al utilizar estructuras anatómicas (como el pene y el vaso deferente) que pueden verse afectadas por otros factores además de la presencia de compuestos androgénicos, es importante estudiar la presencia de fluctuaciones estacionales. Los resultados obtenidos en esta Tesis en relación a la estacionalidad del desarrollo de imposex, podrán ser tomados como antecedentes para futuras investigaciones y uso de la especie *B. globulosus* con fines de monitoreo.

En simultáneo con el desarrollo de imposex en las hembras de *B. globulosus*, los niveles de enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa (SOD) y moléculas implicadas en la detoxificación como glutatión reducido (GSH), así como el daño a los lípidos de las membranas celulares, mostraron un marcado incremento en relación a la actividad marítima y a los parámetros de imposex. Un patrón de respuesta similar, aunque no vinculado al desarrollo de imposex, se reportó en gasterópodos de la especie *Haliotis diversicolor supertexta* expuesta a TBT e *Ilyanassa obsoleta*, como consecuencia de la exposición a cadmio (Cd) (Downs *et al.* 2001). Sin embargo, esta tendencia se obtuvo sólo en condiciones de laboratorio, ante la exposición a condiciones de estrés ambiental como la deficiencia de oxígeno, el cambio en la temperatura o la salinidad (Bayne *et al.* 1979; Davies 2000b; Deschaseaux *et al.* 2011). Estos resultados, junto con los registrados por primera vez para *B. globulosus* en este estudio, confirman la capacidad de respuesta de los gasterópodos marinos ante diferentes perturbaciones en el ambiente (Di Giulio *et al.* 1989; Regoli *et al.* 2002; Manduzio *et al.* 2005). A su vez, por ser la primera vez que se han determinado biomarcadores de estrés oxidativo para la especie, los valores obtenidos podrían ser tomados como valores de referencia en estudios posteriores.

En comparación con datos previos a la realización de este estudio (Primost 2009), se observó que si bien los niveles de imposex en especies como *B. globulosus* se mantuvieron constantes a lo largo de los años, los índices que indican la intensidad del desarrollo del fenómeno (como el FPL) variaron desde 2008 al año 2012 a pesar de la prohibición vigente desde 1998 (a nivel nacional) y desde 2008 a nivel mundial. Algo más drástico, ocurrió con la especie *T. geversianus*, de baja respuesta a la presencia del compuesto (sólo en casos aislados), que registró un FPL de 1,4mm en 2008 y de 5mm en el periodo 2010-2012. Esto corrobora que siguen ocurriendo ingresos de TBT luego de las prohibiciones como lo reportó del Brío (2011) para la misma zona de estudio de esta Tesis en el año 2010.

Los niveles de imposex e índices como el FPL estuvieron en estrecha relación con el tráfico de embarcaciones desde el año 2008 hasta el presente en la zona de los muelles (Figura 49). Si bien en esta Tesis no pudo determinarse la concentración de TBT en gasterópodos y sedimentos, la respuesta de los organismos evidencia la asociación entre estas variables a lo largo del tiempo.

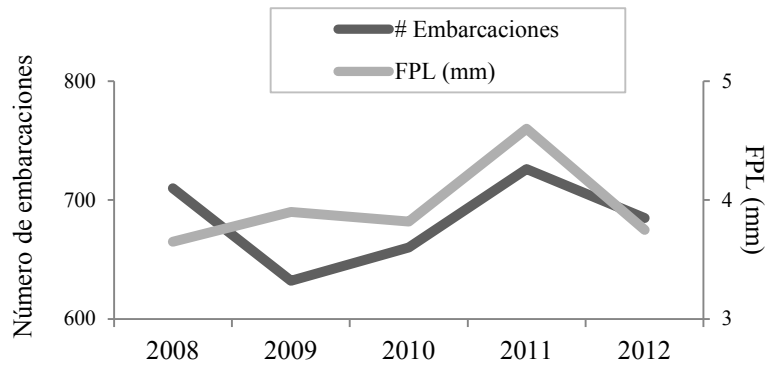


Figura 49. Tendencias en relación al tráfico de embarcaciones en golfo Nuevo y el largo promedio del pene de las hembras de *B. globulosus* con imposex luego de la prohibición mundial de TBT (datos correspondientes al capítulo 1 de esta Tesis).

El objetivo de la prohibición fue lograr la reducción de los niveles ambientales de TBT a través del uso de sistemas anti-incrustantes alternativos y de menor toxicidad para los organismos; sin embargo, todo indica que las pinturas a base de TBT siguen siendo utilizadas y la gran persistencia del compuesto en el ambiente no contribuye a disminuir los niveles al menos en este periodo de tiempo.

Así como los contaminantes pueden afectar el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios y el mecanismo de defensa de los organismos (Livingstone 2003), también pueden afectar el desarrollo de la concha en los moluscos (Son y Hughes 2000; Sokołowski *et al.* 2008; Márquez *et al.* 2011; Kefi *et al.* 2012). Esta estrecha relación entre las malformaciones y la presencia, en especial de TBT en el ambiente fue probada desde hace ya muchos años (Alzieu *et al.* 1986; Héral *et al.* 1989). En el presente estudio, los gasterópodos de la especie *B. globulosus* presentaron una forma particular y significativamente diferente entre varios sitios dentro de una pequeña escala geográfica en golfo Nuevo (30km) y tuvo relación con el gradiente de imposex y el tráfico marítimo de la zona. Así como las valvas de la ostra *Crasostrea gigas* muestran un engrosamiento mayor como respuesta a la disrupción del TBT sobre el metabolismo del calcio (Alzieu *et al.* 1986), la forma más redondeada, con el ápice alejado del sedimento en la zona de mayor incidencia de imposex y la presencia de contaminantes, podría ser una respuesta adaptativa de *B. globulosus* ante las condiciones adversas del medio. Tendencias similares se observaron en el gasterópodo *Odontocymbiola magellanica* de sensibilidad media al TBT (Márquez *et al.* 2011), donde además de variaciones morfométricas de la concha, se registraron pérdidas de peso en las hembras afectadas por imposex. Diferencias en la forma de la concha en relación a estrés físico y presencia de depredadores fueron también observadas en *T. geversianus* en golfo Nuevo (Nieto Vilela *et al.* 2012; Márquez *et al.* en prensa) y en otras especies en el mundo (Palmer

1990; Brookes y Rochette 2007).

La presencia de metales en diferentes tejidos de *B. globulosus* no estuvo asociada con los parámetros de imposex, ni con los niveles de enzimas antioxidantes o el daño a lípidos. Esta especie fue la que mayor bioacumulación registró, superando en todos los sitios el límite permitido para consumo humano (SENASA 2000; MERCOSUR/GMC 2011). Esto indica que la especie no sería apta para consumo, a menos que, al igual que como ocurrió en *T. geversianus*, solamente se ingiera el pie (hasta 1kg por semana).

Si bien no se realizaron estudios específicos para detectar las fuentes de ingreso de los metales en los gasterópodos, podría existir una estrecha relación con los diferentes hábitos alimenticios. *A. ancilla* se alimenta mayormente de almejas (*Diplodonta patagonica*) y otros gasterópodos vivos como *Tegula patagonica* y *Notocochlis isabelleana*, habitantes de fondos duros o mixtos (Zabala *et al.* 2013a). *T. geversianus* se alimenta mayoritariamente del complejo de bivalvos de las especies *Brachidontes rodriguezii* y *Brachidontes purpuratus* (Pio 2010). *B. globulosus* se alimenta mayoritariamente de carroña en descomposición (Daleo *et al.* 2005). De las tres especies estudiadas, *B. globulosus* es la que mayor nivel de metales bioacumuló, como resultado de la exposición a través de otro compartimento además del sedimento, el cual podría ser la dieta. Los niveles de metales determinados en los tejidos de *T. geversianus* fueron similares a los de *B. globulosus*, aunque era esperable que las presas del muricido registraran mayor concentración de elementos metálicos por su modo de vida. Esto no ocurrió así, y puede observarse a través del factor de bioacumulación (FBA) calculado en relación a los bivalvos consumidos, en donde se infiere que otras posibles fuentes de ingreso que no fueron evaluadas podrían estar contribuyendo a la acumulación de metales en el gasterópodo. Estas observaciones hacen referencia a las vías de ingreso de los contaminantes pero también a la fisiología de la especie, siendo necesario el estudio de las fuentes y mecanismos de incorporación de metales además de los mecanismos de almacenamiento como la inducción de metalotioneínas o gránulos de acumulación de metales dentro de los tejidos (Viarengo y Nott 1993).

Uno de los principales interrogantes al alcance de la ecotoxicología es el efecto que la presencia de compuestos tóxicos puede provocar a nivel poblacional en los animales expuestos (Butler 1978; Depledge y Fossi 1994; Fent 1998). La fecundidad es un parámetro poblacional susceptible a cambios ambientales (Ramirez Llodra 2002). En el presente estudio, *B. globulosus* mostró diferencias en cuanto a la fecundidad, en poblaciones de zonas afectadas por imposex y actividad marítima, en contraposición a

una zona de baja actividad e imposex ocasional. Numerosos estudios en diferentes taxones han demostrado los efectos sobre la fecundidad en animales expuestos a contaminantes orgánicos como TBT, bisfenol A y bifenilos policlorados (Wu y Levings 1980; El Menif *et al.* 2006; Forbes *et al.* 2008). En todos los casos y contrariamente a lo observado en el presente estudio, la respuesta ha sido la disminución de la descendencia, malformaciones de los embriones y otros estadios tempranos. En el presente trabajo, si bien resta realizar estudios específicos de concentración de contaminantes en la gónada y ovicápsulas, un factor que podría estar contribuyendo a las tendencias observadas podría ser la disponibilidad de alimento, mayor en la zona portuaria que en el resto de los sitios. El muelle es utilizado con fines recreativos como la pesca con carnada que muchas veces es arrojada al agua, quedando disponibles para *B. globulosus* que se alimenta de carroña. A pesar de los niveles de estrés oxidativo, la deformación en la concha y la bioacumulación de metales, las poblaciones de *B. globulosus* en la zona portuaria parecen mantener altas densidades con pesos y tallas similares a la del sitio más alejado y de menor impacto (CA).

La formación de ovicápsulas en los gasterópodos, además de ser un mecanismo de protección de la descendencia, implica un gasto energético considerable (Pechenik 1979; Perron 1981). En el presente estudio, las hembras de *B. globulosus* de la zona portuaria que portaban ovicápsulas, si bien estaban afectadas por imposex, presentaron penes de menor longitud, en comparación con hembras de la misma población que no portaban ovicápsulas. El número de descendientes en la zona portuaria fue mayor, pero estos presentaron menores tallas que los del sitio menos afectado por imposex (CA), sin embargo, las consecuencias de una progenie de menor talla implica una disminución en la supervivencia (Spight 1976; Marshall *et al.* 2008), con lo cual la situación de estas poblaciones en lo que respecta a la continuidad de la descendencia sería desfavorable. Si se suma al desarrollo de imposex en las hembras, la inducción de estrés oxidativo, el daño a los lípidos y la presencia de metales, el riesgo ecológico de estas poblaciones es considerable y por lo cual deberían realizarse monitoreos en el tiempo.

Todos los efectos mencionados anteriormente, son el resultado de la exposición crónica de los organismos a un ambiente contaminado. Sin embargo, cuando se evaluaron los efectos letales de la exposición al TBT en el nassarido *B. globulosus*, se observó que se requieren concentraciones que ambientalmente no están presentes para provocar la muerte de los individuos. Este hecho confirma que no existe riesgo de extinción local de esta especie como consecuencia de la presencia de TBT en la zona de

estudio, aunque efectos subletales como las variaciones en la fecundidad y el estrés oxidativo podrían indicar lo contrario. En este contexto, a través de los resultados del presente trabajo, se corrobora lo que otros autores destacan sobre la importancia de evaluar los efectos de sustancias disruptoras a largo plazo (Matthiessen 2000; Oehlmann y Schulte-Oehlmann 2003; Oetken *et al.* 2004; Oehlmann *et al.* 2007) que están presentes en concentraciones ambientalmente detectables más que la evaluación de efectos letales agudos como la muerte, teniendo en cuenta la plasticidad de los organismos para responder ante condiciones adversas.

En el presente estudio se determinó que los efectos de la presencia de compuestos de alta toxicidad para los gasterópodos pueden evaluarse desde diferentes enfoques, a través de la utilización de indicadores como imposex, biomarcadores de estrés oxidativo, ensayos de toxicidad y cambios morfométricos de la concha dado que pueden observarse asociaciones entre sí que expliquen las respuestas observadas.

En términos de seguridad alimentaria, el consumo de gasterópodos debe ser cuidadosamente analizado, debido a la gran capacidad de las especies para bioacumular metales como Cd y Pb. De la misma manera que bioacumulan metales, los gasterópodos a lo largo de su vida, incorporan en sus tejidos hidrocarburos poliaromáticos, TBT y otros contaminantes que no fueron evaluados en el presente estudio. A pesar de que en función de la regulación vigente pueda consumirse el pie de los organismos, es necesaria la determinación compuestos de toxicidad para humanos antes de ser propuestos como un recurso pesquero alternativo como medida de seguridad alimentaria para la población.

CONCLUSIONES

- Los índices de imposex medidos en las especies *Adelomelon ancilla* y *Buccinanops globulosus* no presentaron variaciones estacionales pudiendo ser utilizados como bioindicadores de la presencia de TBT durante cualquier época del año. Se recomienda utilizar a *B. globulosus* como bioindicador.
- El control en la legislación vigente en Argentina en relación a la prohibición del uso del TBT no ha sido efectiva en este periodo de tiempo (2008-2012), así como la prohibición mundial en relación a embarcaciones de mayor porte, porque además de registrarse ingresos recientes del contaminante, los indicadores de imposex fueron en aumento en relación a años anteriores. Esto merece especial atención y monitoreo en la zona.
- Se corroboró muy baja incidencia de imposex (sólo en casos muy aislados) en la especie *Trophon geversianus*, aun habitando en zonas de alto tráfico marítimo, destacando la diferente sensibilidad de esta especie a la presencia de TBT.
- Se determinó por primera vez la concentración de cobre (Cu), hierro (Fe), zinc (Zn), cadmio (Cd), plomo (Pb) y aluminio (Al) en gasterópodos de golfo Nuevo. Los mayores valores se registraron en el complejo glándula digestiva-gónada y sedimentos del muelle Luis Piedra Buena (MLP).
- Los niveles de cadmio en *B. globulosus* y *T. geversianus* de todos los sitios estudiados superaron el máximo valor permitido para gasterópodos de consumo humano según la regulación nacional.
- Se determinaron por primera vez en gasterópodos marinos de Argentina biomarcadores de estrés oxidativo. Los niveles de antioxidantes (como la enzima superóxido dismutasa y glutatión reducido) y el daño a lípidos resultaron mayores en la especie *B. globulosus* presente en la zona portuaria. El sitio CA, de bajo tráfico marítimo, podría tomarse como referencia en relación a estos parámetros de estrés para futuras comparaciones.
- En *B. globulosus* se registraron, a través de técnicas de morfometría geométrica (MG), variaciones estadísticamente significativas en la forma de la concha a lo largo de un gradiente de actividad marítima e imposex. En un extremo de variación, los gasterópodos que presentaron conchas redondeadas, con ápices alejados de la línea horizontal (en MLP) en comparación con el sitio de menor incidencia de imposex con conchas ahusadas y ápices cercanos al sedimento.
- La fecundidad en hembras de *B. globulosus* resultó diferente en términos de número

de embriones por ovicápsula que fue mayor en el muelle Luis Piedra Buena. Sin embargo no se observaron diferencias en el número de ovicápsulas por hembra entre los sitios. Asimismo, se registraron menores tallas en los embriones de la zona portuaria lo que podría implicar una menor supervivencia en estadios posteriores a la eclosión en comparación con CA.

- En el sitio más afectado por imposex, las hembras de *B. globulosus* que tenían ovicápsulas presentaron penes de menor longitud que aquellas que no portaban ovicápsulas. Esto podría ser consecuencia del modo de acción o incorporación diferencial de TBT en una parte de la población estudiada.
- La dosis letal media (DL₅₀ 96 h) determinada por el método Probit en organismos de *B. globulosus* expuestos a concentraciones de TBT fue de 5,41µg TBT.g de organismo⁻¹. Considerando las concentraciones de TBT en sedimentos en la zona de estudio, sería poco probable que los caracoles incorporen esas concentraciones en sus tejidos y por lo tanto, la especie no corre riesgo de extinción local.
- Se recomienda, en base a todos los resultados obtenidos en el presente estudio, no consumir gasterópodos de ninguna de las especies estudiadas en golfo Nuevo, a menos que solamente se ingiera el pie, en las cantidades calculadas según la regulación nacional e internacional establecida para Cd y Pb.
- Por último, es necesario realizar estudios periódicos de monitoreo de los contaminantes analizados en este estudio y en relación a la actividad portuaria en toda la zona costera de la provincia de Chubut y en otras zonas donde se estén capturando gasterópodos para consumo humano en pos de la seguridad alimentaria de la población.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdulla A. (2008). Maritime traffic effects on biodiversity in the Mediterranean Sea: Review of impacts, priority areas and mitigation measures. IUCN, 170 pp.
- Abidli S., Lahbib Y., Menif N.T.E. (2009). Imposex and genital tract malformations in *Hexaplex trunculus* and *Bolinus brandaris* collected in the gulfs of Tunis. *Bulletin of Marine Science* 85(1):11-25.
- Abidli S., Santos M.M., Lahbib Y., Castro L.F.C., Reis-Henriques M.A., Menif N.T.E. (2012). Tributyltin (TBT) effects on *Hexaplex trunculus* and *Bolinus brandaris* (Gastropoda: Muricidae): Imposex induction and sex hormone levels insights. *Ecological Indicators* 13:13-21.
- Agemian H., Chau A.S.Y. (1976). Evaluation of extraction techniques for the determination of metals in aquatic sediments. *Analyst* 101(1207):761-767.
- Almeida E., Almeida S., Klitzke C.F., Bainy A.C., de Medeiros M.H.G., Di Mascio P., de Melo Loureiro A.P. (2003). DNA damage in digestive gland and mantle tissue of the mussel *Perna perna*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 135(3):295-303.
- Almeida E., Diamantino T.C., de Sousa O. (2007). Marine paints: The particular case of antifouling paints. *Progress in Organic Coatings* 59:2-20.
- Almeida E.A., Bainy A.C.D., Dafre A.L., Gomes O.F., Medeiros M.H.G., Di Mascio P. (2005). Oxidative stress in digestive gland and gill of the brown mussel (*Perna perna*) exposed to air and re-submersed. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 318(1):21-30.
- Almeida M.J., Moura G., Pinheiro T., Machado J., Coimbra J. (1998). Modifications in *Crassostrea gigas* shell composition exposed to high concentrations of lead. *Aquatic Toxicology* 40:323-334.
- Alzieu C., Heral M. (1984). Ecotoxicological effects of organotin compounds on oyster culture. En: Persoone G., Caspers E., Claus C. (eds) *Ecotoxicological Testing for the Marine Environment*. Inst. Mar. Scient. Res., Belgium, 187-196.
- Alzieu C. (1986). TBT detrimental effects on oyster culture in France - Evolution since antifouling paint regulations. En *Oceans '86*. IEEE, 1130-1134.
- Alzieu C., Sanjuan J., Deltreil J.P., Borel M. (1986). Tin contamination in Arcachon Bay: Effects on oyster shell anomalies. *Marine Pollution Bulletin* 17(1):494-498.
- Alzieu C. (1998). Tributyltin: case study of a chronic contaminant in the coastal environment. *Ocean and Coastal Management* 40:23-36.
- Alzieu C. (2000). Impact of Tributyltin on marine invertebrates. *Ecotoxicology* 9:71-76.
- Anderson M. (1985). Glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods in Enzymology* 113:548-555.
- Antizar-Ladislao B. (2008). Environmental levels, toxicity and human exposure to tributyltin (TBT)-contaminated marine environment. A review. *Environment International* 34:292-308.
- Anupama Nair P.R., Sujatha C.H. (2012). Organic pollutants as endocrine disruptors: Organometallics, PAHs, organochlorine, organophosphate and carbamate insecticides, phthalates, dioxins, phytoestrogens, alkyl phenols and bisphenol A. En: Lichtfouse E., Schwarzbauer J., Robert D. (eds) *Environmental Chemistry for a Sustainable World*. Springer Netherlands, 259-309.
- Apeti D.A., Lauenstein G.G., Riedel G.F. (2009). Cadmium distribution in coastal sediments and mollusks of the US. *Marine Pollution Bulletin* 58(7):1016-1024.
- APPM. Administración Portuaria de Puerto Madryn. <http://www.appm.com.ar/>, año de acceso: 2013.
- Armada Argentina (2004). Puertos Argentinos Intereses Marítimos Nacionales, Argentina, 16 pp.

- Arrighetti F., Penchaszadeh P.E. (2010). Gametogenesis, seasonal reproduction and imposex of *Adelomelon beckii* (Neogastropoda: Volutidae) in Mar del Plata, Argentina. *Aquatic Biology* 9(1):63-75.
- ATSDR (2013). Agency for toxic substances and disease registry: Lead, cadmium, aluminium. U.S. Department of Health and Human Services. <http://www.atsdr.cdc.gov/>, año de acceso: 2013.
- Avaca M.S., Narvarte M., Martín P.R. (2010). Description of the radula of *Buccinanops globulosus* (Neogastropoda, Nassariidae) and an assessment of its variability in northern Patagonian gulfs. *Malacologia* 53(1):175-183.
- Avaca M.S., Narvarte M., Martín P. (2012). Size-assortative mating and effect of maternal body size on the reproductive output of the nassariid *Buccinanops globulosus*. *Journal of Sea Research* 69:16-22.
- Avaca M.S., Narvarte M., Martín P. (2013a). Age, growth and mortality in *Buccinanops globulosus* (Gastropoda: Nassariidae) from Golfo Nuevo (Argentina). *Marine Biology Research* 9:208-219.
- Avaca M.S., Narvarte M., Martín P., Van der Molen S. (2013b). Shell shape variation in the Nassariid *Buccinanops globulosus* in northern Patagonia. *Helgoland Marine Research* 67:567-577.
- Averbuj A. (2009). Biología reproductiva, crecimiento y dieta del caracol ciego *Buccinanops cochlidium* (Dillwyn, 1817) (Gastropoda: Nassariidae) en el golfo San José, Patagonia Argentina. Tesis de doctorado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, 200 pp.
- Averbuj A., Bigatti G., Penchaszadeh P.E. (2010). Gametogenic cycle and size at first maturity of the Patagonic edible snail *Buccinanops cochlidium* from Argentina. *Marine Biology* 157(10):2229-2240.
- Averbuj A., Cremonte F. (2010). Parasitic castration of *Buccinanops cochlidium* (Gastropoda: Nassariidae) caused by a lepecreadiid digenean in San José Gulf, Argentina. *Journal of Helminthology* 84:381-389.
- Averbuj A., Penchaszadeh P.E. (2010a). Reproductive seasonality, oviposition and development of the nassariid whelk *Buccinanops cochlidium* (Dillwyn, 1817) in Patagonia, Argentina. *Journal of Molluscan Studies* 76:25-32.
- Averbuj A., Penchaszadeh P.E. (2010b). On the reproductive biology and impact of imposex in a population of *Buccinanops monilifer* from Mar del Plata, Argentina *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 90(4):729-734.
- Averbuj A., Palomo G., Brogger M.I., Penchaszadeh P.E. (2012). Diet and feeding of the nassariid *Buccinanops cochlidium* from northern Patagonia, Argentina. *Aquatic Biology* 17:261-268.
- Averbuj A., Rocha M.N., Zabala S. (2014). Embryonic development and reproductive seasonality of *Buccinanops globulosus* (Nassariidae) (Kiener, 1834) in Patagonia, Argentina. *Invertebrate Reproduction and Development*:1-10.
- Axiak V., Vella A.J., Micallef D., Chircop R., Mintoff B. (1995). Imposex in *Hexaplex trunculus* (Gastropoda: Muricidae): first results from biomonitoring of tributyltin contamination in the Mediterranean. *Marine Biology* 121:685-691.
- Axiak V., Micallef D., Muscat J., Vella A., Mintoff B. (2003). Imposex as a biomonitoring tool for marine pollution by Tributyltin: some further observations. *Environment International* 28(8):743-749.
- Bainy A.C.D., Almeida E.A., Muller I.C., Ventura E.C., Medeiros I.D. (2000). Biochemical responses in farmed mussel *Perna perna* transplanted to

- contaminated sites on Santa Catarina Island, SC, Brazil. *Marine Environmental Research* 50(1):411-416.
- Bandow C., Weltje L. (2012). Development of an embryo toxicity test with the pond snail *Lymnaea stagnalis* using the model substance tributyltin and common solvents. *Science of the Total Environment* 435-436:90-95.
- Bao V.W.W., Leung K.M.Y., Qiu J.W., Lam M.H.W. (2011). Acute toxicities of five commonly used antifouling booster biocides to selected subtropical and cosmopolitan marine species. *Marine Pollution Bulletin* 62:1147-1151.
- Barroso C.M., Moreira M.H., Bebianno M.J. (2002). Imposex, female sterility and organotin contamination of the prosobranch *Nassarius reticulatus* from the Portuguese coast. *Marine Ecology Progress Series* 230:127-135.
- Bayne B.L., Moore M.N., Widdows J., Livingstone D.R., Salkeld P., Crisp D.J., Morris R.J., Gray J.S., Holden A.V., Newell R.C., McIntyre A.D. (1979). Measurement of the responses of individuals to environmental stress and pollution: Studies with bivalve molluscs [and discussion]. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences* 286(1015):563-581.
- Bayne B.L., Clarke K.R., Moore M.N. (1981). Some practical considerations in the measurement of pollution effects on bivalve molluscs, and some possible ecological consequences. *Aquatic Toxicology* 1(3-4):159-174.
- Beauchamp C., Fridovich I. (1971). Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 44(1):276-287.
- Beaumont A.R., Newman P.B. (1986). Low levels of Tributyl tin reduce growth of marine micro-algae. *Marine Pollution Bulletin* 17(1):457-461.
- Bebianno M.J., Langston W.J. (1992). Cadmium induction of metallothionein synthesis in *Mytilus galloprovincialis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology* 103(1):79-85.
- Bebianno M.J., Langston W.J. (1998). Cadmium and metallothionein turnover in different tissues of the gastropod *Littorina littorea*. *Talanta* 46(2):301-313.
- Belfroid A.C., Purperhart M., Ariese F. (2000). Organotin levels in seafood. *Marine Pollution Bulletin* 40(3):226-232.
- Bellas J., Beiras R., Marino-Balsa J.C., Fernandez N. (2005). Toxicity of organic compounds to marine invertebrate embryos and larvae: a comparison between the sea urchin embryogenesis bioassay and alternative test species. *Ecotoxicology* 14(3):337-353.
- Bellas J. (2006). Comparative toxicity of alternative antifouling biocides on embryos and larvae of marine invertebrates. *Science of the Total Environment* 367:573-585.
- Bellas J. (2008). Prediction and assessment of mixture toxicity of compounds in antifouling paints using the sea-urchin embryo-larval bioassay. *Aquatic Toxicology* 88:308-315.
- Berg M., Arnold C.G., Müller S.R., Mühlemann J., Schwarzenbach R.P. (2001). Sorption and desorption behavior of organotin compounds in sediment-pore water systems. *Environmental Science and Technology* 35(15):3151-3157.
- Berge J.A., Brevik E.M., Bjorge A., Folsvik N., Gabrielsen G.W., Wolkers H. (2004). Organotins in marine mammals and seabirds from Norwegian territory. *Journal of Environmental Monitoring* 6:108-112.
- Bettin C., Oehlmann J., Stroben E. (1996). TBT-induced imposex in marine neogastropods is mediated by an increasing androgen level. *Helgolander Marine Research* 50:299-317.

- Bhosle N.B. (2006). Butyltin compounds in biofilm and marine organisms from the Dona Paula Bay, west coast of India. En: Sonak S. (ed) Multiple dimensions of global environmental change, New Delhi, 432-443.
- Bigatti G. (2005). Anatomía, ecología y reproducción del caracol rojo *Odontocymbiola magellanica* (Gastropoda: Volutidae) en golfos norpatagónicos. Tesis de doctorado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, 184 pp.
- Bigatti G., Penchaszadeh P.E. (2005). Imposex in *Odontocymbiola magellanica* (Caenogastropoda: Volutidae) in Patagonia. Comunicaciones de la Sociedad Malacológica del Uruguay 9(88):371-375.
- Bigatti G., Carranza A. (2007). Phenotypic variability associated with the occurrence of imposex in *Odontocymbiola magellanica* from Golfo Nuevo, Patagonia. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom 87(3):755-759.
- Bigatti G., Ciocco N.F. (2008). Volutid snails as an alternative resource for artisanal fisheries in Northern Patagonic gulfs: availability and first suggestions for diving catches. Journal of Shellfish Research 27(2):417-421.
- Bigatti G., Primost M.A., Cledón M., Averbuj A., Theobald N., Gerwinski W., Arntz W., Morriconi E., Penchaszadeh P.E. (2009). Biomonitoring of TBT contamination and imposex incidence along 4700 km of Argentinean shoreline (SW Atlantic: From 38S to 54S). Marine Pollution Bulletin 58:695-701.
- Bjerregaard P., Andersen O. (2007). Ecotoxicology of metals-sources, transport, and effects in the ecosystem. En: Nordberg G., Fowler B., Nordberg M., Friberg L. (eds) Handbook on the Toxicology of Metals. Elsevier, 251-280.
- Blackmore G. (2000). Field evidence of metal transfer from invertebrate prey to an intertidal predator, *Thais clavigera* (Gastropoda: Muricidae). Estuarine, Coastal and Shelf Science 51:127-139.
- Blackmore G., Morton B. (2002). The influence of diet on comparative trace metal cadmium, copper and zinc accumulation in *Thais clavigera* (Gastropoda: Muricidae) preying on intertidal barnacles or mussels. Marine Pollution Bulletin 44(9):870-876.
- Blackmore G., Wang W. (2004). Relationships between metallothioneins and metal accumulation in the whelk *Thais clavigera*. Marine Ecology Progress Series 277:135-145.
- Boelsterli U.A. (2003). Mechanistic toxicology. Tylor and Francis. London, 314 pp.
- Bökenhans V., Averbuj A., Bigatti G. (2013). Estimación de la edad y crecimiento de dos poblaciones de *Buccinanops globulosus* del Golfo Nuevo mediante análisis de isótopos estables. Resúmenes del I Congreso Argentino de Malacología (CAM), La Plata, Argentina pp 86.
- Bookstein F.L. (1982). Foundations of morphometrics. Annual Review of Ecology and Systematics 13(1):451-470.
- Bookstein F.L. (1991). Morphometric tools for landmark data. Geometry and Biology. Cambridge University Press, New York, 435 pp.
- Bookstein F.L. (1997). Shape and the information in medical images: A decade of the morphometric synthesis. Computer Vision and Image Understanding 66:97-118.
- Borgå K., Fisk A.T., Hoekstra P.F., Muir D.C.G. (2004). Biological and chemical factors of importance in the bioaccumulation and trophic transfer of persistent organochlorine contaminants in arctic marine food webs. Environmental Toxicology and Chemistry 23(10):2367-2385.

- Bosma T.M.P., Harms H., Zehnder A.J.B. (2001). Biodegradation of xenobiotics in environment and technosphere. En: Beek B. (ed) Biodegradation and Persistence. Springer Berlin Heidelberg, 163-202.
- Bourdeau P.E. (2009). Prioritized phenotypic responses to combined predators in a marine snail. *Ecology* 90(6):1659-1669.
- Bourdeau P.E. (2012). Intraspecific trait cospecialization of constitutive and inducible morphological defences in a marine snail from habitats with different predation risk. *Journal of Animal Ecology* 81(4):849-858.
- Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254.
- Brady R.F. (2005). Fouling-release coatings for warships. *Defence Science Journal* 55:75-81.
- Brookes J.I., Rochette R. (2007). Mechanism of a plastic phenotypic response: predator-induced shell thickening in the intertidal gastropod *Littorina obtusata*. *Journal of Evolutionary Biology* 20(3):1015-1027.
- Brown C.C. (1978). The statistical analysis of dose-effect relationships Principles of Ecotoxicology. SCOPE, 115-148.
- Bryan G.W., Waldichuk M., Pentreath R.J., Darracott A. (1979). Bioaccumulation of marine pollutants [and discussion]. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences* 286(1015):483-505.
- Bryan G.W., Gibbs P.E., Hummerstone L.G., Burt G.R. (1986). The decline of the gastropod *Nucella lapillus* around South-West England: Evidence for the effect of Tributyltin from antifouling paints. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 66(3):611-640.
- Bryan G.W., Gibbs P.E., Hummerstone L.G., Burt G.R. (1987). Copper, zinc, and organotin as long-term factors governing the distribution of organisms in the fal estuary in Southwest England *Estuaries* 10(3):208-219.
- Burger J., Fossi C., McClellan-Green P., Orlando E.F. (2007). Methodologies, bioindicators, and biomarkers for assessing gender-related differences in wildlife exposed to environmental chemicals. *Environmental Research* 104:135-152.
- Burgess J.G., Boyd K.G., Armstrong E., Jiang Z., Yan L., Berggren M., May U., Pisacane T., Granmo A., Adams D.R. (2003). The development of a marine natural product-based antifouling paint. *Biofouling* 19:197-205.
- Burton E., Phillips I.R., Hawker D.W. (2004). Sorption and desorption behavior of Tributyltin with natural sediments. *Environmental Science and Technology* 38:6694-6700.
- Burton E.D., Phillips I.R., Hawker D.W. (2006). Tributyltin partitioning in sediments: Effect of aging. *Chemosphere* 63:73-81.
- Butler G.C. (1978). Principles of ecotoxicology. Wiley & Sons., 350 pp.
- Buttemer W.A., Abele D., Costantini D. (2010). From bivalves to birds: oxidative stress and longevity. *Functional Ecology* 24(5):971-983.
- Cao S., Wang J.D., Chen H.S., Chen D.R. (2011). Progress of marine biofouling and antifouling technologies. *Chinese Science Bulletin* 56(7):598-612.
- Caravajal-Rodríguez A., Conde-Padín P., Rolán-Alvarez E. (2005). Decomposing shell form into size and shape by geometric morphometric methods in two sympatric ecotypes of *Littorina saxatilis*. *Journal of Molluscan Studies* 71:313-318.
- Carcelles A. (1947). Mariscos de las Costas Argentinas. *Revista Argentina Austral* 18:1-21.

- Castellanos Z., Landoni N. (1993). Catálogo descriptivo de la malacofauna marina magallánica 9. Neogastropoda Muricidae y Thaisidae. Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires, La Plata, 25 pp.
- CCME (2002). Canadian sediment quality guidelines for the protection of aquatic life: summary tables, updated. In: Canadian Environment Quality Guidelines, 1999. Canadian Council of Ministers of the Environment.
- CEPA (2000). Non-pesticidal Organotin compounds. Canadian Environmental Protection Act, Environment Canada. List, Priority Substances.
- Cima F., Marin M.G., Matozzo V., Rosa L.D., Ballarin L. (1999). Biomarkers for TBT immunotoxicity studies on the cultivated clam *Tapes philippinarum* (Adams and Reeve, 1850). Marine Pollution Bulletin 39(1-12):112-115.
- Clare A.S. (1998). Towards nontoxic antifouling. Journal of Marine Biotechnology 6:3-6.
- Cledón M., N.Theobald, Gerwinski W., Penchaszadeh P.E. (2006). Imposex and organotin compounds in marine gastropods and sediments from the Mar del Plata coast, Argentina. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom 86:751-755.
- Coelho M.R., Bebianno M.J., Langston W.J. (2002). Routes of TBT uptake in the clam *Ruditapes decussatus*. II. Food as vector of TBT uptake. Marine Environmental Research 54:193-207.
- Coelho M.R., Langston W.J., Bebianno M.J. (2006). Effect of TBT on *Ruditapes decussatus* juveniles. Chemosphere 63:1499-1505.
- Collin R., Spangler A. (2012). Impacts of adelphophagic development on variation in offspring size, duration of development, and temperature-mediated plasticity. Biological Bulletin 223(3):268-277.
- Commendatore M.G., Esteves J.L., Colombo J.C. (2000). Hydrocarbons in coastal sediments of Patagonia, Argentina: Levels and probable sources. Marine Pollution Bulletin 40(11):989-998.
- Commendatore M.G., Esteves J.L. (2007). An assessment of oil pollution in the coastal zone of Patagonia, Argentina. Environmental Management 40:814-821.
- Commendatore M.G., Nievas M.L., Amin O., Esteves J.L. (2012). Sources and distribution of aliphatic and polyaromatic hydrocarbons in coastal sediments from the Ushuaia Bay (Tierra del Fuego, Patagonia, Argentina). Marine Environmental Research 70:24-31.
- Conde-Padín P., Grahame J.W., Rolán-Alvarez E. (2007). Detecting shape differences in species of the *Littorina saxatilis* complex by morphometric analysis. Journal of Molluscan Studies 73(2):147-154.
- Conde-Padín P., Caballero A., Rolán-Álvarez E. (2009). Relative role of genetic determination and plastic response during ontogeny for shell-shape traits subjected to diversifying selection. Evolution 63(5):1356-1363.
- Conti M.E., Cecchetti G. (2003). A biomonitoring study: trace metals in algae and molluscs from Tyrrhenian coastal areas Environmental Research 93:99-112.
- Conti M.E., Stripeikis J., Finoia M.G., Tudino M.B. (2011). Baseline trace metals in bivalve molluscs from the Beagle Channel, Patagonia (Argentina). Ecotoxicology 20(6):1341-1353.
- Conti M.E., Stripeikis J., Botré F., Tudino M.B. (2012a). Trace metals intake of *Nacella* (P) *magellanica* from the Beagle Channel, Tierra del Fuego (Patagonia, Argentina). International Journal of Environment and Health 6(1):84-91.

- Conti M.E., Stripeikis J., Finoia M.G., Tudino M.B. (2012b). Baseline trace metals in gastropod mollusks from the Beagle Channel, Tierra del Fuego (Patagonia, Argentina). *Ecotoxicology* 21(4):1112-1125.
- Cumplido M., Averbuj A., Bigatti G. (2010). Reproductive seasonality and oviposition in *Trophon geversianus* (Gastropoda: Muricidae) from Golfo Nuevo, Argentina. *Journal of Shellfish Research* 29(2):423-428.
- Cumplido M., Sastre V., Marino G., Sala L., Taibo P., Baulde D., Bigatti G. (2011). Toxina paralizante de moluscos en gasterópodos marinos de Norpatagonia (Argentina). Resúmenes del Congreso Latinoamericano de Malacología (CLAMA), Puerto Madryn, Argentina, pp 127.
- Cuña V., Saura M., Quesada H., Rolán-Alvarez E. (2011). Extensive micro-geographical shell polymorphism in a planktotrophic marine intertidal snail. *Marine Ecology Progress Series* 427:133-143.
- Chacón O.M., Cuevas F.C., de La Fuente C.O., Díaz F.A., Huaquin L.M. (2007). Endocrine disruption and imposex. *Avances en Ciencias Veterinarias* 22:42-48.
- Chagot D., Alzieu C., Sanjuan J., Grizel H. (1990). Sublethal and histopathological effects of trace levels of tributyltin fluoride on adult oysters *Crassostrea gigas*. *Aquatic Living Resources* 3:121-130.
- Champ M.A. (2000). A review of organotin regulatory strategies, pending actions, related costs and benefits. *The Science of the Total Environment* 258:21-71.
- Champ M.A. (2003). Economic and environmental impacts on ports and harbors from the convention to ban harmful marine anti-fouling systems. *Marine Pollution Bulletin* 46:935-940.
- Chan K.M., Leung K.M.Y., Cheung K.C., Wong M.H., Qiu J. (2008). Seasonal changes in imposex and tissue burden of butyltin compounds in *Thais clavigera* populations along the coastal area of Mirs Bay, China. *Marine Pollution Bulletin* 57:645-651.
- Chandran R., Sivakumar A.A., Mohandass S., Aruchami M. (2005). Effect of cadmium and zinc on antioxidant enzyme activity in the gastropod, *Achatina fulica*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 140(3):422-426.
- Chapman P.M. (1995). Bioassay testing for Australia as part of water quality assessment programmes *Australian Journal of Ecology* 20:7-19.
- Chapman P.M., Wang F., Janssen C., Persoone G., Allen H.E. (1998). Ecotoxicology of metals in aquatic sediments: binding and release, bioavailability, risk assessment, and remediation. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 55(10):2221-2243.
- Chapman R.W., Guillette L.J.J. (2013). Contaminants and imposable: transcriptomics of contaminant-induced sex change. *Molecular Ecology* 22:1485-1487.
- Chen H.G., Jia X.P., Cai W.G., Lin Q., Ma S.W. (2011). Antioxidant responses and bioaccumulation in green-lipped mussels (*Perna Viridis*) under acute Tributyltin Chloride exposure. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 87(5):506-511.
- Chesman B.S., Langston W.J. (2006). Intersex in the clam *Scrobicularia plana*: a sign of endocrine disruption in estuaries? *Biology Letters* 2:420-422.
- Cheung C.C.C., Zheng G.J., Li A.M.Y., Richardson B.J., Lam P.K.S. (2001). Relationships between tissue concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis* *Aquatic Toxicology* 52:189-203.

- Cheung M.S., Fok E.M.W., Ng T.Y.T., Yen Y.F., Wang W.X. (2006). Subcellular cadmium distribution, accumulation, and toxicity in a predatory gastropod, *Thais clavigera*, fed different prey. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25(1):174-181.
- Cheung S.G., Tai K.K., Leung C.K., Siu Y.M. (2002). Effects of heavy metals on the survival and feeding behaviour of the sandy shore scavenging gastropod *Nassarius festivus* (Powys). *Marine Pollution Bulletin* 45(1-2):107-113.
- Choi M., Moon H.B., An Y.R., Choi S.G., Choi H.G. (2011). Accumulation of butyltin compounds in cetaceans from Korean coastal waters. *Marine Pollution Bulletin* 62:1120-1123.
- Choi M., Moon H.B., Yu J., Cho H.S., Choi H.G. (2013). Temporal trends (2004–2009) of imposex in rock shells *Thais clavigera* collected along the Korean coast associated with Tributyltin regulation in 2003 and 2008. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 64:448-455.
- Dafforn K.A., Lewis J.A., Johnston E.L. (2011). Antifouling strategies: History and regulation, ecological impacts and mitigation. *Marine Pollution Bulletin* 62:453-465.
- Dahlhoff E.P. (2004). Biochemical indicators of stress and metabolism: Applications for marine ecological studies. *Annual Review of Physiology* 66(1):183-207.
- Daleo P., Escapa M., Isacch J.P., Ribeiro P., Iribarne O. (2005). Trophic facilitation by the oystercatcher *Haematopus palliatus* Temminck on the scavenger snail *Buccinanops globulosum* Kiener in a Patagonian bay *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 325:27-34.
- Darrigran G. (2002). Potential impact of filter-feeding invaders on temperate inland freshwater environments. *Biological Invasions* 4(1-2):145-156.
- Darrigran G., Damborenea C. (2011). Ecosystem engineering impact of *Limnoperna fortunei* in South America. *Zoological Science* 28(1):1-7.
- Davidson I.C., Brown C.W., Sytsma M.D., Ruiz G.M. (2009). The role of containerships as transfer mechanisms of marine biofouling species. *Biofouling* 25(7):645-655.
- Davies I.M., Minchin A., Harding M. (1997). OSPAR Working group on Concentrations, Trends and Effects of Substances in the Marine Environment (SIME). Report on the TBT training workshop, 24-26 September 1997. Marine Laboratory, Aberdeen Report No. 9, 33 pp.
- Davies I.M., Bailey S.K., Harding M.J.C. (1998). Tributyltin inputs to the North Sea from shipping activities, and potential risk of biological effects. *Journal of Marine Science* 55:34-43.
- Davies I.M. (2000a). Kinetics of the development of imposex in transplanted adult dogwhelks, *Nucella lapillus*. *Environmental Pollution* 107(3):445-449.
- Davies K.J.A. (1995). Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochemical Society Symposia* 61:1-32.
- Davies K.J.A. (2000b). Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB Life* 50(4-5):279-289.
- Davies O.A., Allison M.E., Uyi H.S. (2006). Bioaccumulation of heavy metals in water, sediment and periwinkle (*Tympanotonus fuscatus var radula*) from the Elechi Creek, Niger Delta. *African Journal of Biotechnology* 5(10):968-973.
- Davies P.E., Cook L.S.J., Goenarso D. (1994). Sublethal responses to pesticides of several species of Australian freshwater fish and crustaceans and rainbow trout. *Environmental Toxicology and Chemistry* 13(8):1341-1354.

- de Mora S.J., King N.G., Miller M.C. (1989). Tributyltin and total tin in marine sediments: Profiles and the apparent rate of TBT degradation. *Environmental Technology Letters* 10(10):901-908.
- de Mora S.J., Pelletier E. (1997). Environmental tributyltin research: past, present, future. *Environmental Technology* 18:1169-1177.
- de Zwart L.L., Meerman J.H.N., Commandeur J.N.M., Vermeulen N.P.E. (1999). Biomarkers of free radical damage: Applications in experimental animals and in humans. *Free Radical Biology and Medicine* 26(1/2):202-226.
- DeForest D.K., Brix K.V., Adams W.J. (2007). Assessing metal bioaccumulation in aquatic environments: The inverse relationship between bioaccumulation factors, trophic transfer factors and exposure concentration. *Aquatic Toxicology* 84:236-246.
- del Brío F. (2011). Determinación de TBT, factores de acumulación e imposex, en el volutido *Odontocymbiola magellanica* en la Bahía Nueva, Chubut. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, 102 pp.
- Delucchi F., Tombesi N.B., Freije R.H., Marcovecchio J.E. (2007). Butyltin compounds in sediments of the Bahía Blanca Estuary, Argentina. *Environmental Monitoring and Assessment* 132:445-451.
- Delucchi F., Narvarte M.A., Amín O., Tombesi N.B., Freije R.H., Marcovecchio J.E. (2011). Organotin compounds in sediments of three coastal environments from the Patagonian shore, Argentina. *International Journal of Environment and Waste Management* 8(1-2):3-17.
- Dellatorre F.G., Pisoni J.P., Barón P.J., Rivas A.L. (2012). Tide and wind forced nearshore dynamics in Nuevo Gulf (Northern Patagonia, Argentina): Potential implications for cross-shore transport. *Journal of Marine Systems* 96-97:82-89.
- Depledge M.H., Fossi M.C. (1994). The role of biomarkers in environmental assessment (2). *Invertebrates. Ecotoxicology* 3(3):161-172.
- Deschaseaux E., Taylor A., Maher W. (2011). Measure of stress response induced by temperature and salinity changes on hatched larvae of three marine gastropod species. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 397(2):121-128.
- Deutsch U., Brick M. (1993). Morphological effects of tributyltin (TBT) in vitro on the genital system of the mesogastropoda *Littorina littorea* (Prosobranchia) *Helgoländer Meeresunters* 47:49-60.
- Di Giulio R.T., Washburn P.C., Wenning R.J., Winston G.W., Jewell C.S. (1989). Biochemical responses in aquatic animals: A review of determinants of oxidative stress. *Environmental Toxicology and Chemistry* 8(12):1103-1123.
- Di Salvatore P., Calcagno J.A., Ortíz N., Ríos de Molina M.C., Sabatini S.E. (2013). Effect of seasonality on oxidative stress responses and metal accumulation in soft tissues of *Aulacomya atra*, a mussel from the South Atlantic Patagonian coast. *Marine Environmental Research* 92(0):244-252.
- Diez S., Abalos M., Bayona J.M. (2002). Organotin contamination in sediments from the Western Mediterranean enclosures following 10 years of TBT regulation. *Water Research* 36:905-918.
- Donaghy L., Hong H.K., Lambert C., Park H.S., Shim W.J., Choi K.S. (2010). First characterisation of the populations and immune-related activities of hemocytes from two edible gastropod species, the disk abalone, *Haliotis discus discus* and the spiny top shell, *Turbo cornutus*. *Fish and Shellfish Immunology* 28(1):87-97.
- Downs C.A., Dillon Jr R.T., Fauth J.E., Woodley C.M. (2001). A molecular biomarker system for assessing the health of gastropods (*Ilyanassa obsoleta*) exposed to

- natural and anthropogenic stressors. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 259(2):189-214.
- Dowson P.H., Bubb J.M., Lester J.N. (1993). Temporal distribution of organotins in the aquatic environment: Five years after the 1987 UK retail ban on TBT based antifouling paints. *Marine Pollution Bulletin* 26(9):487-494.
- Doyotte A., Cossu C., Jacquin M.C., Babut M., Vasseur P. (1997). Antioxidant enzymes, glutathione and lipid peroxidation as relevant biomarkers of experimental or field exposure in the gills and the digestive gland of the freshwater bivalve *Unio tumidus*. *Aquatic Toxicology* 39(2):93-110.
- DPMA (1998). Dirección de Protección del Medio Ambiente, Régimen para la protección del medio ambiente. Prefectura Naval Argentina. Ordenanza 4/98, Tomo 6, Anexo 1.
- Duarte C.A., Giarratano E., Amin O.A., Comoglio L.I. (2011). Heavy metal concentrations and biomarkers of oxidative stress in native mussels (*Mytilus edulis chilensis*) from Beagle Channel coast (Tierra del Fuego, Argentina). *Marine Pollution Bulletin* 62(8):1895-1904.
- Dubey S.K., Roy U. (2003). Biodegradation of tributyltins (organotins) by marine bacteria. *Applied Organometallic Chemistry* 17:3-8.
- Duft M., Schulte-Oehlmann U., Tillmann M., Weltje L., Oehlmann J. (2005). Biological impact of organotin compounds on mollusks in marine and freshwater ecosystems. *Coastal Marine Science* 29(2):95-110.
- Dyrynda E.A. (1992). Incidence of abnormal shell thickening in the pacific oyster *Crassostrea gigas* in Poole Harbour (UK), subsequent to the 1987 TBT restrictions. *Marine Pollution Bulletin* 24(3):156-163.
- Edward F.B., Yap C.K., Ismail A., Tan S.G. (2009). Interspecific variation of heavy metal concentrations in the different parts of tropical intertidal bivalves. *Water, Air, and Soil Pollution* 196(1-4):297-309.
- EFSA (2009). Scientific opinion on cadmium in food. European Food Safety Authority panel on contaminants in the food chain (CONTAM). EFSA Journal. www.efsa.europa.eu/efsajournal.
- EFSA (2010). Scientific opinion on lead in food. European Food Safety Authority panel on contaminants in the food chain (CONTAM). EFSA Journal. www.efsa.europa.eu/efsajournal 8(4):151.
- EFSA (2011). Statement on tolerable weekly intake for cadmium. European Food Safety Authority panel on contaminants in the food chain (CONTAM). EFSA Journal. www.efsa.europa.eu/efsajournal.
- Eisler R. (1989). Tin hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review. Contaminant Hazard Reviews U.S. Fish and Wildlife Service, Patuxent Wildlife Research Center Laurel, MD 20708, 1-53.
- Eisler R. (2010). Molluscs Compendium of trace metals and marine biota. Elsevier, Amsterdam, 143-397.
- El Menif N.T., Lahbib Y., Le Pennec M., Flower R., Boumaiza M. (2006). Intensity of the imposex phenomenon - impact on growth and fecundity in *Hexaplex trunculus* (Mollusca: Gastropoda) collected in Bizerta lagoon and channel (Tunisia). *Cahiers de Biologie Marine* 47:165-175.
- EPA (2000). Methodology for deriving ambient water quality criteria for the protection of human health. Technical Support Document, Volume 2: Development of National Bioaccumulation Factors.
- Escher B.I., Ashauer R., Dyer S., Hermens J.L.M., Lee J., Leslie H.A., Mayer P., Meador J.P., Warne M.S.J. (2010). Crucial role of mechanisms and modes of

- toxic action for understanding tissue residue toxicity and internal effect concentrations of organic chemicals. *Integrated Environmental Assessment and Management* 7(1):28-49.
- Esteves J.L., M. Commendatore, Nievas M.L., Paletto V.M., Amín O. (2006). Hydrocarbon pollution in coastal sediments of Tierra del Fuego Islands, Patagonia Argentina. *Marine Pollution Bulletin* 52(5):582-590.
- Evans S.M., Leksono T., McKinnell P.D. (1995). Tributyltin pollution. A diminishing problem following legislation limiting the use of TBT-based anti-fouling paints. *Marine Pollution Bulletin* 30(1):14-21.
- Evans S.M., Evans P.M., Leksono T. (1996). Widespread recovery of dogwhelks, *Nucella lapillus* (L.), from Tributyltin contamination in the North Sea and Clyde Sea. *Marine Pollution Bulletin* 32(3):263-269.
- Evans S.M., Kerrigan E., Palmer N. (2000). Causes of Imposex in the Dogwhelk *Nucella lapillus* (L.) and its Use as a Biological Indicator of Tributyltin Contamination. *Marine Pollution Bulletin* 40(3):212-219.
- Fang Z.Q., Cheung R.Y.H., Wong M.H. (2001). Heavy metal concentrations in edible bivalves and gastropods available in major markets of the Pearl River Delta. *Journal of Environmental Sciences* 13(2):210-217.
- Fent K. (1998). Effects of organotin compounds in fish: From the molecular to the population level. En: Braunbeck T., Hinton D.E., Streit B. (eds) *Fish ecotoxicology, Switzerland*, 259-302.
- Fent K. (2003). Ecotoxicological problems associated with contaminated sites. *Toxicology Letters* 140/141:353-365.
- Fernández-Dávila M.L., Razo-Estrada A.C., García-Medina S., Gómez-Oliván L.M., Piñón-López M.J., Ibarra R.G., Galar-Martínez M. (2012). Aluminum-induced oxidative stress and neurotoxicity in grass carp (Cyprinidae-*Ctenopharingodon idella*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 76:87-92.
- Finnegan M.C., Pittman S., DeLorenzo M.E. (2009). Lethal and sublethal toxicity of the antifoulant compound Irgarol 1051 to the mud snail *Ilyanassa obsoleta*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 56:85-95.
- Finney D.J. (1971). *Probit analysis: A statistical treatment of the sigmoid response curve*. Cambridge University Press, London 256 pp.
- Fitridge I., Dempster T., Guenther J., Nys R.d. (2012). The impact and control of biofouling in marine aquaculture: a review. *Biofouling* 28(7):649-669.
- Foale S. (1993). An evaluation of the potential of gastropod imposex as a bioindicator of tributyltin pollution in Port Phillip Bay, Victoria. *Marine Pollution Bulletin* 26(10):546-552.
- Forbes V.E., Warbritton R., Aufderheide J., Hoeven N.V.D., Caspers N. (2008). Effects of Bisphenol A on fecundity, egg hatchability, and juvenile growth of *Marisa cornuarietis*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27(11):2332-2340.
- Frias J.E., Gil M.N., Esteves J.L., García Borboroglu P., Kane O.J., Smith J.R., Boersma P.D. (2012). Mercury levels in feathers of Magellanic penguins. *Marine Pollution Bulletin* 64(6):1265-1269.
- Fridovich I. (1995). Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annual Review of Biochemistry* 64(1):97-112.
- Gaiero D., Probst J., Depetris P., Lelyter L., Kempe S. (2002). Riverine transfer of heavy metals from Patagonia to the southwestern Atlantic Ocean. *Regional Environmental Change* 3(1-3):51-64.
- Galante-Oliveira S., Oliveira I., Santos J.A., Pereira M.L., Pacheco M., Barroso C.M. (2010). Factors affecting RPSI in imposex monitoring studies using *Nucella*

- lapillus* (L.) as bioindicator. Journal of Environmental Monitoring 12:1055-1063.
- Garaventa F., Pellizzato F., Faimali M., Terlizzi A., Medakovic D., Geraci S., Pavoni B. (2006). Imposex in *Hexaplex trunculus* at some sites on the North Mediterranean coast as a base-line for future evaluation of the effectiveness of the total ban on organotin based antifouling paints. Hydrobiologia 555:281-287.
- Garaventa F., Centanni E., Fiorini S., Noventa S., Terlizzi A., Faimali M., Pavoni B. (2008). New implications in the use of imposex as a suitable tool for tributyltin contamination: experimental induction in *Hexaplex trunculus* (Gastropoda, Muricidae) with different stressors. Cell Biology and Toxicology 24:563-571.
- Gennari A., Viviani B., Galli C.L., Marinovich M., Pieters R., Corsini E. (2000). Organotins induce apoptosis by disturbance of [Ca²⁺]_i and mitochondrial activity, causing oxidative stress and activation of caspases in rat thymocytes Toxicology and Applied Pharmacology 169 185-190.
- Giarratano E., Amin O.A. (2010). Heavy metals monitoring in the southernmost mussel farm of the world (Beagle Channel, Argentina). Ecotoxicology and Environmental Safety 73(6):1378-1384.
- Giarratano E., Duarte C.A., Amin O.A. (2010). Biomarkers and heavy metal bioaccumulation in mussels transplanted to coastal waters of the Beagle Channel. Ecotoxicology and Environmental Safety 73(3):270-279.
- Giarratano E., Gil M.N., Malanga G. (2013). Assessment of antioxidant responses and trace metal accumulation by digestive gland of ribbed mussel *Aulacomya atra atra* from Northern Patagonia. Ecotoxicology and Environmental Safety 92(0):39-50.
- Gibbs P.E., Bryan G.W. (1986). Reproductive failure in populations of the dog-whelk, *Nucella lapillus*, caused by imposex induced by Tributyltin from antifouling paints. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom 66(4):767-777.
- Gibbs P.E., Bryan G.W. (1987). TBT Paints and the demise of the dog-whelk, *Nucella lapillus* (Gastropoda). Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom 1482-1487.
- Gibbs P.E., Bryan G.W., Pascoe P.L. (1991a). TBT-induced imposex in the dogwhelk, *Nucella lapillus* : Geographical uniformity of the response and effects. Marine Environmental Research 32(1-4):79-87.
- Gibbs P.E., Pascoe P.L., Bryan G.W. (1991b). Tributyltin-induced imposex in Stenoglossan gastropods: Pathological effects on the female reproductive system. Comparative Biochemistry and Physiology C Comparative Pharmacology 100(1/2):231-235.
- Gibbs P.E., Bryan G.W. (1994). Biomonitoring of Tributyltin (TBT) pollution using the imposex response of neogastropod molluscs. En: Kramer K.J.M. (ed) Biomonitoring of Coastal Waters and Estuaries, Boca Raton, 205-226.
- Gibbs P.E., Bryan G.W. (1996). Reproductive failure in the gastropod *Nucella lapillus* associated with Imposex caused by Tributyltin pollution: A review. En: Champ M.A., Seligman P.F. (eds) Organotin. Springer, Netherlands, 259-280.
- Gibson P.C., Wilson S.P. (2003). Imposex still evident in eastern Australia 10 years after tributyltin restrictions. Marine Environmental Research 55:101-112.
- Gil M.N., Harvey M., Esteves J.L. (1988). Metal content in bivalves molluscs from the San Jose and Nuevo gulfs, Patagonia Argentina. Marine Pollution Bulletin 19(4):181-182.

- Gil M.N., Sastre V., Santinelli N., Esteves J.L. (1989). Metal content in seston from the San José Gulf, Patagonia, Argentina. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 43(3):337-341.
- Gil M.N., Harvey M.A., Beldoménico H., García S., Commendatore M.G., Gandini P., Frere E., Yorio P., Crespo E., Esteves J.L. (1996). Contaminación por metales y plaguicidas organoclorados en organismos marinos de la zona costera Patagónica. *Informes Técnicos del Plan de Manejo Integrado de la Zona Costera Patagónica (Puerto Madryn, Argentina) N° 32.*
- Gil M.N., Harvey M.A., Esteves J.L. (1999). Heavy metals in intertidal surface sediments from the Patagonian Coast, Argentina. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 63(1):52-58.
- Gil M.N., Torres A., Harvey M., Esteves J.L. (2006). Metales pesados en organismos marinos de la zona costera de la Patagonia argentina continental *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 41(2):167-176.
- Gil M.N., Torres A.I., Amin O., Esteves J.L. (2011). Assessment of recent sediment influence in an urban polluted subantarctic coastal ecosystem. Beagle Channel (Southern Argentina). *Marine Pollution Bulletin* 62:201-207.
- Gilardoni C., Etchegoin J., Diaz J.I., Ituarte C., Cremonte F. (2011). A survey of larval digeneans in the commonest intertidal snails from Northern Patagonian coast, Argentina. *Acta Parasitologica* 56(2):163-179.
- Giménez J., Lasta M., Bigatti G., Penchaszadeh P.E. (2005). Exploitation of the volute snail *Zidona dufresnei* in Argentine waters, Southwestern Atlantic Ocean. *Journal of Shellfish Research* 24(4):1135-1140.
- Goldberg R.N., Averbuj A., Cledón M., Luzzatto D., Nudelman N.S. (2004). Search for triorganotins along the Mar del Plata (Argentina) marine coast: finding of tributyltin in egg capsules of a snail *Adelomelon brasiliense* (Lamarck, 1822) population showing imposex effects. *Applied Organometallic Chemistry* 18:117-123.
- Gollasch S. (2002). The importance of ship hull fouling as a vector of species introductions into the North Sea. *Biofouling* 18(2):105-121.
- Gooding M.P., LeBlanc G.A. (2001). Biotransformation and disposition of testosterone in the eastern mud snail *Ilyanassa obsoleta*. *General and Comparative Endocrinology* 122:172-180.
- Gooding M.P., Wilson V.S., Folmar L.C., Marcovich D.T., LeBlanc G.A. (2003). The biocide Tributyltin reduces the accumulation of testosterone as fatty acid esters in the mud snail (*Ilyanassa obsoleta*). *Environmental Health Perspectives* 111(4):426-430.
- Gray J.S. (1981). The ecology of marine sediments: an introduction to the structure and function of benthic communities. PhD Thesis. Cambridge, University Press 185 pp.
- Gray J.S. (2002). Biomagnification in marine systems: the perspective of an ecologist. *Marine Pollution Bulletin* 45:46-52.
- Griffin M., Pastorino G. (2005). The genus *Trophon* Monfort, 1810 (Gastropoda: Muricidae) in the Tertiary of Patagonia. *Journal of Paleontology* 79(2):296-311.
- Guibert L.M., Loviso C.L., Marcos M.S., Commendatore M.G., Dionisi H.M., Lozada M. (2012). Alkane biodegradation genes from chronically polluted Subantarctic coastal sediments and their shifts in response to oil exposure. *Microbial Ecology* 64(3):605-616.
- Gust M., Buronfosse T., Geffard O., Coquery M., Mons R., Abbaci K., Giamberini L., Garric J. (2011). Comprehensive biological effects of a complex field poly-

- metallic pollution gradient on the New Zealand mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* (Gray). *Aquatic Toxicology* 101(1):100-108.
- Habig W.H., Pabst M.J., Jakoby W.B. (1974). Glutathione S-Transferases: the first enzymatic step in Mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry* 249(22):7130-7139.
- Hails G.W., Milne A.J. (1975). Antifouling paint comprising a copolymer containing organotin salt and a pigment having a component which reacts with sea water and another component which does not react with sea water. Patente US 4191579 A. England.
- Hall B.D., Bodaly R.A., Fudge R.J.P., Rudd J.W.M., Rosenberg D.M. (1997). Food as the dominant pathway of methylmercury uptake by fish. *Water, Air, and Soil Pollution* 100:13-24.
- Hall L.W., Scott M.C., Killen W.D., Unger M.A. (2000). A probabilistic ecological risk assessment of Tributyltin in surface waters of the Chesapeake Bay watershed. *Human and Ecological Risk Assessment* 6(1):141-179.
- Halliwell B. (1999). Antioxidant defence mechanisms: From the beginning to the end (of the beginning). *Free Radical Research* 31(4):261-272.
- Harding M.J.C., Bailey S.K., Davies I.M. (1996). Effects of TBT on the reproductive success of the dogwhelk *Nucella lapillus*. Napier University of Edinburgh and The Scottish Office of Agriculture, Environment and Fisheries Department, Aberdeen, Scotland 75 pp.
- Harvey M.A., Gil M.N. (1988). Concentrations of some trace elements in recent sediments from the San José and Nuevo gulfs, Patagonia Argentina. *Marine Pollution Bulletin* 19(8):394-396.
- Héral M., Alzieu C., Deslous-Paoli J.M. (1989). Effect of organotin compounds (TBT) used in antifouling paints on cultured marine molluscs-a literature study. En: Pauw N.D., Jaspers E., Ackefors H., Wilkins N. (eds) *Aquaculture a biotechnology in progress*. European Aquaculture Society, Bredene, Belgium, 1081-1089.
- Herrmann M., Carstensen D., Fischer S., Laudien J., Penchaszadeh P.E., Arntz W.E. (2009). Population structure, growth, and production of the wedge clam *Donax hanleyanus* (Bivalvia: Donacidae) from northern Argentinean beaches. *Journal of Shellfish Research* 28(3):511-526.
- Hollander J., Collyer M.L., Adams D.C., Johannesson K. (2006). Phenotypic plasticity in two marine snails: constraints superseding life history. *Journal of Evolutionary Biology* 19(6):1861-1872.
- Horiguchi T., Shiraishi H., Shimizu M., Morita M. (1997). Effects of triphenyltin chloride and five other organotin compounds on the development of imposex in the rock shell, *Thais clavigera*. *Environmental Pollution* 95(1):85-91.
- Horiguchi T., Imai T., Cho H.S., Shiraishi H., Shibata Y., Morita M., Shimizu M. (1998). Acute toxicity of Organotin compounds to the larvae of the rock shell, *Thais clavigera*, the disk abalone, *Haliotis discus discus* and the giant abalone, *Haliotis madaka*. *Marine Environmental Research* 46(1-5):469-473.
- Horiguchi T., Nishikawa T., Ohta Y., Shiraishi H., Morita M. (2007). Retinoid X receptor gene expression and protein content in tissues of the rock shell *Thais clavigera*. *Aquatic Toxicology* 84:379-388.
- Horiguchi T., Ohta Y., Nishikawa T., Shiraishi F., Shiraishi H., Morita M. (2008). Exposure to 9- retinoic acid induces penis and *vas deferens* development in the female rock shell, *Thais clavigera*. *Cell Biology and Toxicology* 24:553-562.

- Huang Z., Chen Y., Zhao Y., Zuo Z., Chen M., Wang C. (2005). Antioxidant responses in *Meretrix meretrix* exposed to environmentally relevant doses of tributyltin. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 20:107-111.
- Hutchinson T.H. (2002). Reproductive and developmental effects of endocrine disruptors in invertebrates: in vitro and in vivo approaches. *Toxicology Letters* 131:75-81.
- IMO (2002). International Maritime Organization. Focus on IMO-Anti-fouling systems. 31pp
- IPCS (1989). International Programme on Chemical Safety: Lead - environmental aspects. <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc85.htm>.
- Jadhav S., Bhosale D., Bhosle N. (2011). Baseline of organotin pollution in fishes, clams, shrimps, squids and crabs collected from the west coast of India. *Marine Pollution Bulletin* 62:2213-2219.
- Janssen C.R., Heijerick D.G., Schamphelaere K.A.C.D., Allen H.E. (2003). Environmental risk assessment of metals: tools for incorporating bioavailability. *Environment International* 28:793-800.
- Jia X., Zhang Z., Wang S., Lin P., Zou Z., Huang B., Wang Y. (2009). Effects of tributyltin (TBT) on enzyme activity and oxidative stress in hepatopancreas and hemolymph of small abalone, *Haliotis diversicolor supertexta*. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology* 27(4):816-824.
- Johannesson B. (1986). Shell morphology of *Littorina saxatilis* Olivi: The relative importance of physical factors and predation. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 102(2):183-195.
- Kamel S.J., Oyarzun F.X., Grosberg R.K. (2010). Reproductive biology, family conflict, and size of offspring in marine invertebrates. *Integrative and Comparative Biology* 50(4):619-629.
- Kannan K., Tanabe S., Iwata H., Tatsukawa R. (1995). Butyltins in muscle and liver of fish collected from certain asian and oceanian countries. *Environmental Pollution* 90(3):279-290.
- Kannan K., Senthilkumar K., Giesy J.P. (1999). Occurrence of butyltin compounds in human blood. *Environmental Science and Technology* 33(10):1776-1779.
- Kappus H., Sies H. (1981). Toxic drug effects associated with oxygen metabolism: Redox cycling and lipid peroxidation. *Experientia* 37(12):1233-1241.
- Kefi F.J., Lahbib Y., Abdallah L.G.B., Menif N.T.E. (2012). Shell disturbances and butyltins burden in commercial bivalves collected from the Bizerta lagoon (northern Tunisia). *Environmental Monitoring and Assessment* 184:6869-6876.
- Kelly B.C., Ikonomou M.G., Blair J.D., Morin A.E., Gobas F.A.P.C. (2007). Food web-specific biomagnification of persistent organic pollutants. *Science* 317(5835):236-239.
- Ketata I., Denier X., Hamza-Chaffai A., Minier C. (2008). Endocrine-related reproductive effects in molluscs. *Comparative Biochemistry and Physiology C Comparative Pharmacology* 147:261-270.
- Khati W., Ouali K., Mouneyrac C., Banaoui A. (2012). Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use in biomonitoring. *Energy Procedia* 18(0):784-794.
- Kirschner C.M., Brennan A.B. (2012). Bio-inspired antifouling strategies. *Annual Review of Materials Research* 42(1):211-229.
- Klingenberg C.P. (2011). MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular Ecology Resources* 11:353-357.

- Lagadic L., Caquet T. (1998). Invertebrates in testing of environmental chemicals: Are they alternatives?. *Environmental Health Perspectives Supplements* 106(2):593-611.
- Lahbib Y., Abidli S., Menif N.T.E. (2009). Relative growth and reproduction in Tunisian populations of *Hexaplex trunculus* with contrasting imposex levels. *Journal of Shellfish Research* 28(4):891-898.
- Laitano M.V., Núñez J.D., Cledón M. (2013). Shell alterations in the limpet *Bostrycapulus odites*: A bioindicator of harbour pollution and mine residuals. *Ecological Indicators* 34:345-351.
- Lasta M.L., Roux A., Bremec C. (2000). Caracoles marinos de interés pesquero. Moluscos gasterópodos volútidos. Informe técnico INIDEP, 13 pp.
- Lau M.C., Chan K.M., Leung K.M.Y., Luan T.G., Yang M.S., Qiu J.W. (2007). Acute and chronic toxicities of tributyltin to various life stages of the marine polychaete *Hydroides elegans*. *Chemosphere* 69:135-144.
- Laughlin R.B., Jr., Thain J.E., Davidson B.M., Valkirs A.O., Newton F.C., III (1996). Experimental studies of chronic toxicity of Tributyltin compounds. En: Champ M.A., Seligman P.F. (eds) *Organotin*. Springer Netherlands, 191-217.
- Le Blanc G.A., Bain L.J. (1997). Chronic toxicity of environmental contaminants: Sentinels and biomarkers. *Environmental Health Perspectives Supplements* 105(1):65-80.
- Lee J., Lee K.-T., Park G.S. (2005). Acute toxicity of heavy metals, Tributyltin, ammonia and polycyclic aromatic hydrocarbons to benthic amphipod *Grandidierella japonica*. *Ocean Science Journal* 40(2):61-66.
- Lee R.F. (1991). Metabolism of tributyltin by marine animals and possible linkages to effects. *Marine Environmental Research* 32:29-35.
- Leonard S.S., Harris G.K., Shi X. (2004). Metal-induced oxidative stress and signal transduction. *Free Radical Biology and Medicine* 37(12):1921-1942.
- Lesser M.P. (2006). Oxidative stress in marine environments: Biochemistry and physiological ecology. *Annual Review of Physiology* 68(1):253-278.
- Leung K.M.Y., Furness R.W. (1999). Effects of animal size on concentrations of metallothionein and metals in periwinkles *Littorina littorea* collected from the Firth of Clyde, Scotland. *Marine Pollution Bulletin* 39(1-12):126-136.
- Li Z.Y. (2005). Seasonal variation in imposex intensity of *Thais clavigera*. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology* 23(2):163-168.
- Liang L.N., He B., Jiang G.B., Chen D.Y., Yao Z.W. (2004). Evaluation of mollusks as biomonitors to investigate heavy metal contaminations along the Chinese Bohai Sea. *Science of the Total Environment* 324(1):105-113.
- Lima D., Reis-Henriques M.A., Silva R., Santos A.I., Castro L.F.C., Santos M.M. (2011). Tributyltin-induced imposex in marine gastropods involves tissue-specific modulation of the retinoid X receptor. *Aquatic Toxicology* 101:221-227.
- Liu J.H., Kueh C.S.W. (2005). Biomonitoring of heavy metals and trace organics using the intertidal mussel *Perna viridis* in Hong Kong coastal waters *Marine Pollution Bulletin* 51:857-875.
- Livingstone D.R. (1988). Responses of microsomal NADPH-cytochrome c reductase activity and cytochrome P-450 in digestive glands of *Mytilus edulis* and *Littorina littorea* to environmental and experimental exposure to pollutants *Marine Ecology Progress Series* 46:37-43.

- Livingstone D.R., Frilin L., George S.G. (1994). Molecular biomarkers and toxic consequences of impact by organic pollution in aquatic organisms. En: Sutcliffe D.W. (ed) Freshwater Biological Association, 154-171.
- Livingstone D.R. (2001). Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Marine Pollution Bulletin* 42(8):656-666.
- Livingstone D.R. (2003). Oxidative stress in aquatic organisms in relation to pollution and aquaculture. *Revue de Médecine Vétérinaire* 154(6):427-430.
- Loring D.H., Rantala R.T.T. (1992). Manual for the geochemical analyses of marine sediments and suspended particulate matter. *Earth-Science Reviews* 32(4):235-283.
- Luoma S.N., Rainbow P.S. (2005). Why is metal bioaccumulation so variable? Biodynamics as a unifying concept. *Environmental Science and Technology* 39(7):1921-1931.
- Macken A., Giltrap M., Ryall K., Foley B., McGovern E., McHugh B., Davoren M. (2009). A test battery approach to the ecotoxicological evaluation of cadmium and copper employing a battery of marine bioassays *Ecotoxicology* 18:470-480.
- Maguire R.J., Tkacz R.J., Chau Y.K., Bengert G.A., Wong P.T.S. (1986). Occurrence of organotin compounds in water and sediment in Canada. *Chemosphere* 15(3):253-274.
- Malanga G., Estevez M.S., Calvo J., Puntarulo S. (2004). Oxidative stress in limpets exposed to different environmental conditions in the Beagle Channel. *Aquatic Toxicology* 69(4):299-309.
- Manduzio H., Rocher B., Durand F., Galap C., Leboulenger F. (2005). The point about oxidative stress in molluscs. *Indonesian Scholars Journal* 2:91-104.
- Marigomez I., Soto M., Cajaraville M.P., Angulo E., Giamberini L. (2002). Cellular and subcellular distribution of metals in molluscs. *Microscopy Research and Technique* 56(5):358-392.
- Marinho C.H., Gil M.N., Esteves J.L. (2013). Distribution and origin of trace metals in sediments of a marine park (Northern San Jorge Gulf) from Argentina. *Marine Pollution Bulletin* 72(1):260-263.
- Márquez F., González R.J., Bigatti G. (2011). Combined methods to detect pollution effects on shell shape and structure in Neogastropods. *Ecological Indicators* 11:248-254.
- Márquez F., Nieto Vilela R.A., Bigatti G. (en prensa). Extreme physical stress and predation generate different ecophenotypes in the Patagonian snail *Trophon geversianus*. *Marine Biology*
- Marshall D.J., Bonduriansky R., Bussière L.F. (2008). Offspring size variation within broods as a bet-hedging strategy in unpredictable environments. *Ecology* 89(9):2506-2517.
- Martin J.H. (1979). Bioaccumulation of heavy metals by littoral and pelagic marine organisms. Environmental Protection Agency, Office of Research and Development, Environmental Research Laboratory, 63 pp.
- Mason R.P. (2013). Trace metals and organisms: Essential and toxic metals, organometallics, microbial processes, and metal bioaccumulation. *Trace Metals in Aquatic Systems*. Blackwell Publishing Ltd., 370-421.
- Massara Paletto V., Commendatore M.G., Esteves J.L. (2008). Hydrocarbon levels in sediments and bivalve mollusks from Bahía Nueva (Patagonia, Argentina): An assessment of probable origin and bioaccumulation factors. *Marine Pollution Bulletin* 56:2082-2105.

- Matthiessen P. (2000). Is endocrine disruption a significant ecological issue? *Ecotoxicology* 9:21-24.
- McClellan-Green P., Romano J., Rittschof D. (2006). Imposex induction in the mud snail, *Ilyanassa obsoleta* by three Tin compounds. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 76:581-588.
- Meador J.P., Varanasi U., Krone C.A. (1993). Differential sensitivity of marine infaunal amphipods to Tributyltin. *Marine Biology* 116:231-239.
- Meador J.P., Krone C.A., Dyer D.W., Varanasi U. (1997). Toxicity of sediment-associated tributyltin to infaunal invertebrates: species comparison and the role of organic carbon. *Marine Environmental Research* 43(3):219-241.
- Meador J.P. (2000). Predicting the fate and effects of tributyltin in marine systems. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 166:1-48.
- Mensink B.P., Boon J.P., ten-Hallers-Tjabbes C.C., Hattum B.v., Koeman J.H. (1997). Bioaccumulation of organotin compounds and imposex occurrence in a marine food chain (Eastern Scheldt, the Netherlands). *Environmental Technology* 18(10):1235-1244.
- MERCOSUR/GMC (2011). Reglamento técnico MERCOSUR sobre límites máximos de contaminantes inorgánicos en alimentos. RES. N° 12/11, Grupo Mercado Comun. Secretaría de Políticas, Regulación e Institutos y Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca. Código Alimentario Argentino. <http://www.infoleg.gov.ar/infolegInternet/anexos/195000-199999/199977/norma.htm>.
- Mohamed N.N. (2008). Evaluación de la concentración de metales pesados en moluscos bivalvos, material particulado y sedimentos de la zona costera del Chubut. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, 113 pp.
- Mol V.P.L., Raveedran T.V., Parameswaran P.S. (2009). Antifouling activity exhibited by secondary metabolites of the marine sponge, *Haliclona exigua* (Kirkpatrick). *International Biodeterioration and Biodegradation* 63(1):67-72.
- Moore D.W., Dillon T.M., Suedel B.C. (1991). Chronic toxicity of tributyltin to the marine polychaete worm, *Neanthes arenaceodentata*. *Aquatic Toxicology* 21:181-198.
- Morabito R., Chiavarini S., Cremisini C. (1995). Speciation of organotin compounds in environmental samples by GC-MS. *Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry* 17:435-464.
- Morley N.J. (2006). Parasitism as a source of potential distortion in studies on endocrine disrupting chemicals in molluscs. *Marine Pollution Bulletin* 52:1330-1332.
- Muse J.O., Tudino M.B., d'Huicque L., Troccoli O.E., Carducci C.N. (1995). A survey of some trace elements in seaweeds from Patagonia, Argentina. *Environmental Pollution* 87(2):249-253.
- Narvarte M.A. (2006). Biology and fishery of the whelk *Buccinanops globulosum* (Kiener, 1834) in northern coastal waters of the San Matías Gulf (Patagonia, Argentina). *Fisheries Research* 77:131-137.
- Narvarte M.A., Willers V., Avaca M.S., Echave M.E. (2008). Population structure of the snail *Buccinanops globulosum* (Prosobranchia, Nassariidae) in San Matías Gulf, Patagonia Argentina: Isolated enclaves?. *Journal of Sea Research* 60:144-150.
- Nesto N., Romano S., Moschino V., Mauri M., Da Ros L. (2007). Bioaccumulation and biomarker responses of trace metals and micro-organic pollutants in mussels and

- fish from the Lagoon of Venice, Italy. *Marine Pollution Bulletin* 55(10–12):469-484.
- Nicholson S., Lam P.K.S. (2005). Pollution monitoring in Southeast Asia using biomarkers in the mytilid mussel *Perna viridis* (Mytilidae: Bivalvia) *Environment International* 31:121-132.
- Nieto Vilela R.A., Márquez F., Bigatti G. (2012). Diferencias morfométricas en la concha del caracol *Trophon geversianus* en poblaciones expuestas a diferentes niveles de estrés físico y depredación. Resúmenes de las VIII Jornadas Nacionales de Ciencias del Mar. Comodoro Rivadavia, Argentina pp 65.
- Nieto Vilela R.A., Cumplido M., Sastre V., Marino G., Sala L., Taibo P., Baulde D., Bigatti G. (2013). Concentración de toxina paralizante en gasterópodos marinos con potencial pesquero. Resúmenes del I Congreso Argentino de Malacología (CAM), La Plata, Argentina pp 93.
- Nishikawa J., Mamiya S., Kanayama T., Nishikawa T., Shiraishi F., Horiguchi T. (2004). Involvement of the retinoid x receptor in the development of imposex caused by Organotins in gastropods. *Environmental Science and Technology* 38:6271-6276.
- Noël L., Testu C., Chafey C., Velge P., Guérin T. (2011). Contamination levels for lead, cadmium and mercury in marine gastropods, echinoderms and tunicates. *Food Control* 22(3-4):433-437.
- Núñez J.D., Laitano M.V., Cledón M. (2012). An intertidal limpet species as a bioindicator: Pollution effects reflected by shell characteristics. *Ecological Indicators* 14:178-183.
- Oberdörster E., Rittschof D., McClellan-Green P. (1998). Testosterone metabolism in imposex and normal *Ilyanassa obsoleta*: Comparison of field and TBTA Cl-induced imposex. *Marine Pollution Bulletin* 2(36):144-151.
- Oberdörster E., McClellan-Green P. (2000). The neuropeptide APGWamide induces imposex in the mud snail, *Ilyanassa obsoleta*. *Peptides* 21:1323-1330.
- Oberdörster E., McClellan-Green P. (2002). Mechanisms of imposex induction in the mud snail, *Ilyanassa obsoleta*: TBT as a neurotoxin and aromatase inhibitor. *Marine Environmental Research* 54(3-5):715-718.
- Oberdörster E., Romano J., McClellan-Green P. (2005). The neuropeptide APGWamide as a penis morphogenic factor (PMF) in gastropod mollusks. *Integrative and Comparative Biology* 45:28-32.
- Oehlmann J., Stroben E., Fioroni P. (1992). The rough tingle *Ocenebra erinacea* (Neogastropoda: Muricidae): an exhibitor of imposex in comparison to *Nucella lapillus*. *Helgoländer Meeresunters* 46:311-328.
- Oehlmann J., Fioroni P., Stroben E., Markert B. (1996a). Tributyltin (TBT) effects on *Ocenebrina aciculata* (gastropoda: Muricidae): Imposex development, sterilization, sex change and population decline. *The Science of the Total Environment* 188:205-223.
- Oehlmann J., Stroben E., Schulte-Oehlmann U., Bauer B., Fioroni P., Markert B. (1996b). Tributyltin biomonitoring using prosobranchs as sentinel organisms. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 354:540-545.
- Oehlmann J., Bauer B., Minchin D., Schulte-Oehlmann U., Fioroni P., B. Markert (1998a). Imposex in *Nucella lapillus* and intersex in *Littorina littorea*: interspecific comparison of two TBT-induced effects and their geographical uniformity. *Hydrobiologia* 378:199-213.

- Oehlmann J., Stroben E., Schulte-Oehlmann U., Bauer B. (1998b). Imposex development in response to TBT pollution in *Hinia incrassata* (Ström, 1768) (Prosobranchia, Stenoglossa). *Aquatic Toxicology* 43:239-260.
- Oehlmann J., Schulte-Oehlmann U., Tillmann M., Markert B. (2000). Effects of endocrine disruptors on prosobranch snails (Mollusca: Gastropoda) in the laboratory. Part I: Bisphenol a and octylphenol as xeno-estrogens. *Ecotoxicology* 9:383-397.
- Oehlmann J., Schulte-Oehlmann U. (2002). Mollusc as bioindicators. En: Markert B.A., Breure A.M., Zechmeister H.G. (eds) *Bioindicators and Biomonitoring*, 577-635.
- Oehlmann J., Schulte-Oehlmann U. (2003). Topic 4.2. Endocrine disruption in invertebrates. *Pure and Applied Chemistry* 75(11-12):2207-2218.
- Oehlmann J., Benedetto P.D., Tillmann M., Duft M., Oetken M., Schulte-Oehlmann U. (2007). Endocrine disruption in prosobranch molluscs: evidence and ecological relevance. *Ecotoxicology* 16:29-43.
- Oetken M., Bachmann J., Schulte-Oehlmann U., Oehlmann J. (2004). Evidence for endocrine disruption in invertebrates. *International Review of Cytology* 236:1-44.
- Okoro H.K., Fatoki O.S., Adekola F.A., Ximba B.J., Snyman R.G., Opeolu B. (2011). Human exposure, biomarkers, and fate of organotins in the environment. En: Whitacre D.M. (ed) *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. Springer, New York, 27-54.
- Orensanz J.M., Schwindt E., Pastorino G., Bortolus A., Casas G., Darrigran G., Elías R., López Gappa J.J., Obenat S., Pascual M., Penchaszadeh P., Piriz M.L., Scarabino F., Spivak E.D., Vallarino E.A. (2002). No longer the pristine confines of the world ocean: A survey of exotic marine species in the Southwestern Atlantic. *Biological Invasions* 4(1-2):115-143.
- Osorio C. (1979). Moluscos marinos de importancia económica en Chile. *Biología Pesquera* 11:3-47.
- OSPAR (2009). JAMP Guidelines for Contaminant-Specific Biological Effects (OSPAR Agreement 2008-09), 48 pp.
- Palmer A.R. (1990). Effect of crab effluent and scent of damaged conspecifics on feeding, growth, and shell morphology of the Atlantic dogwhelk *Nucella lapillus* (L.). *Hydrobiologia* 193:155-182.
- Pampanin D.M., Camus L., Gomiero A., Marangon I., Volpato E., Nasci C. (2005). Susceptibility to oxidative stress of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) in the Venice Lagoon (Italy). *Marine Pollution Bulletin* 50:1548-1557.
- Panagoula B., Panayiota M., Iliopoulou-Georgudaki J. (2002). Acute toxicity of TBT and Irgarol in *Artemia salina*. *International Journal of Toxicology* 21:231-233.
- Pannunzio T.M., Storey K.B. (1998). Antioxidant defenses and lipid peroxidation during anoxia stress and aerobic recovery in the marine gastropod *Littorina littorea*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 221(2):277-292.
- Pascoal S., Carvalho G., Vasieva O., Hughes R.N., Cossins A., Fang Y., Ashelford K., Olohan L., Barroso C., Mendo S., Creer S. (2013). Transcriptomics and in vivo tests reveal novel mechanisms underlying endocrine disruption in an ecological sentinel, *Nucella lapillus*. *Molecular Ecology* 22(6):1589-1608.
- Pastorino G. (1993). The taxonomic status of *Buccinanops* d'Orbigny, 1841 (Gastropoda: Nassariidae). *The Veliger* 36(2):160-165.
- Pastorino G. (2005). A revision of the genus *Trophon* Montfort, 1810 (Gastropoda: Muricidae) from southern South America. *The Nautilus* 119(2):55-82.

- Peakall D.B., Burger J. (2003). Methodologies for assessing exposure to metals: speciation, bioavailability of metals, and ecological host factors. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 56:110-121.
- Pechenik J.A. (1979). Role of encapsulation in invertebrate life histories. *American Naturalist*:859-870.
- Penchaszadeh P.E. (1971). Aspectos de la embriogenesis de algunos gasterópodos del genero *Buccinanops* d'Orbigny, 1841 (Gastropoda, Prosobranchiata, Buccinidae). *Physis* 30(81):475-482.
- Penchaszadeh P.E. (1973). Nuevas observaciones sobre la reproducción de *Buccinanops gradatum* (Deshayes, 1844) (Gastropoda, Prosobranchiata, Dorsaninae). *Physis* 32(84):15-18.
- Penchaszadeh P.E., De Mahieu G.C. (1976). Reproducción de gasterópodos prosobranquios del Atlántico Suroccidental. *Volutidae*. *Physis A* 35:145-153.
- Penchaszadeh P.E., Averbuj A., Cledón M. (2001). Imposex in gastropods from Argentina (South-Western Atlantic). *Marine Pollution Bulletin* 42(9):790-791.
- Penchaszadeh P.E., Sánchez Antelo C., Zabala S., Bigatti G. (2009). Reproduction and imposex in the edible snail *Adelomelon ancilla* from northern Patagonia, Argentina. *Marine Biology* 156:1929-1939.
- Pérez A.A., Fajardo M.A., Strobl A.M., Pérez L.B., Piñeiro A., López C.M. (2005). Contenido de plomo, cromo y cadmio en moluscos comestibles del golfo San Jorge (Argentina). *Acta Toxicológica Argentina* 13(1):20-25.
- Pérez A.A., Farías S.S., Strobl A.M., Pérez L.B., López C.M., Piñeiro A., Roses O., Fajardo M.A. (2007). Levels of essential and toxic elements in *Porphyra columbina* and *Ulva sp.* from San Jorge Gulf, Patagonia Argentina. *Science of the Total Environment* 376(1-3):51-59.
- Perron F.E. (1981). The partitioning of reproductive energy between ova and protective capsules in marine gastropods of the genus *Conus*. *The American Naturalist* 118(1):110-118.
- Pessoa M.F., Fernando A., Oliveira J.S. (2001). Use of imposex (pseudohermaphroditism) as indicator of the occurrence of organotin compounds in Portuguese coastal waters - Sado and Mira estuaries. *Environmental Toxicology* 16:234-241.
- Pio M.J. (2010). Anatomía e histología de glándulas pedales asociadas a la estrategia alimenticia del gasterópodo *Trophon geversianus* (Mollusca: Muricidae). Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad CAECE, 49 pp.
- Plejdrup J.K., Simonsen V., Pertoldi C., Schøyen M., Bayley M. (2006). Genetic and morphological diversity in populations of *Nucella lapillus* (L.; neogastropoda) in response to tributyltin contamination. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 64:146-154.
- Porte C., Janer G., Lorusso L.C., Ortiz-Zarragoitia M., Cajaraville M.P., Fossi M.C., Canesi L. (2006). Endocrine disruptors in marine organisms: Approaches and perspectives. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 143:303-315.
- Primost M.A. (2009). Biomonitorio de contaminación por TBT en la costa patagónica mediante el análisis de imposex en cenogasterópodos. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco, 74 pp.
- Primost M.A., Bigatti G. (2011). Variaciones estacionales de parámetros asociados al imposex en *Adelomelon ancilla*, *Trophon geversianus* y *Buccinanops globulosus* a lo largo de un gradiente de contaminación por Tributilestaño (TBT).

- Resúmenes del VIII Congreso Latinoamericano de Malacología (CLAMA). Puerto Madryn, Argentina pp 245.
- Primost M.A., Márquez F., Bigatti G. (2011). Variación en la forma de la concha de *Buccinanops globulosus* asociado a un gradiente de imposex en el Golfo Nuevo, Patagonia Argentina. Resúmenes del VIII Congreso Latinoamericano de Malacología (CLAMA). Puerto Madryn, Argentina pp 246.
- Primost M.A., Sabatini S.E., Ríos de Molina M.C., Bigatti G. (2012). Estrés oxidativo e imposex en poblaciones del caracol *Buccinanops globulosus* expuestas a diferentes niveles de contaminación por tributilestano (TBT). Resúmenes del IV Congreso Argentino de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental (SETAC Argentina). Buenos Aires, Argentina pp 180.
- Qiu J.W., Chan K.M., Leung K.M.Y. (2011). Seasonal variations of imposex indices and butyltin concentrations in the rock shell *Thais clavigera* collected from Hong Kong waters. *Marine Pollution Bulletin* 63:482-488.
- Quintela M., Barreiro R., Ruiz J.M. (2000). The use of *Nucella lapillus* (L) transplanted in cages to monitor tributyltin (TBT) pollution. *The Science of the Total Environment* 247:227-237.
- Raimondo S., Vivian D.N., Barron M.G. (2009). Standardizing acute toxicity data for use in ecotoxicology models: influence of test type, life stage, and concentration reporting. *Ecotoxicology* 18:918-928.
- Rainbow P.S. (1995). Biomonitoring of heavy metal availability in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin* 31(4-12):183-192.
- Rainbow P.S. (2002). Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: why and so what? *Environmental Pollution* 120(3):497-507.
- Rainbow P.S. (2007). Trace metal bioaccumulation: models, metabolic availability and toxicity. *Environment International* 33(4):576-582.
- Ramírez Llodra E. (2002). Fecundity and life-history strategies in marine invertebrates. *Advances in Marine Biology* 43:87-170.
- Ramón M., Amor M.J. (2001). Increasing imposex in populations of *Bolinus brandaris* (Gastropoda: Muricidae) in the northwestern Mediterranean. *Marine Environmental Research* 52:463-475.
- Rató M., Russel-Pinto F., Barroso C. (2009). Assessment of digenean parasitism in *Nassarius reticulatus* (L.) along the Portuguese coast: evaluation of possible impacts on reproduction and imposex expression. *Journal of Parasitology* 95(2):327-336.
- Rechimont M.E., Galván D.E., Sueiro M.C., Casas G., Piriz M.L., Diez M.E., Primost M., Zabala M.S., Márquez F., Brogger M., Alfaya J.E.F., Bigatti G. (2013). Benthic diversity and assemblage structure of a north Patagonian rocky shore: a monitoring legacy of the NaGISA project. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 93(8):2049-2058.
- Regoli F., Orlando E. (1994). Seasonal variation of trace metal concentrations in the digestive gland of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*: Comparison between a polluted and a non-polluted site. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 27(1):36-43.
- Regoli F., Principato G. (1995). Glutathione, glutathione-dependent and antioxidant enzymes in mussel, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to metals under field and laboratory conditions: implications for the use of biochemical biomarkers. *Aquatic Toxicology* 31(2):143-164.

- Regoli F., Nigro M., Bertoli E., Principato G., Orlando E.F. (1997). Defenses against oxidative stress in the Antarctic scallop *Adamussium colbecki* and effects of acute exposure to metals. *Hydrobiologia* 355(1-3):139-144.
- Regoli F. (2000). Total oxyradical scavenging capacity (TOSC) in polluted and translocated mussels: a predictive biomarker of oxidative stress. *Aquatic Toxicology* 50:351-361.
- Regoli F., Gorbi S., Frenzilli G., Nigro M., Corsi I., Focardi S., Winston G.W. (2002). Oxidative stress in ecotoxicology: from the analysis of individual antioxidants to a more integrated approach. *Marine Environmental Research* 54(3-5):419-423.
- Ribera D., Narbonne J.F., Michel X., Livingstone D.R., O'Hara S. (1991). Responses of antioxidants and lipid peroxidation in mussels to oxidative damage exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology* 100(1-2):177-181.
- Rodriguez-Ariza A., Peinado J., Pueyo C., Lopez-Barea J. (1993). Biochemical indicators of oxidative stress in fish from polluted littoral areas. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 50(12):2568-2573.
- Rodríguez J.G., Tueros I., Borja A., Franco J., Alonso J.I.G., Garmendia J.M., Muxika I., Sariago C., Valencia V. (2009). Butyltin compounds, sterility and imposex assessment in *Nassarius reticulatus* (Linnaeus, 1758), prior to the 2008 European ban on TBT antifouling paints, within Basque ports and along coastal areas. *Continental Shelf Research* 29:1165-1173.
- Rohlf F.J., Slice D. (1990). Extensions of the procrustes method for the optimal superimposition of landmarks. *Systematic Biology* 39:40-59.
- Rohlf F.J. (2004a). Software TPSDig version 1.40. Department of Ecology and Evolution. State University of New York.
- Rohlf F.J. (2004b). Software TPSRelw, Relative Warps Analysis, 1.35. Department of Ecology and Evolution, State. University of New York.
- Rohlf F.J. (2004c). Software TPSUtil, version 1.28. Department of Ecology and Evolution, State. University of New York.
- Rohlf J.F., Marcus L.F. (1993). A revolution morphometrics. *Trends in Ecology and Evolution* 8(4):129-132.
- Romano J.A. (2007). Acute toxicity and sub-lethal effects of non-point source pollutants on invertebrates. PhD Thesis. University Program in Integrated Toxicology Nicholas School of the Environment and Earth Sciences, Duke University, 187 pp.
- Roméo M., Bennani N., Gnassia-Barelli M., Lafaurie M., Girard J.P. (2000). Cadmium and copper display different responses towards oxidative stress in the kidney of the sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Aquatic Toxicology* 48(2):185-194.
- Ronis M.J.J., Mason A.Z. (1996). The metabolism of testosterone by the periwinkle (*Littorina littorea*) *in vitro* and *in vivo*: effects of Tributyltin. *Marine Environmental Research* 42(1-4):161-166.
- Rosas C.L., Gil M.N., Uhart M.M. (2012). Trace metal concentrations in Southern Right Whale (*Eubalaena australis*) at Península Valdés, Argentina. *Marine Pollution Bulletin* 64(6):1255-1260.
- Ross A. (1965). Industrial applications of Organotin compounds. *Annals of the New York Academy of Sciences* 125(1):107-123.
- Rüdel H. (2003). Case study: bioavailability of tin and tin compounds. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 56:180-189.

- Rufino M.M., Vasconcelos P., Pereira F., Fernández-Tajes J., Darriba S., Méndez J., Gaspar M.B. (2013). Geographical variation in shell shape of the pod razor shell *Ensis siliqua* (Bivalvia: Pharidae). *Helgoland Marine Research* 67(1):49-58.
- Ruiz J.M., Bryan G.W., Gibbs P.E. (1994). Chronic toxicity of water tributyltin (TBT) and copper to spat of the bivalve *Scrobicularia plana*: ecological implications. *Marine Ecology Progress Series* 113:105-117.
- Ruiz J.M., Bryan G.W., Gibbs P.E. (1995a). Effects of tributyltin (TBT) exposure on the veliger larvae development of the bivalve *Scrobicularia plana* (da Costa). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 186:53-63.
- Ruiz J.M., Bryan G.W., Gibbs P.E. (1995b). Acute and chronic toxicity of tributyltin (TBT) to the pediveliger larvae of the bivalve *Scrobicularia plana*. *Marine Biology* 124:119-126.
- Sabatini S.E., Rocchetta I., Luquet C.M., Guido M.I., Molina M.C.R.d. (2009). Effects of sewage pollution and bacterial load on growth and oxidative balance in the freshwater mussel *Diplodon chilensis*. *Limnologica* 41:356-362.
- Sabatini S.E., Rocchetta I., Nahabedian D.E., Luquet C.M., Eppis M.R., Bianchi L., Molina M.C.R.d. (2011). Oxidative stress and histological alterations produced by dietary copper in the fresh water bivalve *Diplodon chilensis*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 154:391-398.
- Safe S. (2003). Toxicology and risk assessment of POPs. En: Fiedler H. (ed) *Persistent Organic Pollutants*. Springer Berlin Heidelberg, 223-235.
- Safe S.H. (1986). Comparative toxicology and mechanism of action of Polychlorinated Dibenzo-P-Dioxins and Dibenzofurans. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 26(1):371-399.
- Santos M.M., Hallers-Tjabbes C.C.T., Santos A.M., Vieira N. (2002). Imposex in *Nucella lapillus*, a bioindicator for TBT contamination: re-survey along the Portuguese coast to monitor the effectiveness of EU regulation. *Journal of Sea Research* 48:217- 223.
- Santos M.M., Castro L.F.C., Vieira M.N., Micael J., Morabito R., Massanisso P., Reis-Henriques M.A. (2005). New insights into the mechanism of imposex induction in the dogwhelk *Nucella lapillus*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 141:101-109.
- Sarkar A., Ray D., Shrivastava A.N., Sarker S. (2006). Molecular Biomarkers: Their significance and application in marine pollution monitoring. *Ecotoxicology* 15:333-340.
- Saura M., Rivas M.J., Diz A.P., Caballero A., Rolán-Alvarez E. (2012). Dietary effects on shell growth and shape in an intertidal marine snail, *Littorina saxatilis*. *Journal of Molluscan Studies* 78(2):213-216.
- Scammell M.S., Batley G.E., Brockbank C.I. (1991). A field study of the impact on oysters of tributyltin introduction and removal in a pristine lake. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 20:276-281.
- Scarabino V. (1977). Moluscos del Golfo San Matías, provincia de Río Negro, República Argentina. Inventario y claves para su identificación. *Comisión de la Sociedad Malacológica de Uruguay* 4:177-285.
- Schultz M.P., Bendick J.A., Holm E.R., Hertel W.M. (2011). Economic impact of biofouling on a naval surface ship. *Biofouling* 27(1):87-98.
- Schumacher J.F., Carman M.L., Estes T.G., Feinberg A.W., Wilson L.H., Callow M.E., Callow J.A., Finlay J.A., Brennan A.B. (2007). Engineered antifouling microtopographies-effect of feature size, geometry, and roughness on settlement of zoospores of the green alga *Ulva*. *Biofouling* 23(1):55-62.

- SENASA (2000). Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. Decreto 4238/68. Capítulo XXIII del Reglamento sanitario de explotación y comercialización de moluscos y bivalvos vivos para consumo humano directo. Inciso 23.24.2.5: Calidad Química (Res. SAGPYA N°53 del 30/09/98). <http://www.senasa.gov.ar/contenido.php?to=n&in=1092&io=8275>; <http://infoleg.mecon.gov.ar/infolegInternet/anexos/50000-54999/53420/norma.htm>.
- Senda T. (2009). International trends in regulatory aspects. En: Arai T., Harino H., Ohji M., Langston W.J. (eds) *Ecotoxicology of Antifouling Biocides*. Springer Japan, 23-34.
- Sepúlveda R.D., Ibáñez C.M. (2012). Clinal variation in the shell morphology of intertidal snail *Acanthina monodon* in the Southeastern Pacific Ocean. *Marine Biology Research* 8(4):363-372.
- Shi H.H., Huang C.J., Zhu S.X., Yu X.J., XiE W.Y. (2005). Generalized system of imposex and reproductive failure in female gastropods of coastal waters of mainland China. *Marine Ecology Progress Series* 304:179-189.
- Shim W.J., Kahng S.H., Hong S.H., Kim N.S., Kim S.K., Shim J.H. (2000). Imposex in the rock shell, *Thais clavigera*, as evidence of Organotin contamination in the marine environment of Korea. *Marine Environmental Research* 49:435-451.
- SHN (2013). Servicio de Hidrografía Naval. <http://www.hidro.gov.ar>, año de acceso 2013.
- Smith R., Bolam S.G., Rees H.L., Mason C. (2008). Macrofaunal recovery following TBT ban Long-term recovery of subtidal macrofaunal communities in relation to declining levels of TBT contamination. *Environmental Monitoring and Assessment* 136(Environ Monit Assess):245-256.
- Smolarz K., Bradtke K. (2011). Bioindicative potential of shell abnormalities occurring in the clam *Macoma balthica* (L.) from the Baltic Sea. *Marine Pollution Bulletin* 62:1421-1426.
- Sohal R.S., Mockett R.J., Orr W.C. (2002). Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis. *Free Radical Biology and Medicine* 33(5):575-586.
- Sokołowski A., Pawlikowski K., Wołowicz M., Garcia P., Namieśnik J. (2008). Shell deformations in the Baltic clam *Macoma balthica* from southern Baltic Sea (the Gulf of Gdansk): hypotheses on environmental effects. *AMBIO: A Journal of the Human Environment* 37(2):93-100.
- Son M.H., Hughes R.N. (2000). Relationship between imposex and morphological variation of the shell in *Nucella lapillus* (Gastropoda: Thaididae). *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 50:599-606.
- Sousa A., Laranjeiro F., Takahashi S., Tanabe S., Barroso C.M. (2009). Imposex and organotin prevalence in a European post-legislative scenario: Temporal trends from 2003 to 2008. *Chemosphere* 77:566-573.
- Spight T.M. (1976). Ecology of hatching size for marine snails. *Oecologia* 24(4):283-294.
- Spooner N., Gibbs P.E., Bryan G.W., Goad L.J. (1991). The effect of tributyltin upon steroid titres in the female dogwhelk, *Nucella lapillus*, and the development of imposex. *Marine Environmental Research* 32(1-4):37-49.
- Staglicic N., Prime M., Zoko M., Erak Ž., Brajčić D., Blazević D., Madirazza K., Jelic K., Peharda M. (2008). Imposex incidence in *Hexaplex trunculus* from Kaštela Bay, Adriatic Sea. *Acta Adriatica* 49(2):159-164.

- Stengel D.B., O'reilly S., O'Halloran J. (2006). Contaminants and pollutants En: Davenport J., Davenport J.L. (eds) *The Ecology of Transportation: Managing Mobility for the Environment*. Springer Netherlands, 361-389.
- Sternberg R.M., Gooding M.P., Hotchkiss A.K., LeBlanc G.A. (2010). Environmental-endocrine control of reproductive maturation in gastropods: implications for the mechanism of tributyltininduced imposex in prosobranchs. *Ecotoxicology* 19:4-23.
- Stewart C., Mora S.J.d. (1990). A review of the degradation of Tri(n-butyl)tin in the marine environment. *Environmental Technology* 11:565-570.
- Stewart C., Mora S.J.d. (1992). Elevated Tri(n-butyl)tin concentrations in shellfish and sediments from Suva Harbour, Fiji. *Applied Organometallic Chemistry* 6:507-512.
- Storey K.B. (1996). Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 29:1715-1733.
- Strand J., Jacobsen J.A., Pedersen B., Granmo A. (2003). Butyltin compounds in sediment and molluscs from the shipping strait between Denmark and Sweden. *Environmental Pollution* 124:7-15.
- Stroben E., Oehlmann J., Fioroni P. (1992a). The morphological expression of imposex in *Hinia reticulata* (Gastropoda: Buccinidae): a potential indicator of tributyltin. *Marine Biology* 13(4):625-636.
- Stroben E., Oehlmann J., Fioroni P. (1992b). *Hinia reticulata* and *Nucella lapillus*. Comparison of two gastropod tributyltin bioindicators. *Marine Biology* 114:289-296.
- Stromgren T., Bongard T. (1987). The effect of Tributyltin oxide on growth of *Mytilus edulis*. *Marine Pollution Bulletin* 18(1):30-31.
- Suter G.W. (2001). Applicability of indicator monitoring to ecological risk assessment. *Ecological Indicators* 1(2):101-112.
- Tablado A., López Gappa J. (2001). Morphometric diversity of the pulmonate limpet *Siphonaria lessoni* in different coastal environments. *Scientia Marina* 65(1):33-41.
- Takahashi K. (2009). Release rate of biocides from antifouling paints. En: Arai T., Harino H., Ohji M., Langston W.J. (eds) *Ecotoxicology of Antifouling Biocides*. Springer Japan, 3-22.
- Tanabe S. (1999). Butyltin contamination in marine mammals: A review. *Marine Pollution Bulletin* 39(1-12):62-72.
- Tanhan P., Sretarugsa P., Pokethitiyook P., Kruatrachue M., Upatham E.S. (2005). Histopathological alterations in the edible snail, *Babylonia areolata* (spotted babylon), in acute and subchronic cadmium poisoning. *Environmental Toxicology* 20(2):142-149.
- Templado J., Paulay G., Gittenberger A., Meyer C. (2010). Sampling the marine realm. En: Eymann J., Degreef J., Häuser C., Monje J.C., Samyn Y., Van den Spiegel D. (eds) *Manual on Field Recording Techniques and Protocols for All Taxa Biodiversity Inventories*, 35.
- Terlizzi A., Delos A.L., Garaventa F., Faimali M., Geraci S., B.Markert (2004). Limited effectiveness of marine protected areas: imposex in *Hexaplex trunculus* (Gastropoda, Muricidae) populations from Italian marine reserves. *Marine Pollution Bulletin* 48:164-192.
- Teso V., Arrighetti F., Penchaszadeh P.E. (2012). Reproductive cycle in an imposex-affected population of *Olivancillaria deshayesiana* (Gastropoda: Olividae) from Mar del Plata, Argentina. *Aquatic Biology* 15:111-119.

- Thain J., Waldock M., Waite M. (1987). Toxicity and degradation studies of Tributyltin (TBT) and Dibutyltin (DBT) in the aquatic environment OCEANS '87 1398-1404.
- Titley-O'Neal C.P., Munkittrick K.R., MacDonald B.A. (2011). The effects of organotin on female gastropods. Journal of Environmental Monitoring 13:2360-2388.
- Torres P.J., Commendatore M.G., Primost M.A., Bigatti G. (2013). Hidrocarburos Poliaromáticos (PAHs) en *Buccinanops globulosus* afectados por imposex. Resúmenes del I Congreso Argentino de Malacología (CAM). La Plata, Argentina pp 99
- UNEP (2000). Bibliography for a selected number of persistent toxic substances
- UNESCO (1999). Península Valdés world heritage list. <http://whc.unesco.org/>.
- Urta A., Oliva D., Sepúlveda M. (2007). Use of a morphometric analysis to differentiate *Adelomelon ancilla* and *Odontocymbiola magellanica* (Caenogastropoda: Volutidae) of Southern Chile. Zoological Studies 46(3):253-261.
- USEPA (1977). Guidelines for the pollution classification of great lakes harbor sediments. U.S. Environmental Protection Agency, Region V. Chicago, Illinois, 8 pp.
- USEPA (2003). Ambient aquatic life water quality criteria for Tributyltin. Environmental Protection Agency, USA. 138 pp.
- Valavanidis A., Vlahogianni T., Dassenakis M., Scoullou M. (2006). Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. Ecotoxicology and Environmental Safety 64:178-189.
- Valavanidis A., Vlachogianni T. (2010). Metal pollution in ecosystems. Ecotoxicology studies and risk assessment in the marine environment. Department of Chemistry, University of Athens, University Campus Zografou, Athens, Greece. http://chem-tox-ecotox.org/wp/wp-content/uploads/2010/01/02-Metals-17_01_2010.pdf.
- Valenti T.W., Cherry D.S., Neves R.J., Schmerfeld J. (2005). Acute and chronic toxicity of mercury to early life stages of the rainbow mussel, *Villosa iris* (Bivalvia: Unionidae). Environmental Toxicology and Chemistry 24(5):1242-1246.
- Van den Broeck H., De Wolf H., Backeljau T., Blust R. (2007). Effects of environmental stress on the condition of *Littorina littorea* along the Scheldt estuary (The Netherlands). Science of the Total Environment 376 346-358.
- Vasconcelos P., Gaspar M.B., Castro M. (2006). Imposex in *Hexaplex* (Trunculariopsis) *trunculus* (Gastropoda: Muricidae) from the Ria Formosa lagoon (Algarve coast—southern Portugal). Marine Pollution Bulletin 52:332-356.
- Vasconcelos P., Moura P., Barroso C.M., Gaspar M.B. (2011). Size matters: importance of penis length variation on reproduction studies and imposex monitoring in *Bolinus brandaris* (Gastropoda: Muricidae). Hydrobiologia 661:363-375.
- Vavilin D.V., Ducruet J.M., Matorin D.N., Venediktov P.S., Rubin A.B. (1998). Membrane lipid peroxidation, cell viability and Photosystem II activity in the green alga *Chlorella pyrenoidosa* subjected to various stress conditions. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 42:233-239.
- Vázquez N.N., Gil M.N., Esteves J.L., Narvarte M.A. (2007). Monitoring heavy metal pollution in San Antonio Bay, Río Negro, Argentina. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 79(2):121-125.
- Vermeij G.J. (1972). Intraspecific shore-level size gradients in intertidal molluscs. Ecology 53(4):693-700.

- Viarengo A., Canesi L., Pertica M., Poli G., Moore M.N., Orunesu M. (1990). Heavy metal effects on lipid peroxidation in the tissues of *Mytilus galloprovincialis* lam. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology* 97(1):37-42.
- Viarengo A., Canesi L. (1991). Mussels as biological indicators of pollution. *Aquaculture* 94(2/3):225-243.
- Viarengo A., Canesi L., Pertica M., Livingstone D.R. (1991). Seasonal variations in the antioxidant defence systems and lipid peroxidation of the digestive gland of mussels. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology* 100(1-2):187-190.
- Viarengo A., Nott J.A. (1993). Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology* 104(3):355-372.
- Waisbaum R.G.d., Rodriguez C., Nudelman N.S. (2010). Determination of TBT in water and sediment samples along the Argentine Atlantic coast. *Environmental Technology* 31(12):1335-1342.
- Waldock M.J., Thain J.E. (1983). Shell thickening in *Crassostrea gigas*: Organotin antifouling or sediment induced? *Marine Pollution Bulletin* 14(11):411-415.
- Waldock M.J., Waite M.E., Miller D., Smith D.J., Law R.J. (1989). The determination of total tin and organotin compounds in environmental samples. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food Directorate of Fishery Research. No. 4, 24 pp.
- Waldock M.J., Thain J.E., Waite M.E. (1996). An assessment of the value of shell thickening in *Crassostrea gigas* as an indicator of exposure to Tributyltin. En: Champ M.A., Seligman P.F. (eds) *Organotin*. Springer Netherlands, 219-237.
- Walsh K., Dunstan R.H., Murdoch R.N. (1995). Differential bioaccumulation of heavy metals and organopollutants in the soft tissue and shell of the marine Gastropod, *Austrocochlea constricta*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 28(1):35-39.
- Wang C.G., Chen Y.X., Li Y., Wei W., Yu Q. (2005). Effects of low dose Tributyltin on activities of hepatic antioxidant and phase II enzymes in *Sebastes marmoratus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 74(1):114-119.
- Wang W., Ke C. (2002). Dominance of dietary intake of cadmium and zinc by two marine predatory gastropods. *Aquatic Toxicology* 56(3):153-165.
- Wang W.X., Fisher N.S. (1999). Delineating metal accumulation pathways for marine invertebrates. *The Science of the Total Environment* 237-238(0):459-472.
- Watanabe N., Sakai S., Takatsuki H. (1992). Examination for degradation paths of butyltin compounds in natural waters. *Water Science and Technology* 25(11):117-124.
- Wenner A.M. (1988). Crustaceans and other invertebrates as indicators of beach pollution. En: Soule D.F., Kleppel G.S. (eds) *Marine Organisms as Indicators*. Springer New York, 199-229.
- White S.L., Rainbow P.S. (1982). Regulation and accumulation of copper, zinc and cadmium by the shrimp *Palaemon elegans*. *Marine Ecology Progress Series* 8(95):101.
- WHO/FAO (2004). Safety evaluation of certain food additives and contaminants. In WHO Food Additives Series, 52. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA).
- Willers V. (2004). Utilización del caracol *Buccinanops globulosum* como indicador de contaminación por tributil estaño (TBT) en la Bahía de San Antonio (Río Negro,

- Patagonia Argentina). Tesis de Licenciatura. Universidad nacional de la Patagonia San Juan Bosco, 65pp.
- Winston G.W., Di Giulio R.T. (1991). Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquatic Toxicology* 19(2):137-161.
- Wolf H.D., Coen W.D., Backeljau T., Blust R. (2001). Intersex and sterility in the periwinkle *Littorina littorea* (Mollusca: Gastropoda) along the Western Scheldt estuary, the Netherlands. *Marine Environmental Research* 52:249-255.
- Wu R.S.S., Levings C.D. (1980). Mortality, growth and fecundity of transplanted mussel and barnacle populations near a pulp mill outfall. *Marine Pollution Bulletin* 11(1):11-15.
- Yusoff N.A.M., Long S.M. (2011). Comparative bioaccumulation of heavy metals (Fe, Zn, Cu, Cd, Cr, Pb) in different edible mollusk collected from the estuary area of Sarawak River. *Universiti Malaysia Terengganu, International Annual Symposium (UMTAS)*:806-811.
- Yüzereroğlu T.A., Gök G., Çoğun H.Y., Firat Ö., Aslanyavrusu S., Maruldağ O., Kargin F. (2010). Heavy metals in *Patella caerulea* (Mollusca, Gastropoda) in polluted and non-polluted areas from the Iskenderun Gulf (Mediterranean Turkey). *Environmental Monitoring and Assessment* 167(1-4):257-264.
- Zabala M.S. (2012). Ecología trófica, crecimiento y reproducción en el gasterópodo *Adelomelon ancilla* en el Golfo Nuevo. Tesis de doctorado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, 201 pp.
- Zabala S., Bigatti G., Botto F., Iribarne O.O., Galván D.E. (2013a). Trophic relationships between a Patagonian gastropod and its epibiotic anemone revealed by using stable isotopes and direct observations. *Marine Biology* 160:909-919.
- Zabala S., Penchaszadeh P.E., Panarello H.O., Brogger M.I., Bigatti G. (2013b). Life history parameters in the edible snail *Adelomelon ancilla* from patagonian waters. *Malacologia* 56(1-2):215-229.
- Zelditch M.L., Swiderski D.L., Sheets H.D., Fink W.L. (2004). Geometric morphometrics for biologists: a primer. Elsevier Academic Press, New York and London, 437 pp.
- Zhou J., Zhu X., Cai Z. (2010). Tributyltin toxicity in abalone (*Haliotis diversicolor supertexta*) assessed by antioxidant enzyme activity, metabolic response, and histopathology. *Journal of Hazardous Materials* 183:428-433.
- Zhou Q., Zhang J., Fu J., Shi J., Jiang G. (2008). Biomonitoring: An appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. *Analytica Chimica Acta* 606:135-150.

APÉNDICE

Apéndice 1. Primeros resultados obtenidos antes del incendio de los laboratorios, pero que no cumplían con los estándares de recuperación deseados.

Sitio/Especie	Tipo de muestra	% Recuperación	TBT (ngSn.g ⁻¹)	DBT (ngSn.g ⁻¹)	MBT (ngSn.g ⁻¹)
Estación cálida					
Muelle Almirante Storni	Sedimento	55	17,4	Nd	Nd
Muelle Luis Piedra Buena	Sedimento	49	22	15,8	Nd
Punta Cuevas	Sedimento	50	10	Nd	Nd
Punta Este	Sedimento	60	14,4	15,6	Nd
Cerro Avanzado	Sedimento	55	26,18	17,6	Nd
Estación fría					
Muelle Almirante Storni	Sedimento	63	13,4	Nd	Nd
Muelle Luis Piedra Buena	Sedimento	65	13,32	14,52	10,18
Punta Cuevas	Sedimento	63	14,4	17,4	17
Punta Este	Sedimento	74	11	Nd	Nd
Cerro Avanzado	Sedimento	55	19,16	15,27	14,8
Morfometría					
Muelle Luis Piedra Buena	Sedimento	80	15,67	14,84	11,29
Punta Cuevas	Sedimento	44	15,48	15,20	10,76
Punta Este	Sedimento	56	15,92	16,52	Nd
Playa Paraná	Sedimento	76	21	14,6	Nd
Cerro Avanzado	Sedimento	40	16,18	15,62	Nd
Ambrossetti	Sedimento	37	16,74	14,45	10,58
Vías de ingreso					
Muelle Almirante Storni/A. Ancilla					
Branquia	biota		29,68	69,01	25,02
Alimento	biota	Nd	13,43	Nd	116,54
Digestivo Hembras	biota	Nd	15,53	37,29	329,72
Pie Machos	biota	Nd	11,61	Nd	12,09
Resto Cuerpo Hembras	biota	Nd	11,41	2,17	471,10
Resto Cuerpo Machos	biota	Nd	18,79	238,69	16,88
Reproductivo Hembras	biota	Nd	10,52	Nd	697,62
Muelle Luis Piedra Buena /B. globulosus					
Branquia	biota	Nd	11,87	Nd	8,12
Pie Hembras	biota	70	123,02	Nd	8,39
Pie Machos	biota	Nd	15,40	129,20	8,94
Resto Cuerpo Hembras	biota	Nd	13,61	12,53	87,53
Resto Cuerpo Machos	biota	Nd	10,31	Nd	342,85
Reproductivo Hembras	biota	62	83,73	175,28	19,99
Punta Cuevas/B. globulosus					

Sitio/Especie	Tipo de muestra	% Recuperación	TBT (ngSn.g ⁻¹)	DBT (ngSn.g ⁻¹)	MBT (ngSn.g ⁻¹)
Reproductivo +digestivo H	biota	Nd	19,25	38,03	135,29
Reproductivo +digestivo M	biota	Nd	122,68	3,33	7,30
Pie Hembras	biota	13	10,32	201,05	26,87
Pie Machos	biota	Nd	14,37	Nd	7,313
Cerro Avanzado/B. globulosus					
Reproductivo +digestivo H	biota	2,9	14,45	Nd	9,29
Pie Hembras	biota	Nd	10,27	Nd	18,35
Muelle Luis Piedra Buena/T. geversianus (int)					
Pie Hembras	biota	Nd	12,10	Nd	8,82
Pie Machos	biota	24	15,77	285,25	11,24
Resto Cuerpo Hembras	biota	12	127,66	1224,95	22,49
Resto Cuerpo Machos	biota	41	21,50	Nd	61,73
Reproductivo Hembras	biota	Nd	10,69	Nd	49,02
Punta Cuevas/T. geversianus (int)					
Alimento	biota	Nd	10,21	Nd	94,04
Reproductivo +digestivo H	biota	Nd	14,79	Nd	8,96
Reproductivo +digestivo M	biota	9	62,74	777,04	37,12
Pie Hembras	biota	Nd	10,73	24,19	201,66
Pie Machos	biota	Nd	12,84	Nd	12,81
Cerro Avanzado/T. geversianus (int)					
Alimento	biota	Nd	11,55	Nd	7,18
Pie Hembras	biota	7	17,09	Nd	106,62
Pie Machos	biota	Nd	10,28	0,35	8,69
Muelle Luis Piedra Buena/T. geversianus (sub)					
Branquia	biota	Nd	11,23	Nd	73,36
Pie Hembras	biota	4	15,78	47,31	14,34
Pie Machos	biota	Nd	14,46	7,37	348,80
Resto Cuerpo Hembras	biota	Nd	10,12	Nd	6,44
Resto Cuerpo Machos	biota	60	28,15	79,48	47,43
Reproductivo Hembras	biota	Nd	18,52	1346,59	17,89
Reproductivo + digestivo M	biota	14	14,94	125,82	82,05
Punta Este/T. geversianus (sub)					
Pie Hembras	biota	12	13,23	Nd	14,45
Pie Machos	biota	Nd	12,83	3,60	7,06