



UNIVERSIDAD DE CHILE

**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS**



**ESTUDIO MORFOHISTOLÓGICO DEL SISTEMA REPRODUCTOR
DE *Nassarius gayii* PRESENTE EN SECTORES CERCANOS Y
ALEJADOS DE ÁREAS PORTUARIAS**

LORENA ELIZABETH PANES PÉREZ

**Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias Biológicas
Animales**

PROFESOR GUÍA: LAURA G. HUAQUÍN MORA

Proyecto CSMAR 02/3-2

SANTIAGO, CHILE

2006



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



ESTUDIO MORFOHISTOLÓGICO DEL SISTEMA REPRODUCTOR DE *Nassarius gayii* PRESENTE EN SECTORES CERCANOS Y ALEJADOS DE ÁREAS PORTUARIAS

LORENA ELIZABETH PANES PÉREZ

**Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias Biológicas**

NOTA FINAL:

NOTA

FIRMA

PROFESOR GUÍA : LAURA G. HUAQUÍN MORA :

PROFESOR CONSEJERO : RAQUEL CEPEDA :

PROFESOR CONSEJERO : GUSTAVO FARIAS :

INDICE DE CONTENIDOS.

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	2
	Antecedentes del género <i>Nassarius</i>	2
	<i>Nassarius gayii</i>	3
	Anatomía del sistema reproductivo de los neogastrópodos.....	4
	Cambio de sexo o imposex.....	5
	¿Por qué se usan pinturas anti-incrustantes con compuestos organoestañosos?	7
	Disruptores químicos endocrinos.....	8
	Ejemplos de intervención en el sistema endocrino.....	9
	Registros en Chile.....	10
	Legislación.....	11
III.	HIPÓTESIS	13
IV.	OBJETIVOS	13
	1. Objetivo General	13
	2. Objetivos Específicos	13
V.	MATERIALES Y MÉTODOS	14
VI.	RESULTADOS	17
	1. Datos registrados.....	17
	2. Descripción de la anatomía reproductiva de machos y hembras de <i>N. gayii</i>	21
	3. Alteraciones del sistema reproductivo.....	41
VII.	DISCUSIÓN	51
i.	CONCLUSIONES	59
ii.	BIBLIOGRAFÍA	60

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS.

ÍNDICE DE TABLAS.

TABLA 1:	<i>Resumen de datos según localidad</i>	21
----------	---	----

ÍNDICE DE FIGURAS.

FIGURA 1:	Distribución de <i>N. gayii</i> , desde Islas Lobos de fuera (Perú) hasta el Estrecho de Magallanes (Chile).....	3
FIGURA 2:	<i>N. gayii</i>	3
FIGURA 3:	Esquema modificado del aparato reproductivo de <i>Nassarius vibex</i> ,.....	5
FIGURA 4:	Tornillo mecánico de sobremesa.....	14
FIGURA 5:	<i>N. gayii</i> , colectados desde Coliumo (A) y desde San Antonio (B).....	17
FIGURA 6:	Proporción hembra-macho encontradas en muestras de <i>N. gayii</i> en a) San Antonio y b) Coliumo.....	17
FIGURA 7:	a) Longitud total según la localidad; b) Longitud total según estación; c) Longitud total según localidad y estación; d) Longitud total según sexo (medidas en mm).....	18
FIGURA 8:	a) Peso total según la localidad; b) Peso total según estación; c) Peso total según localidad y estación (medidas en mm).....	19
FIGURA 9:	d) lp / lt según localidad; e) lp / lt según estación; f) lp / lt según localidad y estación.....	20
FIGURA 10:	Esquema general de una hembra de <i>N. gayii</i>	22
FIGURA 11:	Esquema espacial para <i>N. gayii</i> . Dibujo original Lorena Panes.....	23
FIGURA 12:	Esquema de un macho de <i>N. gayii</i> ,.....	23
FIGURA 13:	Esquema del aparato reproductivo de un macho de <i>N. gayii</i>	24
FIGURA 14:	Macho de <i>N. gayii</i> (10x).....	24

FIGURA 15: Histología del testículo del macho de <i>N. gayii</i> , (Coliumo). A) (H-E 4x) y B) 20x.....	25
FIGURA 16: Histología del testículo del macho de <i>N. gayii</i> , (Coliumo). (H-E 40 x).....	26
FIGURA 17: Corte histológico del espermioducto de macho de <i>N. gayii</i> (Coliumo).....	27
FIGURA 18: Corte histológico de la próstata del macho de <i>N. gayii</i> , (Coliumo).....	28
FIGURA 19: Histología del conducto deferente del macho de <i>N. gayii</i> , (Coliumo).....	29
FIGURA 20: Histología del pene del macho de <i>N. gayii</i> (Coliumo).....	30
FIGURA 21: <i>N. gayii</i> , Microscopía electrónica de barrido de machos.....	31
FIGURA 22: Esquema de una hembra de <i>N. gayii</i>	32
FIGURA 23: Esquema del aparato reproductivo de una hembra de <i>N. gayii</i>	32
FIGURA 24: Fotografía de una hembra normal de <i>N. gayii</i>	33
FIGURA 25: Histología del ovario de la hembra de <i>N. gayii</i> (Coliumo). A) (H-E 4x) y B) 20x.....	34
FIGURA 26: Histología del ovario de la hembra de <i>N. gayii</i> (Coliumo). 40x.....	34
FIGURA 27: Corte histológico del oviducto de la hembra de <i>N. gayii</i> (Coliumo). 20x.....	35
FIGURA 28: Corte histológico de la glándula de la cápsula, de ingestión y de la albúmina de la hembra de <i>N. gayii</i> (Coliumo).....	37
FIGURA 29: Corte histológico de cápsula de huevos de la hembra de <i>N. gayii</i> (Coliumo).....	37
FIGURA 30: Histología de la bursa copuladora de la hembra de <i>N. gayii</i> (Coliumo).....	38
FIGURA 31: Histología de la glándula pedal ventral de la hembra de <i>N. gayii</i> (Coliumo).....	39
FIGURA 32: <i>N. gayii</i> , Coliumo. Microscopía electrónica de barrido de tres hembras normales.....	40
FIGURA 33: Esquema de una hembra con imposex de <i>N. gayii</i>	41

FIGURA 34: Esquema del aparato reproductivo de una hembra con imposex de <i>N. gayii</i>	41
FIGURA 35: Hembra con imposex de <i>N. gayii</i> (San Antonio).....	42
FIGURA 36: Hembra con imposex de <i>N. gayii</i> (San Antonio).....	42
FIGURA 37: Corte histológico del tejido ovárico de la hembra con imposex de <i>N. gayii</i> (San Antonio).....	43
FIGURA 38: Corte histológico de la glándula de la albúmina y de la cápsula, de la hembra con imposex de <i>N. gayii</i> (San Antonio).....	44
FIGURA 39: Corte histológico de la glándula de la cápsula (GC), de la hembra con imposex de <i>N. gayii</i> (San Antonio).....	45
FIGURA 40: Histología de la glándula pedal ventral (GP) de la hembra con imposex de <i>N.</i> <i>gayii</i> (San Antonio).....	46
FIGURA 41: Histología del oviducto de la hembra con imposex de <i>N. gayii</i> (San Antonio).....	47
FIGURA 42: Histología del conducto deferente de la hembra con imposex de <i>N. gayii</i> (San Antonio).....	48
FIGURA 43: Histología del pene de la hembra con imposex de <i>N. gayii</i> (San Antonio)...	49
FIGURA 44: <i>N. gayii</i> , San Antonio. Microscopía electrónica de barrido de una hembra con imposex, obtenida desde.....	50

RESUMEN.

A partir de los años 70, se han observado alteraciones anatómicas y reproductivas en los moluscos, especialmente en neogastrópodos hembras que desarrollan características masculinas (imposex). Esto sucede en áreas cercanas a zonas portuarias contaminadas con organoestañosos. *Nassarius gayii* (Kiener, 1835) es un molusco neogastrópodo gonocórico que habita niveles submareales y se distribuye desde Perú hasta el Estrecho de Magallanes. El objetivo de este estudio fue describir la anatomía normal del sistema reproductivo de machos y hembras, y las modificaciones encontradas en presencia de contaminación por tributilestaño (TBT). Las muestras fueron obtenidas en otoño y primavera en el Puerto de San Antonio (33° 57' S, 71° 52' O) el que corresponde a un sitio con alta concentración de TBT, y en la Bahía Coliumo (36° 31' S, 72° 56' O) considerado un sitio menos contaminado por su lejanía a las áreas portuarias. En los individuos capturados se determinó el sexo y se realizó una descripción macroscópica y microscópica general del sistema reproductivo. La descripción anatómica normal para hembras y machos, se realizó con individuos que no presentaban alteraciones evidentes en su tracto reproductor con respecto a lo descrito en la literatura para el género. Las hembras que presentaron estructuras reproductivas masculinas fueron consideradas con imposex. En San Antonio hubo más machos que hembras, todas ellas con imposex. En cambio, en Bahía Coliumo, la proporción de machos y hembras fue similar y no se registró imposex. Similar a lo que sucede en otras especies el imposex en las hembras de *N. gayii* se reflejó en la aparición de un pene, conducto deferente y el plegamiento del oviducto. No se observó presencia de tejido testicular en las hembras. Estas modificaciones morfológicas se pueden traducir tanto en alteraciones en la tasa reproductiva, como en disminuciones en el tamaño efectivo poblacional, lo que a largo plazo

podría poner en riesgo la persistencia de *N. gayii* a nivel local. Estos resultados sugieren que en Chile es importante controlar el uso de TBT, por sus efectos sobre la fauna y sus potenciales efectos como disruptor endocrino en el ser humano.

Palabras claves: Morfología sistema reproductor *Nassarius gayii*, Imposex, TBT.

SUMMARY.

Since the seventies, anatomic and reproductive alterations have been observed in mollusks, especially in neogastropods females that develop male characteristics (imposex). This happens in areas near to harbors polluted with organic tin compounds. *Nassarius gayii* (Kiener, 1835) is a neogastropod gonochoric mollusk that inhabits in sub tidal levels and is distributed from Peru to Magellan Strait. The goal of this study is to describe normal anatomy of the male and female reproductive system, and changes founded in presence of tributyltin (TBT) pollution. Samples were obtained in autumn and spring in San Antonio Port (33° 57' S, 71° 52' W), a place with a high TBT concentration, and in Coliumo Bay (36° 31' S, 72° 56' W) a less polluted area far away of harbors. Captured individuals were sexed and a general macroscopic and microscopic description of the reproductive system was made. Normal anatomy description was made using individuals without evident reproductive tract alterations in accord to literature. Females with male reproductive structures were considered with imposex. In San Antonio, there were more males than females, all of them with imposex. On the contrary, in Coliumo Bay proportion of males and females was similar and imposex was not recorded. Similar to other species, imposex in *N. gayii* females was revealed in a penis, vas deferens and a coiled oviduct presence. Testis tissue in females was not observed. These morphological modifications could be expressed both in alterations in reproductive rates and in reductions in effective population size, putting in danger local population persistence of *N. gayii*, in a long run. These results suggest that control of TBT used in Chile is important, because of its effects on fauna and as potential endocrine disruptor in the human being.

Key words: Morphology reproductive system *Nassarius gayii*, Imposex, TBT.

INTRODUCCIÓN.

Desde hace algunos años, se han observado alteraciones del sexo, especialmente en neogastrópodos hembras que habitan áreas cercanas a zonas portuarias, las cuales manifiestan características masculinas, fenómeno denominado “imposex”, el que se evidencia por el desarrollo de un pene detrás del tentáculo derecho de la cabeza del animal (Oehlmann *et al.*, 1996).

El primer registro de imposex en América del sur, lo realizaron en Chile Gooding *et al.*, (1999) en tres especies de gastrópodos comestibles, *Chorus giganteus* (Lesson, 1830), *Xanthochorus cassidiformis* (Blainville, 1832) y *Nucella crassilabrum* (Lamarck, 1789). Posteriormente Osorio y Huaquín (2003) y Huaquín *et al.*, (2004) observan imposex en *Acanthina monodon* (Pallas, 1774).

Aunque imposex aparece como respuesta específica a contaminantes organoestañosos como el tributilestaño (TBT), puede haber otros agentes causales, que ponen en riesgo a las poblaciones de gastrópodos gonocóricos o de sexos separados en el intermareal o en sedimentos del fondo marino.

Así, son muchas otras las especies que pueden estar alteradas sexualmente. Entre ellas, se ha observado a *Nassarius gayii*, que se distribuye desde Perú hasta el Estrecho de Magallanes, habitando niveles submareales. Logra una longitud máxima de 14 mm. Es una especie carroñera que prefiere los sedimentos fangosos y con un alto contenido de materia orgánica o en ambientes con sedimento arenoso (Zagal y Hermosilla, 2001).

Uno de los aspectos diferenciales entre los sexos es la presencia de la glándula de la cápsula y la glándula de la albúmina en las hembras. En los machos, el pene, está localizado en la cabeza, detrás del tentáculo derecho. En hembras de Nassaridae con imposex se describen tres características masculinas: un pene, un vaso deferente y el plegamiento del oviducto.

El objetivo de este estudio es describir aspectos anatómicos del sistema reproductivo de la especie, junto a los posibles cambios de sexo en las hembras o presencia de imposex, en el Puerto de San Antonio y en un área alejada de zonas portuarias Bahía Coliumo (VIII Región), por lo tanto, con distintos niveles de contaminación por organoestañosos, emanada desde las embarcaciones.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

Antecedentes del género.

El género *Nassarius* pertenece al orden Neogastropoda. Sus ejemplares son dioicos (de sexos separados) y gonocóricos (con sólo una gónada). Las especies de este género mayormente descritas, son del hemisferio norte. Así, el caracol de fango, *Nassarius obsoletus* (Say, 1822), es un neogastropodo dioico abundante en la zona intertidal de la costa este y partes de la costa oeste de los Estados Unidos. Generalmente habita estuarios fangosos y pocas veces en pantanos. Puede tolerar salinidades tan bajas como 16‰ (Fretter y Graham, 1985) y temperaturas tan altas como 35° C (Smith, 1980). La época reproductiva, en la parte occidental de Long Island Sound, se observa entre mayo y junio. Smith (1980) señala que la progenie alcanza la madurez sexual después de dos años, viviendo a menudo uno a dos años más.

En las hembras de *N. obsoletus* con imposex, se manifiestan tres características masculinas: un pene, un vaso deferente y el plegamiento del oviducto el cual es normalmente recto, que al alterarse, se asemeja a la vesícula seminal en los machos. La primera característica es la más frecuente y la última la menos frecuente (Oehlmann *et al.*, 1996).

Según Smith (1980), la frecuencia e intensidad del imposex son similares entre diversas agrupaciones de edad de los caracoles, aunque puede haber una tendencia menor en juveniles.

Nassarius reticulata (Linnaeus, 1758) es una especie en la que se ha descrito gran parte de la anatomía reproductiva (Fretter y Graham 1962) y en la cual se ha observado una alta capacidad de dispersión, ya que eclosiona como una larva nadadora veliger y permanece en el plancton por dos a tres meses hasta su metamorfosis (Stroben *et al.*, 1992).

Nassarius vibex (Say, 1822) es una especie común en lugares fangosos del sudeste de Estados Unidos y llega al tamaño adulto cerca de los 15 mm de largo de la concha. En general, en los individuos maduros, los machos son más pequeños que las hembras (Demaintenon, 2001).

***Nassarius gayii*.**

N. gayii, tiene una longitud máxima de 1,4 cm, su concha es pequeña, de color café con estrías blancas muy finas e interior blanco y de opérculo córneo (Zagal y Hermostilla, 2001). Según Guzmán *et al.*, (1998) externamente puede presentar una coloración que varía de tonos café rosáceo a tonos verde oliva.

Esta especie tiene una distribución vertical bastante amplia, según Marinovich (1973), va desde Islas Lobos de Afuera (6° 55' S, 80° 43' O Perú) hasta el Estrecho de Magallanes (53° 08' S, 70° 55' O Chile). Vive en playas de arena fina o fango, a poca profundidad (2 m). En Bahía de Mejillones se observa con mayor abundancia a una profundidad entre los 10 y 14 m, viviendo asociado a *Mitrella unifasciata* (Sowerby, 1832) entre otros (Gallardo, 1963; Zúñiga *et al.*, 1983). Incluso puede hallarse a una profundidad alrededor de los 20 m, en los límites del sustrato rocoso (Vásquez y Vega, 2004).

Según Zagal y Hermostilla (2001), forma parte de la fauna asociada con *Pyura chilensis* (Molina, 1782). Es una especie carroñera de bivalvos muertos y otros organismos de la macrofauna. También consume materia orgánica depositada y desechos de bivalvos. Es depredado por estrellas de mar y peces como la cabrilla *Sebastes capensis* (Gmelin, 1788), el pejegallo *Callorhynchus callorhynchus* (Linnaeus, 1758) y la raya *Psammobatis lima* (Poepfig, 1835).

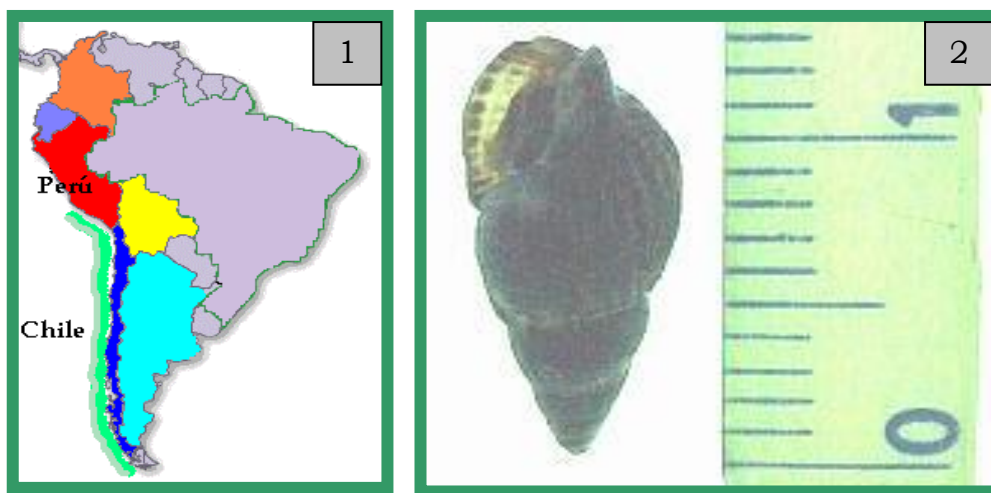


FIGURA 1. Distribución de *N. gayii*, desde Islas Lobos de fuera (Perú) hasta el Estrecho de Magallanes (Chile).

FIGURA 2. *N. gayii*. En la foto el ejemplar mide aproximadamente 1,2 cm.

Letelier *et al.*, (2005) dividieron a la población según su desarrollo y describen dentro de la frecuencia de longitudes la presencia de tres modas. La primera corresponde a organismos de hasta 6mm, los reclutas de la población, es decir la fase pre reproductiva. La segunda tiene una amplitud de 6 a 11,5 mm de longitud, es decir la porción de la población que se postula en fase reproductiva y finalmente la tercera moda estaría constituida por organismos mayores a 11,5 mm, que representaría la parte longeva de la población.

Anatomía del sistema reproductivo de los neogastrópodos.

Los gastrópodos prosobranquios exhiben todo tipo de sexualidad, pero en la mayoría de las especies marinas, los sexos están separados y ella no cambia durante la vida del individuo (Fretter y Graham, 1962).

La forma básica de los sistemas reproductivos de machos y hembras de neogastrópodos muestra ser similar. La especie mejor caracterizada al respecto es *Nucella lapillus* (Linnaeus, 1758), descrita por Fretter y Graham (1962), la que se tomará de ejemplo para detallar la anatomía del sistema reproductivo de este grupo.

Uno de los aspectos diferenciales entre los sexos es la presencia de la glándula de ingestión espermática en las hembras: esta glándula frecuentemente es café oscura, pero puede tener matices rojos o negros. En los machos, un simple ducto, el vaso deferente, lleva los espermatozoides desde el testículo hacia el pene, localizado en la cabeza, detrás del tentáculo derecho. La región proximal de este ducto espermático es muy enrollada, formando la vesícula seminal, donde son almacenados los gametos.

Su porción media está situada dentro de la cavidad del manto formando la próstata, la cual es una estructura glandular y dilatada. Desde la próstata, la porción distal del ducto o vaso deferente paleal, cruza el piso de la cavidad del manto hasta la base del pene, desde aquí hasta su extremo. El vaso deferente paleal es un tubo subsuperficial, formado por el crecimiento y fusión de los bordes de los surcos superficiales, cuya línea se va cerrando y se transforma en una línea superficial en toda su longitud. Bajo la dermis, el epitelio se enrolla y se fusiona.

Fretter y Graham (1962), mencionan que ontogenéticamente, este vaso se desarrolla por partes, se pliega en principio en el epitelio, apareciendo adyacente al pene y a la

próstata, luego esas dos secciones migran hacia delante en forma conjunta. Este patrón de desarrollo es seguido como un rasgo en el desarrollo de imposex.

En contraste, la estructura del gonoducto femenino es más compleja, como resultado de modificaciones y la formación de glándulas de secreción para permitir la encapsulación de ovocitos fecundados. La fecundación interna se logra mediante la cópula, el pene entra al oviducto a través de la vulva situada en la papila genital.

Los espermatozoides son depositados en la bursa copuladora, para luego pasar dentro del canal ventral de la glándula de la cápsula. Los huevos son llevados desde el ovario, a través del oviducto, hacia la glándula de la albúmina, donde son mezclados con secreciones y probablemente fertilizados. Los huevos, posteriormente, pasan a la glándula de la cápsula, que produce primero proteínas de la matriz y luego el material mucoide, formando la cubierta fibrosa externa de la cápsula (Fretter y Graham, 1962).

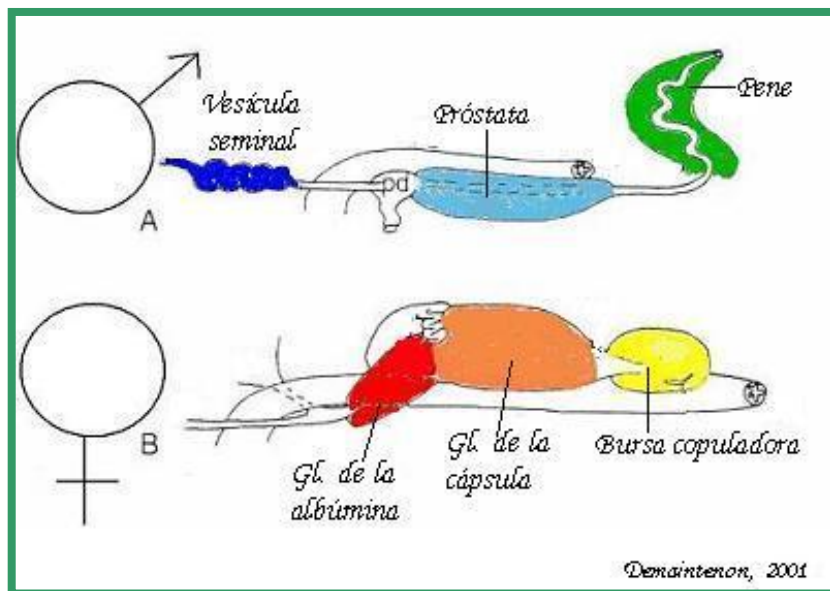


FIGURA 3. Esquema modificado del aparato reproductivo de *N. vibex*, donde se indican las estructuras del gonoducto masculino y femenino. Fuente Demaintenon, 2001.

Cambio de sexo o imposex.

Desde hace algunos años se han observado algunas alteraciones en especies marinas, especialmente del aparato reproductivo. El inicio de estos cambios se observaron después de la década de los 60, cuando se introducen al mercado las pinturas anti-

incrustantes para embarcaciones, que contienen compuestos organoestañosos como el tributilestaño (TBT).

La evidencia circunstancial se produjo cuando estas pinturas empiezan a afectar no sólo a los organismos incrustantes o “fouling”, sino que también a otros grupos de organismos, entre ellos a los moluscos, los que comienzan a mostrar diferentes signos. Por ejemplo las ostras del Pacífico, cultivadas en Francia en cercanías de botes, mostraron un alto índice de mortalidad de sus larvas y graves deformaciones en las conchas de los ejemplares adultos, que los hacía invendibles (Alzieu, 1986; Evans *et al.*, 1995).

Otros cambios morfológicos se traducen en una formación de un pene en las hembras de neogastrópodos como ya se mencionó y en casos más graves en una transformación a nivel de las vías reproductoras denominado sexo impuesto o “imposex” (Smith, 1971). Más adelante estos cambios morfológicos en las hembras del caracol *N. obsoletus*, fueron ligados a la contaminación de TBT (Smith, 1981). Otra evidencia reportada, fue una disminución marcada de poblaciones de *N. lapillus* alrededor de las costas del sudoeste de Inglaterra, causada probablemente por imposex inducida por TBT (Bryan *et al.*, 1989).

Imposex es, esencialmente, un fenómeno observado en hembras, los efectos sobre los machos se discuten raramente y son sobre todo anatómicos. Jenner (1979), describió a machos con glándulas pedales femeninas en una población de *N. obsoleta*, afectada por imposex. La exposición al TBT evidenció una longitud del pene mayor en *Littorina littorea* (Linnaeus, 1758) y en *N. lapillus*. En *N. vibex* existe efecto en los machos, cambiando la sincronización del desarrollo de partes del sistema reproductivo, lo que sugiere una madurez funcional precoz en ellos (Demaintenon, 2001).

Registros en Río de Janeiro por Braga de Castro *et al.*, (2000) describen hallazgos de imposex en *Thais haemastoma* (Linnaeus, 1758), que se relacionan con la contaminación ambiental derivada de componentes organoestañosos en sus puertos.

El TBT causa anormalidades reproductivas a través del metabolismo esteroidal, produciendo niveles de testosterona mayores a los normales en los organismos (Oehlmann y Bettin, 1996).

Actualmente, se ha visto que en algunas especies los efectos pueden llegar a ser bastante severos, hasta causar la esterilización de la hembra a través de la malformación u

obstrucción del oviducto anterior. La esterilización inducida por imposex no se ha considerado hasta ahora en especies de Nassariidae, esto se ha descrito en murícidos y en Hydrobiae e, indudablemente, refleja una cierta variación organogenética fundamental entre estas taxa (Demaitre, 2001).

Según Evans *et al.*, (2000) el sexo impuesto o “imposex”, ha sido descrito en más de 118 especies de gastrópodos de 63 géneros en el mundo y es irreversible en la mayoría de los ejemplares de las especies afectadas.

Por esta razón, es que la presencia de poblaciones de gastrópodos en las áreas portuarias del mundo ha disminuido e incluso desaparecido por problemas de contaminación con pinturas antifouling que contienen TBT.

¿Por qué se usan pinturas anti-incrustantes con compuestos organoestañosos?

Los compuestos organoestañosos son agentes anti-incrustantes de gran eficacia en los buques, siendo los más importantes y eficaces el tributilestaño (TBT) y el óxido de tributilestaño (TBTO) (CE., 2000).

Las incrustaciones se refieren a la colonización de los cascos de barcos y estructuras sumergidas por un amplio abanico de organismos. Tan sólo una pequeña cantidad de incrustaciones biológicas pueden hacer aumentar el consumo de combustible hasta un 40% y, posiblemente, hasta un 50%, ya que aumenta la resistencia del buque al movimiento. Por lo tanto, un buque limpio navega con más rapidez y utiliza menos energía.

Para que un anti-incrustante sea eficaz, aparte de tener una relación calidad/precio favorable, su sustancia activa debe estar biodisponible y en consecuencia liberarse permanentemente en el entorno inmediato. Pero, esta liberación en el medio acuático, junto a la elevada y crónica toxicidad de los compuestos organoestañosos, puede afectar a los ecosistemas expuestos (OMI., 1999).

El TBT presenta bioacumulación en áreas portuarias. La velocidad de degradación depende del medio, con períodos de dos semanas en el agua, dos meses en la biota y de seis meses a veinte años en los sedimentos (CE.,2000).

El estaño posee propiedades lipofílicas e iónicas que promueven la bioacumulación en los lípidos y en las macromoléculas que estén expuestas. La bioconcentración y acumulación de tributilestaño en la cadena de alimentos está bien documentada; y su

biomagnificación, de incluso 500.000 veces, ha sido reportada en algunas especies (Laughlin, 1996).

Disruptores químicos endocrinos.

Los productos químicos han aportado muchos beneficios a la humanidad, sin embargo, el principal problema en la actualidad es la presencia, cada vez mayor, en cantidad y diversidad de sustancias químicas cuyos riesgos para la salud y el medio ambiente son desconocidos o insuficientemente conocidos y evaluados.

Actualmente el medio acuático está siendo receptor final de sustancias residuales provenientes de desechos industriales. A estas sustancias que afectan el sistema endocrino de los seres vivos, tanto de animales como del ser humano y particularmente al sistema reproductor, se les denomina “*disruptores químicos endocrinos*” (EDC).

Según Olea (2001), los EDC, son sustancias químicas capaces de provocar alteraciones en el desarrollo sexual e incluso se les asocia a algunos tipos de cáncer.

La industria química ha generalizado el uso de sustancias químicas que actúan como disruptores endocrinos hormonales. El número de estos compuestos, crece día a día, dado que, de los 150.000 compuestos químicos presentes en el agua, la atmósfera, el suelo o los alimentos, 62.000 tienen efectos aún no estudiados. La presencia en el ambiente de compuestos químicos con efectos estrogénicos es tal que algunos hablan de un “mar de estrógenos”: *bifenol, nomilfenol, atrazina, endosulfán, cimetidina, dioxinas, DDT* y otros muchos compuestos sintéticos que tienen efectos estrogénicos probados sobre el sistema endocrino (Olea, 2001).

Aunque tales nombres no son familiares, la presencia de los EDC, puede rastrearse en infinidad de productos característicos de nuestra época: en alimentos como vegetales, carnes, leche, huevos, conservas, aditivos para la alimentación, diferentes tipos de plásticos, pegamentos, pinturas, recubrimientos, aislantes, esmaltes dentarios, fármacos, juguetes, lacas, esmaltes de uñas, perfumes, envases, resina de empastes, así como en equipos electrónicos, fabricación de adhesivos y otros en los que destacan los *plaguicidas* (que se utilizan en el campo y que son una amenaza para los trabajadores y los seres vivos), gasolinas y anticonceptivos llevan uno o varios compuestos de efectos estrogénicos que,

además de entrar directamente en nuestro cuerpo, contaminan todos los ambientes pero, especialmente el agua.

Ejemplos de intervención en el sistema endocrino.

La capacidad de los contaminantes medio ambientales, para interferir en la función endocrina fue establecida hace más de 30 años cuando se asoció la caída en la población de pájaros piscívoros en los Estados Unidos, debido a problemas reproductivos graves, con la exposición medio ambiental al DDE un metabolito del pesticida organoclorado DDT (Hickey y Anderson, 1968; Heath y Spann, 1969). El problema inmediato fue parcialmente resuelto con la retirada del pesticida en 1972, aunque observaciones posteriores, tanto en el laboratorio como en el campo, indican que el DDT y otros pesticidas organoclorados, continúan impregnadas en poblaciones expuestas debido a su persistencia medioambiental, a la bioacumulación en tejidos y a su transmisión dentro de la cadena alimenticia.

Son múltiples ejemplos recogidos de la literatura científica. Por ejemplo lo ocurrido con la población de caimanes del lago Apopka en Florida, que resultaron accidentalmente expuestos al *pesticida dicofol/keltano*, tras un vertido accidental en 1980. Diez años más tarde, la población de caimanes había descendido significativamente, había aumentado la mortalidad en los huevos y la mitad de las crías morían antes de los diez días. Se encontraron hembras adolescentes que tenían anomalías severas en los ovarios y presentaban niveles de estrógenos en la sangre dos veces más altos de lo normal. Posteriormente se descubrieron efectos importantes sobre el desarrollo sexual de los machos jóvenes, los cuales estaban fuertemente feminizados, presentando penes pequeños y tenían niveles de estrógenos más altos en su sangre que los normales. Las investigaciones llevadas a cabo sirvieron para concluir que los productos químicos que fueron vertidos al lago habían alterado el sistema endocrino de los embriones, provocando las malformaciones descritas y limitando la capacidad de los caimanes para reproducirse (Woodward *et al.*, 1993; Guillette *et al.*, 1995).

Jobling y Sumpter (1993), publicaron por primera vez la observación experimental relativa a los desórdenes de expresión del fenotipo sexual en peces. Los peces machos capturados en las cercanías de plantas de tratamiento de aguas residuales en algunos ríos ingleses, presentaban características sexuales femeninas. Varias sustancias químicas

especialmente los alquifenoles, encontrados en detergentes y plásticos, fueron identificados como responsables de causar estos efectos feminizantes.

Dentro de estas disrupciones del sistema endocrino, es en donde se clasifican las alteraciones reproductivas de los moluscos que se asocian en forma inequívoca con la exposición a TBT y a otros derivados del estaño utilizados como antiincrustantes, que tienen una actividad hormonal bien documentada (Bryan y Gibbs, 1991).

Registros en Chile.

Chile tiene una extensa línea costera de 4200 Km. de largo, con 779 especies de gastrópodos (Lozada y Osorio, 1995) incluyendo murícidos como el loco *Concholepas concholepas* (Brugière, 1789), caracol locate *Thais chocolata* (Duclos, 1832) y caracol trumulco *C. giganteus*.

A pesar que la contaminación con TBT (lixiviación de compuestos organoestañosos), causa graves daños, en nuestro país este tema no ha sido expuesto, no existen estudios como tampoco control, en relación a las concentraciones en el agua. Actualmente hay dificultades para determinar las concentraciones de TBT en agua, sedimento o biota, ya que las técnicas son de alto costo y difíciles de llevar a cabo.

En la zona sur de nuestro país, Gooding *et al.*, (1999), comprobaron la presencia de imposex en tres especies de murícidos autóctonos en la bahía de Corral *C. giganteus*, *X. cassidiformis* y *N. crassilabrum*. Señalando que este fenómeno (imposex), puede generar problemas en los cultivos de gastrópodos, en la diversidad de moluscos y de los sistemas acuáticos a corto plazo.

En la zona central, se describe la presencia de imposex en *A. monodon*, estudio realizado en las zonas cercanas al puerto de San Antonio, obteniendo promedios de imposex de 94,5 %, este resultado se acompaña de una disminución de las densidades de la población de esta especie, en zonas donde hace algún tiempo era abundante (Osorio y Huaquín 2003).

Por lo tanto, hay evidencias de imposex en 4 especies de la costa de Chile entre la IV a X Región. Existiendo tendencias claras de disminución de las poblaciones de *A. monodon*, en el área portuaria; donde la contaminación pueden llevar a la pérdida irreparable de genomas de estas poblaciones.

En Algarrobo V Región, Cocas (2000), demostró la sensibilidad del loco (*C. concholepas*) a la inducción experimental de imposex por TBT, ya que al cabo de 6 semanas de experimentación, las hembras recolectadas en esta área desarrollaron pene y conducto deferente, histológicamente similares a los observados en los machos juveniles, también se observó la atrofia de los acinos digestivos de la glándula digestiva de todos los animales sometidos a inyecciones con TBT. Esta atrofia se relacionaría a la función detoxificadora atribuida a este órgano en algunos animales.

Legislación.

Mundialmente, las legislaciones prohíben la aplicación de antifouling basados en TBT a los barcos menores de 25 m de largo y también a jaulas de cultivo marino. El primer país en legislar al respecto fue Francia, 1982; luego el Reino Unido, 1987; y la mayoría de los otros países europeos; Estados Unidos, Nueva Zelanda y Australia entre 1987 y 1991 (Gibbs y Bryan, 1994).

En consecuencia, hoy en día, la contaminación por TBT ha declinado en muchas áreas costeras, en el agua, sedimentos y tejidos de moluscos, acompañado por una disminución en la intensidad de imposex en gastrópodos y en la deformación de las conchas en ostras (Gibbs y Bryan, 1994).

No obstante, según Barroso *et al.*, (2000) el uso continuado de pinturas con TBT en grandes embarcaciones, hace que el problema permanezca en puertos comerciales y pesqueros.

En 1998, el CPMM (Comité de Protección del Medio Marino) creado por la Organización Marítima Internacional, acuerda el proyecto de reglamentación obligatoria para prohibir el uso de compuestos organoestañosos en los sistemas antiincrustantes. Para esto existen dos fechas:

- El 2003 para la prohibición del uso de compuestos organoestañosos como biocidas en los sistemas antiincrustantes y
- El 2008 para la prohibición completa de estos compuestos (OMI., 1999).

Pese a estas prohibiciones, nuestro país, no posee restricciones, utilizándose indiscriminadamente incluso en mallas de cultivo. Los sedimentos adsorben TBT y al ser resuspendidos pueden actuar como fuentes de contaminación incluso por décadas.

Esta situación se agrava al considerar que existen numerosas instalaciones portuarias en constante crecimiento distribuidas entre Arica y Punta Arenas. La presencia de grandes puertos con tráfico importante de embarcaciones de gran tonelaje hace suponer que ya existe algún grado significativo de contaminación con TBT, al menos en zonas cercanas a los puertos y que en consecuencia las poblaciones de moluscos que habitan esas zonas, tal vez estén afectadas por imposex y no sean detectadas.

Para San Antonio, localidad portuaria, la concentración de Estaño (Sn) en los sedimentos fue de 37 ng/g (Huaquín *et al.*, 2004), y el promedio del TBT en el agua, calculado por muestreos entre el 2002 y 2003, fue de 42, 63 ng/L (Comunicación personal)¹

En Chile la normativa de calidad de agua (Decreto Supremo N° 90/2000) indica que los límites máximos permitidos para el estaño son de 1,0 mg/L para descargas que estén fuera de la zona de protección litoral y en las zonas de protección son aceptados vertidos de 0,5 mg/L. Estos valores permitidos sobrepasan 1.000 a 10.000 veces las concentraciones que son ya peligrosas para la fauna. Sin embargo, no existe una ley que controle el uso de antifouling basados en TBT (Osorio y Huaquín, 2003).

¹ CENMA. 2002 (Comunicación personal) Universidad de Chile.

HIPÓTESIS.

En zonas portuarias contaminadas con TBT, las hembras de *Nassarius gayii* adquieren características masculinas, evidenciadas por la presencia de un pene en su sistema reproductivo. Por el contrario, esta característica no se presentaría en hembras recolectadas en sectores libres de este contaminante.

OBJETIVO GENERAL.

Describir y comparar el sistema reproductivo de ejemplares de *N. gayii* provenientes de sectores cercanos (San Antonio) y alejados (Bahía Coliumo) de áreas portuarias.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- 1) Describir la anatomía reproductiva mesoscópica y microscópica de machos y hembras de *N. gayii*.
- 2) Determinar y describir las alteraciones del sistema reproductivo en individuos que están afectados por cambio de sexo.
- 3) Relacionar la presencia de estas alteraciones con la contaminación por TBT en la zona portuaria y su ausencia en zonas no contaminadas con este organoestañoso.

MATERIAL Y MÉTODO.

Se colectaron 47 ejemplares en marzo y 50 en octubre del 2004 de *N. gayii* de la costa de la zona central de Chile (Puerto de San Antonio 33° 57' S, 71° 52' O). De la costa de la zona sur (Bahía Coliumo 36° 31' S, 72° 56' O) se obtuvo 108 individuos en junio del 2004 y 50 en octubre del 2005 de la misma especie, muestreados por el Dr. Tarifeño, enviados a Santiago en seco entre algas.

Las colectas se hicieron en períodos de baja marea, entre los 2 a 16 metros, desde la zona submareal. Para esto se utilizó una draga, instrumento que se sumerge manualmente para recoger el sedimento con fauna marina.

Los individuos capturados fueron depositados en bolsas plásticas, etiquetados y almacenados en un “cooler” con hielo para ser trasladados vivos al Departamento de Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

Se obtuvo el tamaño y peso de cada individuo con concha y el peso blando una vez retirada ésta. Las mediciones se hicieron con un calibre milimetrado y el peso con una balanza de precisión de 0,01 mg. Los caracoles fueron anestesiados con cloruro de magnesio al 7%. La concha de estos individuos se retiró presionándola con un tornillo mecánico de sobremesa, quedando sólo las partes blandas de la muestra (Figura 4).



FIGURA 4. Tornillo mecánico de sobremesa, utilizado para retirar la concha a los caracoles y trabajar con sus partes blandas.

Los individuos fueron sexados según los siguientes criterios:

SEXO	CARACTERÍSTICAS
Hembra	Presencia de glándula de la cápsula y glándula de la albúmina.
Macho	Muestra pene sin presencia de glándula de la cápsula ni glándula de la albúmina
Hembra con imposex	Muestra pene con presencia de glándula de la cápsula y glándula de la albúmina.

Estos criterios son muy similares a los usados por Smith en 1980, para la descripción de *Ilyanassa obsoleta* sobretodo en hembras con imposex.

Para la descripción mesoscópica, las partes blandas de 5 hembras, 5 machos y 5 hembras con imposex, fueron fijadas con formalina al 10 % en agua de mar y almacenados en alcohol de 70°.

Se midió la longitud de pene, bajo lupa con ocular graduado, tanto en machos y en hembras con imposex, para obtener el Índice de Longitud Relativa del pene (RPL) de Oehlmann *et al.*, (1991) *.

$$*RPL = \frac{\text{Largo de pene de hembras}}{\text{Largo de pene de machos}} \times 100$$

Para cuantificar los datos se utilizó el programa Microsoft Excel. Con lo datos almacenados se calcularon promedios, error y desviación estándar. Se compararon las variables como tamaño y peso, entre otras, a través de una prueba de "T" para muestras independientes (con el programa Statistica 6.0), entre el grupo de Coliumo y San Antonio.

Las muestras que se utilizaron en microscopía óptica (5 hembras, 5 machos y 5 hembras con imposex) fueron fijadas en Alfac y sometidas a procedimientos histológicos de rutina, como deshidratación en alcohol a concentraciones crecientes (en autotécnico), inclusión en parafina, para finalmente obtener cortes seriados de 5µm de grosor con micrótomo manual.

Posteriormente, las muestras fueron teñidas con Hematoxilina–Eosina (H-E), con la cual el núcleo adquirió un color azul intenso y prácticamente todas las estructuras citoplasmáticas y sustancias intercelulares se tiñeron de color rosado; con esto se pudo

realizar una descripción general del sistema reproductivo de *N. gayii* y sus alteraciones. Se obtuvieron fotografías para ilustrar la descripción histológica, con una máquina fotográfica NIKON COOLPIX, MDC LENS 4500, perteneciente al Departamento de Morfología Experimental de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

Las observaciones con microscopía electrónica de barrido se realizaron con machos y hembras sanas y afectadas, que se fijaron por 24-48 hrs en glutaraldehído al 3% en tampón fosfato, después se lavaron por otras 24-48 hrs en tampón y a continuación se deshidrataron en acetona a concentraciones crecientes, se realizó secado en punto crítico y sombreado en oro para su posterior observación en el microscopio electrónico de barrido TESLA BS 343 del Programa CIMAT, del laboratorio de Biología del Departamento de Ciencias Biológicas. El resto de individuos quedó a disposición del Proyecto CSMAR 02/3-2.

Los datos de concentración de TBT y de Estaño (Sn) para la zona de San Antonio, fueron tomados de las investigaciones de Huaquín *et al.*, (2004) y de datos aportados al proyecto por el Centro Nacional del Medio Ambiente (CENMA) Universidad de Chile.

RESULTADOS.

A) Datos registrados.

Observaciones generales.

Comparando ambas muestras como grupo completo, se observó entre sí una visible diferencia en cuanto al tamaño o longitud total medida (Figura 5).



FIGURA 5. *N. gayii*, colectados en Coliumo (A) y en San Antonio (B).

Recuento de machos y hembras.

En San Antonio, se encontró 60 machos y 37 hembras, ($p \leq 0,02$) y todas las hembras presentaron un notorio pene, conducto deferente y cierto grado de plegamiento del oviducto. En Coliumo se registró una leve diferencia, 85 hembras y 73 machos, en los cuales, no existió una diferencia significativa ($p \leq 0,34$). En este sitio las hembras no presentaron características masculinas.

En la figura 6a y b, se indica la proporción sexual expresada en porcentaje en ambas localidades.

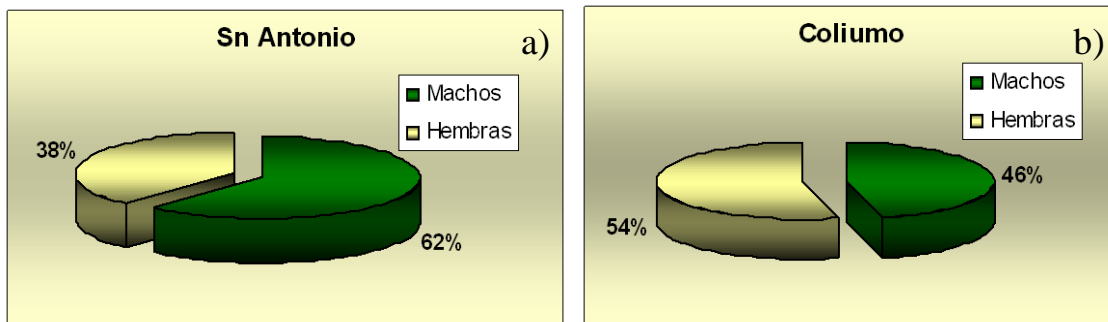


FIGURA 6. Proporción hembra-macho encontradas en muestras de *N. gayii* en a) San Antonio y b) Coliumo.

Morfometría.

I) Longitud: los resultados obtenidos de la longitud total (desde el ápice hasta la apertura de la concha) de los caracoles, en distintas condiciones fueron los siguientes:

- Longitud promedio según localidad.

La longitud de los individuos de San Antonio fue 8,47mm y los de Coliumo 12,55mm, siendo el primer valor significativamente menor que el segundo ($p \leq 0,01$) (Figura 7a).

- Longitud promedio según estación.

En ambas localidades muestreadas, se observó una mayor longitud en primavera que en otoño ($p \leq 0,01$) (ver Figura 7b).

- Longitud promedio según localidad-estación.

La longitud de los ejemplares de Coliumo fueron mayores que los de San Antonio, tanto en primavera como en otoño ($p \leq 0,02$), como se ve en la Figura 7c.

- Longitud promedio según sexo.

En general, las hembras fueron más grandes que los machos recolectados, no así las hembras con imposex, que fueron de menor tamaño que machos ($p \leq 0,01$) (Figura 7d).

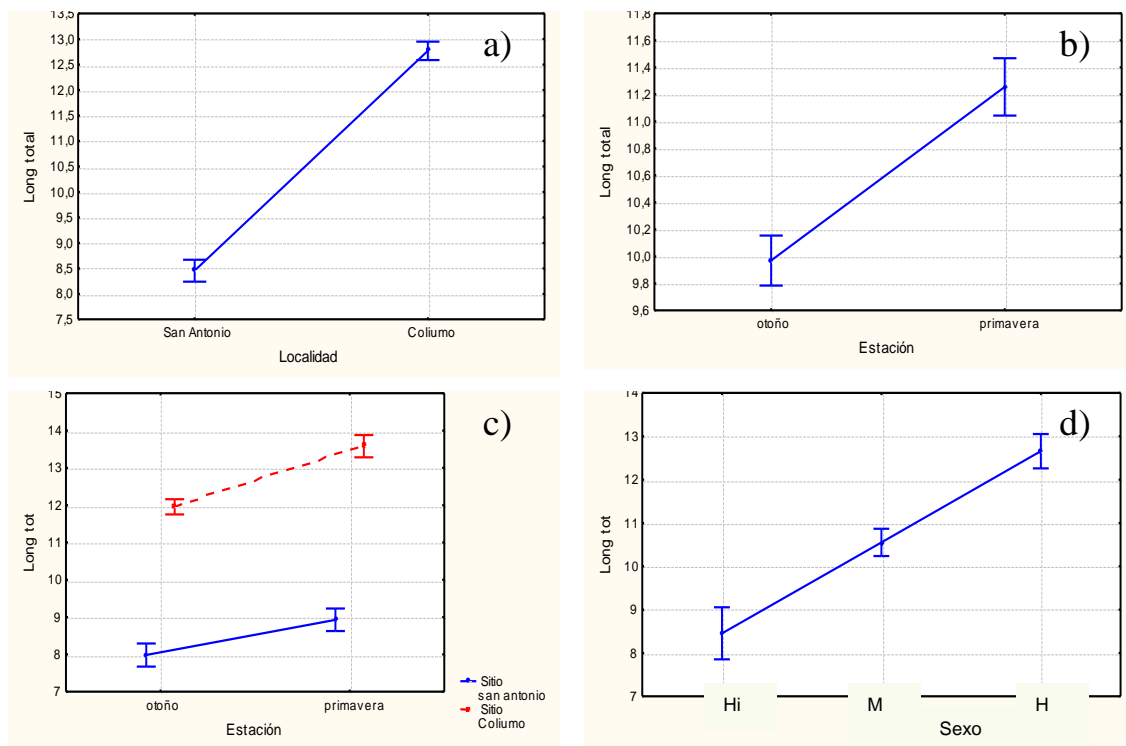


FIGURA 7. a) Longitud promedio según la localidad; b) Longitud prom. según estación; c) Longitud prom. según localidad y estación; d) Longitud prom. según sexo, donde hembra con imposex (Hi), macho (M) y hembra normal (H) (medidas en mm).

II) Peso: al analizar los resultados del peso total (que incluye la concha y las partes blandas del caracol) en distintas circunstancias, se observó los siguiente:

- Peso promedio según localidad (ver gráfico en Figura 8a).

El peso promedio de los ejemplares en San Antonio (0,13 g), fue menor que los obtenidos en Coliumo, cuyo promedio fue de 0,42 g, siendo la diferencia altamente significativa ($p \leq 0,01$).

- Peso promedio según estación (Figura 8b).

En ambas localidades muestreadas, el peso promedio fue mayor en primavera (0,34 g), que en otoño (0,21 g), que resultó ser significativamente diferente ($p \leq 0,01$).

- Peso promedio según localidad y estación (Figura 8c).

En ambos sitios el peso aumentó en primavera, pero el aumento más marcado ocurrió en Coliumo, diferencias que fueron significativas ($p \leq 0,01$).

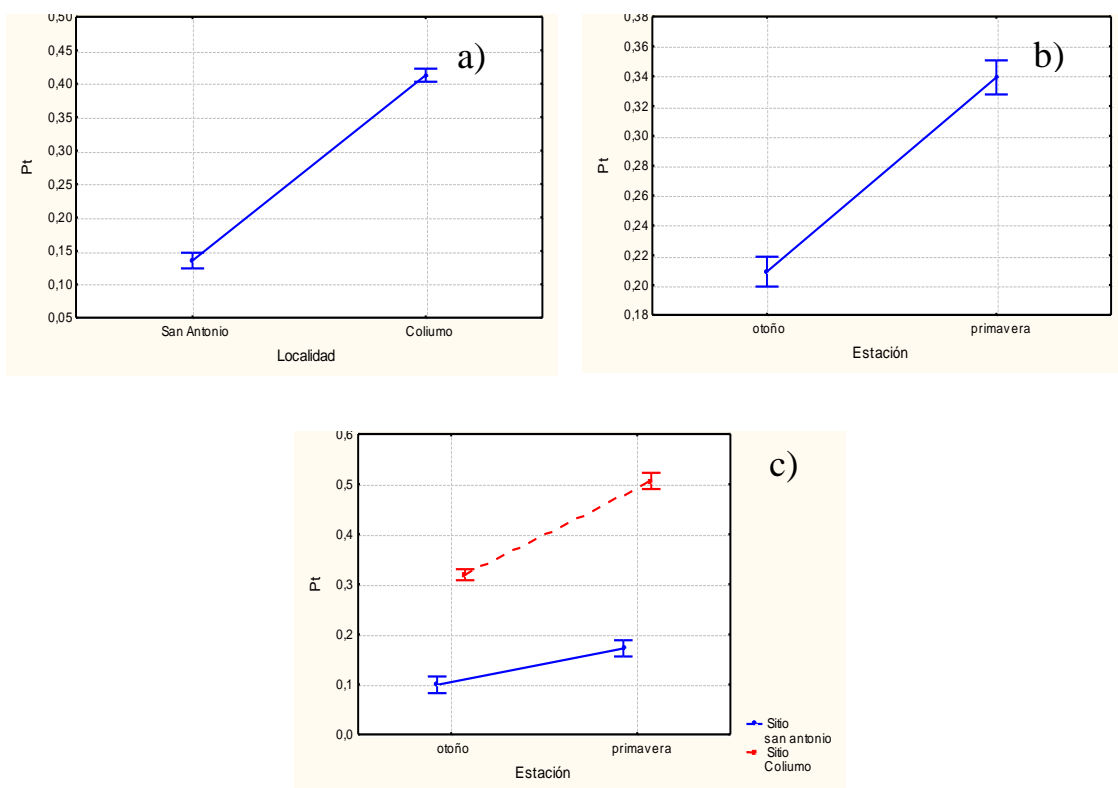


FIGURA 8. a) Peso promedio según la localidad; b) Peso prom. según estación; c) Peso prom. según localidad y estación (medidas en mm).

III) Longitud peneana: los resultados obtenidos de la longitud del pene y su relación con la localidad y estación, fueron los siguientes:

- Longitud de pene (l_p) corregido por la longitud total (l_t) por localidad (ver Figura 9a).

Este índice fue mayor en los machos de San Antonio que en los de Coliumo 0,51 versus 0,44 ($p \leq 0,01$).

- l_p / l_t por estación (Figura 9b).

El índice fue mayor en primavera que en otoño y significativamente diferente ($p \leq 0,01$).

- l_p / l_t por localidad y estación (Figura 9c).

En ambas localidades el índice fue mayor en primavera que en otoño, siendo la subida más abrupta la de los machos de Coliumo ($p \leq 0,01$).

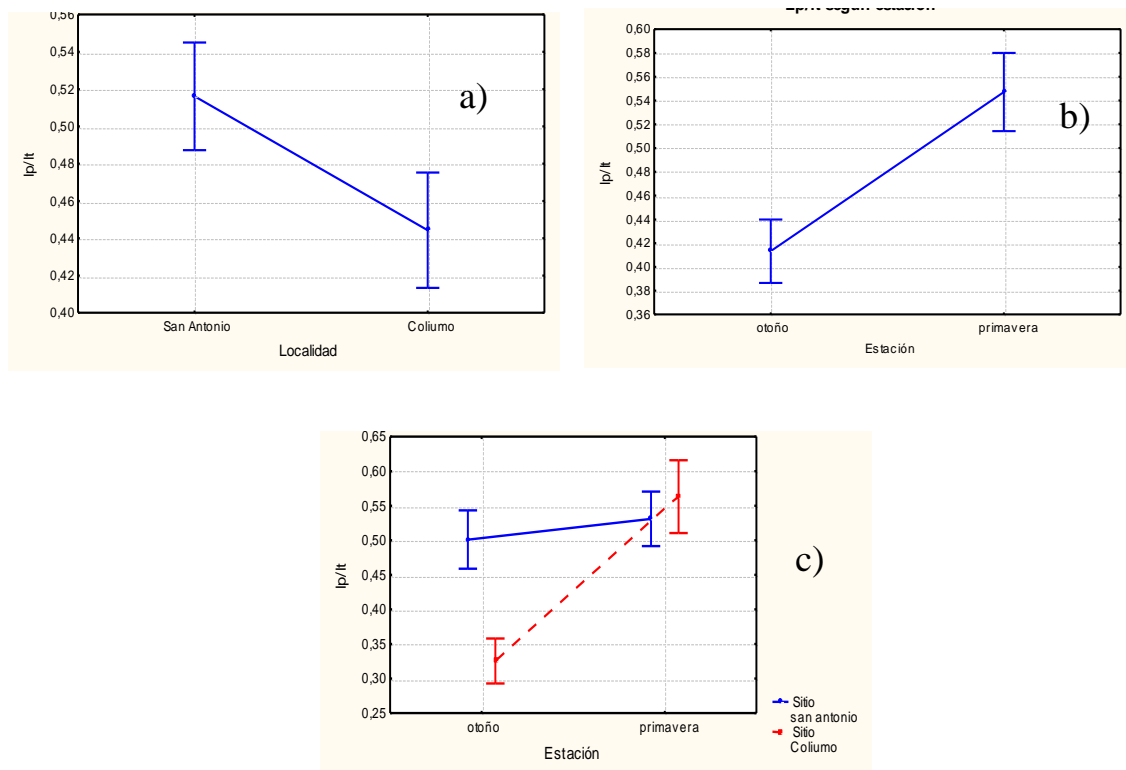


FIGURA 9. a) l_p / l_t según localidad; b) l_p / l_t según estación; c) l_p / l_t según localidad y estación.

- Índice de Longitud Relativa del pene (RPL) de Oehlmann *et al.*, (1991).

Este índice fue de 78,16% y se limitó a las hembras de la V Región por ser las únicas con presencia de pene.

A continuación se indica una síntesis de los datos registrados (Tabla 1).

TABLA 1. Resumen de datos según localidad.

Se señala número de muestras (N), cantidad de machos/hembras (♂/♀), longitud de la concha (L), longitud de pene (Lp), porcentaje de imposex (% i) e índice de longitud relativa de pene (% RPLI).

Localidad	N	♂/♀	L	Lp	% i	% RPLI
Sn Antonio	97	60 / 37	8,47±0,12	4,35 ± 0,13 ♂	100	78,16
				3,40 ± 0,18 ♀		
Coliumo	158	73 / 85	12,55±0,10	5,02 ± 0,27 ♂	0	----

B) Descripción de la anatomía reproductiva de machos y hembras de *N.*

gayii.

Descripción general.

N.gayii, es un caracol relativamente pequeño, cuya longitud total puede llegar a los 15,9 mm, posee una concha de color café con estrías blancas. La abertura de la concha es ocluida por el opérculo, estructura quitinosa ubicada en la parte posterior del pie. El manto, característica propia de todos los moluscos, cubre la pared dorsal del cuerpo, en los bordes se pliega o invagina formando un bolsillo o receso, que conforma la conocida cavidad del manto. El sifón, estructura acanalada, larga y extensible, se localiza en la parte anterior, izquierda y dorsal del borde del manto.

En algunos se encontró la probóscide extendida, proyectando la rádula con sus dientes cartilagosos.

Esta especie posee una sola branquia o ctenidio que se localiza al lado izquierdo en el techo de la cavidad del manto. En la región más alta del ctenidio se encuentra el área cardiaca que está conectada a la branquia.

El corazón, en la cavidad pericardial, tiene una aurícula y un ventrículo, el que por su pequeño tamaño, sólo se ve en algunos ejemplares. Entre la branquia y el sifón se ubica el osfradio bipectinado similar a una branquia aunque ésta es monopectinada (Figura 10).

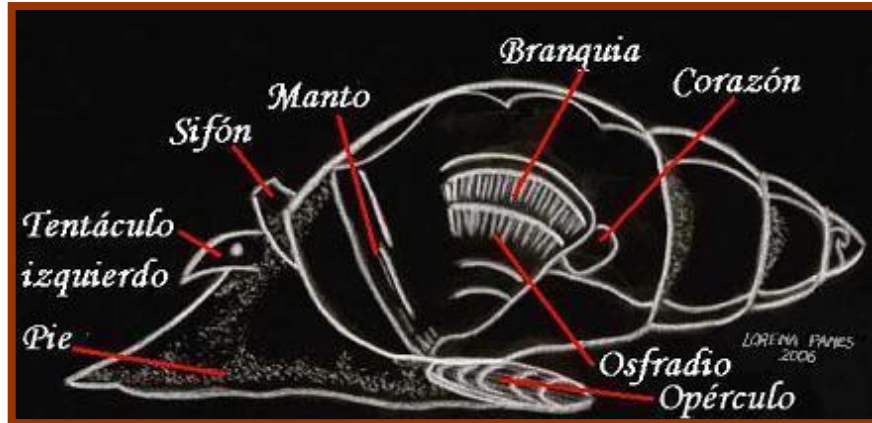


FIGURA 10. Esquema general de una hembra de *N. gayii* con las estructuras observadas tras retirarle su concha (Dibujo original Lorena Panes).

Sistema reproductor.

Como la mayoría de los gastrópodos Prosobranquios, *Nassarius* es gonocórico, es una especie de sexos separados (dioica), con fecundación interna. La mayor parte del sistema reproductivo es visible, después de extraída su concha, e incluso, se puede observar antes de abrir la cavidad del cuerpo.

El macho se puede reconocer por su alargado pene con punta de bisel, que se ubica sobre el tentáculo derecho, bajo el reborde del manto y la concha. La hembra normal, no posee pene y presenta una glándula de la cápsula blanca amarillenta muy protuberante, al lado derecho de la masa visceral y de la cavidad del manto, característica por la cual se pueden reconocer.

En ambos sexos, la gónada yace en el ápice de la masa visceral, se ve más amarillenta que la glándula digestiva adyacente, presenta un largo gonoducto al lado derecho del cuerpo conectando los distintos sectores del sistema. Este conducto es regionalmente especializado en ambos sexos y es similar a otros neogastrópodos.

Las observaciones del sistema reproductivo de machos y hembras, se realizaron en especímenes mayores de 6 mm de longitud, considerándose la fase reproductiva y longeva de la población. Puesto que los de menor tamaño carecen de desarrollo completo.

Para efectos descriptivos, cuando se mencione el área cefálica se está refiriendo hacia la apertura de la concha o por donde se proyecta el cuerpo del caracol al exterior; la zona caudal, es la sección visualmente más espiralada; el área dorsal implica el techo y la ventral, la zona de apoyo del cuerpo cuando el caracol está en movimiento (Figura 11).

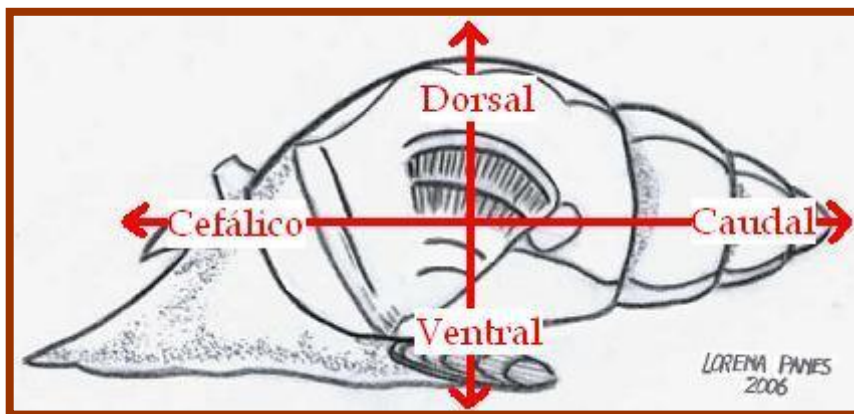


FIGURA 11. Esquema espacial para *N. gayii* (Dibujo original Lorena Panes).

- Aparato reproductor macho.

Se compone del testículo en cuyos túbulos se producen los espermatozoides; un largo espermioducto que atraviesa la glándula prostática, continuándose en el vaso deferente, que se comunica y termina en el pene (Figura 12 y 13).



FIGURA 12. Esquema de un macho de *N. gayii*, posición espacial de Testículo, Conducto deferente y Pene (Dibujo original Lorena Panes).

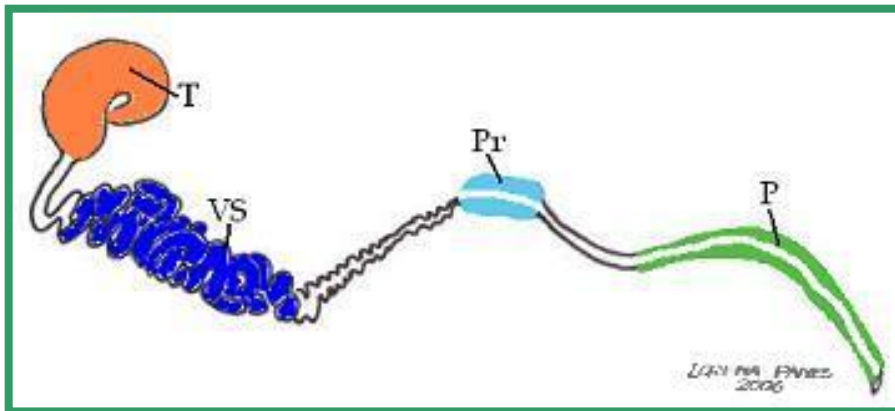


FIGURA 13. Esquema del aparato reproductivo de un macho de *N. gayii*, donde P, Pene; Pr, próstata; VS, vesícula seminal y T, testículo (Dibujo original Lorena Panes).

Testículo: está situado en la parte posterior de la región más aguzada de la masa visceral, detrás de la glándula digestiva; si se observa a la lupa, es de color amarillo oscuro y si se palpa es de consistencia blanda, friable. Toma la misma forma del extremo de la columela, pero ocupa la menor porción de este extremo. Se diferencia macroscópicamente de la glándula digestiva puesto que esta última posee un color más anaranjado-marrón, casi café (Figura 14).

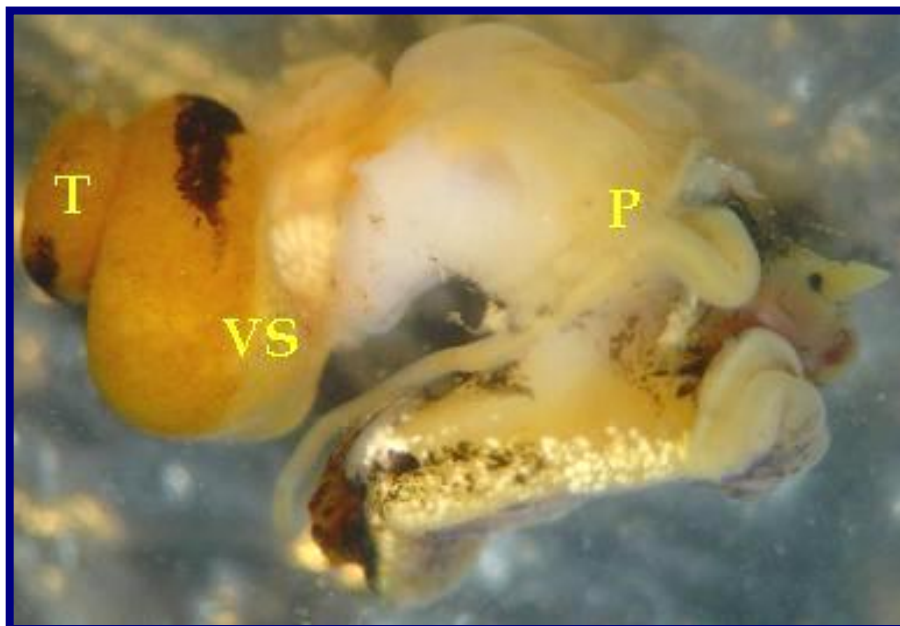


FIGURA 14. Macho de *N. gayii*, obtenido a la lupa donde T, testículo; VS, vesícula seminal y P, pene (10x)

El testículo está situado sobre la mitad de la glándula digestiva de la masa visceral. Los túbulos seminíferos que lo conforman, están compuestos por un epitelio germinal unicelular separado por tejido conectivo. Los cortes histológicos de la gónada en época reproductiva, muestran una espermatogénesis en pleno proceso, puesto que existen células que se están separando desde el epitelio germinal para entrar al lumen de los túbulos (Figura 15 A y B).

En la zona periférica puede apreciarse una delgada capa fibrosa, se observan varios túbulos seminíferos y diferentes tipos celulares de la línea espermatogénica. Las células con núcleo redondeado, que se apoyan directamente sobre la membrana basal, son espermatogonias; inmediatamente por dentro se encuentran espermatocitos primarios, con un núcleo igualmente esférico.

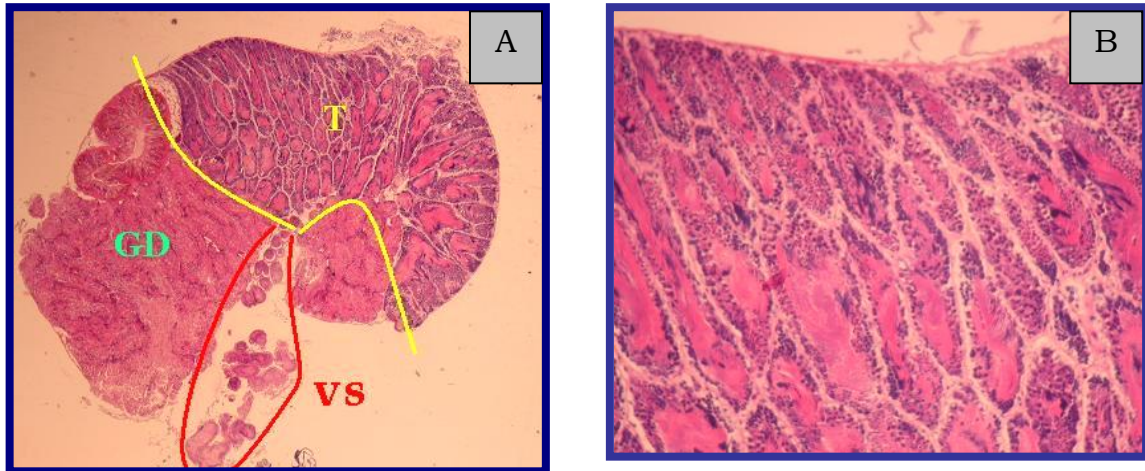


FIGURA 15. Histología del testículo del macho de *N. gayii*, (Coliumo). **A)** Se observa la glándula digestiva (GD), tejido testicular (T) y la vesícula seminal (VS) (H-E 4x) **B)** Tejido testicular (H-E 20x).

Las espermátidas de forma más ovalada, aparecen fundamentalmente en la zona próxima a la luz del túbulo. Las espermátidas están cercanas al estadio de espermatozoides, diferenciándose por la mayor longitud y el color más rosado de las colas de estos últimos (Figura 16).

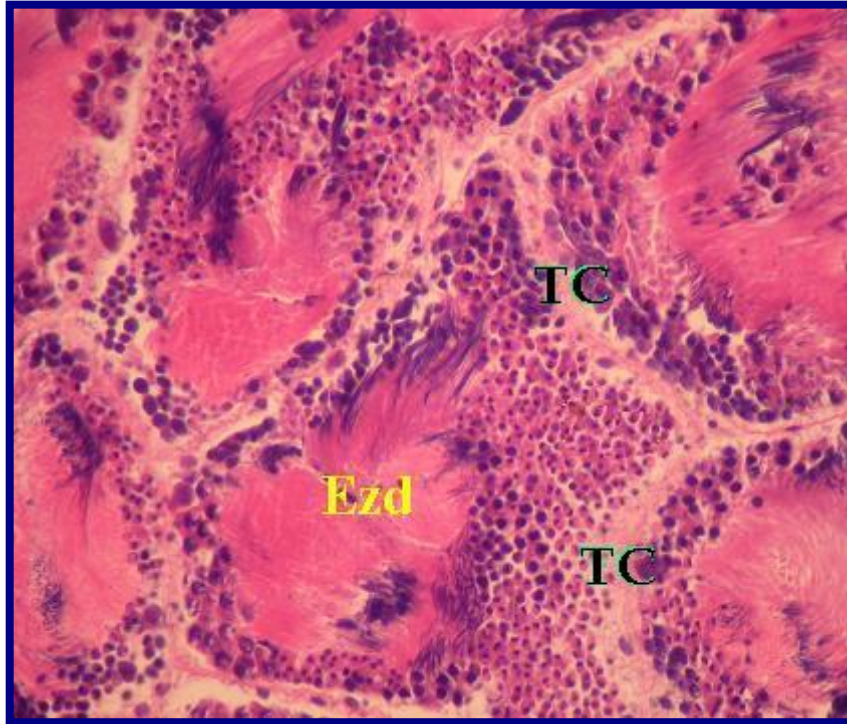


FIGURA 16. Histología del testículo del macho de *N. gayii*, (Coliumo). El corte muestra la espermatogénesis en pleno proceso, se señalan los espermatozoides (Ezd) y tejido conectivo (TC) (H-E 40x).

Espermioducto: en general muy delgado y blanquecino, emerge desde testículo por su "hilio", en el contorno izquierdo inferior de la gónada; se dirige hacia ventral y hacia cefálico, contorneando la curvatura interna de la masa visceral. Tal como el oviducto, a nivel del reborde del riñón, el espermi ducto pasa al falso piso de la cavidad del manto, la que recorre de caudal a cefálico y ligeramente a la derecha.

La parte proximal del espermi ducto, posee mayor diámetro y está fuertemente enrollado, al corte se le puede observar con un epitelio celular cúbico no ciliado muy delgado, distendido y repleto de espermatozoides orientados con sus cabezas hacia la pared del túbulo y sus colas hacia el lumen (Figura 17 A y B).

En su recorrido por el falso piso de la cavidad paleal, el espermi ducto viaja a la derecha del recto y adosado a él; para posteriormente atravesar la glándula prostática.

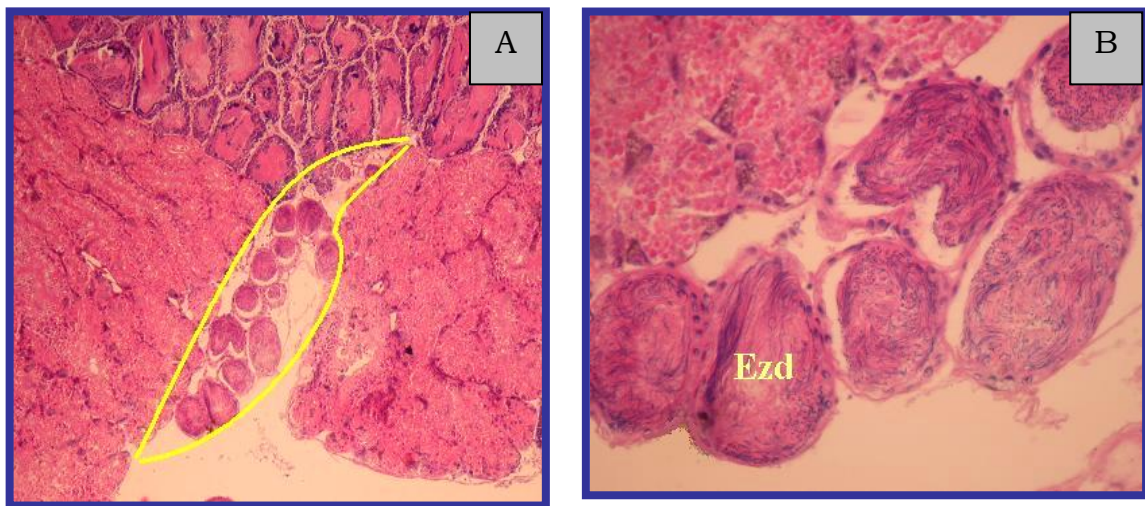


FIGURA 17. Corte histológico del espermi ducto del macho de *N. gayii* (Coliumo). **A)** Demarcado con color amarillo. En esta zona el espermi ducto se enrolla muchas veces sobre sí mismo, constituyendo la vesícula seminal. (H-E 10x). En **B)** Detalle de la figura A, espermatozoides (Ezd) (H-E 40x).

Glándula prostática: esta glándula es de un color blanquecino, es difícil de observar a la lupa puesto que es poco consistente, más pequeña que las glándulas del tracto genital femenino, midiendo aproximadamente 1 mm de longitud y 0,4 mm de ancho.

La próstata es un adenómero alveolar, y cada célula de este adenómero posee núcleos centrales, que se tiñen de color rosado, contienen una secreción mucosa. A través de su longitud la próstata está rodeada por una espesa capa de tejido muscular subepitelial. El epitelio del lumen que atraviesa esta glándula túbulo-alveolar es un epitelio columnar ciliado, su altura muestra ser un tanto variable (Figura 18 A y B).

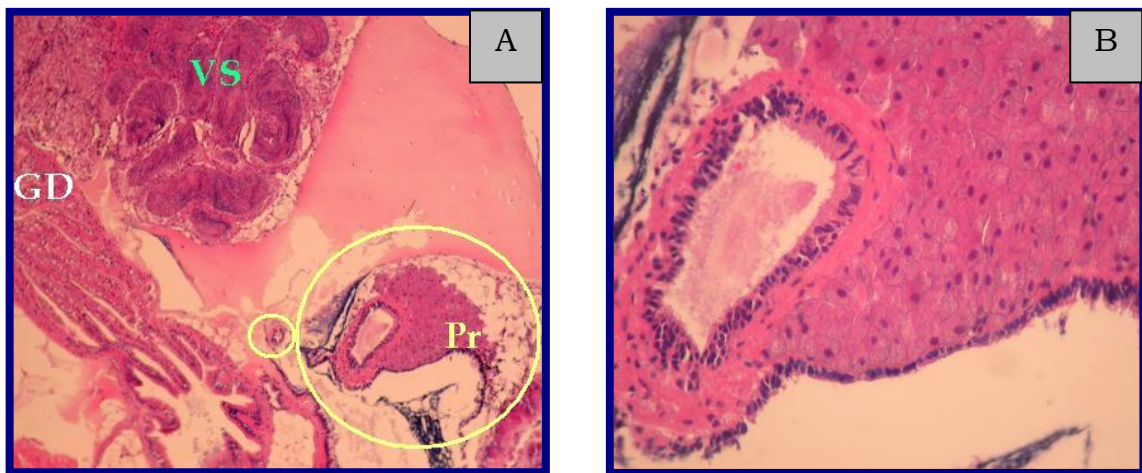


FIGURA 18. Corte histológico de la próstata del macho de *N. gayii*, (Coliumo). En **A)** Hay dos círculos de color amarillo, el más pequeño encierra al espermioducto y el más grande, la próstata (Pr). Se muestra glándula digestiva (GD) y la vesícula seminal (VS) (H-E 10x). **B)** Detalle de la figura A (H-E 40x).

Conducto deferente: el conducto deferente al emerger desde la glándula prostática, se le visualiza en una posición subsuperficial, presentándose como un conducto recto y se observa prácticamente del mismo diámetro que lo precede. Presenta un epitelio de células columnares ciliadas, rodeado de una notoria pared muscular circular. Luego se flecta para pasar al área intrapeneana, recorriéndolo por toda su longitud para abrirse en su extremo distal (Figura 19 A y B).

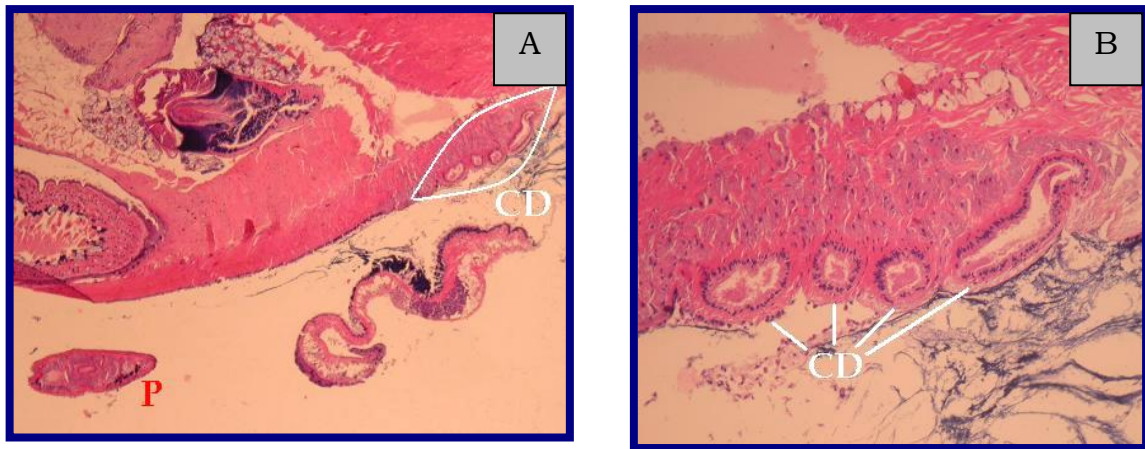
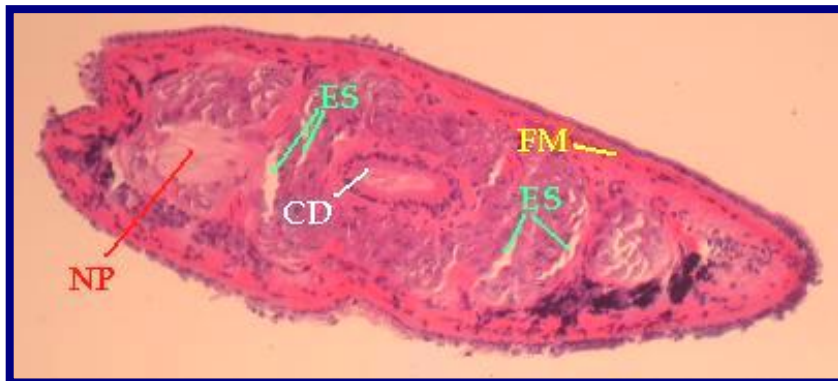


FIGURA 19. Histología del conducto deferente del macho de *N. gayii*, (Coliumo). **A)** conducto deferente (CD) en una posición subsuperficial y se muestra la porción intrapeneana (P) (H-E 4x) **B)** Detalle de la figura A (H-E 20x).

Pene: el pene es aplastado lateralmente. Se muestra alargado, “transparente” y su conducto generalmente puede ser visto pasando a través de éste. Las características histológicas de este conducto son similares a las de la próstata, también posee un epitelio columnar ciliado. El pene posee un epitelio simple de células cúbicas, al cual subyace una gruesa capa de musculatura lisa circular y luego una longitudinal. Se visualizan espacios sanguíneos, rodeados por tejido conectivo, que corren lateralmente a lo largo del pene. En la porción central, el conducto está rodeado por una gruesa cubierta muscular circular, transversal y a un costado se observa el nervio peneano (Figura 20).

FIGURA 20. Histología del pene del macho de *N. gayii* (Coliumo). Se observan fibras



musculares (FM), el conducto deferente intrapeneano (CD), espacios sanguíneos (ES) y el nervio peneano (NP) (H-E 20x).

En las figuras 21 A, B y C; se muestran fotografías de microscopía electrónica de barrido de machos de Coliumo, donde se puede distinguir tentáculo derecho, pene, manto y testículo.

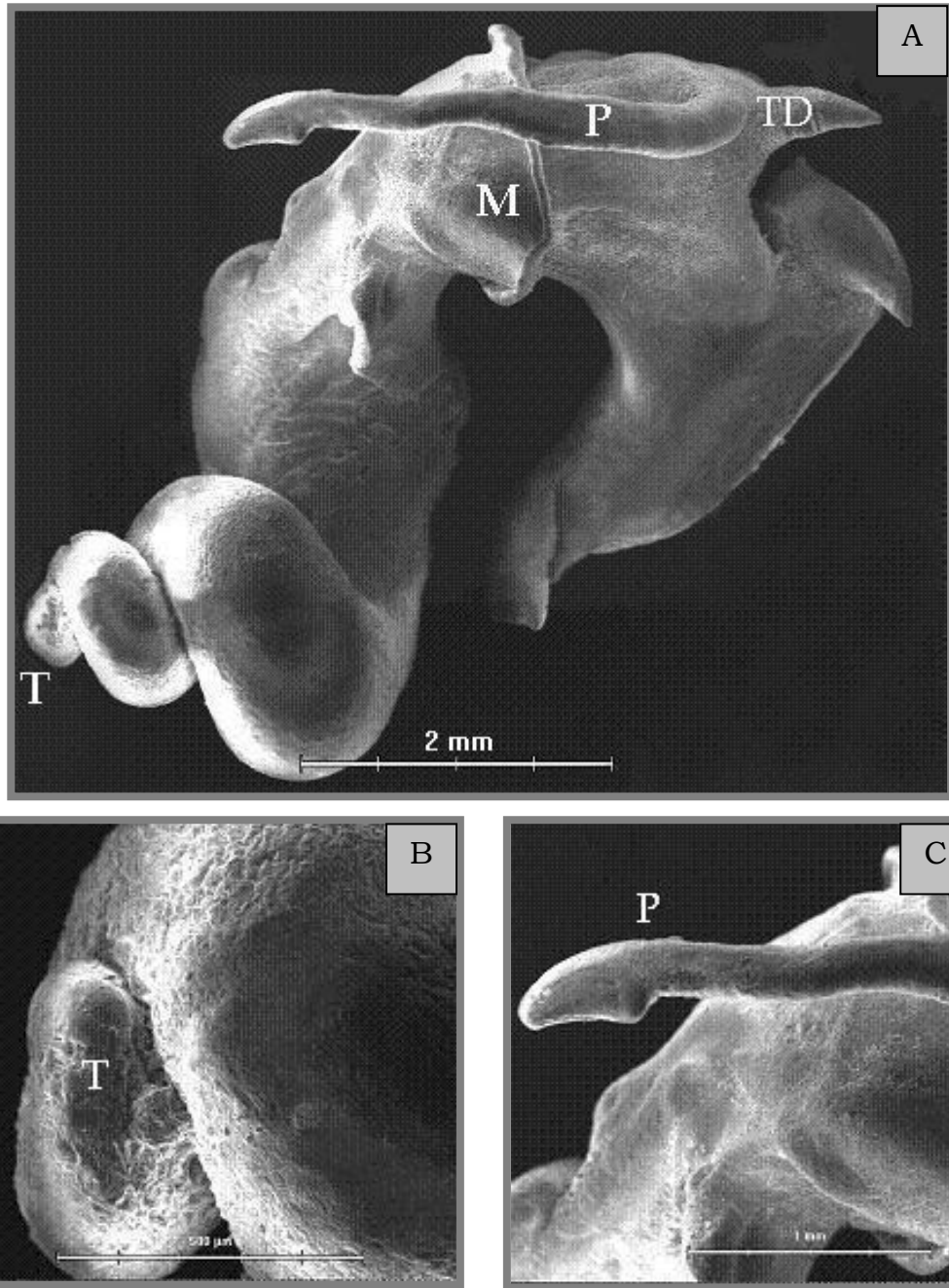


FIGURA 21. *N. gayii*, Microscopía electrónica de barrido de machos. **A)** Ejemplar completo, donde M, borde del manto; P, pene; T, testículo y TD, tentáculo derecho. **B)** Acercamiento a testículo y **C)** Porción distal del pene.

- Aparato reproductor hembra.

La hembra consta de un ovario que produce los óvulos y de una vía de transporte que consta de un oviducto que atraviesa la glándula de la albúmina, glándula de la cápsula y termina en el poro genital (Figura 22 y 23).



FIGURA 22. Esquema de una hembra de *N. gayii* donde se muestra la posición del Ovario, Glándula de la albúmina y de la cápsula (Dibujo original Lorena Panes).

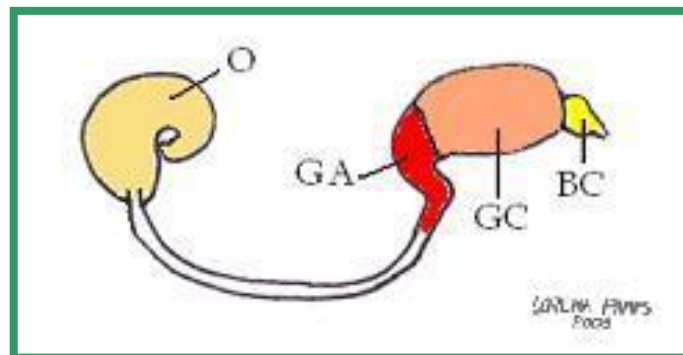


FIGURA 23. Esquema del aparato reproductivo de una hembra de *N. gayii* en donde BC, bursa copuladora; GC, glándula de la cápsula; GA, glándula de la albúmina y O, ovario. (Dibujo original Lorena Panes).

Ovario: tiene similar color, misma forma externa y posición del testículo. La consistencia es también homogénea blanda, friable. Si se observa a la lupa, es de color amarillo cremoso, homogéneo y si se palpa es de consistencia blanda, friable. Toma la misma forma del extremo de la columela, pero ocupa la menor porción de este extremo. Se diferencia macroscópicamente de la glándula digestiva puesto que esta última posee un color más anaranjado-marrón, casi café (Figura 24).

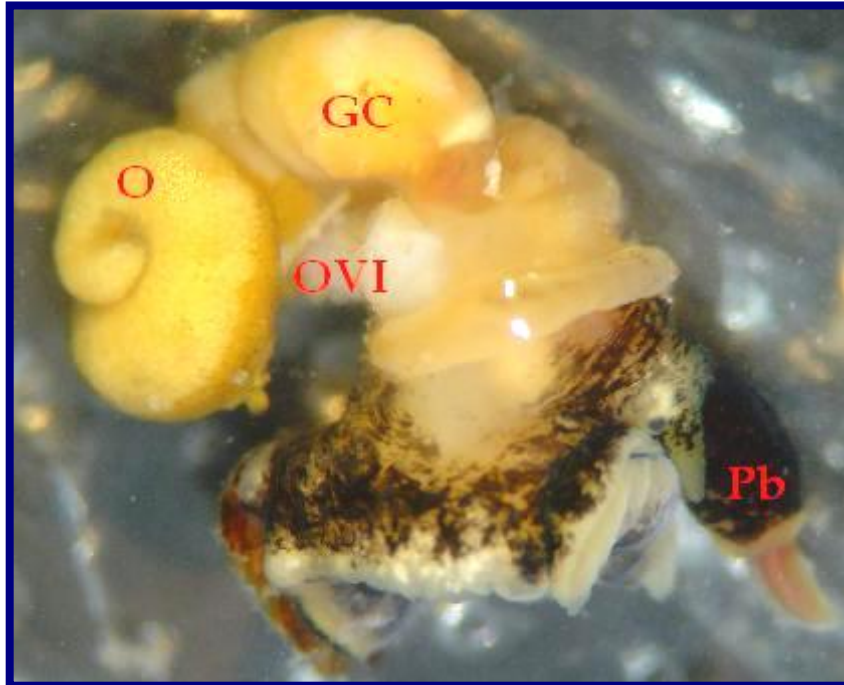


FIGURA 24. Fotografía de una hembra normal de *N. gayii*. Se observa ovario (O), glándula de la cápsula (GC), oviducto (OVI) y proboscis (Pb) (10x).

Microscópicamente, el ovario presenta diferentes afinidades tintoriales en relación con la glándula digestiva, éste posee una fina cubierta externa (Figura 25 A y B).

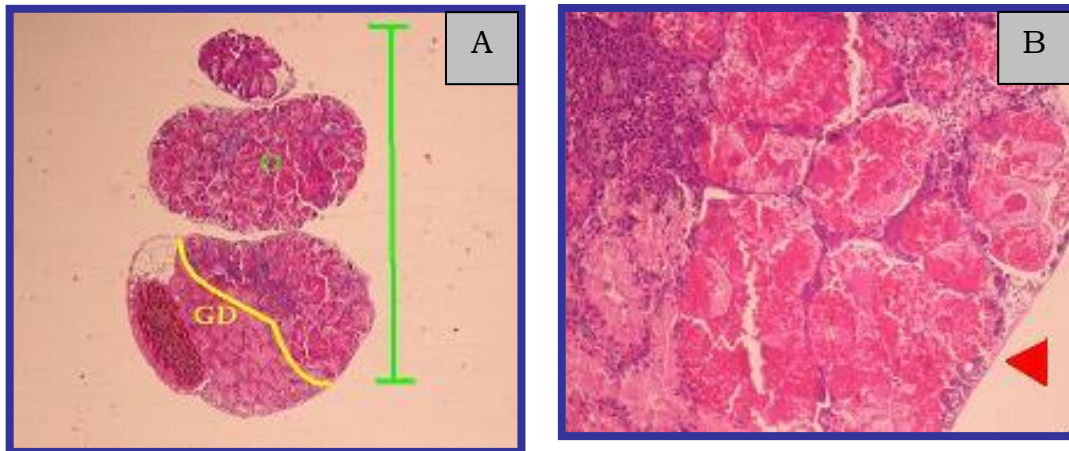


FIGURA 25. Histología del ovario de la hembra de *N. gayii* (Coliumo). **A)** Se observa la glándula digestiva (GD) de un rosado más pálido que el tejido ovárico (O) (H-E 4x) y **B)** detalle de la figura A, la flecha roja señala la fina cubierta externa del ovario (H-E 20x).

Desde el ovario se prolongan al interior septos de tejido conjuntivo que presentan células con epitelio plano, formando parte de la línea germinal (ovogonias y ovocitos). En todo el estroma se observa una gran cantidad de ovocitos en diferentes estados de desarrollo, los más avanzados en su interior presentan plaquetas vitelinas esféricas, que se tiñen de color rojo al reaccionar con la eosina, los ovocitos más maduros presentan plaquetas de mayor tamaño (Figura 26).

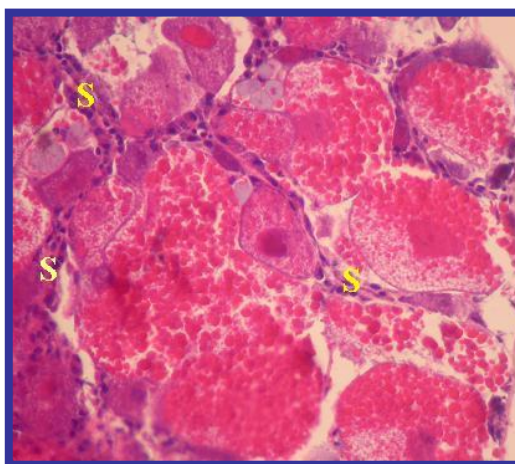


FIGURA 26. Histología del ovario de la hembra de *N. gayii* (Coliumo). Hacia el interior de éste, se distinguen septos (S) de tejido conjuntivo. El interior de los ovocitos maduros contiene plaquetas vitelinas que se tiñen de color rojo (H-E 40x).

Oviducto: a la lupa es posible observar que el oviducto emerge por el costado inferior izquierdo de la gónada. En su salida de la gónada, este cordón es muy estrecho, blanquecino y de paredes delgadas. Contornea, sin enrollarse, la curvatura interna cóncava, por el lado derecho de la masa visceral. En los cortes histológicos, se puede ver su epitelio celular simple cúbico ciliado (Figura 27).

Posteriormente se pone en contacto con la superficie ventral de la glándula digestiva y riñón. A este nivel, pasa a la cavidad del manto, recorre el falso piso hacia anterior, al lado derecho del recto (de color naranja) en estrecho contacto con él, abriéndose a su derecha en el poro genital. La porción del oviducto que pasa al falso piso de la cavidad del manto es llamada oviducto paleal.

En su recorrido paleal, se observan algunas diferenciaciones: una proximal que es la glándula de la albúmina, y otra glándula más distal, que corresponde a la llamada glándula de la cápsula. Estas serán descritas a continuación en el mismo orden.

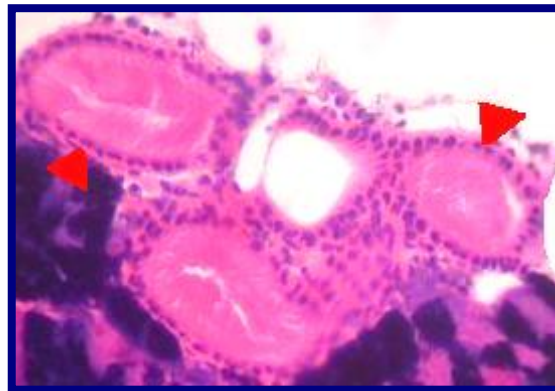


FIGURA 27. Corte histológico del oviducto de la hembra de *N. gayii* (Coliumo). Las flechas rojas señalan el epitelio celular simple cúbico ciliado del oviducto (H-E 20x).

Glándula de la albúmina: es de color blanquecino, con forma de embudo y doblado en su porción más delgada, es de apariencia homogénea y de consistencia friable. Mide alrededor de 0,4 mm. Entre esta glándula y la de la cápsula, se describe la glándula de ingestión, ésta no se distingue macroscópicamente en *N. gayii*, como en otras especies de mayor tamaño.

El oviducto se abre en la glándula de la albúmina, en forma de codo que crece en grosor, continuándose hacia anterior, para entrar a la glándula de la cápsula por ventral.

La glándula de la albúmina y de la cápsula, son prácticamente una sola unidad anatómica, se les puede diferenciar por sus propiedades de tinción, pero ellas están estrechamente en contacto.

Esta glándula posee células glandulares serosas, con un núcleo más periférico, que se tiñen mucho más oscuras que las de la glándula de la cápsula, prácticamente de un color púrpura con la hematoxilina (Figura 28 A).

Glándula de la cápsula: ésta tiene la función de formar la envoltura externa de los huevos. Se ubica en la región anterior del oviducto paleal, por lo tanto, es la estructura anexa más distal de la vía reproductora de estos animales.

Es de forma oblonga, redondeada posteriormente y aguzada en la región anterior. Mide alrededor 2 mm de longitud y 1 mm de ancho, en ejemplares que como largo total tienen alrededor de 12 mm. Es de color blanquecino, su apariencia también es homogénea y tiene mayor consistencia que la glándula de la albúmina.

El extremo posterior de esta glándula puede ser café o puede tener una apariencia transparente, anteriormente la glándula termina en un área glandular rojiza.

La cara dorsal superior de la glándula de la cápsula es convexa y la inferior es cóncava, se apoya en la pared del manto y colinda con el recto.

En la mitad posterior su cuerpo es más traslúcido, contactándose con la glándula de ingestión, pareciendo ser sólo una. Finalmente posee un vértice de dirección anterior y ventral, formado por la unión de las caras superior e inferior, inclinadas ambas hacia abajo.

Al corte, se observan dos lóbulos compactos: superior e izquierdo, e inferior derecho, unidos por una sutura en los bordes internos de la glándula, en donde en su interior se forma un lumen ojival. La secreción en el lumen de la glándula tiene una similar reacción en la tinción. Las células mucoides, son notoriamente teñidas con eosina (Figura 28 B).

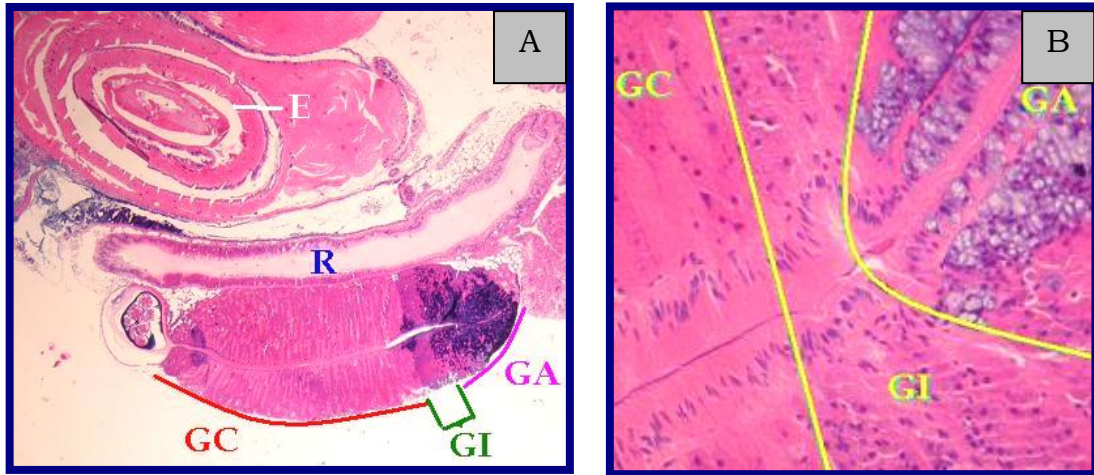


FIGURA 28. Corte histológico de la glándula de la cápsula (GC), de ingestión (GI) y de la albúmina (GA) de la hembra *N. gayii* (Coliumo). **A)** Se indican además recto (R) y esófago (E) (H-E 4x). **B)** Detalle de la figura A (H-E 40x).

En secciones histológicas longitudinales, se observa una cápsula de huevos con la misma apariencia de los ovocitos maduros, ubicados al finalizar el lumen de esta glándula, ellos se ven repletos de plaquetas con vitelo, cada huevo está separado por una capa proteica muy delgada que se tiñe de color de azul oscuro con la hematoxilina. Externa a esta pared oscura, existe cápsula mucoide en formación, de color rosada y de mayor grosor, que los envuelve a todos (Figura 29 A y B).

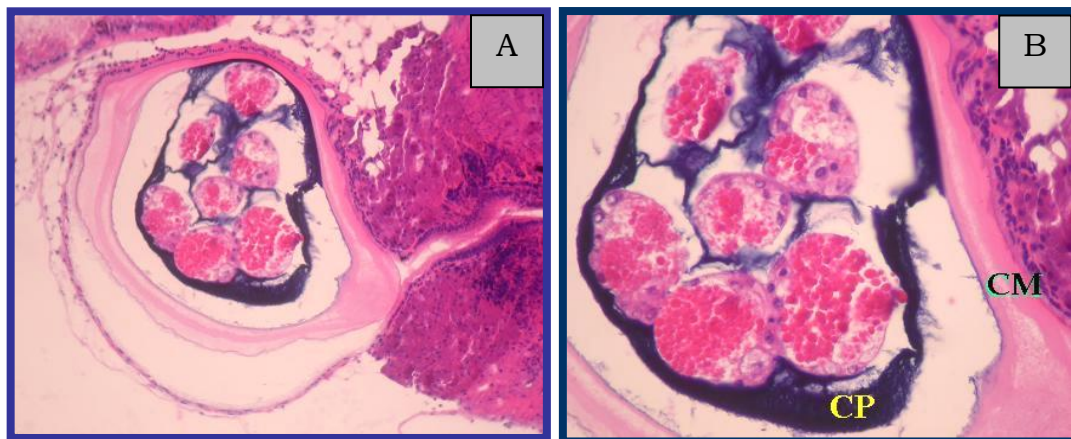


FIGURA 29. Corte histológico cápsula de huevos de la hembra de *N. gayii*, (Coliumo). **A)** (H-E 20x). **B)** Detalle de la figura donde se indica la cubierta mucoide (CM) y la cubierta proteica (CP) (H-E 40x).

Anteriormente el canal ventral de la glándula de la cápsula conduce hacia la bolsa copuladora, que se observa plegada, posee un epitelio columnar ciliado y está cubierta externamente por el manto. Se ven células caliciformes diseminadas entre las células ciliadas y una gruesa cubierta muscular de fibra circular, bajo el epitelio (Figura 30 A y B). En el mismo corte y también muy plegada, es posible evidenciar la presencia de la apertura genital, con una cubierta muscular más delgada a diferencia de la bursa.

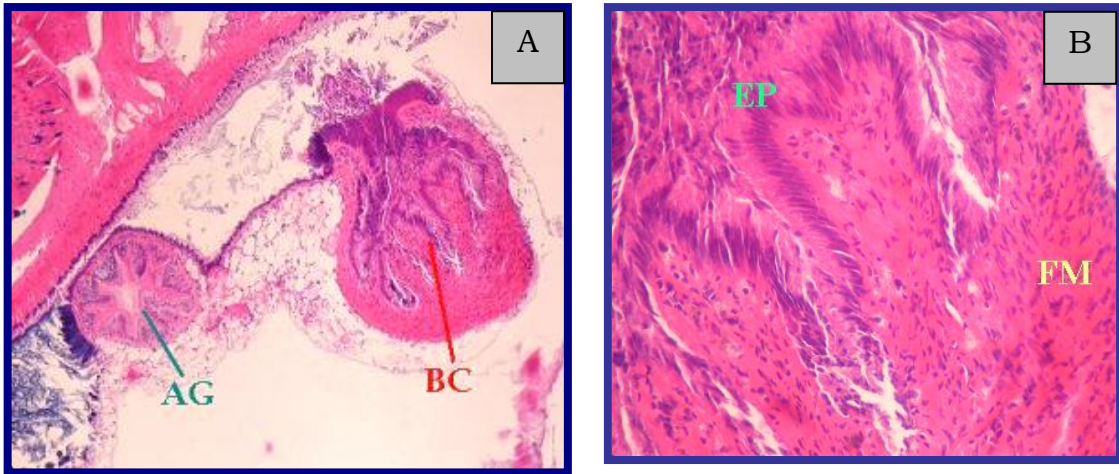


FIGURA 30. Histología de la bursa copuladora de la hembra de *N. gayii* (Coliumo). **A)** Bursa copuladora (BC) y la apertura genital (AG) (H-E 10x). **B)** La bursa copuladora posee un epitelio columnar ciliado (EP) y una gruesa cubierta muscular (FM) (H-E 40x).

Glándula pedal ventral: ubicada en la zona anterior del pie, entre la superficie ventral de éste y el órgano perforador accesorio. Así como se ha descrito en otros neogastrópodos, moldearía y produciría una secreción que endurece la pared de la cápsula de los huevos (Fretter, 1962).

Esta glándula anexa, se puede decir que completa el sistema genital femenino. Está compuesta por un epitelio columnar ciliado con núcleos basales y presenta células glandulares subepiteliales, notoriamente teñidas con un color púrpura. No posee glándulas intraepiteliales como sucede con la bolsa copuladora (Figura 31 A y B).

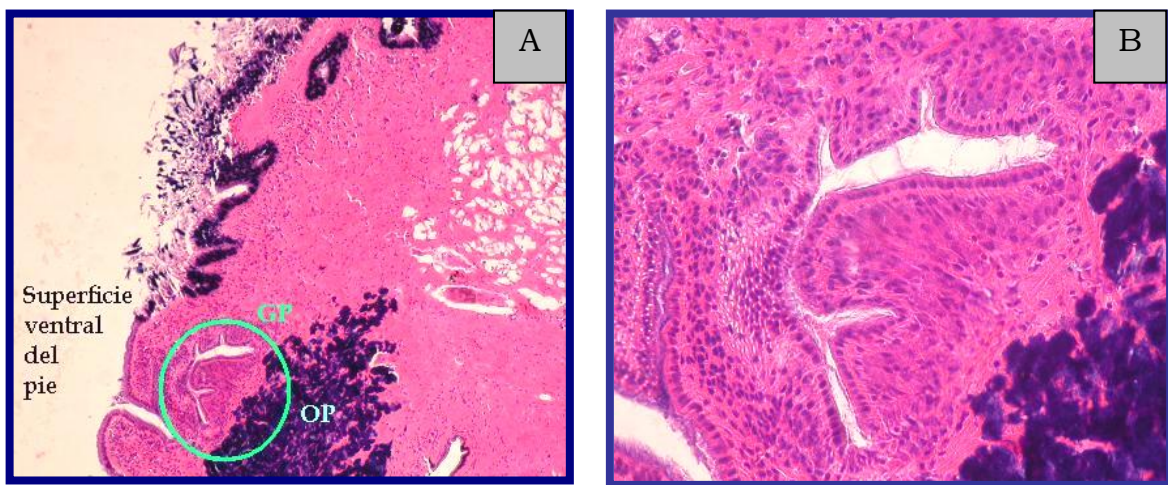


FIGURA 31. Histología de la glándula pedal ventral (GP) de la hembra de *N. gayii* de Coliumo. **A)** Al lado de esta glándula está el órgano perforador accesorio (OP) (H-E 10x). **B)** Detalle de la figura (H-E 40x).

En las figuras 32 A, B, C y D, se muestran fotografías de microscopía electrónica de barrido de hembras de *Coliumo*, donde se pueden distinguir tentáculos, manto, glándula de la cápsula entre otras estructuras.

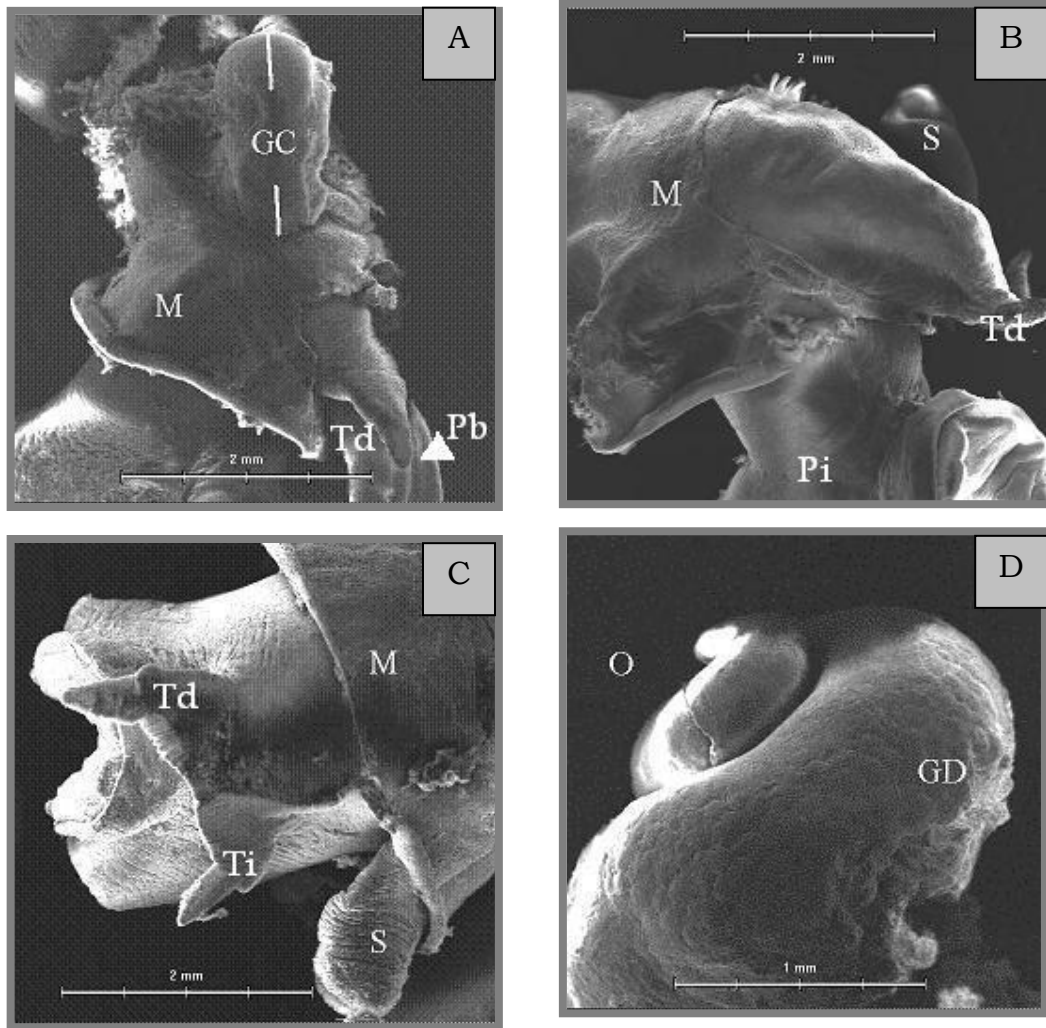


FIGURA 32. *N. gayii*, (*Coliumo*). Microscopía electrónica de barrido de tres hembras normales,

A) Área Cefálica donde se muestra tentáculo derecho (Td), proboscis (Pb), manto (M) recortado sobre el tentáculo y glándula de la cápsula (GC). **B)** Se muestra pie (Pi), tentáculo derecho (Td) y la cara izquierda del sifón (S). **C)** Área cefálica observada por dorsal mostrando ambos tentáculos, derecho e izquierdo (Td y Ti), el sifón (S) y el manto (M).

D) Región más espiralada del cuerpo de esta especie, donde se aprecia ovario (O), y glándula digestiva (GD).

C) Alteraciones del sistema reproductivo.

Alteraciones macroscópicas.

Las muestras de San Antonio se caracterizaron porque al inicio de las observaciones, todos los ejemplares presentaban un pene, lo que indicaba, *a priori*, que todos eran machos.

Sin embargo, una vez retirada la concha se pudo evidenciar que eran hembras, por poseer glándula de la cápsula y de la albúmina. Además se repetía en ellas la característica de un oviducto enrollado (Figura 33 y 34).

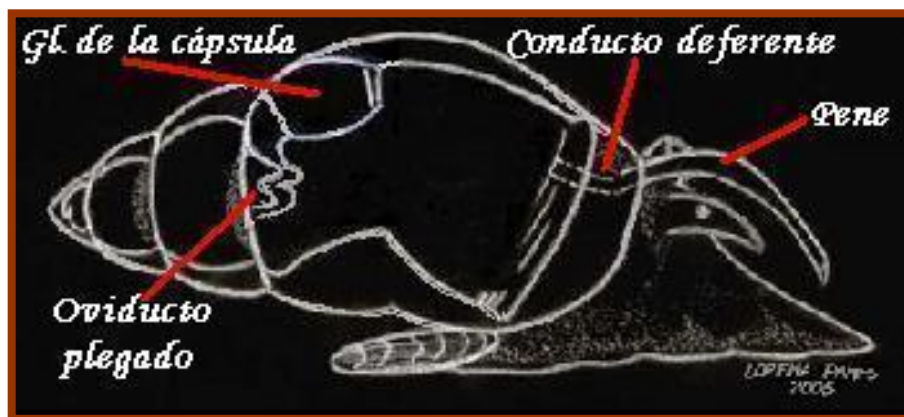


FIGURA 33. Esquema de una hembra con imposex de *N. gayii* donde se muestra Glándula de la Cápsula, Pene, Conducto deferente y el oviducto plegado (Dibujo original Lorena Panes).

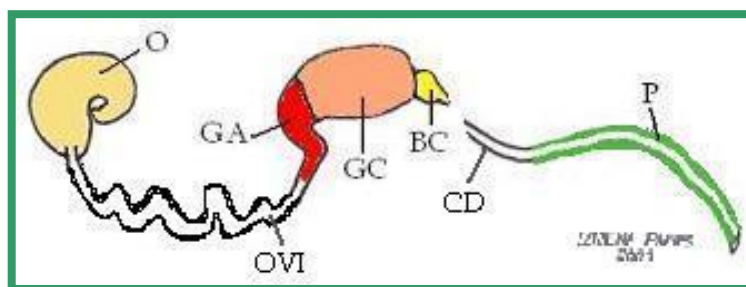


FIGURA 34. Esquema del aparato reproductivo de una hembra con imposex de *N. gayii* en donde P, pene; CD, conducto deferente; BC, bursa copuladora; GC, glándula de la cápsula; GA, glándula de la albúmina; OVI, oviducto plegado y O, ovario (Dibujo original Lorena Panes).

En las observaciones siguientes con la lupa estereoscópica (4x), estas hembras presentaron prácticamente las mismas características de una hembra normal, como las recolectadas en Coliumo. La mayoría mostró formas similares de la glándula de la cápsula con las muestras de Coliumo y un 20% un oviducto más bien recto, no alterado. El largo de pene fue desuniforme entre las hembras (Figura 35 A y B).

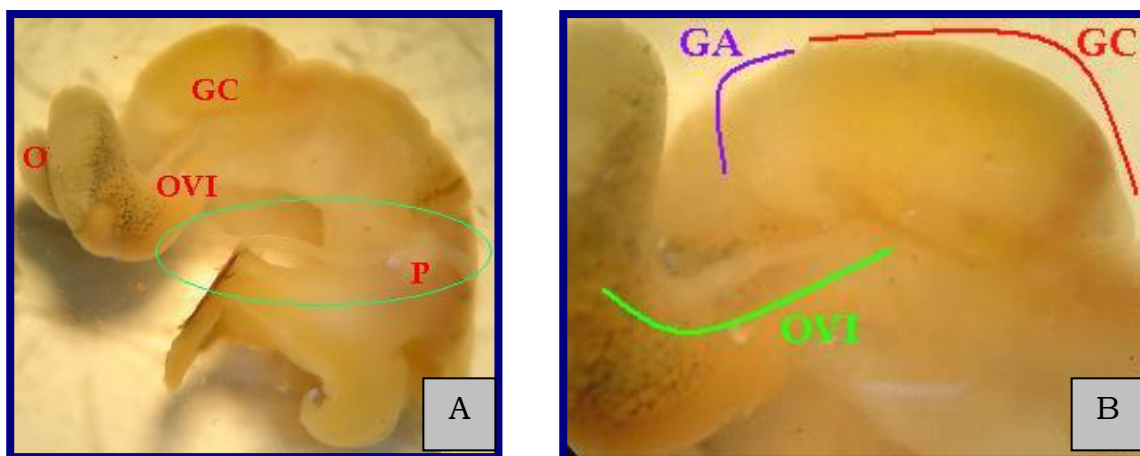


FIGURA 35. Hembra con imposex de *N. gayii*, (San Antonio). **A)** Se observa ovario (O), oviducto más bien recto (OVI), glándula de la cápsula (GC) y la aparición de un largo pene (P) (10x). **B)** Detalle de la figura A, glándula de la albúmina (GA) (20x).

En la figura 36 A y B, se muestra una hembra con una atrofia aparente en la glándula de la cápsula, con aumento en la altura y cambio de color. Pertenecía al 80% que presentó un plegamiento y engrosamiento del oviducto, semejante al de la vesícula seminal descrita en los machos. El tamaño de su pene fue diminuto.

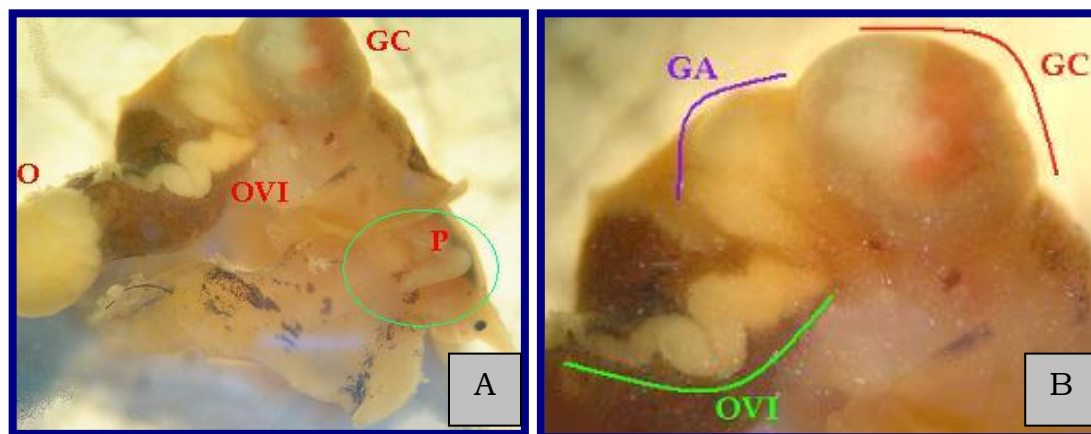


FIGURA 36. Hembra con imposex de *N. gayii*, (San Antonio) **A)** (10x). **B)** Se ve un plegamiento y engrosamiento de OVI, GC con un contenido heterogéneo y P incipiente (20x).

Descripción microscópica de las hembras masculinizadas.

▪ Estructuras femeninas.

Ovario: posee la misma posición, el mismo color, consistencia y similares características histológicas de los cortes provenientes de las hembras de la VIII Región.

En todo el estroma se observa una gran cantidad de ovocitos que en su interior presentan plaquetas vitelinas esféricas eosinófilas, los ovocitos más maduros presentan plaquetas de mayor tamaño (Figura 37 A y B).

No se encontró evidencia de tejido testicular, en el ovario.

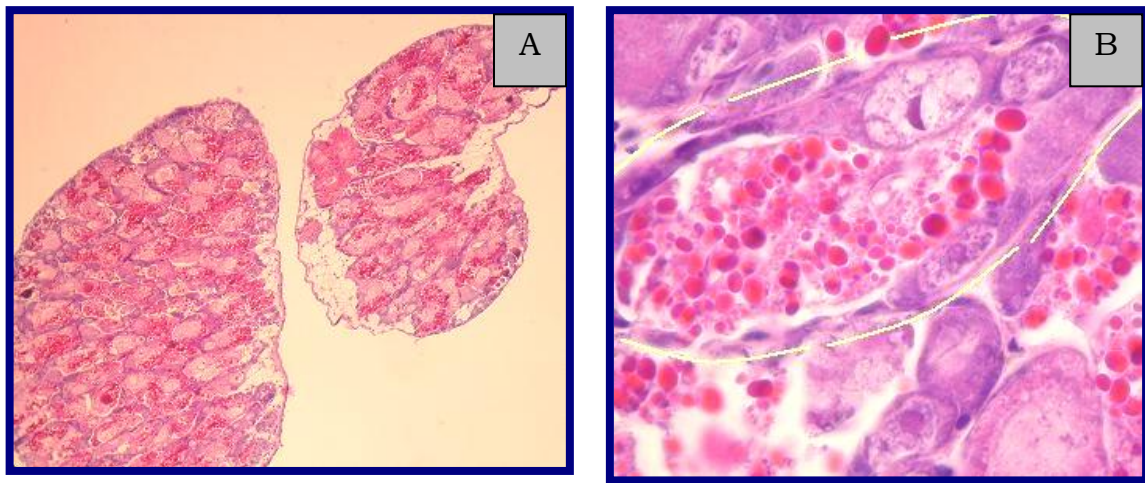


FIGURA 37. Corte histológico del tejido ovárico de una hembra con imposex de *N. gayii* (San Antonio). **A)** (H-E 10x). **B)** Ovocito que en su interior presenta plaquetas vitelinas (aceite de inmersión H-E 100x).

Glándula de la albúmina y de la cápsula: estas estructuras corresponden prácticamente a una sola unidad anatómica, se les puede discriminar por sus propiedades de tinción, pero ellas están en estrecho contacto.

La glándula de la albúmina posee células glandulares serosas acidófilas, con un núcleo más periférico, sus células se ven mucho más oscuras que las de la glándula de la cápsula.

A la lupa, ambas siguen permaneciendo en la misma posición, en estrecho contacto, y con las mismas características . En la figura 38 A y B, se puede observar la glándula de la cápsula no alterada de una hembra con imposex.

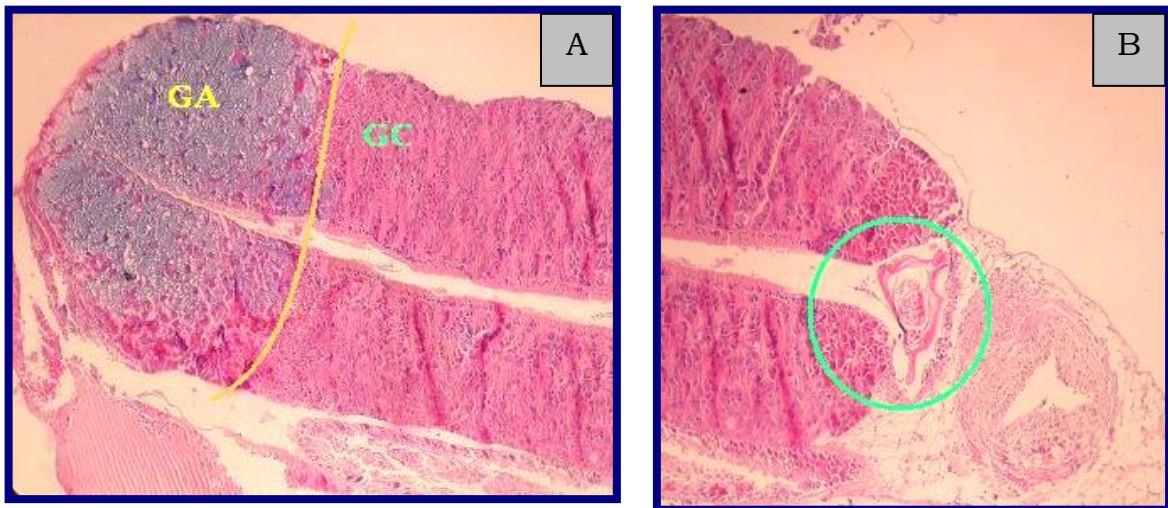


FIGURA 38. Corte histológico de la glándula de la albúmina (GA) y de la cápsula (GC), de una hembra con imposex de *N. gayii* (San Antonio). **A)** GA y GC en estrecho contacto (H-E 10x). **B)** Detalle del área cefálica de GC con cápsula de huevos en formación (H-E 10x).

La glándula de la cápsula de 3 de las 50 hembras afectadas por cambio de sexo presentó una malformación en su apariencia. Esta malformación consistió en un cambio de forma (acortándose en longitud, pero ensanchándose) y de coloración en el contenido. Con los cortes histológicos, pudo verse que el contenido de esta glándula atrofiada, era heterogéneo y se observó un patrón celular muy desordenado. Al corte longitudinal puede observarse el acortamiento y estrechez del lóbulo superior derecho y la ausencia prácticamente del lóbulo inferior derecho. En las figuras 39 A, B, C y D; se puede ver la glándula de la cápsula alterada de una hembra con imposex.

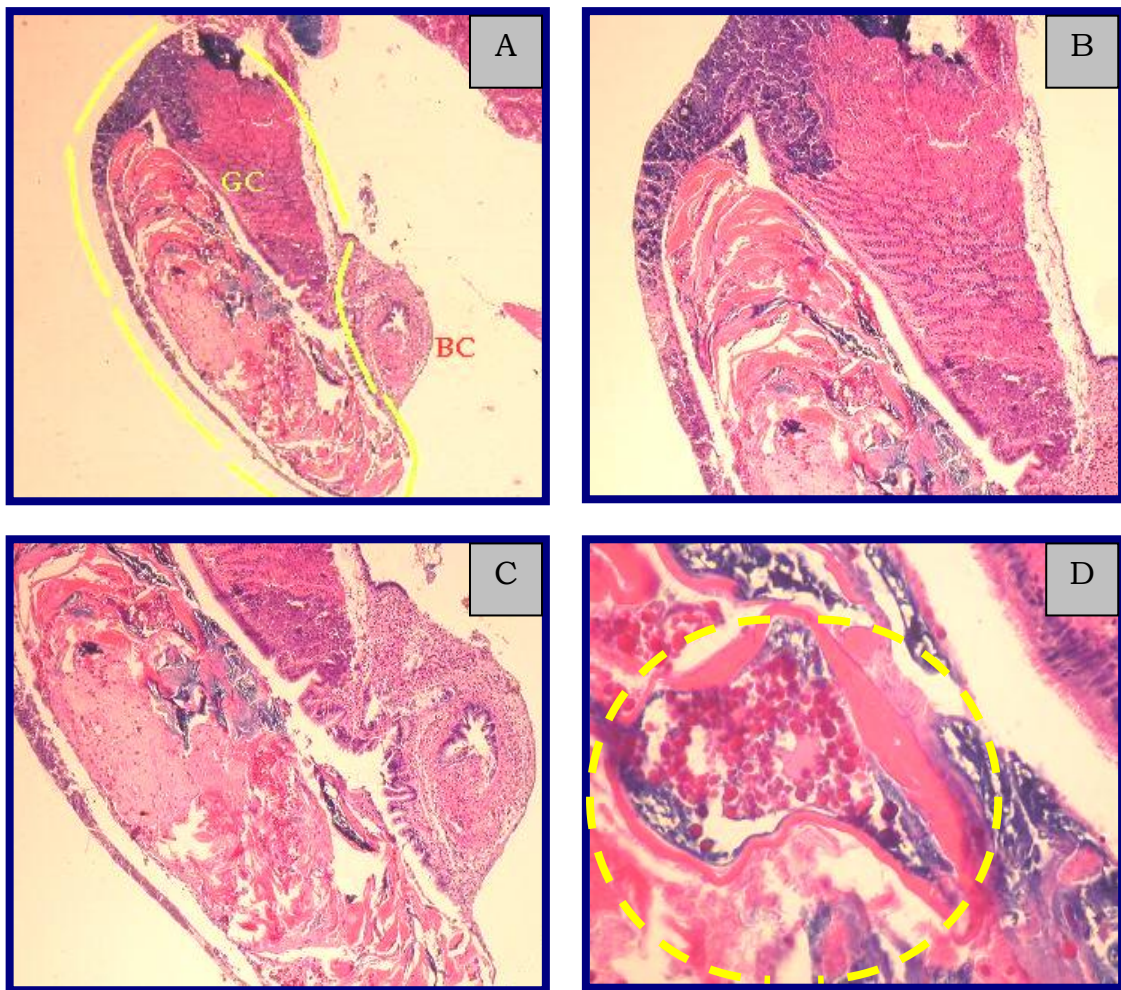


FIGURA 39. Corte histológico de la glándula de la cápsula (GC), de la hembra con imposex de *N. gayii* (San Antonio). **A)** Glándula de la cápsula (GC) y bursa copuladora (BC) (H-E 4x). **B)** Detalle de la figura (H-E 10x). **C)** Se observa un contenido heterogéneo (H-E 10x). **D)** Detalle del contenido de GC, en amarillo un ovocito maduro (H-E 40x).

Glándula pedal ventral: esta glándula es anexa al sistema genital femenino. Está compuesta por un epitelio columnar ciliado y presenta células glandulares subepiteliales, notoriamente teñidas con un color púrpura. La glándula pedal observada en las hembras con imposex, no muestra variación con las hembras recolectadas de la VIII Región y sólo estuvo presente en hembras (Figura 40).

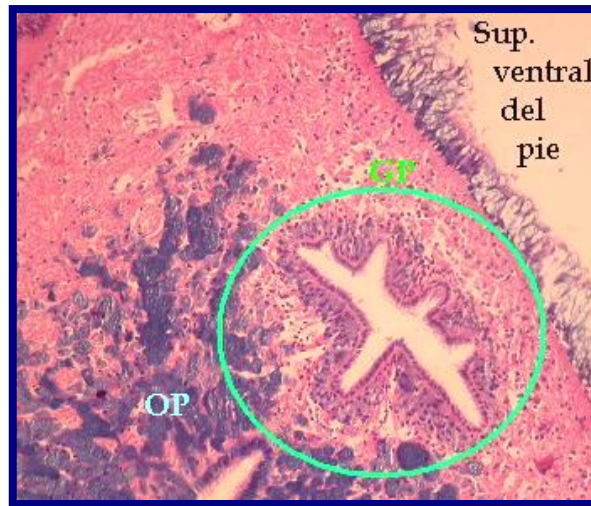


FIGURA 40. Histología de la glándula pedal ventral (GP) de la hembra con imposex de *N. gayii* (San Antonio). Ubicada en la zona anterior del pie, se puede observar el órgano perforador accesorio (OP) (H-E 20x).

- Estructuras de aspecto masculino.

Oviducto: a la lupa (4x) es posible observar que el oviducto igualmente emerge por el costado inferior izquierdo de la gónada. En su salida de la gónada, este cordón es más grueso que el que poseen las hembras de *Coliumo* y se pliega sobre sí mismo de una forma similar a lo que sucede en los machos, pero en un menor grado (Figura 41 A y B).

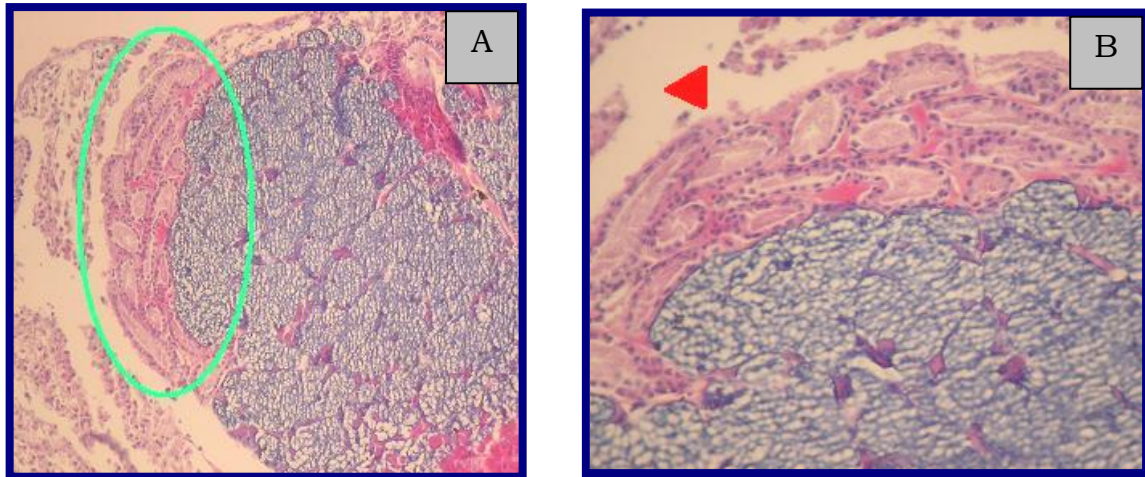


FIGURA 41. Histología del oviducto de la hembra con imposex de *N. gayii* (San Antonio). **A)** En verde, se señala el oviducto plegado (H-E 20x). **B)** Oviducto indicado por la flecha roja (H-E 40x).

Conducto deferente: la ubicación y conformación histológica de las estructuras anexas masculinas encontradas en las hembras con imposex, era la misma encontrada en los machos adultos recolectados de la V y VIII Región.

El conducto deferente aparece en la cavidad paleal, sin conexión a la próstata como es el caso de los machos. También está en una posición subsuperficial, presentándose como un conducto recto, presenta un epitelio de células columnares ciliadas, rodeado de una notoria pared muscular circular. Luego se flecta para entrar al área intrapeneana recorriendo toda su longitud, para abrirse en su extremo distal. Este conducto inducido está separado del oviducto (Figura 42 A y B).

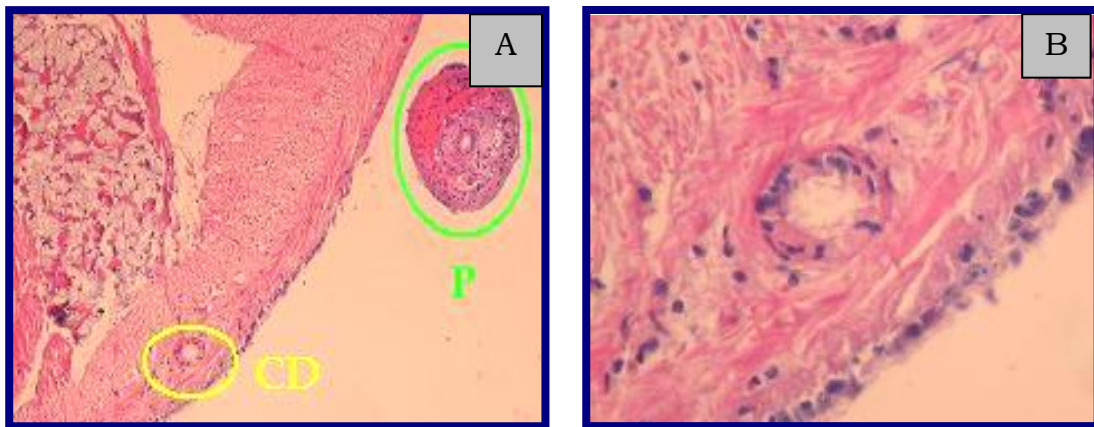


FIGURA 42. Histología del conducto deferente (CD) de la hembra con imposex de *N. gayii* (San Antonio). **A)** CD se visualiza en una posición subsuperficial antes de llegar a la base del pene (P) (H-E 10x). **B)** Detalle de CD de la figura A (H-E 40x).

Pene: la mayor parte de las hembras posee un largo pene. Éste se ve aplastado lateralmente. Se muestra alargado, “transparente” y su conducto posee un epitelio columnar ciliado.

El pene posee un epitelio simple de células cúbicas, al cual subyace una gruesa capa de musculatura lisa circular y luego una longitudinal. Se visualizan algunos espacios sanguíneos, rodeados por tejido conectivo, que corren lateralmente a lo largo del pene. En la porción central, el conducto está rodeado por una gruesa cubierta muscular circular, transversal y a un costado se observa el nervio peneano (Figura 43).

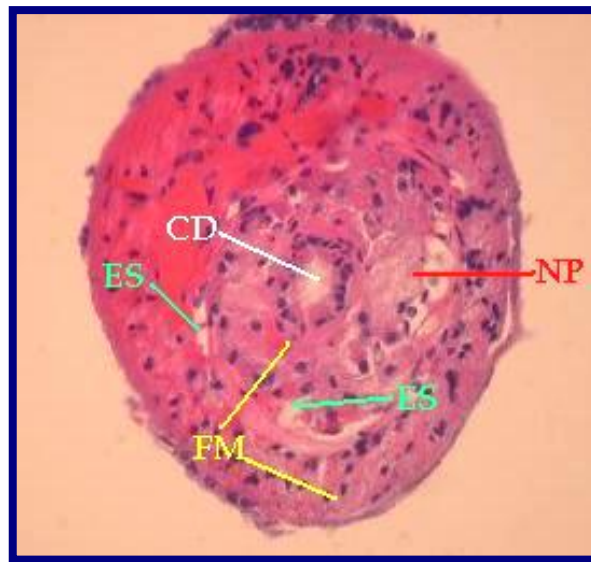


FIGURA 43. Histología del pene de la hembra con imposex de *N. gayii* (San Antonio). Se indica conducto deferente (CD), espacios sanguíneos (ES), fibras musculares (FM) y nervio peneano (H-E 40x).

A continuación se muestran fotografías de microscopía electrónica de barrido de hembras con imposex de *Coliumo*, donde se pueden distinguir glándula de la cápsula, manto, pene, probóscide y tentáculos (Figuras 44 A, B y C).

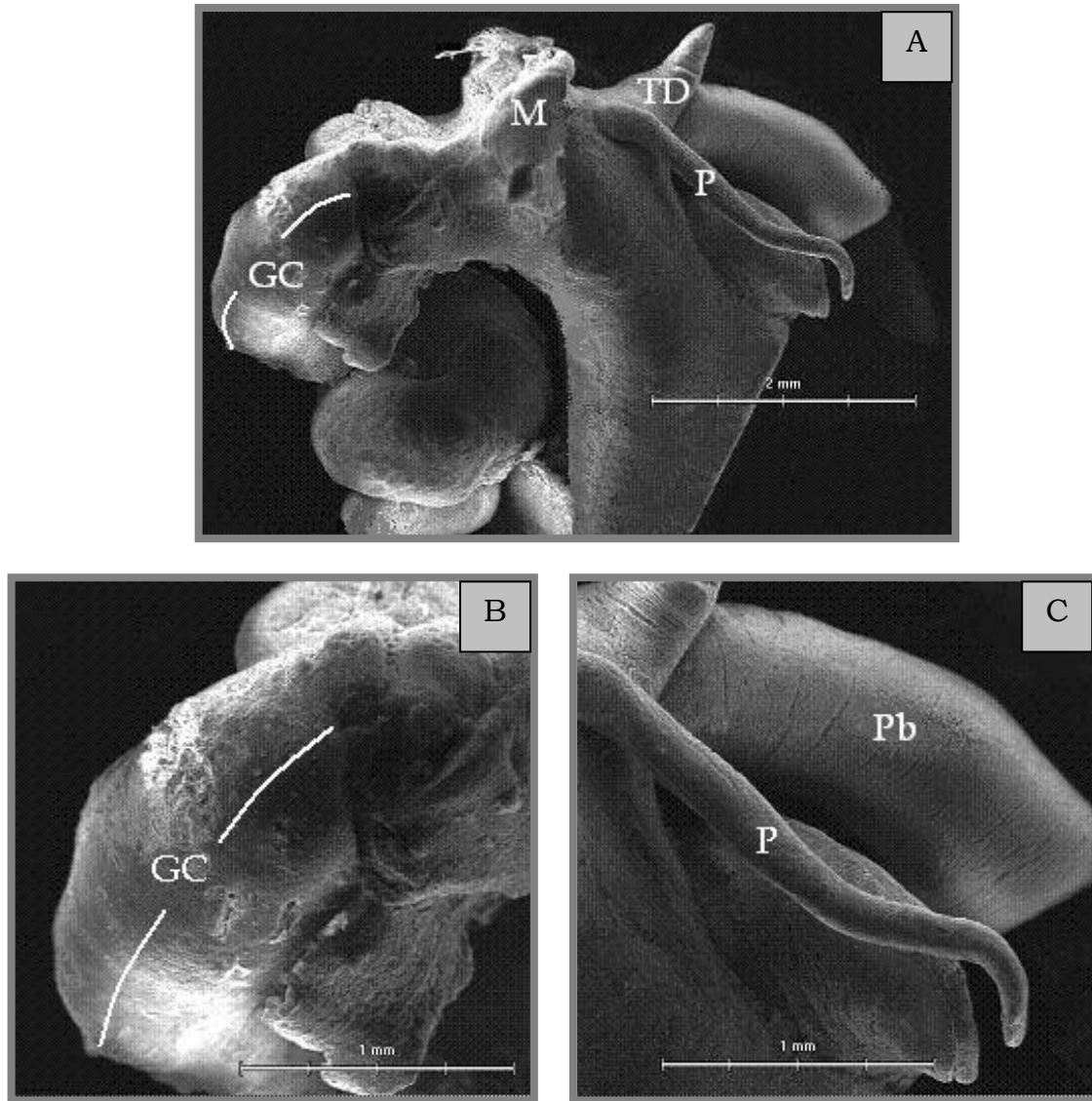


FIGURA 44. *N. gayii*, (San Antonio) Microscopía electrónica de barrido de una hembra con imposex, donde GC, glándula de la cápsula; M, borde del manto; P, pene; Pb, probóscide y TD, tentáculo derecho. **A)** Ejemplar completo. **B)** Glándula de la cápsula vista por dorsal. **C)** Área cefálica, donde se observa la proboscis evertida (Pb) y la región distal del pene.

DISCUSIÓN.

Los antecedentes recopilados permitieron describir los detalles morfológicos generales de *N. gayii*, la morfología del sistema reproductor de hembras y machos, así como también del fenómeno de imposex en hembras de San Antonio. A través de observaciones a la lupa, al microscopio óptico y microscopio electrónico de barrido se logró confirmar un escenario diferente para ambas localidades estudiadas. Visto así, los animales de la localidad de Coliumo se percibieron como normales morfológicamente, mientras que los del Puerto de San Antonio presentaron el fenómeno de imposex.

En San Antonio la proporción sexual mostró un incremento en el número de machos. El aumento de machos en esta población podría deberse a la presencia de TBT en el área portuaria en estudio, situación que ha sido reportada en *Thais clavigera* (Kuster, 1860) por Tan (1997), Blackmore (2000), Shim *et al.*, (2000) y Li (2003) y en otros gastrópodos tales como *N. lapillus* por Bryan *et al.*, (1986), en *Thais biserialis* (Blainville, 1832) por Ramasamy y Murugan (2002) y en *Ocenebrina aciculata* (Lamarck, 1822) citado por Oehlmann *et al.*, (1996). Además todas las hembras de esta zona mostraron imposex, lo que podría ser por una mayor concentración de testosterona circulante, como consecuencia de un bloqueo en el paso de andrógenos a estrógenos (Oehlmann *et al.*, 1996; Rilov *et al.*, 2000).

Es probable que el aumento de machos en San Antonio, se deba a trastornos en la cascada de eventos hormonales que provocan fallas en la diferenciación sexual. Estos trastornos pudieran relacionarse a una mortalidad selectiva en las hembras, como se observó en las hembras de *N. lapillus* al noroeste de Inglaterra (Bryan *et al.*, 1986), en *Thais bitubercularis* (Lamarck, 1822), en *T. clavigera* y *Thais jubilaea* (Tan y Sigurdsson, 1990) de Singapur (Tan, 1997). Incluso esto lo menciona Nicholson y Evans (1997), para *Buccinum undatum* en las costas de Inglaterra. Y si existiera una mortalidad selectiva, por la talla que logran los ejemplares de la V Región, estaría ocurriendo en especímenes mayores a 10 mm, ya que los individuos de San Antonio fueron comparativamente más pequeños y livianos en promedio (8,47 mm y 0,13 g) que los de Coliumo (12,55 mm y 0,42 g). Se podría inferir que los de San Antonio están en la fase reproductiva y los de Coliumo en la fase longeva, según lo planteado por Letelier *et al.*, (2005) quien en un estudio sobre

dinámica poblacional de *N. gayii* en San Antonio, separa a la población según su desarrollo en tres modas: la primera corresponde a organismos de hasta 6 mm los reclutas de la población; la segunda, a la fase reproductiva con un rango entre 6 a 11,5 mm de longitud, y finalmente, la tercera moda estaría constituida por organismos mayores a 11,5 mm, que representaría la parte longeva de la población.

En otros estudios donde se comparan poblaciones con y sin imposex, no se han encontrado grandes variaciones con respecto al tamaño de los ejemplares muestreados. En el actual estudio, existe una tendencia en ambas localidades a encontrar especímenes de mayor tamaño y peso en primavera, pero, las medidas de los ejemplares de Coliumo resultaron siempre ser mayores que los de San Antonio. Es probable que la interferencia ambiental presente en San Antonio, influya en estos indicadores, impidiendo que alcancen las dimensiones observadas en Coliumo, lo que es comparable con lo que menciona Joose (1988), quien señala en los gastrópodos, que las hormonas peptídicas participan en funciones, tanto fisiológicas, como reproductivas, por lo que es posible que el crecimiento de los caracoles muestreados en el puerto de San Antonio, sea truncado por una interferencia causada por los contaminantes en el medio marino.

En cada sitio las hembras fueron un poco más grandes que los machos, lo que coincide con lo que indica Demaintenon (2001), en *N. vivex*.

Según la longitud del pene, corregido por la longitud total, los machos presentes en San Antonio, mostraron en promedio penes más largos que los de Coliumo. Similar observación realizó Demaintenon (2001), para *L. littorea* y *N. lapillus*, presentes en áreas portuarias. Sin embargo, hay que considerar que en los machos de San Antonio se mantuvo prácticamente constante el tamaño peneano, sin diferencias estacionales. Se puede pensar entonces que, existe algún estímulo que mantendría un alto nivel de testosterona circulante, impidiendo la reducción de tamaño como lo observado en Coliumo en este estudio y en *N. reticulata*, como en otros prosobranquios, que muestran que el largo del pene disminuye considerablemente a fines de verano, durante el reposo sexual (Stroben *et al.*, 1992).

Tras varios estudios se ha logrado relacionar, el aumento de los niveles de testosterona libre en hembras y machos de *N. lapillus*, con el TBT (Spooner *et al.*, 1991; Bettin *et al.*, 1996). En consecuencia, tal vez en los machos de San Antonio, los niveles

circulantes de esta hormona, son tan constantes, que no permiten la normal regresión de tamaño del pene, tras la época reproductiva.

Es importante destacar que en todos los individuos de San Antonio, se observó pene, incluso en menores de 6 mm, considerada como fase pre reproductiva por Letelier *et al.*, 2005, lo que apuntaría a una madurez precoz. Esta situación ya había sido descrita por Demaintenon (2001), quien observó que machos de *N. vivex* desarrollaban precozmente maduración gonádica y una temprana formación del espermi ducto y de pene.

El índice de RPLI mostrado en la población de San Antonio (78,16%) fue bastante elevado en contraste a otros valores que se dan en la bibliografía. Oehlmann *et al.*, (1996) describen que una población con valores de RPLI mayores de 25% tiene altos riesgos de ser disminuida, por ausencia de hembras sin imposex (o “normales”). Hecho que pudiera estar sucediendo para *N. gayii* en esta localidad.

Se presume que la localidad de Coliumo es un área limpia de contaminantes tipo TBT, por la ausencia de barcos pesqueros y otras embarcaciones (sin lixiviación de antiincrustantes de sus pinturas), de tal forma que estos caracoles, se desarrollarían en forma normal hasta lograr el tamaño adulto, lo que es respaldado con la proporción sexual cercana a 1 y con promedios apropiados en longitud total y longitud de pene.

Aún cuando para los neogastrópodos dioicos Fretter y Graham (1962), hayan señalado que en especies de sexos separados, la sexualidad no cambia durante la vida del individuo, vemos que esta aseveración no se cumple para las hembras de San Antonio. Desde hace algunos años, se vienen observando alteraciones del sexo o "imposex" en neogastrópodos, sobretudo en hembras que habitan áreas cercanas a zonas portuarias, las cuales desarrollan características masculinas. Estas alteraciones se distinguen en aspectos anatómicos y también en la constitución histológica de órganos como el ovario o como la glándula de la cápsula y neoformaciones peneanas, tal como sucede en *A. monodon* (Osorio y Huaquín 2003; Huaquín *et al.*, 2004).

Las observaciones del aparato reproductivo del macho de *N. gayii*, muestran similitud a otros monotocardios descritos. Sin embargo, la porción distal del pene, muestra un extremo con forma de bisel, más que el de hacha indicado por Smith (1980) en *N. obsoletus*. Tampoco se vio una reducción del pene a una papila, en ninguna de las fechas muestreadas, como sucede con *N. obsoletus*, descrito por Smith (1980).

En los machos recolectados en primavera, el vaso deferente fue más evidente de ser observado con lupa. La vesícula seminal mostró un mayor engrosamiento y un color marcadamente blanquecino, por la presencia de células germinales en ella.

Por otro lado, la descripción del aparato reproductivo de la hembra de *N. gayii*, posee algunas diferencias a otras de este mismo género. En *N. reticulata* existe una fuerte división descrita entre la glándula de la albúmina y de la cápsula, sin embargo en *N. gayii* y tal como sucede en *N. vivex*, son prácticamente una sola unidad anatómica (Demaintenon, 2001).

La glándula de ingestión no fue aparente, esto es posible porque sus células glandulares son muy similares a las de la glándula de la cápsula, haciendo difícil diferenciar una de otra.

Aunque se describe al poro genital como término de la vía reproductora, y también el lugar de entrada de los espermatozoides, externamente, no se ve en *N. gayii*. Esto puede ser por su pequeño tamaño y por encontrarse bajo la cavidad del manto.

Con respecto a las hembras de *N. gayii* con imposex, recolectadas en la V Región, presentaron un pene similar a la de los machos, incluso en los cortes histológicos transversales, se observó la misma disposición celular. *Bryan et al.*, (1988) fueron los primeros investigadores en demostrar, experimentalmente, que las hembras de *N. lapillus* incrementaban la longitud del pene al exponerlas durante 14 días a TBT, en concentraciones de 200 ng Sn/L.

Cabe destacar que las hembras de *N. gayii* afectadas por esta masculinización presentan un pene de tamaño similar al del macho, a diferencia de las hembras de *A. monodon*, especie que habita la zona intermareal, en las cuales se encontró un pseudopene vestigial, como lo menciona Wu (1985), con hembras recolectadas en Coquimbo.

En las hembras con imposex de *N. gayii* no se encontró evidencia de un pene bifurcado o de dos penes como se describe en *H. reticulata*, como tampoco excrescencias o tejido hiperplásico en el pene y/o en el vaso deferente, como *N. lapillus* (*Stroben et al.*, 1992).

Aunque según Horiguchi *et al.*, (2002) la imposición de espermatogénesis en el sistema reproductivo de las hembras como un ovotestis fue registrado en *N. lapillus* por

Gibbs *et al.*, (1988) en *O. aciculata* y en *Haliotis gigantean* (Gmelin, 1791) por Oehlmann *et al.*, (1996) se piensa que en *Nassarius* no existiría la formación de tejido testicular.

Por otro lado, en las hembras con imposex de *N. gayii* se observó macro y microscópicamente la formación de un oviducto enrollado; lo que concuerda con descripciones previas en *N. reticulata* (Smith, 1980; Stroben *et al.*, 1992).

Por consiguiente, es posible que las características sexuales masculinas encontradas en hembras de *N. gayii*, como son la aparición de pene, conducto deferente y un oviducto plegado, se deban al aumento de testosterona libre circulante, provocadas probablemente por altas concentraciones de TBT como se menciona anteriormente.

Según Huaquín *et al.*, (2004) para San Antonio, el valor promedio de Estaño (Sn) en el sedimento fue de 37,1 ng/g y la concentración de TBT en sus muestras de agua fue de 42,63 ng/L cantidades que sobrepasan las concentraciones mínimas para inducir imposex.

El inicio de estas transformaciones puede gatillarse a distintas concentraciones dependiendo de la especie, es así como según Gibbs *et al.*, (1988) en *N. lapillus* se necesita <0,5 ng/L de TBT, en cambio Gibbs *et al.*, (1990) menciona que para *O. erinacea* y Bryan *et al.*, (1989) para *N. obsoleta*, imposex es iniciado con 1 ng/L de TBT.

En 1998, el CPMM (Comité de Protección del Medio Marino) creado por la Organización Marítima Internacional (OMI), acuerda el proyecto de reglamentación obligatoria para prohibir el uso de compuestos organoestañosos en los sistemas de fabricación de pinturas antiincrustantes. Para esto se señalan dos fechas:

- El 2003 para la prohibición del uso de compuestos organoestañosos como biocidas en los sistemas antiincrustantes y
- El 2008 para la prohibición completa de estos compuestos (OMI., 1999).

En Chile la normativa de calidad de agua (Decreto Supremo N° 90/2000) indica que los límites máximos permitidos para el estaño son de 1,0 mg/L para descargas que estén fuera de la zona de protección litoral y en las zonas de protección son aceptados vertidos de 0,5 mg/L. Estos valores permitidos sobrepasan 1.000 a 10.000 veces las concentraciones que son ya peligrosas para la fauna. Sin embargo, no existe una ley que controle el uso de antiincrustantes basados en TBT (Osorio y Huaquín, 2003). Pese a estas prohibiciones, en nuestro país no hay restricciones por lo que el TBT podría usarse indiscriminadamente.

Resumiendo, aunque hubiese una ley en Chile que restringiera su uso hoy, por la existencia de puertos y estuarios cuyos fondos tienen mucho sedimento en donde se depositan contaminantes, es probable que por la prohibición la contaminación disminuiría superficialmente, pero la resuspensión de TBT en la columna de agua podría perdurar por muchos años.

En algunas especies con imposex puede producirse una obstrucción en la vía reproductiva causando esterilización. Sin embargo, en *Nassaridae* no se ha mencionado su ocurrencia. En este estudio, en sólo 2 de las 37 hembras estudiadas, se evidenció una atrofia en la glándula de la cápsula, que al corte histológico se pudo observar un acúmulo de secreciones glandulares y huevos probablemente atrapados. Esto señalaría un probable bloqueo y tal vez que sí puede existir esterilización en *Nassarius*.

Gibbs *et al.*, (1987) y Oehlmann *et al.*, (1991) describen que imposex causa esterilización por bloqueo del oviducto paleal en *N. lapillus*, Short *et al.*, (1989) lo mencionan en *Nassarius lima* (Dillwyn, 1817), Bright y Ellis (1990) en *Nucella lamellosa* (Gmelin, 1791) y Spence *et al.*, (1990) en *T. haemastoma*. La esterilización en otras especies puede ocurrir por un estrechamiento de la bolsa copuladora y la glándula de la cápsula como lo señalan Gibbs *et al.*, (1990) y Oehlmann *et al.*, (1992) en *O. erinacea*, lo que es mencionado también por Gibbs *et al.*, (1991) en *Urosalpinx cinerea* (Say, 1822). La primera posibilidad impide la expulsión de cápsulas con huevos; la segunda podría evitar la cópula y la formación de las cápsulas.

Dado que, las alteraciones encontradas no fueron igual para todas las hembras, se piensa que cada individuo alterado respondería en forma diferente a la misma concentración del contaminante en el medio, lo que podría deberse a diferencias en la edad, sensibilidad y tiempo de exposición al contaminante. Por lo tanto, existiría siempre la posibilidad de que ocurra la cópula y la expulsión de huevos capsulados y en consecuencia se mantendría la viabilidad de esta especie, por lo que las restricciones por infertilidad, no serían siempre obvias, a pesar del alto valor registrado en el índice RPLI.

Los cambios morfológicos a nivel reproductivo ya mencionados, que pueden traducirse tanto en alteraciones en la tasa reproductiva de esta especie, como en disminuciones en el tamaño efectivo poblacional, podrían poner en riesgo la persistencia de *N. gayii* a nivel local, tal vez, a largo plazo.

Oehlmann *et al.*, (1996) describen que una población con valores de RPLI mayores de 25% tiene altos riesgos de ser disminuida, entonces ¿qué hace que esta población de RPLI 78,16%, siga permaneciendo en el medio?; tal vez, la habilidad de esta especie de trasladarse varios kilómetros, a través de su larva nadadora veliger, al igual que la que posee *H. reticulata* señalado por Stroben *et al.*, (1992). La carga y descarga de granos y otros insumos en el puerto, depositan sedimentos con alta cantidad de materia orgánica, situación que podría ser un atractivo poderoso para llegar a esta zona portuaria.

Quizás la población logra de todos modos reproducirse y mantenerse viable, puesto que *Nassaridae* aparentemente posee menos sensibilidad que otras especies y su respuesta a los niveles de TBT, no siempre es la misma.

Existen muchas dificultades en las mediciones químicas de los organoestañosos en el medio ambiente, por concepto de costos (Cleary, 1991; Foale, 1993), actualmente los cambios en los niveles de imposex, han sido la principal herramienta de medición empleada (Evans *et al.*, 1995).

Sin embargo, es poco probable que *N. gayii* sirva como indicador de distintas concentraciones de TBT, ya que los cambios morfológicos y morfométricos registrados en las hembras con imposex, no son homogéneos para todas. No obstante, este gastrópodo sería un buen indicador de la presencia de TBT.

Imposex en gastrópodos es sólo uno de los efectos negativos de este organoestañoso, otros efectos según Evans (1999), tienen que ver con la mortalidad, monstruosidad y desbalances hormonales en delfines, cangrejos, langostas, ostras, larvas de invertebrados y algas marinas. Estos fenómenos son disrupciones del sistema endocrino que pueden afectar tanto a animales como al ser humano y particularmente al sistema reproductor.

Los efectos de los disruptores endocrinos en la vida silvestre, especialmente en los invertebrados, pueden alcanzar consecuencias adversas para la biodiversidad y la sustentabilidad de los ecosistemas naturales.

Los resultados encontrados en esta memoria, apuntan a que las alteraciones observadas son producto de drásticos cambios ambientales y a la ausencia de control de contaminantes en el ambiente, tal como se ha descrito en otras especies.

En relación a *N. gayii*, especie que no ha sido muy estudiada, sería fundamental realizar un seguimiento en este puerto como también a poblaciones de otras localidades portuarias, para analizar la evolución de la especie en el tiempo, en cuanto al número de ejemplares, la proporción de sexos y sus características reproductivas; y además, ver si existe una disminución de las alteraciones, o si este estado se mantiene.

Así, dentro de los futuros estudios debiera incluirse un estudio experimental, en la cual se controlen factores que pueden potenciar, o causar interferencia en la inducción de imposex. Se podrían utilizar diferentes niveles de TBT, en los grupos experimentales de laboratorio para confirmar la relación causa-efecto entre el desarrollo de imposex en *N. gayii* u otros componentes organoestañosos. Imposex ocurre posiblemente como resultado a la polución con TBT aunque otras causas no deberían ser excluidas.

Tal vez el uso combinado de *N. gayii*, *A. monodon*, y otros neogastrópodos como especies biomonitoras permitiría un buen análisis de contaminación de TBT de toda la costa del Pacífico. Así como lo recomienda Stroben *et al.*, (1992), con *N. lapillus* e *H. reticulata*, para las costas europeas.

CONCLUSIONES.

1.- El estudio entrega detalles descriptivos de la morfología del aparato reproductor de *N. gayii*, poniendo en evidencia la alta compartimentalización que posee la especie.

2.- Las localidades muestreadas, difieren en los porcentajes de sexo, en los tamaños, pesos y en las longitudes de pene de los machos.

3.- En la muestra de Coliumo, se encontró una proporción similar de machos y hembras, por el contrario, en San Antonio se observó un menor porcentaje de hembras.

4.- Comparativamente, los individuos de Coliumo obtuvieron una longitud y un peso total promedio mayor que los de San Antonio. Sin embargo, el índice de longitud de pene corregido, fue mayor en los machos de esta última área.

5.- El índice de longitud relativa del pene (RPL), incluyendo a hembras con imposex y a machos, fue de 78,16% en el área de San Antonio.

6.- Todas las hembras de San Antonio presentaron una masculinización del sistema reproductivo, sin observarse la formación de ovotestes.

7.- Las características sexuales masculinas encontradas en las hembras de *N. gayii* son: el desarrollo de pene, conducto deferente y el plegamiento del oviducto.

8.- El imposex en las hembras de *N. gayii* en San Antonio es coincidente con las altas concentraciones de TBT en el área que posee un flujo de embarcaciones que son fuentes potenciales de compuestos organoestañosos.

9.- Imposex es un riesgo potencial para las especies de neogastrópodos de importancia económica y para todos los organismos marinos, pues puede llegar a alterar su biodiversidad y la sustentabilidad de los ecosistemas naturales.

BIBLIOGRAFÍA.

- **ALZIEU, C.; SANJUAN, J.; DELTEIL, J. P.; BOREL, M.** 1986. Tin contamination in Arcachon Bay: effects on oyster shell anomalies. *Mar. Pollut. Bull.* 17 (11): 494-498.
- **BARROSO, C. M.; MOREIRA, M. H.; GIBBS, P. E.** 2000. Comparison of imposex and intersex development in four Prosobranch species for TBT monitoring of a southern European estuarine system. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 201: 221-232.
- **BETTIN, C.; OEHLMANN, J.; STROBEN, E.** 1996. TBT-induced imposex in marine neogastropods is mediated by an increasing androgen level. *Helgolander Meeresun.* 50: 299-317.
- **BLACKMORE, G.** 2000. Imposex in *Thais clavigera* (Neogastropoda) as an indicator of TBT (tributyltin) bioavailability in coastal waters of Hong Kong. *J. Mollus. Stud.* 66: 1-8.
- **BRAGA DE CASTRO, I.; MATTHEWS, H.; FERNANDEZ, M.** 2000. Occurrence of imposex in *Thais haemastoma* (Linnaeus, 1767) (Mollusca: Gastropoda) as a indication of contamination by Organotin in the coastline of Fortaleza city Ceará, Brazil. *Arq. Ciên. Mar. Fort.* 33: 143-148.
- **BRIGHT, D. A.; ELLIS D.V.** 1990. A comparative survey of imposex in northeast Pacific neogastropods (Prosobranchia) related to tributyltin contamination and choice of a suitable bioindicator. *Canadian J. Zool.* 68: 1915-1924.
- **BRYAN, G. W.; GIBBS, P. E.; HUMMERSTONE, L. G.; BURT, G. R.** 1986. The decline of the gastropod *Nucella lapillus* around the south-west England: evidence for the effect of tributyltin from antifouling paints. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 66: 611-640.
- **BRYAN, G. W.; GIBBS; P.E.; BURT, G. R.** 1988. A comparison of the effectiveness of tri-*n*-butyltin chloride and five other organotin compounds in promoting the development of imposex in the dogwhelk, *Nucella lapillus*. *J. Mar. Biol. Assoc. UK.* 68: 733-744.
- **BRYAN, G.W.; GIBBS, P.E.; HUGGET, R.J.; CURTIS, L.A.; BAILEY, D.S.; DAUER, D.M.** 1989. Effects of Tributyltin Pollution on the Mud Snail, *Ilyanassa obsoleta*, from the York River and Sarah Creek, Chesapeake Bay. *Mar. Poll. Bull.* 20 (9): 458-462.
- **BRYAN, G. W.; GIBBS; P.E.** 1991. Impact of low concentrations of tributyltin (TBT) on marine organisms: a review. **In:** Metal ecotoxicology: concepts and applications. Newman MC, McIntosh AW (Eds.). Lewis Publishers Inc, Ann. Arbour. pp 323-361.

- **CE. DIARIO OFICIAL DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS.** 2000. Sobre el proyecto de disposiciones nacionales notificado por el Reino de Bélgica que limita la comercialización y el uso de los compuestos organoestañosos. L 205: 7-12.
- **CLEARY, J. J.** 1991. Organotin in the marine surface microlayer and sub-surface waters of south west England: relation to toxicity thresholds and the UK environmental quality standard. Mar. Environ. Res. 32: 97–101.
- **COCAS, L. A.** 2000. Efectos del tributilestaño (TBT) sobre la exposición sexual normal de *Concholepas concholepas* (Bruguière 1789) Neogastropoda: Muricidae. Tesis presentada al Instituto de Oceanología. Universidad de Valparaíso. Optando al Grado de Licenciado en Biología Marina y al Título Profesional de Biólogo Marino. 92 pp.
- **DEMAINTENON, M. J.** 2001. Ontogeny of the pseudohermaphroditic reproductive system in *Nassarius vibex* (Gastropoda: Buccinidae: Nassariinae). J. Moll. Stud. 67: 51-57.
- **EVANS, S.M.; LEKSONO, T.; MCKINNEL, P.D.** 1995. Tributyltin Pollution: A diminishing problem following legislation limiting the use of TBT - bases anti-fouling paints. Mar. Pollut. Bull. 30 (1): 14-21.
- **EVANS, S.M.** 1999. Tributyltin pollution: the catastrophe that never happened. Mar. Poll. Bull. 40:212-219.
- **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. Mar. Poll. Bull. 40: 212-219.
- **FOALE, S.** 1993. An evaluation of the potential of gastropod imposex as a bioindicator of tributyltin pollution in Port Phillip Bay, Victoria. Mar. Poll. Bull. 26: 546-552.
- **FRETTER, V.; GRAHAM, A.** 1962. British Prosobranch Mollusc: their functional anatomy and ecology. London Ray Society. 14: 321-385.
- **FRETTER, V.; GRAHAM, A.** 1985. The Prosobranch Molluscs of Britain and Denmark. Part 8 Neogastropoda. J. Moll. Stud. 15: 435-456.
- **GALLARDO V. A.** 1963. Notas sobre la densidad de la fauna bentónica en el sublitoral del Norte de Chile. Gayana 10: 3-15.
- **GIBSS, P. E.; BRYAN, G. W.** 1987. TBT paints and the demise of the dogwhelk, *Nucella lapillus* (Gastropoda). Proc. Oceans' 87, New York, USA. 4: 1482–1487.

- **GIBBS, P. E.; PASCOE, P. L.; BURT, G. R.** 1988. Sex change in the female dogwhelk, *Nucella lapillus*, induced by tributyltin from antifouling paints. J. Mar. Biol. Assoc. UK. 68: 715-731.
- **GIBBS, P.E.; BRYAN, G.W.; PASCOE, P. L.; BURT, G. R.** 1990. Reproductive abnormalities in female *Ocenebra erinacea* (Gastropoda) resulting from tributyltin-induced imposex. J. Mar. Biol. Assoc. UK. 70: 639-656.
- **GIBBS, P.E.; BRYAN, G.W.; PASCOE, P. L.** 1991. TBT induced imposex in the dogwhelk, *Nucella lapillus*, geographical uniformity of the response and effects. Mar. Environ. Res. 32: 79-87.
- **GIBBS, P.E.; BRYAN, G.W.** 1994. Biomonitoring of TBT pollution using the imposex response of Neogastropods Molluscs. Biomonitoring of Coastal Water and Estuaries. 9: 205-226.
- **GOODING, M.; GALLARDO, C.; LEBLANC, G.** 1999. Imposex en three marine gastropod species in Chile and potential impact on muriciculture. Mar. Pollut. Bull. Oxford. 38(12): 1227-1231.
- **GUILLETTE, L. T.; GROSS, A.; RONNEY, H.; PERCIVAL, A.** 1995. Gonadal steroidogenesis en vitro from juvenile alligators obtained from contaminated of control lakes. Environ. Health Perspec. 103: 31-36.
- **GUZMÁN, N.; SAA, S.; ORTLIEB, L.** 1998. Catálogo descriptivo de los moluscos litorales Gastropoda y Pelecypoda de la zona de Antofagasta, 23° S (Chile). Estud. Oceanol. 17: 17-86.
- **HEATH, R. G.; SPANN, J. W.** 1969. Marked DDE impairment of mallard reproduction in controlled studies. Nature 224: 47-48.
- **HICKEY, J. J.; ANDERSON, D. W.** 1968. Chlorinated hydrocarbons and eggshell changes in raptorial and fish eating birds. Science 162: 271 – 273.
- **HORIGUCHI, T.; KOJIMA, M.; KAYA, M.; MATSUO, T.; SHIRAISHI, H.; MORITA M., ADACHI.** 2002. Tributyltin and triphenyltin induce spermatogenesis in ovary of female abalone, *Haliotis gigantean*. Mar. Environ. Res. 54: 79-684.
- **HUAQUÍN, L.; OSORIO, C.; VERDUGO, R.; COLLADO, G.** 2004. Morphological changes en the reproductive system of females *Acanthina monodon* (Pallas, 1774) (Gastropoda: Muricidae) affected by imposex from the coast of central Chile. Invertebr. Reprod. Develop. 46: 111-117.
- **JENNER, M. G.** 1979. Pseudohermaphroditism in *Ilyanassa obsoletus* (Mollusca: Neogastropoda). Science 205: 1407-1409.

- **JOOSSE, J. 1988.** The hormones of molluscs. **In:** Endocrinology of Selected Invertebrate Types. Laufer, H. Downer, G.H. (Eds.). Alan R. Liss, Inc. New York, USA. 89-140.
- **JOBLING, S.; SUMPTER, J. 1993.** Detergent components in sewage effluent are weakly estrogenic to fish: An in vitro study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Hepatocytes. *Aquatic Toxicol.* 27:361-72,
- **LAUGHLIN, R. B. JR. 1996.** Bioaccumulation of tributyltin by aquatic organisms. Organotin Environmental Fate and Effects. Chapman and Hall, London, U.K. pp 369-382.
- **LETELIER, S.; BARRÍA, P.; OSORIO, C. 2005.** Dinámica poblacional de *Nassarius gayii* (Kiener, 1834) (Gastropoda, Prosobranquia) en el puerto de San Antonio, Chile Central. *Bol. Mus. Nac. Nat. Chile.* 54: 57-70.
- **LI, Z. 2003.** The incidence of imposex in intertidal gastropods from Hong Kong. **In:** Turning the Tides, a Festschrift in Honour of Professor Brian Morton. Shin, P.K.S. (Ed.). The Marine Biological Association of Hong Kong, Hong Kong, China. pp 227-254.
- **LOZADA, E.; OSORIO, C. 1995.** Mollusca. **In:** Diversidad biológica de Chile. Comité nacional de diversidad biológica. Comisión nacional de investigación científica y tecnológica. Santiago, Chile. pp 148-155.
- **MARINCOVICH, L. 1973.** Intertidal Mollusks of Iquique, Chile. Nature History Museum Los Angeles County. *Sci. Bull.* 16:1-49.
- **NICHOLSON, G.J.; EVANS, S.M. 1997.** Anthropogenic impacts on the stocks of the common whelk *Buccinum undatum* (L.). *Mar. Environ. Res.* 44: 305-314.
- **OEHLMANN, J.; STROBEN, E.; FIORONI, P. 1991.** The morphological expression of imposex in *Nucella lapillus* (Linneus) (Gastropoda: Muricidae). *J. Moll. Stud.* 57: 375-390.
- **OEHLMANN, J.; STROBEN, E.; FIORONI, P. 1992.** The rough tingle *Ocenebra erinacea* (Gastropoda: Muricidae) an exhibitor of imposex in comparison to *Nucella lapillus*. *Helgolander Meeresun.* 46: 311-328.
- **OEHLMANN, J.; BETTIN, C. 1996.** Tributyltin induced imposex and the role of steroids in marine snails. *Malacol. Rev. Suppl.* 6: 157 – 161.
- **OEHLMANN, J.; FIORONI, P.; STROBEN, E.; MARKERT, B. 1996.** Tributyltin (TBT) effects on *Ocenebrina aciculate* (Gastropoda: Muricidae): Imposex development, sterilization, sex change and population decline. *Sci. Total Environ.* 188: 205-223.

- **OLEA, N.** 2001. Disruptores hormonales: un nuevo reto ambiental. Jornada en el Centro Mesonero Romanos. Casa de la Panadería. Plaza Mayor. Madrid. 30 pp. [En línea]
<<http://www.istas.net/ma/decops/Nolea.pdf>>
<<http://www.istas.net/ma/areas/residuos/informe1.pdf>> [consulta: 23-01-06].
- **OMI. ORGANIZACIÓN MARÍTIMA INTERNACIONAL.** 1999. Sistemas antiincrustantes: hacia una solución no tóxica. 32 pp. [En línea]
<<http://www.imo.org/>> [consulta: 23-01-06]
- **OSORIO, C.; HUAQUÍN, L.** 2003. Alteración de la sexualidad de *Acanthina monodon* (Pallas, 1774) (Gastrópoda: Muricidae) en el litoral de Chile Central, inducida por compuestos organoestañosos. Cienc. Tecnol. Mar. 26 (2): 97-107.
- **RAMASAMY, M.S.; MURUGAN, A.** 2002. Imposex in muricid gastropod *Thais biserialis* (Mollusca: Neogastropoda: Muricidae) from Tuticorin Harbour, southeast coast of India. Indian J. Mar. Sci. 31: 243-245.
- **RILOV, G.; GASITH, A.; EVANS, S.M.; BENAYAHU, Y.** 2000. Unregulated use of TBT-based antifouling paints in Israel (eastern Mediterranean): high contamination and imposex levels in two species of marine gastropods. Mar. Ecol. Prog. Ser. 192: 229-238.
- **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. Mar. Environ. Res. 49: 435-451.
- **SHORT, J. W.; RICE, S. D.; BRODERSEN, C. C.; STICKLE, W. B.** 1989. Occurrence of tri-n-butyltin caused imposex in the North Pacific marine snail *Nucella lima* in Auke bay, Alaska. Mar. Biol. 102: 291-297.
- **SMITH, B. S.** 1971. Sexuality in the American mud snail, *Nassarius obsoletus* Say. Proc. Malacol. Soc. Londres. 39: 377-378.
- **SMITH, B. S.** 1980. The estuarine mud snail, *Nassarius obsoletus*: abnormalities in the reproductive system. J. Moll. Stud. 46: 247-256.
- **SMITH, B. S.** 1981. Male characteristics in females *Nassarius obsoletus*: variations related to locality, season and year. Veliger 23: 212-216.
- **SPENCE, S. K.; HAWKINS, S. J.; SANTOS, R. S.** 1990. The mollusc *Thais haemastoma* an exhibitor of "imposex" and potential indicator of tributyltin pollution. Mar. Ecol. 11: 147-156.
- **SPOONER, N.; GIBBS, P.; BRYAN, C.; GOAD, L.** 1991. The effects of tributyltin upon steroid titres in the female dogwhelk, *Nucella lapillus*, and the development of imposex. Mar. Environ. Res. 32: 37-49.

- **STROBEN, E.; OEHLMANN, J.; FIORONI, P.** 1992. The morphological expression of imposex in *Hinia reticulata* (Gastropoda: Buccinidae): a potential indicator of tributyltin pollution. *Mar. Biol.* 113: 625-636.
- **TAN, K. S.** 1997. Imposex in three species of *Thais* from Singapore, with additional observations on *T. clavigera* (Kuster) from Japan. *Mar. Pollut. Bull.* 34: 577-581.
- **VÁSQUEZ, J. A.; VEGA, J. M. A.** 2004. Ecosistemas marinos costeros del Parque Nacional Bosque Fray Jorge. In: FA Squeo, JR Gutiérrez y IR Hernández (Eds.) *Historia natural del Parque Nacional Bosque Fray Jorge.* Ediciones Universidad de La Serena, La Serena, Chile. 13: 235-252.
- **WOODWARD, A. H.; PERCIBAL, M.; JENNINGS; MOORE, C.** 1993. Low clutch viability of American alligators of Lake Apopka, Florida. *Science* 56: 52-63.
- **WU, S. K.** 1985. The genus *Acanthina* (Gastropoda: Muricidae) in West America. Special Publication of the Mkaishima *Mar. Biol. St.* 236:45-66.
- **ZAGAL, C.; HERMOSILLA, C.** 2001. Guía de invertebrados marinos del litoral valdiviano. *Quebecor World.* Santiago, Chile. 217 pp.
- **ZÚÑIGA, O.; BAEZA, H.; CASTRO, R.** 1983. Análisis de la macrofauna bentónica del sublitoral de la Bahía de Mejillones del Sur. *Estud. Oceanol.* 3 (1): 41-62.