

TBT e imposex en Galicia: los efectos de un disruptor endocrino en poblaciones de gasterópodos marinos

R. Barreiro, M. Quintela, J. M. Ruiz

Área de Ecología, Facultade de Ciencias. Universidade da Coruña. Campus da Zapateira s/n. E-15071 A Coruña.

*En este artículo se resume la experiencia de nuestro grupo de investigación en el campo de los efectos de un disruptor endocrino androgenizante (el tributilo de estaño, más conocido como TBT por su abreviatura del inglés tributyltin) en gasterópodos marinos del litoral gallego. Nuestras investigaciones sobre este tema comenzaron en 1996 y continúan en la actualidad. Después de una breve introducción sobre qué es el TBT y su problemática, se resumen los principales hallazgos conseguidos con nuestro trabajo, que se basan principalmente en el estudio de los efectos en el gasterópodo carnívoro *Nucella lapillus* con alguna información adicional para otras especies como el carroñero *Nassarius reticulatus*. Nuestro trabajo abarca tanto la bioacumulación de contaminante, la manifestación de un biomarcador específico de los efectos del TBT (masculinización de hembras, conocido como imposex) en poblaciones naturales y en experiencias de trasplante, el estudio de la presencia de individuos genéticamente más resistentes a los efectos del TBT y algunos datos de ecología molecular sobre la estructuración poblacional y capacidad de dispersión de *Nucella lapillus*.*

Antecedentes

El tributilo de estaño o TBT (del inglés TriButylTin) consiste en tres grupos butilo unidos a un átomo de Estaño (IV) por enlaces covalentes. Desde que se conocen sus propiedades biocidas (principios 1950s) se viene utilizado con diversos fines, destacando su empleo como principio activo en las pinturas anti-incrustantes aplicadas a los barcos para retrasar el desarrollo de organismos adheridos a su superficie (de Mora, 1996). Pinturas que prolongan la conservación y facilitan el movimiento de las embarcaciones. Estas pinturas consumen un 70% de la producción mundial de TBT y son la principal vía de entrada de este compuesto al medio acuático desde mediados de los 1960s (International Maritime Organization, 1999). Las utilizan un 70-80% de la flota mercante mundial, siendo las preferidas por sus beneficios en ahorro de fuel, menor mantenimiento e intervalos entre operaciones de repintado más largos (Champ, 2000).

Química básica y niveles ambientales. La hidrofobicidad y carga positiva del TBT favorecen su adsorción al material particulado en suspensión (de Mora, 1996). Gracias a este proceso el TBT puede ser retirado rápidamente de la columna de agua para acumularse en los sedimentos, donde se ha medido un amplio rango de concentraciones (desde < 0.2 ng/g PS hasta varios miles de ng/g PS) según la proximidad a fuentes de este contaminante (Batley, 1996). En el sedimento el TBT puede persistir durante años o incluso décadas (Sarradin *et al.*, 1991), representando un depósito del contaminante a largo plazo que puede plantear problemas (ej. dragados) al ser relativamente débil y reversible (Maguire, 2000). Además, el TBT puede ser biodegradado por un amplio espectro de organismos (desde bacterias hasta mamíferos) en un proceso de debutilación secuencial donde el TBT produce, en primer lugar, dibutilo de estaño (DBT), luego monobutilo (MBT), llegando finalmente a Sn (IV) (Valkirs *et al.*, 1991), siendo el DBT el principal producto de la degradación. En consecuencia la vida media del TBT en agua comprende desde 1 semana hasta 2-4 meses en función de la temperatura y actividad biológica del medio (Seligman *et al.*, 1996).

En medio acuático marino, el TBT puede estar presente en niveles máximos del orden de 50-200 ng/L (ppt) en zonas muy contaminadas (puertos, astilleros) (Batley, 1996; Waite *et al.* 1996), con situaciones puntuales de hasta varios miles de ng/L en países sin control sobre el uso de estos compuestos (Alzieu, 2000). En zonas alejadas de lugares de entrada de contaminante no suelen superar los 10-20 ng/l, frecuentemente encontrándose en el entorno o por debajo de 1-2 ng/l (Waite *et al.* 1996; Michel y Averty, 1999).

Bioacumulación y bioamplificación. El carácter moderadamente lipofílico del TBT facilita su concentración en organismos acuáticos, siendo muy variable la capacidad de éstos para bioacumular este contaminante (Fent, 1996). Los factores de bioconcentración (BCFs) con frecuencia son del orden de 10^4 - 10^5 (Maguire, 2000), correspondiendo los más altos a bivalvos y gasterópodos. Así, los moluscos son el grupo con mayores concentraciones corporales, pudiendo alcanzar o superar 5.000-10.000 ng/g PF TBT (Laughlin *et al.*, 1986). Alta acumulación que podría estar relacionada con una baja actividad de los sistemas enzimáticos encargados de debutilar el TBT en otros grupos taxonómicos (Lee, 1991). Sin embargo, no hay evidencias claras de que este compuesto pueda ser bioamplificado a lo largo de la cadena trófica (Alzieu, 1996).

Toxicidad en medio marino. El TBT puede provocar daños tanto mortales como subletales en grupos taxonómicos diversos y a distintos niveles de organización, desde alteraciones bioquímicas hasta extinciones a escala local (Fent, 1996). Se considera el compuesto organoestánnico más peligroso (OSPAR Commission, 2000), si bien es menos tóxico para mamíferos que otros compuestos utilizados con el mismo fin durante los 1950s (compuestos orgánicos de Hg y Pb, compuestos de As o DDT) (Bennett, 1996). Es capaz de provocar efectos dañinos a concentraciones extremadamente bajas, con umbrales tóxicos en los grupos más sensibles (ej. fito- y zooplancton, ostras) por debajo de 1 ppt (10^{-12}) (Alzieu, 1996) fáciles de alcanzar en situaciones reales, incluso en zonas alejadas de fuentes de TBT. Entre los casos más destacados (umbral ~ 0.8 ng/L) está la deformación de las conchas de la ostra del Pacífico o japonesa, *Crassostrea gigas* cuyo resultado final es un animal deformado con una cavidad corporal relativamente pequeña y sin aprovechamiento comercial (Alzieu, 1986).

El otro caso igualmente relevante por lo llamativo de las bajas concentraciones que lo provocan es el efecto en gasterópodos marinos descubierto alrededor de 1970 al detectarse, en distintas zonas del mundo, hembras con pene (Bryan *et al.*, 1993). Anomalía que recibió la denominación de **imposex** (?superposición de rasgos masculinos en las hembras?) y que ya a finales de los 1970s se había demostrado que se debía al TBT (Smith, 1980; Smith 1981). Estudios posteriores mostraron que en algunas especies (ej. la europea *Nucella lapillus*) el imposex podía impedir la reproducción en las hembras llevando a la desaparición de la especie a escala local y regional por falta de reclutamiento (Bryan *et al.*, 1986; Gibbs y Bryan, 1986). En la actualidad el imposex se conoce en unas 150 especies de gasterópodos llamando la atención su carácter casi universal (Matthiessen y Gibbs, 1998). No todas sufren el mismo grado de masculinización, de manera que no todas se ven esterilizadas (Gibbs *et al.*, 1997). Tampoco son todas igual de sensibles. El imposex muchas veces se induce a concentraciones por debajo de 2 ng/l, destacando los casos de especies particularmente sensibles (ej. *Nucella lapillus*) donde aparece con 0.5 o menos ng/l (Bryan *et al.*, 1987). Motivo por el que el imposex en estas especies se considera la respuesta biológica más sensible a este contaminante (Gibbs y Bryan, 1996). Igualmente, hay diferencias en la concentración umbral necesaria para provocar esterilidad (Oehlmann *et al.*, 1996). Estas diferencias de sensibilidad hacen posible que el imposex en diferentes especies pueda servir de biomarcador de distintos niveles de contaminación.

El imposex sigue un comportamiento dosis-respuesta: la magnitud de desarrollo del pene y del vaso o conducto deferente masculino (VD) en las hembras dependen de la concentración ambiental de TBT (Gibbs y Bryan, 1994). El imposex sirve así como biomarcador cuantitativo de la exposición y efectos del TBT, cuantificando su intensidad con 2 índices (Gibbs *et al.*, 1987): el Índice del Tamaño Relativo del Pene (RPSI) que cuantifica el tamaño del pene de las hembras, y el Índice de la Secuencia del Vaso Deferente (VDSI) basado en una valoración semicuantitativa del grado de desarrollo del VD (**Fig. 1**).

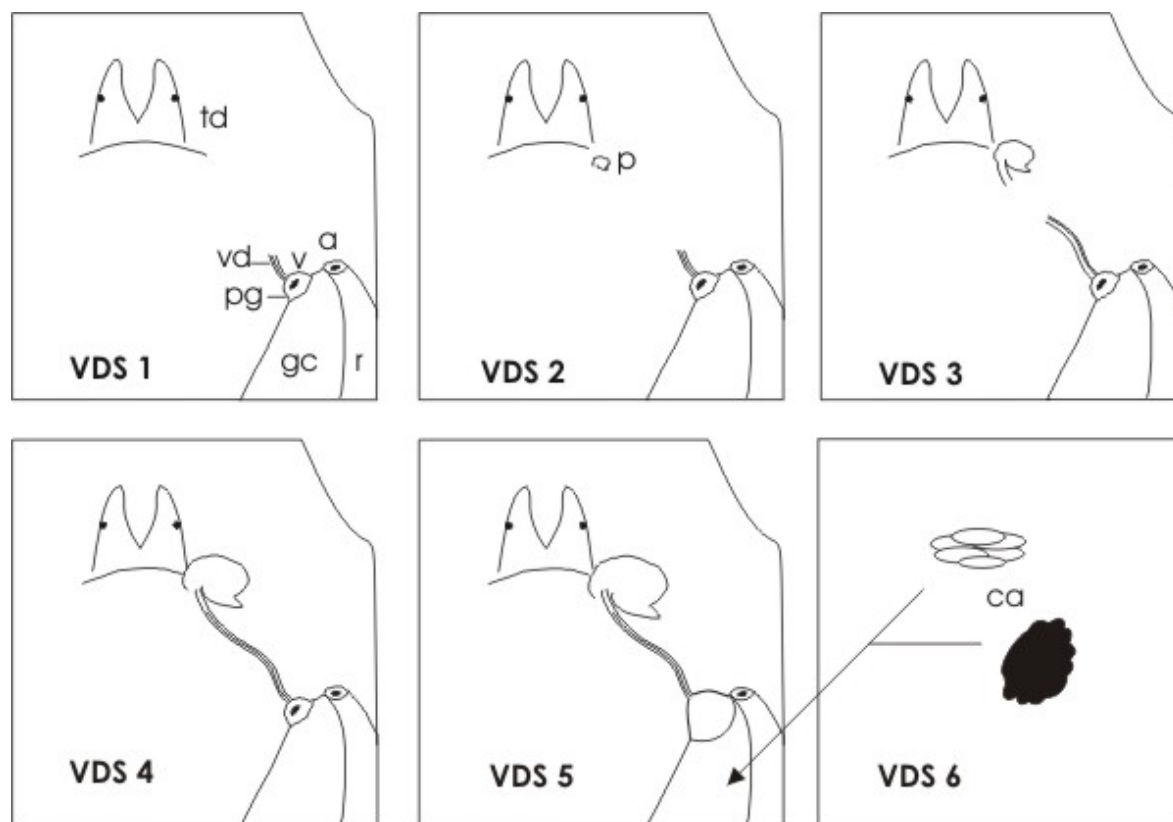


Figura 1. Imposex en *Nucella lapillus*. Esquema del desarrollo del imposex: estadios 1 a 6 (Gibbs *et al.*, 1987). Abreviaturas: a (ano), ca (cápsulas abortadas), gc (glándula de la cápsula), p (pene), pg (papila genital), r (recto), td (tentáculo derecho), v (vulva), vd (vaso deferente).

El binomio TBT-imposex pertenece a una familia más amplia de efectos tóxicos de los contaminantes conocidos como disruptores endocrinos. Compuestos capaces de alterar el funcionamiento normal del sistema endocrino de los animales y cuyos efectos se han visto en casos como la alteración de la reproducción y sistema inmune en focas, desarrollo de órganos sexuales de caimanes macho, desarrollo de órganos reproductores en peces, o adelgazamiento de cáscaras de huevos en aves marinas y rapaces (Colborn *et al.*, 1993). Y que podría tener relación con problemas de salud humana en aparente ascenso durante la segunda mitad del siglo XX. (Colborn y Thayer, 2000). Aunque el imposex es probablemente el mejor caso de disrupción endocrina con demostración causa-efecto incontestable y consecuencias poblacionales graves.

Primeros trabajos: extensión e incidencia del imposex en Galicia como biomarcador de TBT

Antecedentes y objetivos. Ante este estado de cosas y dada la casi total falta de información sobre la incidencia del imposex y la contaminación por TBT en el litoral español, acometimos en 1996 un amplio sondeo del litoral gallego para conocer el ? estado de la cuestión? en nuestras aguas. Elegimos *Nucella lapillus* (**Fig. 2, a**) como especie indicadora, un gasterópodo común en nuestro litoral, cuyo imposex es uno de los biomarcadores más sensibles de TBT conocidos, y cuya capacidad para bioacumular TBT hace posible usar sus contenidos corporales como apoyo para interpretar los datos de imposex.

Resultados y conclusiones. Los resultados mostraron la amplísima incidencia del imposex en Galicia (Ruiz *et al.*, 1998). Esta anomalía apareció en todos los lugares muestreados, afectando al 100% de las hembras en un 70% de éstos (en 20% afectaba a más del 80% de las hembras y en el 5% restante superaba el 65%). Se trataba de un imposex muy desarrollado, con un 80% de hembras con un pene y un VD completamente desarrollados. Aunque el grado de severidad del imposex variaba entre poblaciones. Los valores más bajos ocurrían en localidades de costa abierta (tamaño del pene en hembras un 5-10% el de los machos, nula o mínima esterilidad) y los más altos en las del interior de las rías (tamaño del pene en hembras hasta un 40-50% el de los machos, hasta casi 50% de hembras estériles en algunos lugares) (**Fig. 2, b y c**). Demostrando que las medidas legislativas de principios de los 1990s no habían evitado la presencia de TBT en nuestras costas en concentraciones suficientemente grandes como para provocar el imposex en cualquier punto del litoral (**Fig. 2, d**). Resultados que reforzaban la visión del TBT como un contaminante a escala global y apoyaban la visión cada vez más generalizada de que el imposex era la norma en *Nucella lapillus* a lo largo de su rango de distribución.

Nuestros resultados también sugerían que la respuesta de esta especie no era idéntica a la de latitudes más septentrionales. Los diversos índices de imposex mostraban una relación asintótica significativa con la concentración de contaminante (ej. **Fig. 2, e**). Sin embargo, a iguales niveles de bioacumulación el desarrollo del imposex (tamaño del pene en hembras, grado desarrollo de su VD, porcentaje de esterilidad) era menor en nuestro caso. Resultados que sugerían que la sensibilidad de la especie al contaminante no era idéntica a lo largo de todo su rango de distribución, en contradicción con la creencia general previa, basada principalmente en estudios a lo largo del litoral británico. Planteando que esta diferencia en sensibilidad podía guardar relación con el hallazgo reciente de cierta variabilidad en la expresión del imposex. Variabilidad cuyas implicaciones analizamos posteriormente.

Tanto TBT como sus metabolitos DBT y MBT cambiaban en paralelo de concentración entre localidades (coeficientes de correlación en torno a 0.8). Sin embargo, la abundancia relativa de TBT frente a sus metabolitos variaba de unos sitios a otros. En los animales menos contaminados, de costa abierta, no sólo la concentración total de TBT era menor, sino también la fracción que dicho TBT representaba frente a su metabolito DBT. Observación que sugería que el TBT de esos animales procedía de una fuente más lejana que el que contaminaba los animales del interior de las rías con mayor concentración de contaminante y una mayor fracción de butilestaño a modo de TBT. Esto llevaba a pensar que el TBT en esas zonas de costa abierta podía proceder bien de contaminante "escapado" del interior de las rías o incluso, al menos en parte, del intenso tráfico marítimo internacional que discurre a lo largo del litoral gallego. Hipótesis reforzada por la ausencia de TPT en los tejidos de los animales de costa abierta, a diferencia de los de interior de las rías. Cabe mencionar que este compuesto suele encontrarse en zonas donde hay embarcaciones deportivas, pero suele ser indetectable en lugares donde la contaminación de organoestánicos procede principalmente de barcos comerciales.

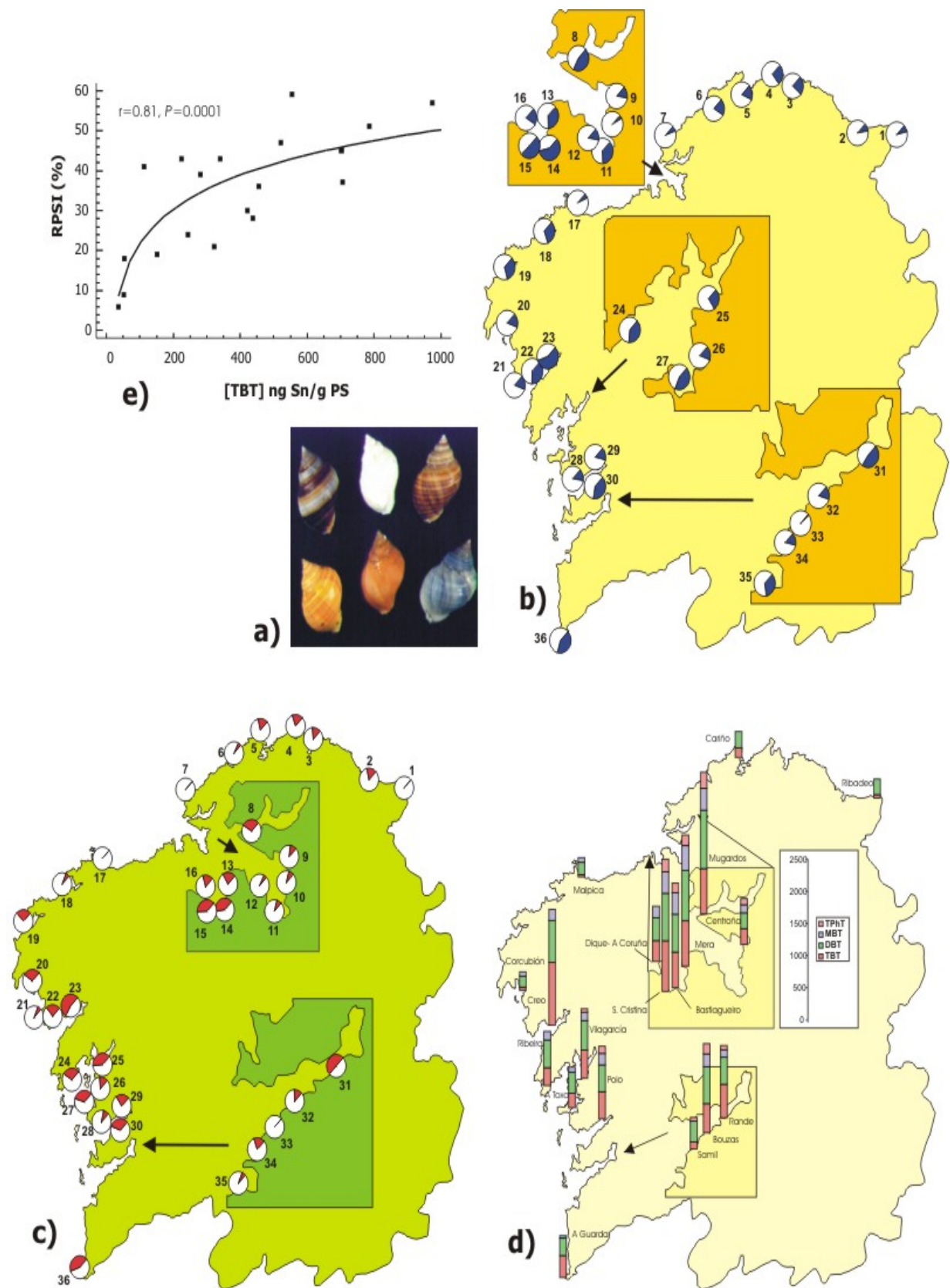


Figura 2. Imposex en *Nucella lapillus*. a) Especímenes de *Nucella lapillus* procedentes de una localidad protegida. b) Índice del Tamaño Relativo del Pene (RPSI en %) por localidad (sector azul). c) Porcentaje de hembras estériles por localidad (sector rojo). d) Concentración de los estannanos (MBT, DBT, TBT y TPhT) medidos en tejidos de hembras de 19 localidades. e) Relación entre la concentración de TBT en los tejidos de las hembras (ng Sn/g PS) y el Índice del Tamaño Relativo del Pene (RPSI, %).

Demostración de la versatilidad de los biomarcadores: uso de trasplantes

Antecedentes. Otra conclusión de nuestro sondeo con *Nucella lapillus* era que esta especie, por su ausencia en determinados enclaves, no podía usarse como indicador de TBT en todo el litoral. Ausencia que podía sospecharse debida a la propia contaminación en algunos casos. Como en las inmediaciones del puerto de A Coruña o la ría de Ferrol, donde *Nucella lapillus* había sido habitante común del litoral en el pasado pero nosotros no habíamos sido capaces de encontrarla en la actualidad. Por culpa de ello, el auténtico grado de contaminación del litoral quedaba distorsionado al carecer precisamente de datos para lugares donde potencialmente esa contaminación podía ser más elevada debido a la existencia de grandes puertos.

Objetivos. Ante esta situación realizamos ensayos, trasplantando individuos procedentes de localidades con poco imposex, persiguiendo dos objetivos: demostrar la viabilidad de esta especie como indicadora de la contaminación también en esas zonas, y obtener una valoración de la contaminación en esos lugares.

Método y protocolos. Realizamos dos experiencias consecutivas ensayando una modalidad diferente de trasplante en cada una (Barreiro *et al.*, 1998, Quintela *et al.*, 2000). En la primera, trasplantando los individuos a tres puntos dentro del puerto de A Coruña en nasas de pesca sumergidas permanentemente, como trasplante que permite trabajar incluso en sitios donde no hay un hábitad adecuado para *Nucella*. Y una segunda, donde los trasplantes se hicieron en 2 sitios dentro del puerto de A Coruña y 2 en la ría de Ferrol, directamente sobre roca para una exposición a la contaminación más fiel a la de condiciones naturales. En total la duración de los ensayos fue de 5 (nasas) y 6 (roca) meses (**Fig. 3**).

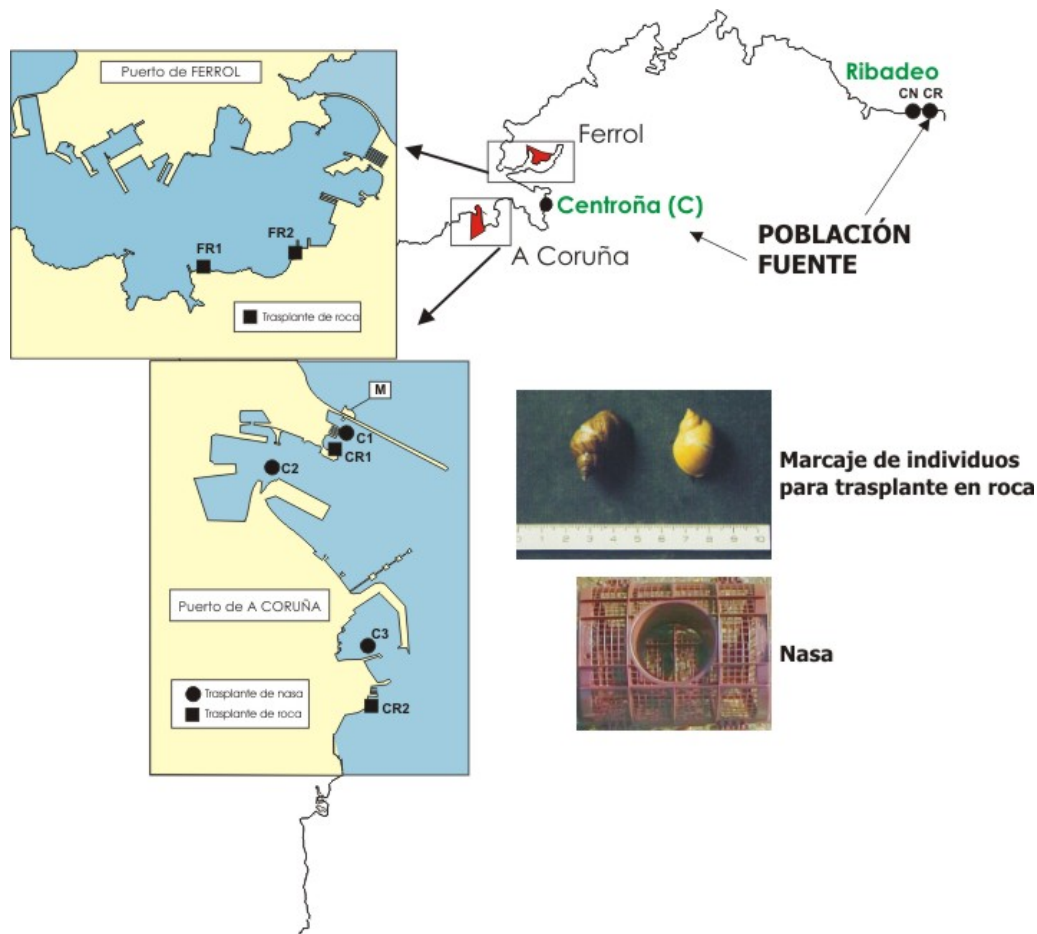


Figura 3. Trasplantes de *Nucella lapillus*. Mapas de las zonas donde se han llevado a cabo los trasplantes: puertos de Ferrol y A Coruña. Individuos de *Nucella lapillus* del trasplante en roca marcados con una estría limada en la concha (fotografía superior). Arte de pesca utilizado para el trasplante en nasa (fotografía inferior).

Resultados y conclusiones. El trasplante en nasa fue perfectamente, con mortalidad < 1% y reinicio del crecimiento en los animales (**Fig. 4, a**), a pesar de ser adultos, quienes aumentaron apreciablemente en longitud (un 10%) y peso (sin concha, un 30%). La situación fue algo diferente en los trasplantes de roca con una baja recuperación de individuos trasplantados (~20%) y hallazgo de animales muertos o en mal estado con cierta frecuencia, aunque también en este caso pudo completarse la experiencia.

Ambos tipos de trasplante fueron útiles para detectar y cuantificar la contaminación por TBT. Encontrando un razonable paralelismo en las respuestas obtenidas en los dos casos tanto en bioacumulación de TBT como en incremento en longitud del pene de las hembras. En ambas modalidades de trasplante los cambios más marcados de intensidad de imposex (longitud del pene de hembras) ocurrieron al principio del periodo de exposición, siendo más rápida la respuesta en las nasas (1 mes) (**Fig. 4, b**) que en la roca (3 meses) (**Fig. 4, c**). Lo que indicaba que este tipo de experiencias no necesitan prolongarse más de 2-3 meses para detectar la contaminación por TBT y poder comparar distintos lugares. Sin embargo, fueron necesarias exposiciones más largas para obtener un desarrollo del imposex comparable al de las poblaciones naturales. De hecho, en el caso de los trasplantes de roca la relación entre intensidad de imposex y bioacumulación de TBT fue muy semejante a la vista en poblaciones naturales, sugiriendo que los trasplantes son una alternativa adecuada para la detección de la contaminación por TBT, lográndose con exposiciones de unos 5-6 meses respuestas que reproducen razonablemente las vistas en poblaciones naturales.

Los resultados mostraron claramente la importancia de la contaminación por TBT en las dos áreas estudiadas. Capaz de inducir un desarrollo apreciable del imposex incluso en individuos adultos. Lo que, aunque no demuestra categóricamente que el TBT sea el responsable de la ausencia de esta especie en esos lugares sugiere que éste puede tener o haber tenido cierta responsabilidad. Sobre todo si se tiene presente que el efecto de ese mismo nivel de exposición a este contaminante por parte de individuos juveniles puede ser mayor que el visto, por nosotros, con adultos.

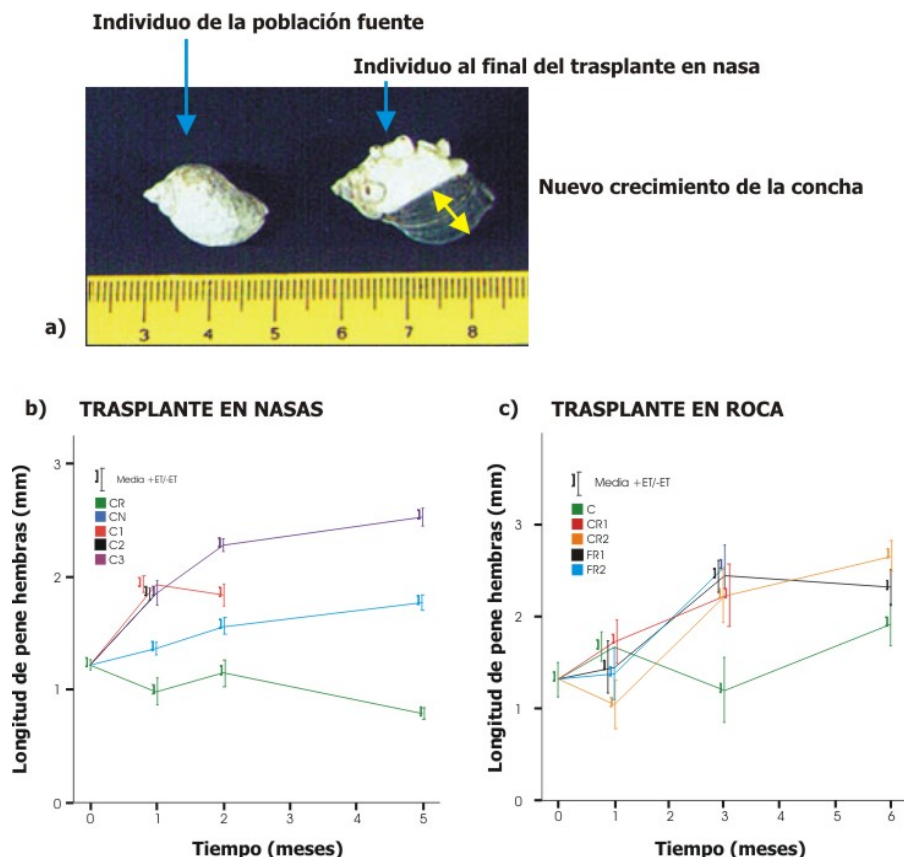


Figura 4. Trasplantes de *Nucella lapillus*. a) Especímenes procedentes de la localidad fuente del trasplante en nasas: individuo del control (especimen de la izquierda) e individuo trasplantado a nasa que experimentó reanudación del crecimiento (derecha). b) Longitud de pene de las hembras (media \pm ET) a lo largo del trasplante en nasas: en el campo (CR, control de roca) y en las nasas (CN y C1-C3). c) Longitud de pene de las hembras (media \pm ET) a lo largo del experimento de trasplante en roca: en el control (C) y en los puntos de trasplante (CR1-2 y FR1-2).

Un problema en Galicia: el Síndrome de Dumpton, sus consecuencias para la conservación de la especie y su uso como biomarcador de TBT

Antecedentes. El sondeo del litoral gallego nos había mostrado que el imposex en *Nucella lapillus* en Galicia presentaba cierta variabilidad en su expresión, destacando la existencia de hembras con imposex pero sin pene (**Fig. 5, a**). Variabilidad que no aparecía en el Reino Unido pero sí se había encontrado en la Bretaña francesa, en el sector meridional del rango de distribución de este gasterópodo en el Atlántico europeo. Y que había llevado al grupo alemán de Stroben y colaboradores (Stroben *et al.*, 1991; Stroben *et al.*, 1992), a desarrollar una modificación del esquema de clasificación de desarrollo del VD original, propuesto en base a observaciones en el Reino Unido (Gibbs *et al.*, 1987), para adecuarlo a las variantes encontradas en el desarrollo de imposex. Sin embargo, no se había considerado la posibilidad de que esa variabilidad pudiera tener alguna conexión con diferencias entre individuos en su sensibilidad al TBT. Pese a que en 1993 se encontró una pequeña población superviviente de *Nucella lapillus* en una zona del SE de Inglaterra donde la contaminación por TBT había hecho desaparecer a la especie (Gibbs, 1993). Esta población incluía un porcentaje (10%) de machos con aparato genital incompleto (**Fig. 5, b**) por culpa de un defecto genético (Síndrome de Dumpton, SD). Ese defecto podía transmitirse a las hembras con imposex, las cuales se masculinizaban menos, impidiendo que el imposex las esterilizase y permitiendo así la supervivencia de la especie. El mismo fenómeno se encontró algo más tarde también en las inmediaciones del puerto de Brest (Huet *et al.*, 1996). Aunque su relevancia pasó desapercibida al parecer una anomalía restringida geográficamente a dos enclaves dentro del amplio rango de distribución de la especie.

Objetivos. Sin embargo, nuestro hallazgo de hembras con imposex pero sin pene en Galicia indicaba que el SD no se limitaba a esas dos zonas del litoral atlántico europeo. Es más, como en Galicia las poblaciones con este síndrome eran más frecuentes que en esas otras dos zonas, decidimos aprovechar la oportunidad que esto representaba para, estudiar más detalladamente su presencia y distribución geográfica en Galicia e indagar las posibles consecuencias del SD para proteger a la especie del TBT y para el uso del imposex como biomarcador de TBT (Barreiro *et al.*, 2000, Quintela *et al.*, 2002).

Protocolo. Para ello la base de datos de 36 localidades que teníamos del sondeo inicial se completó muestreando más localidades hasta un total de 56 todo a lo largo de la costa gallega.

Resultados y conclusiones. El primer problema con el que nos enfrentamos fue que los esquemas convencionales de desarrollo del VD no se ajustaban bien a lo que nosotros encontrábamos en Galicia, y no siempre cuantificaban adecuadamente la intensidad del imposex. Propusimos así una nueva versión modificada del sistema original, que además de ajustarse mejor a los casos que nosotros habíamos encontrado, mantenía un sentido biológico, al basarse sólo en el VD que es el rasgo del imposex que puede acabar esterilizando a las hembras, y es más sencillo y fácil de aplicar que otras versiones anteriores (**Fig. 5, c**).

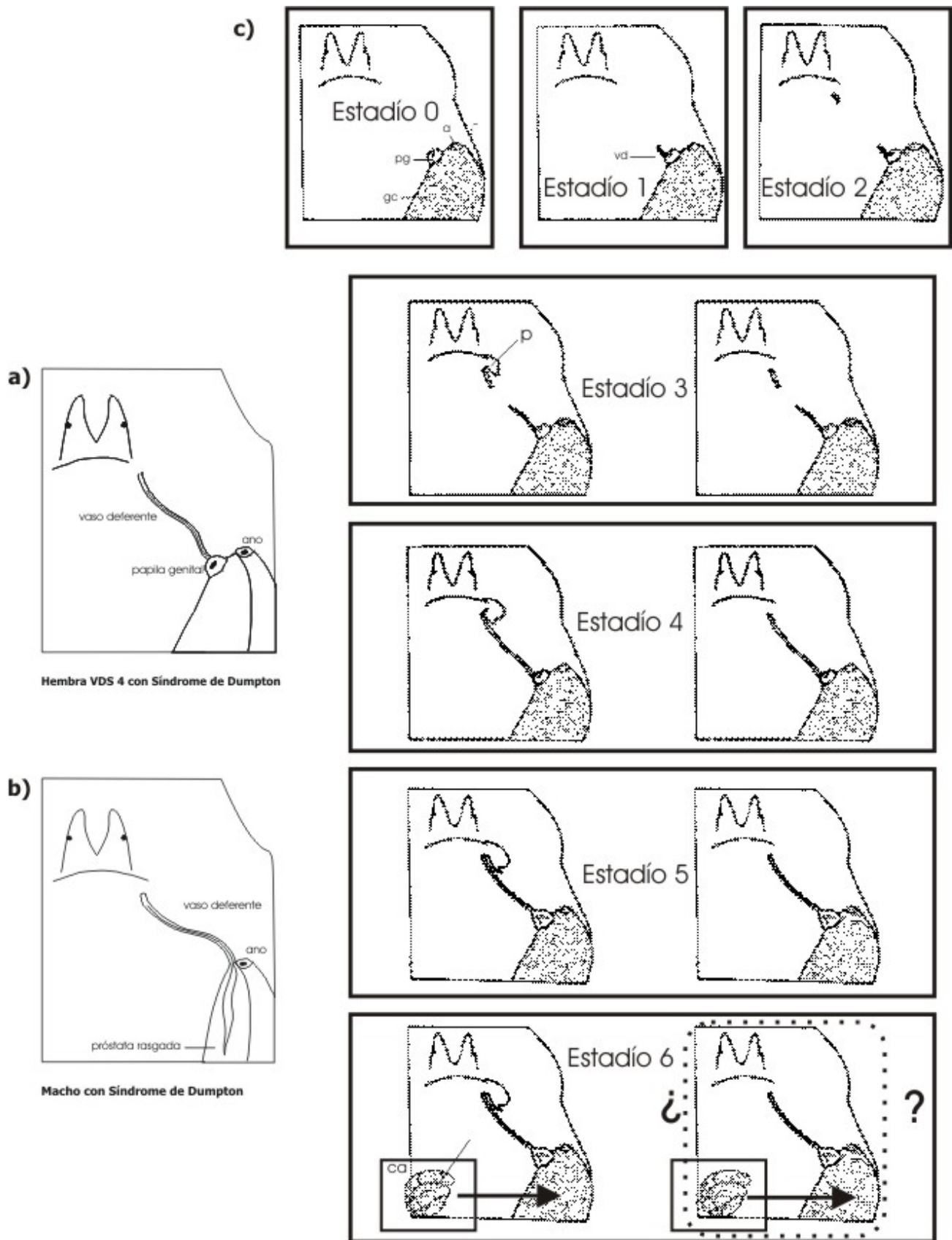


Figura 5. Síndrome de Dumpton (SD) en *Nucella lapillus*. a) Esquema de macho afectado por SD: afálico y con la próstata rasgada. b) Esquema de hembra VDS 4 afectada por SD: afálica y con el vaso deferente completo. c) Propuesta de esquema de la Secuencia del Vaso Deferente (VDS) basada sólo en el desarrollo del vaso deferente. Antes del estadio 3 los individuos afálicos y portadores de pene son indistinguibles. El estadio 6 afálico se muestra sólo como posibilidad porque no ha sido encontrado todavía (Barreiro et al., 1999). Abreviaturas: a (ano), ca (cápsulas abortadas), gp (gonoporo), p (pene), vd (vaso deferente).

La presencia de SD en Galicia estaba muy extendida por todo el litoral, encontrándose tanto machos como hembras afálicas dispersos por toda la región, sin patrón geográfico alguno (Fig. 6). La afalia femenina se podía encontrar en muchos más sitios que la masculina. Existiendo también diferencias entre sexos en el porcentaje de individuos afectados, nunca superando los machos el 20% (generalmente < 10%) mientras que se podían encontrar poblaciones con un 20-50% de hembras con SD. En cualquier caso, el síndrome se debía considerar un fenómeno de baja frecuencia incluso en las hembras (casi un 50% de poblaciones con < 10% de individuos afectados).

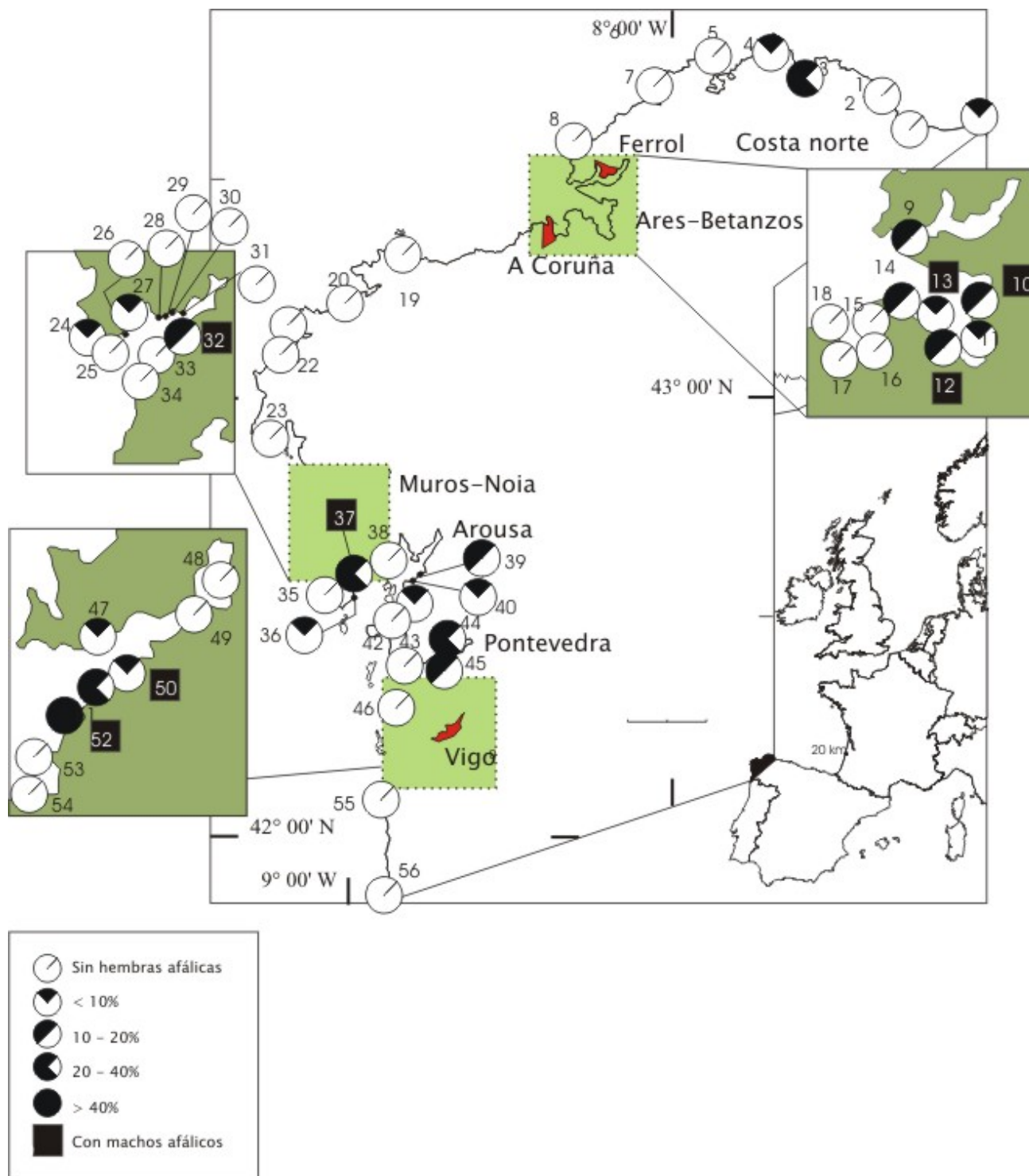


Figura 6. Síndrome de Dumpton (SD) en *Nucella lapillus*. Distribución y frecuencia de afalia femenina y masculina por localidad.

El imposex era la norma en la especie y un 90% de las hembras estaban en un estado de VDS de 4 ó 5, es decir con un VD totalmente desarrollado, que en algunas incluso impedía la reproducción. Sin embargo, en muchas localidades coexistían hembras sin imposex o con sólo imposex inicial con otras que sufrían ese imposex muy intenso, observación inusual en esta especie. Encontrando que la presencia de hembras sin nada o con poco imposex estaba significativamente ligada a la presencia de SD en la población, observación que reforzaba la visión del SD como protector de los efectos del TBT (Fig. 7, a).

Por otra parte, nuestros resultados también mostraban que el SD puede alterar la relación entre intensidad de imposex e intensidad de la contaminación. Relación usualmente considerada como muy homogénea justificando que la Comisión OSPAR recomiende el imposex en *Nucella lapillus* para monitorizar la contaminación por TBT en el Atlántico Noroccidental. Sirviendo así de llamada a atención sobre el correcto uso del imposex como biomarcador en esta especie en costas europeas.

Antecedentes Por otra parte, las experiencias con los trasplantes y el examen de un gran número de individuos nos había llevado a sospechar que el SD podía proteger de los efectos del TBT no sólo favoreciendo que las hembras presentase un imposex menos intenso sino también su VD fuese más delgado y por tanto más difícil que impidiese el funcionamiento de la papila genital.

Objetivo. Realizamos así un pequeño estudio que demostrase cuantitativamente esas apreciaciones subjetivas comparando el calibre del VD de individuos con SD con el de individuos sin este síndrome.

Protocolo. Recogiendo un gran número de individuos en 3 sitios con SD y 3 sin SD para medir el calibre de su VD.

Resultados y conclusiones. Los resultados obtenidos confirmaban nuestras apreciaciones subjetivas, siendo el calibre del VD claramente mayor en las hembras sin SD, triplicando, en valores medios, al de las hembras Dumpton (Fig. 7, b). Igualmente, el VD de los machos normales duplicaba al de los machos Dumpton (Fig. 7, c). Además, con frecuencia el calibre en hembras (sin SD) superaba, hasta duplicarlo o incluso cuadruplicarlo, el de los machos, destacando que este órgano masculino cuando aparece en las hembras tiene un desarrollo anormal que facilita la esterilización. Por tanto, nuestros resultados explicaban por qué el porcentaje de hembras estériles era claramente menor en los individuos con SD que en los que no lo tienen. El menor calibre del VD en las hembras Dumpton hacía menos probable que ese vaso interfiriese con el normal funcionamiento de la papila genital.

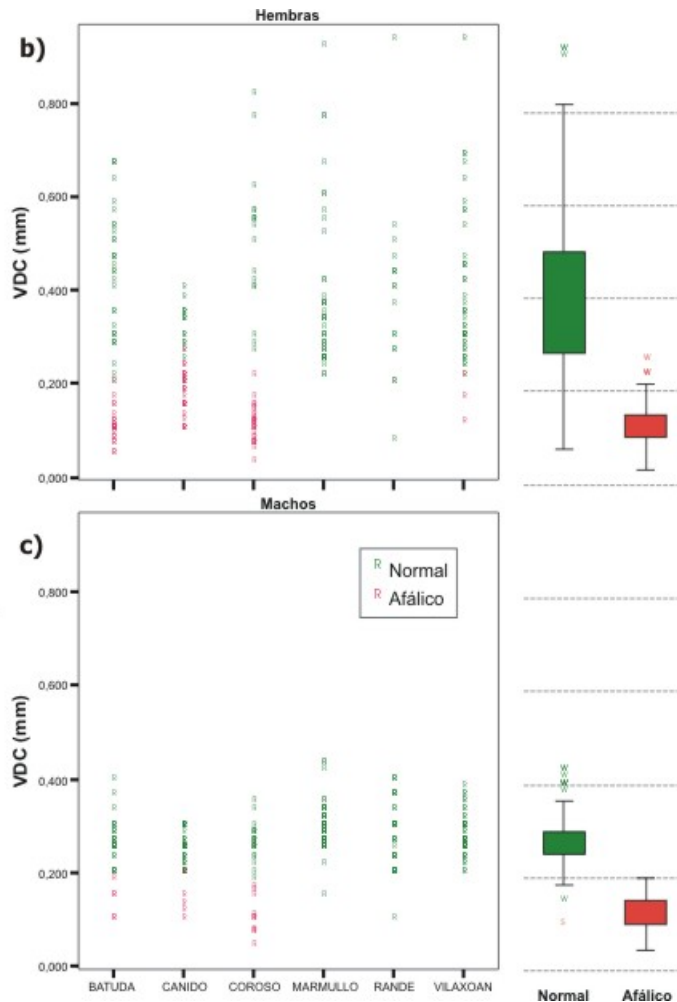
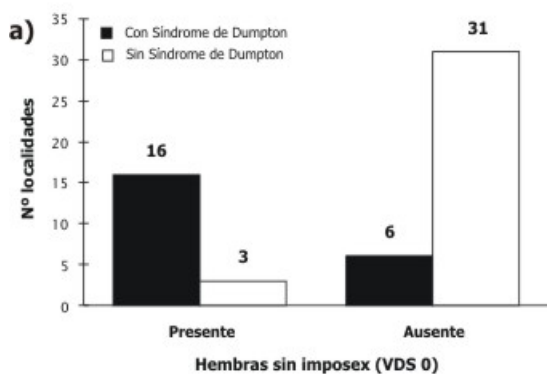


Figura 7. Síndrome de Dumpton (SD) en *Nucella lapillus*. a) No-independencia entre presencia de hembras con SD y ausencia de imposex (i.e. VDS 0). Se indica el número de localidades muestreadas. Afaia femenina presente se refiere a puntos donde existen hembras con VD bien desarrollado (VDS 3 a 5) pero carentes de pene. El valor p del test chi-cuadrado con corrección de Yates es <0.0001 . b-c) Diferencias en el calibre del vaso deferente entre individuos afectados (en rojo) y no afectados (en verde) por el Síndrome de Dumpton. Valores individuales del calibre del vaso deferente (VDC) de hembras (b) y machos (c) por localidad. Los gráficos de caja adyacentes resumen los valores totales para cada sexo.

Imposex en otras especies: *Nassarius reticulatus*

Antecedentes. Aunque *Nucella lapillus* es un excelente indicador de TBT, no permite cubrir todo el litoral pues no habita costas sin sustrato rocoso intermareal, ni zonas de baja salinidad, ni con alta contaminación por TBT. Para esos casos existe otra opción, y es usar especies alternativas como el *Nassarius reticulatus* (**Fig. 8, a**) que también desarrolla imposex y sí suele habitar esos lugares.

Objetivo/interés del estudio. Con la intención de tener más información sobre el nivel de contaminación en esas zonas, hicimos un sondeo del imposex y la bioacumulación en *Nassarius reticulatus*, centrado principalmente en las dos rías en las que habíamos detectado una presencia importante de TBT con los trasplantes (Barreiro *et al.*, 2001). Muestreando también, a efectos comparativos, sitios en la ría de Vigo (otra ría con tráfico comercial intenso) y varios puntos en las de Betanzos y Muros, a modo de referencia de una zona menos contaminada. La sorpresa fue que durante este sondeo encontramos que en algunos sitios una parte apreciable de las hembras contenían masas de cápsulas de huevos abortadas que indicaban que eran estériles (**Fig. 8, b**). Hallazgo inesperado que llevó a un análisis más detallado tratando de descubrir si el imposex podía tener alguna relación con la esterilidad.

Protocolo. El imposex se cuantificó siguiendo la metodología convencional. Sin embargo, tras examinar las primeras muestras nos percatamos de que la masculinización en esta especie parecía afectar también a la sección más interna del gonoducto femenino (la sección gonadal). Por tanto, ensayamos una tercera estima del grado de masculinización basada en el aspecto de esa zona del gonoducto femenino.

Resultados y conclusiones. Los resultados mostraron que, como ocurría con *Nucella lapillus*, el imposex era la norma en todas las localidades afectando al 100% de las hembras en la mayor parte de los sitios estudiados. Aunque destacaban las 3 rías con grandes puertos comerciales (Ferrol, A Coruña y Vigo). Comparando con otras zonas de Europa, la conclusión general era que el TBT estaba presente en todas las zonas trabajadas en niveles comparables a los que se podían encontrar en cualquier otra zona del litoral Europeo con fuentes de TBT como puertos. Pero que además no se limita a las inmediaciones de grandes puertos como en ocasiones sugieren los datos obtenidos en otras zonas del mundo.

La masculinización de la sección interna del gonoducto afectaba $> 25\%$ de las hembras, claramente asociado a la intensidad del imposex. Esta deformación tendía a aparecer sólo en hembras con un VD totalmente desarrollado (**Fig. 8, c**), apoyando la idea inicial de que las deformaciones del gonoducto interno se debían también al TBT. Por otra parte, indicaba que se trataba de un síntoma "tardío" de masculinización que aparecía sólo cuando las hembras ya se habían visto expuestas a una contaminación fuerte por TBT. Proponiéndose además que el grado de masculinización de esa zona interna podía ser un índice más útil para discriminar entre sitios muy contaminados que los índices convencionales de imposex.

Hasta la fecha se pensaba que *Nassarius reticulatus* era una de esas especies de gasterópodo en la que el imposex nunca podía llevar a la esterilidad. Sin embargo, nosotros no sólo encontrábamos hembras estériles sino que en los sitios en que aparecían las encontrábamos con cierta facilidad, y sus porcentajes iban de un 4-26% (**Fig. 8, d**). Aparecieron sólo en localidades de Ferrol y A Coruña, ambas rías con fuerte contaminación por TBT. Se trataba siempre de hembras con un grado máximo de imposex. Indicando nuestros resultados que el porcentaje de esterilidad se relacionaba significativamente con la intensidad del imposex, lo que sugería que esa esterilidad podía estar de alguna manera relacionada o bien con el imposex, o bien con los efectos del TBT.

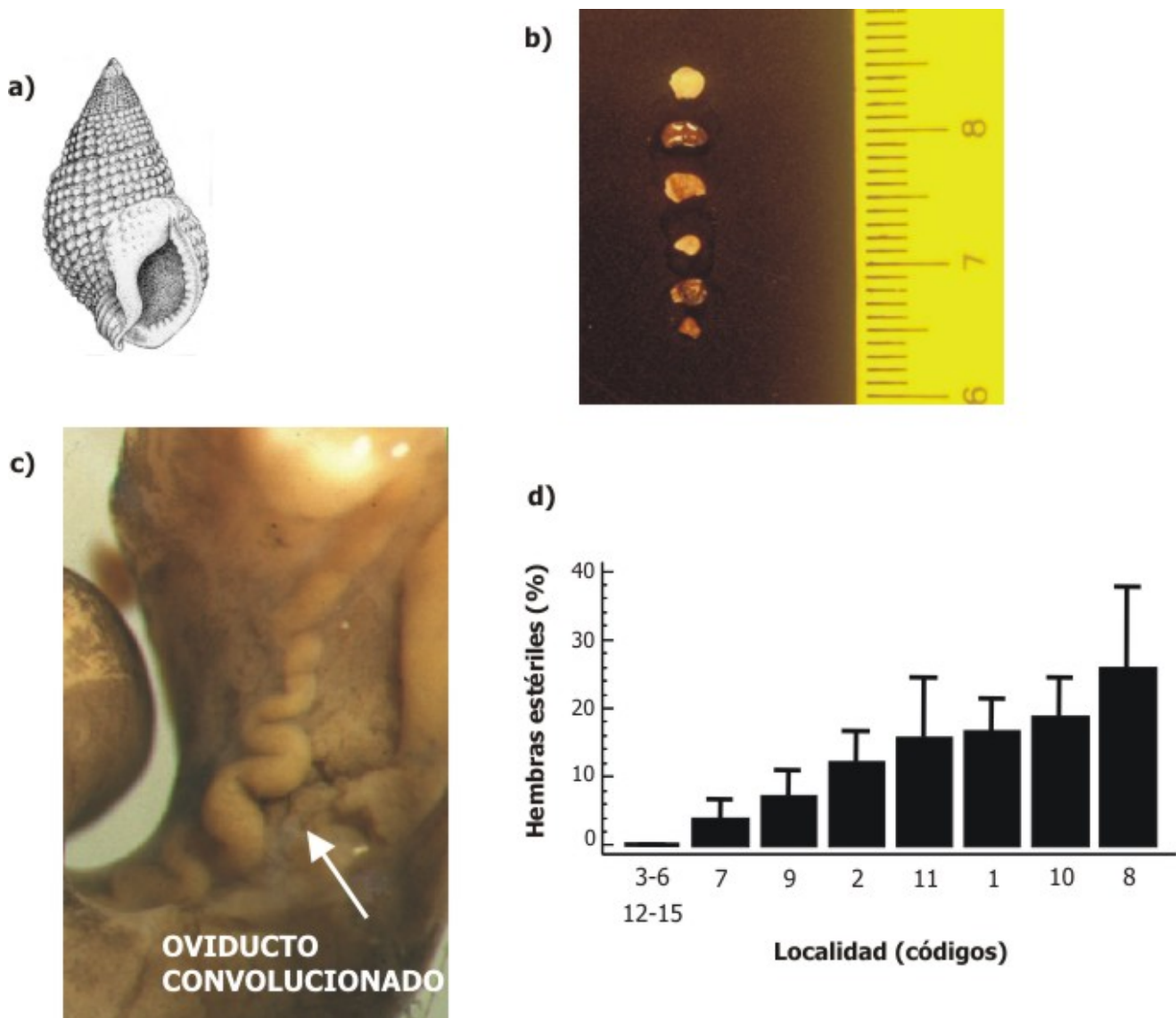


Figura 8. Imposex en *Nassarius reticulatus*. a) Dibujo de un espécimen. b) Cápsulas abortadas encontradas en el interior de la glándula de la cápsula. c) Oviducto convolucionado de una hembra fuertemente afectada por imposex. d) Porcentaje de hembras estériles por localidad.

Un paso adelante: potencial para la recuperación de *Nucella Lapillus* evaluado con técnicas moleculares

Antecedentes. Desde que a finales de los 1970s empezó a percibirse que el TBT de las pinturas anti-incrustantes provocaba efectos perjudiciales en el medio ambiente, se han ido adoptando medidas legislativas, que generalmente han consistido en la prohibición del uso de estas pinturas en embarcaciones de menos de 25 m de eslora. Prohibición parcial que comúnmente se aplica en los países en los que existe legislación al respecto. A finales del 2001, la Organización Marítima Internacional aprobó un Convenio Internacional que fijaba el 1 de enero de 2003 como fecha tope para seguir aplicando pinturas con TBT a barcos, de manera que para el 1 de enero de 2008 no quede ningún barco pintado con TBT (International Maritime Organization, 2001).

Objetivos. Por tanto, la situación previsible de cara al futuro es que la contaminación por TBT tienda a disminuir. Ante esta situación, nos planteamos un estudio para evaluar la capacidad potencial de *Nucella lapillus* para recolonizar áreas de donde había desaparecido por culpa de la contaminación por TBT. Anteriormente otros investigadores habían visto que el descenso de las concentraciones ambientales de TBT ocurrido gracias a la prohibición parcial estaba relacionado con una reducción de la intensidad del imposex y una mejora de la capacidad de reproducción en *N. lapillus* (Evans *et al.*, 1991, Evans *et al.*, 1995, Evans *et al.*, 1996). Sin embargo, muy pocos estudios habían presentado evidencias de que *N. lapillus* hubiese recolonizado zonas donde había desaparecido por culpa del TBT, tal vez debido a que es un gasterópodo al que se le supone una capacidad de dispersión limitada por falta de fase planctónica en su ciclo vital.

Protocolo. La capacidad de dispersión se estimó recurriendo a métodos indirectos que se basan en cuantificar el grado de diferenciación genética entre poblaciones bajo el supuesto de que mayor diferenciación corresponde a menor capacidad de dispersión (Quintela, 2002). Como datos moleculares para estimar esa diferenciación genética utilizamos marcadores RAPDs (*Random Amplified Polymorphic DNA*) en 6 poblaciones de *Nucella lapillus* elegidas por pares en tres rías y distantes desde 4 km hasta más de 300 km de costa (**Fig. 9, a**).

Resultados. Los resultados obtenidos mostraban que nuestras poblaciones estaban muy diferenciadas genéticamente, con un valor total de F_{ST} de más de 0.4 que claramente correspondía a un flujo genético muy reducido (**Fig. 9, b**). La correlación significativa entre distancia genética y distancia geográfica entre poblaciones junto con la coherencia entre los grupos de poblaciones de un análisis *cluster* (**Fig. 9, c**) basado en distancias genéticas y la posición geográfica de esas poblaciones nuestros datos indicaban que la dispersión en *Nucella lapillus* se encontraba limitada por aislamiento por distancia: las diferencias genéticas entre poblaciones aumentan cuanto mayor es la distancia geográfica entre éstas. De hecho, sólo se podía sospechar un cierto intercambio de individuos, aunque reducido, en el caso de las dos poblaciones que estaban más cerca la una de la otra. Lo que sugiere que la dispersión en esta especie seguramente se limita a distancias más o menos cortas entre poblaciones adyacentes.

De modo que los resultados eran típicos de una especie poco móvil, y coherentes con el tipo de desarrollo larvario de *Nucella lapillus* y carácter sedentario de sus individuos. Resultados que sugieren que *Nucella lapillus* tendrá dificultades para recolonizar áreas más o menos alejadas de potenciales poblaciones fuente.

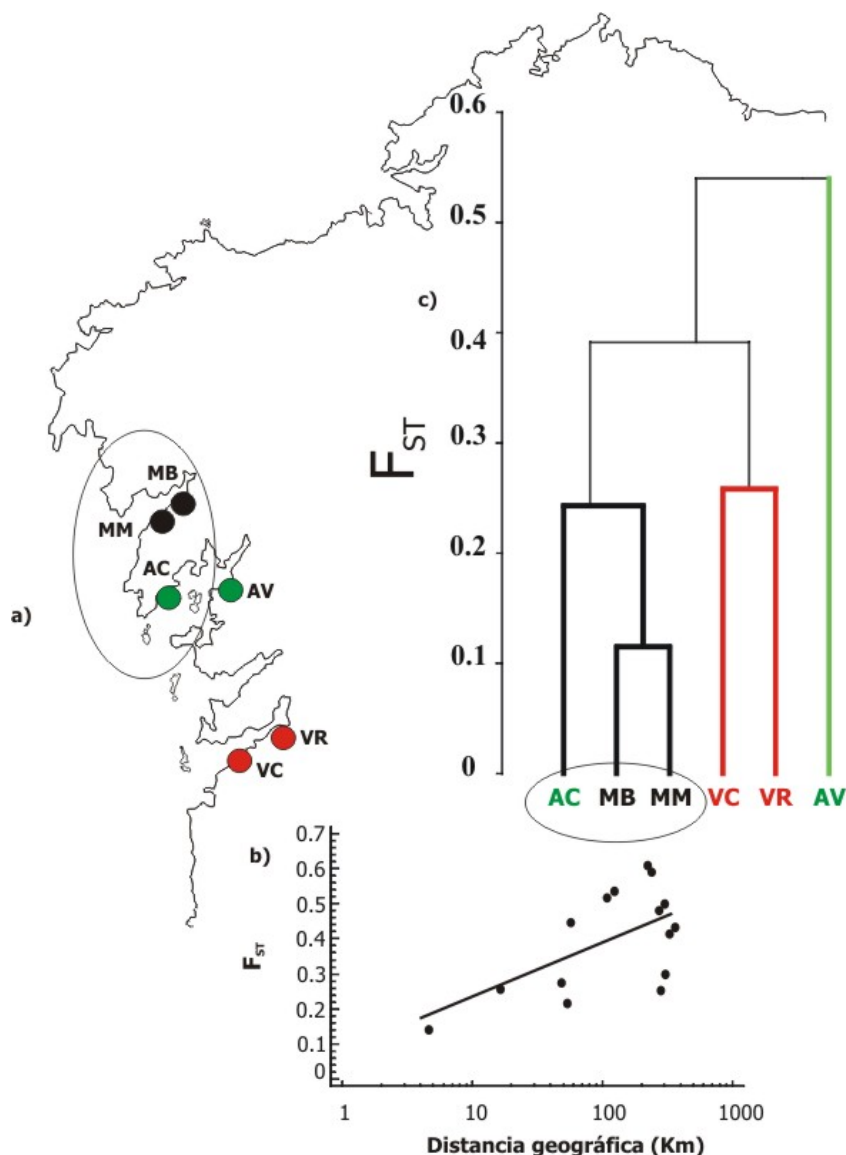


Figura 9. Estructura de población en *Nucella lapillus* estimada mediante RAPD. a) Situación de las seis localidades estudiadas. b) Relación entre el grado de estructuración (F_{ST}) y la distancia geográfica entre pares de poblaciones. c) Dendrograma UPGMA basado en F_{ST} entre poblaciones.

Referencias

- Alzieu, C. 1986. TBT detrimental effects on oyster culture in France - Evolution since antifouling paint regulations. En *Proceedings of Oceans'86, Vol 4, International Organotin Symposium* pp. 1130-1134. IEEE Publishing Services, New York.
- Alzieu, C. 1996. Biological effects of tributyltin on marine organisms. En *Tributyltin: case study of an environmental contaminant* (de Mora, S. J., editor. pp. 167-211. Cambridge University Press, Cambridge.
- Alzieu, C. 2000. Impact of tributyltin on marine invertebrates. *Ecotoxicology* 9:71-76.
- Barreiro, R., González, R., Quintela, M. y Ruiz, J. M. 2001. Imposex, organotin bioaccumulation and sterile females in *Nassarius reticulatus* from polluted areas of NW Spain. *Marine Ecology Progress Series* 218:203-212.
- Barreiro, R., Quintela, M. y Ruiz, J. M. 1999. Aphally and imposex in *Nucella lapillus* from Galicia (NW Spain): incidence, geographical distribution and consequences for the biomonitoring of TBT contamination. *Marine Ecology Progress Series* 185:229-238.
- Barreiro, R., Quintela, M. y Ruiz, J. M. 2000. Aphally and imposex in *Nucella lapillus* (L.) from Galicia (NW Spain): incidence and consequences for the monitoring of TBT contamination. Pages 129-130 en 3º Congreso Ibérico de Contaminación y Toxicología Ambiental. Universidade do Algarve, Faro, Portugal.
- Barreiro, R., Ruiz, J. M. y Quintela, M. 1998. Respuesta a la contaminación por TBT en individuos trasplantados de *Nucella lapillus* (L.) desde zonas poco contaminadas a los puertos de Ferrol y A Coruña. *Cuadernos de Investigación Biológica (Bilbao)* 20:279-282.
- Batley, G. 1996. The distribution and fate of tributyltin in the marine environment. En *Tributyltin: case study of an environmental contaminant* (de Mora, S. J., editor. pp. 139-166. Cambridge University Press, Cambridge.
- Bennett, R. F. 1996. Industrial manufacture and applications of tributyltin compounds. En *Tributyltin: case study of an environmental contaminant* (de Mora, S. J., editor. pp. 21-61. Cambridge University Press, Cambridge.
- Bryan, G. W., Burt, G. R., Gibbs, P. E. y Pascoe, P. L. 1993. *Nassarius reticulatus* (Nassariidae: Gastropoda) as an indicator of tributyltin pollution before and after TBT restrictions. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 73:913-929.
- Bryan, G. W., Gibbs, P. E., Burt, G. R. y Hummerstone, L. G. 1987. The effects of tributyltin (TBT) accumulation on adult dogwhelks, *Nucella lapillus*: long-term field and laboratory experiments. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 67:525-544.
- Bryan, G. W., Gibbs, P. E., Hummerstone, L. G. y Burt, G. R. 1986. The decline of the gastropod *Nucella lapillus* around South-West England: evidence for the effect of tributyltin from antifouling paints. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 66:611-640.
- Champ, M. A. 2000. A review of organotin regulatory strategies, pending actions, related costs and benefits. *The Science of the Total Environment* 258:21-71.
- Colborn, T. y Thayer, K. 2000. Aquatic ecosystems: Harbingers of endocrine disruption. *Ecological Applications* 10:949-957.
- Colborn, T., von Saal, F. S. y Soto, A. M. 1993. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environmental Health and Perspectives* 101:378-384.
- de Mora, S. J. 1996. The tributyltin debate: ocean transportation versus seafood harvesting. En *Tributyltin: case study of an environmental contaminant* (de Mora, S. J., editor. pp. 1-20. Cambridge University Press, Cambridge.
- Evans, S. M., Evans, P. M. y Leksono, T. 1996. Widespread recovery of dogwhelks, *Nucella lapillus* (L.), from tributyltin contamination in the North Sea and Clyde Sea. *Marine Pollution Bulletin* 32:263-269.
- Evans, S. M., Hutton, A., Kendall, M. A. y Samosir, A. M. 1991. Recovery in populations of dogwhelks *Nucella lapillus* (L.)

suffering from imposex. *Marine Pollution Bulletin* 22:331-333.

Evans, S. M., Leksono, T. y McKinnell, P. D. 1995. Tributyltin pollution: a diminishing problem following legislation limiting the use of TBT-based anti-fouling paints. *Marine Pollution Bulletin* 30:14-21.

Fent, K. 1996. Ecotoxicology of organotin compounds. *Critical Reviews in Toxicology* 26:1-117.

Gibbs, P. E. 1993. A male genital defect in the dog-whelk, *Nucella lapillus* (Neogastropoda), favouring survival in a TBT-polluted area. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 73:667-678.

Gibbs, P. E., Bebianno, M. J. y Coelho, M. R. 1997. Evidence of the differential sensitivity of neogastropods to tributyltin (TBT) pollution, with notes on a species (*Columbella rustica*) lacking the imposex response. *Environmental Technology* 18:1219-1224.

Gibbs, P. E. y Bryan, G. W. 1986. Reproductive failure in populations of the dog-whelk, *Nucella lapillus*, caused by imposex induced by tributyltin from antifouling paints. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 66:767-777.

Gibbs, P. E. y Bryan, G. W. 1994. Biomonitoring of Tributyltin (TBT) Pollution using the Imposex Response of Neogastropod Molluscs. En *Biomonitoring of Coastal Waters and Estuaries* (Kramer, K. J. M., editor. pp. 205-226. CRC Press, Inc., Boca Raton.

Gibbs, P. E. y Bryan, G. W. 1996. TBT-induced imposex in neogastropod snails: masculinization to mass extinction. En *Tributyltin: case study of an environmental contaminant* (de Mora, S. J., editor. pp. 212-236. Cambridge University Press, Cambridge.

Gibbs, P. E., Bryan, G. W., Pascoe, P. L. y Burt, G. R. 1987. The use of the dog-whelk, *Nucella lapillus*, as an indicator of tributyltin (TBT) contamination. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 67:507-523.

Huet, M., Paulet, Y. M. y Le Penneec, M. 1996. Survival of *Nucella lapillus* in a tributyltin-polluted area in west Brittany: a further example of a male genital defect (Dumpton syndrome) favouring survival. *Marine Biology* 125:543-549.

International Maritime Organization. 1999. Anti-fouling systems, moving towards the non-toxic solution. Focus on IMO International Maritime Organization, London, UK.

International Maritime Organization. 2001. International Convention on the Control of Harmful Anti-fouling Systems on Ships. en.

Laughlin, R. B., French, W. y Guard, H. E. 1986. Accumulation of bis(tributyltin) oxide by the marine mussel *Mytilus edulis*. *Environmental Science and Technology* 20:884-890.

Lee, R. F. 1991. Metabolism of tributyltin by marine animals and possible linkages to effects. *Marine Environmental Research* 32:29-35.

Maguire, R. J. 2000. Review of the persistence, bioaccumulation and toxicity of tributyltin in aquatic environments in relation to Canada's toxic substances management policy. *Water Quality Research Journal of Canada* 35:633-679.

Matthiessen, P. y Gibbs, P. E. 1998. Critical appraisal of the evidence for tributyltin-mediated endocrine disruption in mollusks. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17:37-43.

Michel, P. y Averty, B. 1999. Contamination of French Coastal Waters by Organotin Compounds - 1997 Update. *Marine Pollution Bulletin* 38:268-275.

Oehlmann, J., Stroben, E. y Fioroni, P. 1996. New facts about TBT-induced imposex in prosobranchs: general aspects. *Malacological Review Supplement* 6:149-155.

OSPAR Commission. 2000. OSPAR Background Document on Organic Tin Compounds. OSPARCOM, London.

Quintela, M. 2002. *Nucella lapillus* (L.) en Galicia: Imposex como Biomarcador de Contaminación por TBT y Estructura de la Población. PhD Thesis. Universidade da Coruña, A Coruña.

- Quintela, M., Barreiro, R. y Ruiz, J. M. 2000. The use of *Nucella lapillus* (L.) transplanted in cages to monitor tributyltin (TBT) pollution. *The Science of the Total Environment* 247:227-237.
- Quintela, M., Barreiro, R. y Ruiz, J. M. 2002. Dumpton Syndrome reduces tributyltin (TBT) sterilising effect on *Nucella lapillus* (L.) by limiting the development of imposed vas deferens. *Marine Environmental Research* 54:657-660.
- Ruiz, J. M., Quintela, M. y Barreiro, R. 1998. Ubiquitous imposex and organotin bioaccumulation in gastropods *Nucella lapillus* (L.) from Galicia (NW Spain): A possible effect of nearshore shipping. *Marine Ecology Progress Series* 164:237-244.
- Sarradin, P. M., Astruc, A., Desauziers, V., Pinel, R. y Astruc, M. 1991. Butyltin pollution in surface sediments of Arcachon Bay after ten years of restricted use of TBT-based paints. *Environmental Technology* 12:537-543.
- Seligman, P. F., Maguire, R. J., Lee, R. F., Hinga, K. R., Valkirs, A. O. y Stang, P. M. 1996. Persistence and fate of tributyltin in aquatic ecosystems. En *Organotin: environmental fate and effects* (Champ, M. A. y Seligman, P. F., editors), pp. 430-457. Chapman & Hall, London.
- Smith, B. S. 1980. The estuarine mud snail, *Nassarius obsoletus*: abnormalities in the reproductive system. *Journal of Molluscan Studies* 46:247-256.
- Smith, B. S. 1981. Tributyltin compounds induce male characteristics on female mud snails *Nassarius obsoletus*= *Ilyanassa obsoleta*. *Journal of Applied Toxicology* 1:141-144.
- Stroben, E., Oehlmann, J. y Bettin, C. 1991. TBT-induced imposex and the role of steroids in marine snails. Pages 68-73 en Tenth World Meeting of the Organotin Environmental Programme Association, Berlin.
- Stroben, E., Oehlmann, J. y Fioroni, P. 1992. The morphological expression of imposex in *Hinia reticulata* (Gastropoda: Buccinidae): a potential indicator of tributyltin pollution. *Marine Biology* 113:625-636.
- Valkirs, A. O., Davidson, B., Kear, L. L. y Fransham, R. L. 1991. Long-term monitoring of tributyltin in San Diego Bay, California. *Marine Environmental Research* 32:151-167.
- Waite, M. E., Thain, J. E., Waldock, J. M., Cleary, J. J., Stebbing, A. R. D. y Abel, R. 1996. Changes in concentrations of organotins in water and sediment in England and Wales following legislation. En *Organotin* (Champ, M. A. y Seligman, P. F., editors), pp. 553-580. Chapman & Hall, London, UK.