UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

# Variación en la forma y estructura de la concha de neogastrópodos del Caribe colombiano, asociada al fenómeno de imposex

**Jeimmy Paola Rico Mora**

Universidad Nacional de Colombia Sede Caribe
Instituto de Estudios en Ciencias del Mar – CECIMAR
Convenio Universidad Nacional de Colombia - INVEMAR
Santa Marta D.T.C.H., Colombia
2017

# Variación en la forma y estructura de la concha de neogastrópodos del Caribe colombiano, asociada al fenómeno de imposex

**Jeimmy Paola Rico Mora**

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

**Magister en Ciencias - Biología**

Director:

Dr. rer. nat. Néstor Hernando Campos Campos

Codirectora:

Dra. rer. nat. Adriana Bermúdez Tobón

Línea de Investigación:

Ecología de invertebrados marinos, contaminación ambiental marina

Grupo de Investigación:

Fauna Marina Colombiana: Biodiversidad y Usos

Universidad Nacional de Colombia Sede Caribe

Instituto de Estudios en Ciencias del Mar – CECIMAR

Convenio Universidad Nacional de Colombia - INVEMAR

Santa Marta D.T.C.H., Colombia

2017

*A Carlos Arturo mi amado esposo, a mis padres Adsenet y Luis Paulino, a mis hermanos Lizeth Viviana, María Paula y Juan David, y a mi mejor amigo Pegaso dedico este trabajo, fruto de su paciencia apoyo y comprensión.*

# Agradecimientos

Quiero agradecer a la Universidad Nacional de Colombia Sede Caribe por la financiación de salidas de campo y trabajo en laboratorio por medio de los proyectos “Efecto tributilo de estaño gasterópodos del caribe, el imposex” (Cód. HERMES 2747) y “Fortalecimiento de la relación entre el grupo fauna marina biodiversidad y usos y el posgrado en Ciencias Biologia linea Biología Marina” (Cód. HERMES 32267). De igual manera agradezco a la Universidad y a COLCIENCIAS por el apoyo que me brindaron a través de la beca-pasantía del Programa Nacional de Jóvenes Investigadores e innovadores - 2015 (Convenio No. 0567-2015). Al consejo Profesional de Biología especial agradecimiento por otorgarme la beca de investigación CPBiol-2015 por un valor de cinco millones de pesos colombianos M/cte ($5.000.000) (contrato No. 06 de 2015). Esta investigación se desarrolló con el permiso Marco de la Universidad Nacional de Colombia de Recolección de Diversidad Biológica y el permiso de Recolección de muestras biológicas expedido por Parques Nacionales Naturales.

A mi director Dr. rer. nat. N.H. Campos Campos y a mi codirectora Dr. rer. nat. A. Bermúdez Tobón especial agradecimiento por su apoyo, dedicación, paciencia y direccionamiento durante el desarrollo de la tesis. Al Dr. G. Bigatti y a la Dr. E.J. Márquez gracias por sus comentarios y sugerencias. Quiero agradecer a mis amigos y compañeros del posgrado en Ciencias-Biología, especialmente a M. Benavides Serrato, G.J. Orozco Berdugo, K.J. Mejía Quintero y R.O. Rodríguez, gracias por su apoyo en campo, laboratorio y acompañamiento durante la maestría y el desarrollo de la tesis. Agradezco a los docentes y personal del laboratorio de Biología y Ecología Marina de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá por brindarme un espacio de trabajo. Al Dr. H. Meneses gracias por su apoyo en la toma de las tomografías y a M. Calle por su colaboración durante el trabajo en el SEM. Agradezco al equipo de consultoría del departamento de Estadística de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá. A toda mi familia gracias por el apoyo y paciencia que tuvieron durante todo este proceso de formación, gracias por creer en mí.

# Resumen

Alteraciones fenotípicas en la concha de neogasterópodos han sido relacionadas con el imposex, que es el desarrollo de caracteres sexuales masculinos en hembras de gasterópodos por contaminación de tributilo de estaño TBT. Para Colombia sólo se ha reportado imposex en *Stramonita haemastoma* y no se tiene conocimiento sobre efectos relacionados con este fenómeno. El objetivo fue determinar el grado de alteración en la forma y estructura de la concha asociados al fenómeno de imposex en las especies *Plicopurpura patula* y *Thais deltoidea* del Caribe colombiano. Se recolectaron ejemplares en ocho litorales rocosos de los departamentos de La Guajira, Magdalena y Bolívar. Los organismos fueron sexados, medidos y pesados. Se estimó el grado de imposex, la longitud promedio del pene en hembras (FPL) y el índice de la longitud relativa del pene en hembras (RPLI) y sus estándar, el índice de la secuencia del vaso deferente (VDSI) y la frecuencia de imposex (%I). Para comparar la forma de la concha de *P. patula* en cuatro estaciones se utilizó morfometría geométrica. La densidad de las conchas fue analizada con tomografía computarizada simple y se utilizó microscopía electrónica de barrido para observar la microestructura del labio externo de la concha. Los índices evidencian desarrollo de imposex grado I en *P. patula* y de grados I y II en *T. deltoidea* para las estaciones Marina (I > 95%) y Muelle (I=25% - 11.11%). Se encontraron diferencias significativas en el tamaño y la forma de la concha de los individuos de estaciones con y sin imposex (P valores < 0.0001, pruebas t y MANOVA NP). En estaciones con imposex se presentaron conchas alargadas con aberturas estrechas y espira larga, mientras que en zonas sin afectación las conchas fueron globosas con abertura ancha y espira corta. *Plicopurpura patula* presentó conchas frágiles con disminución en el grosor de dos capas de la concha y densidades bajas en Marina (698.03 - 559.49 UH) y Muelle (1017 - 804.50 UH), en las demás estaciones se registraron densidades > 1200 UH. Para *T. deltoidea* no se registraron alteraciones estructurales o cambios en la densidad relacionados con la presencia de imposex. Los resultados permiten concluir que las dos especies presentan

un gado de imposex similar, no obstante, las alteraciones de la concha con relación al imposex difieren entre especies, siendo *P. patula* la que presenta mayor alteración.

**Palabras clave: Imposex, Plicopurpura patula, Thais deltoidea, forma de la concha, microestructura de la concha, densidad de la concha, morfometría geométrica, TBT.**

# Abstract

Imposex has been related to phenotypic alterations in the neogastropod shell. Imposex is the development of male sexual characteristics in females of gastropods due to tributyltin (TBT) contamination. In Colombia, imposex has been reported in *Stramonita haemastoma*, and there is no knowledge of effects related to this phenomenon. The objective of this work was to determine the degree of shape and structure shell alteration associated with imposex phenomenon in the species *Plicopurpura patula* and *Thais deltoidea* from Colombian Caribbean. Specimens were collected in eight rocky shores of the La Guajira, Magdalena and Bolívar departments. The organism were sexed, measured and weighed. The degree of imposex, the mean penis length in females (FPL), the relative female penis length index (RPLI) and the standardized indexes, the vas deferens index (VDSI) and the imposex frequency (% I) were estimated. Geometric morphometry was used to compare the shape of the *P. patula* shell in four stations. The shell density was analyzed with computed tomography and scanning electron microscopy was used to observe the microstructure of the external lip of the shell. Indices show imposex development grade I in *P. patula* and grades I and II in *T. deltoidea* for Marina (I> 95%) and Muelle (I = 25% - 11.11%) stations. Significant differences were found in size and shape shells of individuals from stations with and without imposex (P values <0.0001, t tests and MANOVA NP). Elongated shells with narrow aperture-shell and elongated spire were found in stations with imposex, while in areas without affectation the shells were globose with wide aperture-shell and short spire. *Plicopurpura patula* presented fragile shells with decrease in thickness of two layers shell and low densities in Marina (698.03 - 559.49 UH) and Muelle (1017 - 804.50 UH), the other stations recorded density > 1200 UH. For *T. deltoidea* were not recorded structural alterations or density changes related to imposex. The results allow us to conclude that the two species present a similar imposex degree, however, the shell alterations associated to imposex differ between species, being *P. patula* the one that presents greatest alteration.

**Keywords: Imposex, *Plicopurpura patula*, *Thais deltoidea*, shell shape, shell microstructure, shell density, geometric morphometry, TBT.**

# Contenido

**Pág.**

**Resumen** ..... **IX**

**Lista de figuras** ..... **XV**

**Lista de tablas** ..... **XVIII**

**Lista de Símbolos y abreviaturas** ..... **XIX**

**Introducción** ..... **1**

**1. Variación morfológica de la concha en relación al grado de imposex en dos neogasterópodos del Caribe colombiano** ..... **5**
1.1 Introducción ..... 5
1.2 Metodología ..... 6
1.2.1 Área de estudio ..... 6
1.2.2 Muestreo ..... 9
1.2.3 Biometría e imposex ..... 9
1.2.4 Morfometría geométrica ..... 10
1.3 Resultados ..... 13
1.3.1 Biometría e imposex ..... 13
1.3.2 Morfometría geométrica ..... 20
1.4 Discusión ..... 29
1.4.1 Biometría e imposex ..... 29
1.4.2 Forma de la concha ..... 31
1.5 Conclusiones y recomendaciones ..... 33
1.5.1 Conclusiones ..... 33
1.5.2 Recomendaciones ..... 34

**2. Variación estructural de la concha con relación al grado de imposex** ..... **35**
2.1 Introducción ..... 35
2.2 Metodología ..... 36
2.2.1 Densidad de la concha ..... 36
2.2.2 Estructura de la concha ..... 37
2.2.3 Análisis estadístico ..... 37
2.3 Resultados ..... 38
2.3.1 Densidad de la concha ..... 38
2.3.2 Estructura de la concha ..... 52
2.4 Discusión ..... 58
2.5 Conclusiones ..... 61

**3. Conclusiones y recomendaciones ..... 62**
3.1.1 Conclusiones ..... 62
3.1.2 Recomendaciones ..... 63

**Bibliografía ..... 65**

# Lista de figuras

**Pág.**

**Figura 1-1:** Sitios de muestreo en el Caribe continental central y norte de Colombia. CV Cabo de la Vela, BN Bahía Neguange, BC, Bahía Concha, PB Punta Betín, MS Marina de Santa Marta, TB Tierrabomba, ML Muelle de Tierrabomba, BH Bocachica. ..... 7

**Figura 1-2:** Ubicación de los 20 hitos anatómicos tipo I y II empleados como coordenadas de referencia para las conchas de *P. patula* de cuatro estaciones de muestreo (Marina de Santa Marta, Punta de Betín, Bahía Concha y Bahía Neguange). La numeración de los puntos corresponde al orden seguido durante la digitalización de los hitos. ..... 11

**Figura 1-3:** Distribución de frecuencias de la longitud de la concha LS (mm) para hembras y machos *de Plicopurpura patula* y *Thais deltoidea* para las estaciones de muestreo. ..... 14

**Figura 1-4:** Cuerpo blando de ejemplares de *Plicopurpura patula* y *Thais deltoidea*. **a** Hembra, **b** macho, **c** y **d** hembras de *P. patula* y *T. deltoidea* afectadas con imposex de grado I, **e** hembra de *T. deltoidea* con imposex grado II. ..... 18

**Figura 1-5:** Gráfico con los dos primeros componentes principales de la concha de *Plicopurpura patula*, mostrando la ordenación de la forma de la concha respecto al desarrollo de imposex. Los gráficos estructura de alambre (wireframe) representan las formas extremas positiva y negativa a lo largo del eje del PC1. Los cambios de la forma tienen un factor de escala (SF) de 0.1. ..... 23

**Figura 1-6:** Análisis de variable canónica para la ordenación de conchas de *Plicopurpura patula* por estación. Los gráficos estructura de alambre (wireframe) representan las formas extremas positiva y negativa a lo largo del eje del CV1. Los cambios de la forma tienen un factor de escala (SF) de 4.0. ..... 24

**Figura 1-7:** Histogramas de validación cruzada para la comparación pareada entre los individuos de *Plicopurpura patula* de las cuatro estaciones de muestreo. Los gráficos de estructura de alambre (wireframe) representan las formas extremas positiva y negativa a lo largo del eje. Los cambios de la forma tienen un factor de escala (SF) de 3.0..... 26

**Figura 2-1:** Tomografía computarizada de la concha de cuatro hembras del caracol marino *Plicopurpura patula* afectadas con imposex. Los cuatro ejemplares pertenecen a la estación de la Marina de Santa Marta, Caribe colombiano. La escala de colores indica la densidad estimada en unidades Hounsfield, los colores del espectro del azul representan bajas densidades mientras que los del espectro del rojo densidades altas. De izquierda a derecha incrementa la longitud máxima de la concha. ..... 39

**Figura 2-2:** Tomografía computarizada de la concha de cuatro machos del caracol marino *Plicopurpura patula* de la estación de la Marina de Santa Marta, Caribe colombiano. La escala de colores indica la densidad estimada en unidades Hounsfield, los colores del espectro del azul representan bajas densidades mientras que los del espectro del rojo densidades altas. De izquierda a derecha incrementa la longitud máxima de la concha. ..... 40

**Figura 2-3:** Tomografía computarizada de la concha de hembras y machos del caracol marino *Plicopurpura patula* de la estación Muelle de Tierrabomba, Caribe colombiano. M: macho, H: hembra sana. La escala de colores indica la densidad estimada en unidades Hounsfield, los colores del espectro del azul representan bajas densidades mientras que los del espectro del rojo densidades altas. ..... 41

**Figura 2-4:** Tomografía computarizada de la concha de hembras (H) y machos (M) del caracol marino *Plicopurpura patula* de las estaciones Punta Betín (PB) y Bahía Concha (BC) del Caribe colombiano. La escala de colores indica la densidad estimada en unidades Hounsfield, los colores del espectro del azul representan bajas densidades mientras que los del espectro del rojo densidades altas. ..... 42

**Figura 2-5:** Tomografía computarizada de la concha de hembras (H) y machos (M) del caracol marino *Plicopurpura patula* de las estaciones Bahía Neguange (BN) y Cabo de la Vela (CV) del Caribe colombiano. La escala de colores indica la densidad estimada en unidades Hounsfield, los colores del espectro del azul representan bajas densidades mientras que los del espectro del rojo densidades altas. ..... 43

**Figura 2-6:** Tomografía computarizada de la concha de hembras (H) y machos (M) del caracol marino *Plicopurpura patula* de las estaciones Bocachica (BH) y Tierrabomba (TB) del Caribe colombiano. La escala de colores indica la densidad estimada en unidades Hounsfield, los colores del espectro del azul representan bajas densidades mientras que los del espectro del rojo densidades altas. ..... 44

**Figura 2-7:** Tomografía computarizada de la concha de hembras con imposex (I) y machos (M) del caracol marino *Thais deltoidea* de las estaciones Marina de Santa Marta (MS) y Muelle de Tierrabomba (ML) del Caribe colombiano. La escala de colores indica la densidad estimada en unidades Hounsfield, los colores del espectro del azul representan bajas densidades mientras que los del espectro del rojo densidades altas. ..... 45

**Figura 2-8:** Tomografía computarizada de la concha de hembras (H) y machos (M) del caracol marino *Thais deltoidea* de las estaciones Bahía Neguange (BN), Punta Betín (PB) y Bahía Concha (BC) del Caribe colombiano. La escala de colores indica la densidad estimada en unidades Hounsfield, los colores del espectro del azul representan bajas densidades mientras que los del espectro del rojo densidades altas. ..... 46

**Figura 2-9: a**. Microestructura en un corte transversal del labio externo de la concha de *Plicopurpura patula*. **b**, **c** y **d**. Capas lamelar cruzada externa, intermedia e interna mostrando la orientación de las lamelas de primer orden. P: periostraco, 1: capa lamelar cruzada externa, 2: capa lamelar cruzada intermedia, 3: capa lamelar cruzada interna. 53

**Figura 2-10:** Microestructura de cortes transversales del labio externo de la concha de *Plicopurpura patula* del Caribe colombiano. **a** Marina de Santa Marta, **b** Punta de Betín, **c** Bahía concha, **d** Bahía Neguange, **e** Cavo de la Vela, **f** Tierrabomba, **g** Muelle tierrabomba **h** Bocahica. La línea punteada demarca zonas de transición entre las capas externa e intermedia, P: periostraco, 1: capa lamelar cruzada externa, 2: capa lamelar cruzada intermedia, 3: capa lamelar interna. ..... 55

**Figura 2-11:** Microestructura de cortes transversales del labio externo de la concha de *Thais deltoidea* del Caribe colombiano. **a** Marina de Santa Marta, **b** Punta de Betín, **c** Bahía concha, **d** Bahía Neguange, **e** Muelle de Tierrabomba P: periostraco, 1: capa lamelar cruzada externa, 2: capa lamelar cruzada interna. ..... 57

# Lista de tablas

**Pág.**

**Tabla 1-1:** Información de las estaciones de muestreo. ..... 7
**Tabla 1-2:** Datos biométricos de *Plicopurpura patula* y *Thais deltoidea* para las estaciones de muestreo a lo largo del Caribe continental colombiano. ..... 16
**Tabla 1-3:** Parámetros de imposex para *Plicopurpura* patula y *Thais deltoidea* del Caribe colombiano. ..... 19
**Tabla 1-4:** Coeficiente de repetibilidad R para las coordenadas alineadas, las deformaciones relativas (RW) y los tamaños promedio de los centroides (CS). ..... 20
**Tabla 1-5:** Pruebas de normalidad y homocedasticidad para el tamaño del centroide. ... 21
**Tabla 1-6:** Significancia estadística de la variación del tamaño del centroide entre estaciones. ..... 22
**Tabla 1-7:** Variación del tamaño del centroide entre sexos dentro de cada estación de muestreo. La comparación de las medias en la estación de la Marina SM se hizo con un ANOVA y para las demás estaciones las comparaciones se hicieron sobre 10000 permutaciones con una prueba t con corrección secuencial de Bonferroni. ..... 22
**Tabla 1-8:** Análisis de variable canónica con un test de 10000 permutaciones para distancias pareadas. ..... 25
**Tabla 1-9:** Análisis de función discriminante con asignación cruzada para comparaciones pareadas. ..... 25
**Tabla 1-10:** Comparaciones pareadas con corrección secuencial de Bonferroni. ..... 29
**Tabla 2-1:** Densidad promedio de cinco cortes transversales del labio externo de la concha de *Plicopurpura patula* y *Thais deltoidea* del Caribe colombiano. ..... 47
**Tabla 2-2:** Parámetros de imposex y densidad promedio por sexos, de cortes transversales del labio externo de la concha de *Plicopurpura patula* y *Thais deltoidea* del Caribe colombiano. ..... 48
**Tabla 2-3:** P valores de las comparaciones de medias de densidad del labio externo de la concha entre las estaciones de muestreo para *Plicopurpura patula* del Caribe colombiano. ..... 50
**Tabla 2-4:** P valores de las comparaciones de medias de densidad del labio externo de la concha entre las estaciones de muestreo para Thais deltoidea del Caribe colombiano. . 51

# Lista de Símbolos y abreviaturas

## Símbolos con letras latinas

| Símbolo | Término | Unidad SI |
|---|---|---|
| *mm* | Milimetro | m |
| *g* | Gramo | g |
| *ng* | Nanogramos | |
| *UH* | Unidades Hounsfield | |

## Abreviaturas

| Abreviatura | Término |
|---|---|
| *BC* | Bahía Concha |
| *BH* | Bocachica |
| *CV* | Cabo de la Vela |
| *ds* | Desviación estándar |
| *H* | Hembra sana |
| *HS* | Altura de la concha |
| *I* | Hembra con imposex |
| *IVDS* | Índice de la secuencia del vaso deferente |
| *LS* | Longitud de la concha |
| *M* | Macho |
| *ML* | Muelle de Tierrabomba |
| *MPL* | Longitud promedio del pene de los machos |
| *MS* | Marina de Santa Marta |
| *PB* | Punta Betín |
| *RPLI* | índice de la longitud relativa del pene de hembras |
| *TB* | Tierrabomba |
| *TW* | Peso total de la concha |
| *VS* | Vaso deferente |
| *VDS* | Secuencia del vaso deferete |
| *WB* | Peso del cuerpo blando |

# Introducción

La utilización de los compuestos organoestánicos como agentes biocidas, especialmente el tributilo de estaño (TBT), tuvo una gran acogida a nivel mundial en el siglo pasado gracias a la reducción de costos en la navegación y mantenimiento de estructuras portuarias y de maricultura (Goldberg, 1986; Rodríguez *et al.*, 2008). No obstante, a partir de los años 1970 se evidenció el efecto contaminante que estos compuestos tienen sobre la biota marina, y a su vez sobre la economía de ciudades costeras dedicadas al cultivo de moluscos (Blaber, 1970; Smith, 1971; Alzieu *et al*., 1980). Múltiples estudios han identificado las especies marinas y dulceacuícolas sensibles a bajas concentraciones en agua y sedimento de dichos compuestos, y han detectado efectos tóxicos letales y subletales, que van desde alteraciones del ARN, neurotoxicidad, inmunotoxicidad, teratogenia, disrupción endocrina hasta la muerte (Brooke *et al.*, 1986; Thain *et al*., 1987; Bushong *et al.*, 1988; Crothers, 1989; Deutsch y Fioroni, 1996; Austen y McEvoy, 1997). Debido a que el TBT es uno de los xenobióticos más tóxicos producidos e introducidos en el medio acuático, la Organización Marítima Internacional (OMI) adoptó el Convenio Internacional sobre el Control de los Sistemas Anti-incrustantes Perjudiciales (AFS) en 2001, estableciendo la prohibición del TBT dentro de la formulación de pinturas a partir del año 2008 (OMI, 2013).

La disrupción endocrina causante del desarrollo de imposex en hembras de gasterópodos, es el efecto tóxico por contaminación de TBT más conocido en todo el mundo y ha sido registrado para 268 especies, siendo la familia Muricidae la más sensible (Titley-O'Neal *et al*., 2011). El término imposex fue descrito por primera vez por Smith en 1971 como una superposición de caracteres masculinos en hembras de gasterópodos expuestas al TBT (LeBlanc *et al.*, 2005). Se caracteriza por un aumento de testosterona en las hembras induciendo el desarrollo de un conducto deferente y/o el crecimiento de un pene en la región posterior al tentáculo derecho. Evans y Nicholson (2000) mencionan que el imposex es irreversible para muchas especies de neogasterópodos. Debido a las malformaciones producidas y al bloqueo del oviducto las hembras pueden presentar esterilidad (Oehlmann

*et al*., 1996); por lo tanto se considera que este fenómeno puede generar una disminución de las poblaciones, alterar la dinámica poblacional e incluso podría llegar a provocar extinciones locales al disminuir el tamaño efectivo de las poblaciones y generar desequilibrios en la comunidad en la que habitan (Oehlmann *et al*., 1996).

El mecanismo bioquímico de inducción del imposex está en debate. No obstante, existen diversas hipótesis que han sido sustentadas in vitro y ex situ. Una de ellas propone que el TBT inhibe la acción de la enzima aromatasa, impidiendo que la testosterona y la androstenediona se trasnformen en estradiol y estrona (Spooner *et al.,* 1991). Por otro lado, Gooding *et al*. (2003) mencionan que hay una supresión de la hormona ATAT (testosterona acil transferasa) encargada de esterificar la testosterona para formar un complejo testosterona-ácidos grasos. Sin embargo, resultados experimentales no muestran una inhibición o supresión directa de la ATAT y por lo tanto los autores proponen que el TBT puede ser un co-ayudante al bloqueo del proceso de esterificación, o ser un factor en el aumento de la hidrólisis del complejo testosterona-ácidos grasos. Castro *et al.* (2007) proponen que el imposex puede ser inducido a través de la modulación de las vías de señalización de los receptores retinoicos X (RXR).

Dada a la importancia comercial y ecológica de los moluscos se han realizado estudios que evidencian daños subletales en la concha causados por la exposición a contaminantes como el estaño (Laitano *et al*., 2013; Begliomini *et al*., 2017). Para el caso de los bivalvos se sabe que la exposición a organoestánicos causa engrosamiento y alargamiento de la concha (Alzieu *et al.*, 1980; 1982; Almeida *et al*., 1998), y cambios en la composición de la matriz orgánica (Lawler y Aldrich, 1987, Almeida *et al*., 1998). Para los gasterópodos se han realizado algunos estudios sobre la relación del TBT, grado de imposex y variaciones en la forma, tamaño y estructura de la concha. En especies como *Nucella lapillus* el tamaño de la concha y el peso se incrementan con el aumento del grado imposex (Son y Hughes, 2000). Mientras que en otras especies ocurre lo opuesto y el tamaño de la concha y el peso son menores en individuos expuestos a altas concentraciones de TBT y alto grado de imposex (Bigatti y Carranza, 2007; Márquez *et al.*, 2011). Variaciones significativas en la forma de concha entre individuos con imposex y sin imposex han sido evidenciadas en algunas especies, y se han encontrado malformaciones microestructurales y cambios en la composición de las conchas (Márquez *et al.*, 2011, Nuñez *et al*., 2012; Laitano *et al.*, 2013; Márquez *et al*., 2017). A pesar de que estos estudios muestran otros efectos a parte

del imposex, no se sabe con exactitud si todas las especies de neogasterópodos sensibles al contaminante presentan las mismas alteraciones morfológicas y estructurales, por lo que es necesario ampliar los estudios a otras especies.

En Latinoamérica la ocurrencia de imposex ha sido reportada en Chile (Gooding *et al.*, 1999), Argentina (Penchaszadeh *et al.*, 2001, Bigatti y Penchaszadeh, 2005), Venezuela (Miloslavich *et al*. 2007, Paz-Villarraga *et al.*, 2015), Brasil (Castro *et al*., 2000) y Ecuador (Rodríguez *et al*., 2016). Para Colombia sólo hay un reporte de imposex en la especie *Stramonita haemastoma* en las costas de Cartagena (Sierra-Márquez y Olivero-Verbel, 2014), y se carece de información que indique si se presentan otros efectos a nivel morfológico, fisiológico y/o genético. Además, Colombia no figura como país signatario del convenio sobre el Control de los Sistemas Anti-incrustantes Perjudiciales y no posee regulaciones para el control del uso de pinturas anti-incrustantes, quedando a elección del usuario el uso de pinturas libres de TBT. Por lo tanto, existe la necesidad de conocer el estado de afectación de las poblaciones de neogasterópodos en el Caribe colombiano y proporcionar información sobre los efectos de la exposición y acumulación de TBT en los gasterópodos marinos en la región del Caribe para el manejo sostenible de sus poblaciones. Partiendo de lo anterior, el objetivo de la presente investigación fue determinar el grado de alteración en la forma y estructura de la concha asociados al fenómeno de imposex en dos especies de neogasterópodos intermareales del Caribe colombiano, *Plicopurpura patula* (Lineo, 1758) y *Thais deltoidea* (Lamarck, 1822).

*Plicopurpura patula* y *Thais deltoidea* son neogasterópodos gonocóricos de la familia Muricidae que habitan sustratos rocosos. *Plicopurpura patula* habita desde las costas de Venezuela hasta la Florida (Domínguez, 2009). Se encuentra en la franja superior y media del mesolitoral y en posos de marea (Díaz y Puyana, 1994; Parra-Carrillo, 2012), es un depredador activo y se alimenta de invertebrados intermareales entre los que destacan los poliplacóforos y otras especies de gasterópodos como *Nerita* spp. *y Littorina* spp. (Parra-Carrillo, 2012). Se tiene poca información sobre la biología de ésta especie aunque múltiples estudios ecológicos y reproductivos se han hecho en su especie homóloga *Plicopurpura pansa* (Gould, 1853) que habita en el pacífico. En estos neogasterópodos la reproducción es interna y la hembra deposita las cápsulas que contienen los huevos debajo de las piedras bajo el nivel del agua (Lewis, 1960). El desarrollo en la cápsula toma

alrededor de dos a ocho semanas y las larvas que eclosionan son nadadoras activas (Lewis, 1960).

*Thais deltoidea* habita en los litorales de Las Bahamas, Brasil, Colombia, Costa Rica, Cuba, República Dominicana, Haití, Honduras, Jamaica, México, Panamá, Puerto Rico, Trinidad y Tobago, Estados Unidos, Venezuela e Islas Vírgenes (Yidi-Daccarett y Sarmiento-Bossio, 2011). Se encuentra frecuentemente en el infralitoral entre tapetes de algas, oquedades incluso entre corales como *Acropora palmata* y *A. curvicornis* (Cervigón et al., 1992, Díaz y Puyana, 1994). Es un depredador activo y la reproducción es interna, Lewis (1960) menciona que la especie se reproduce en octubre y noviembre en Barbados, para Colombia no se tiene registros. Las cápsulas de los huevo son depositadas en oquedades y depresiones en la roca debajo del nivel del agua.

Esta investigación constituye una herramienta para el diagnóstico y la evaluación del fenómeno imposex a partir de cambios en la morfología de la concha de los gasterópodos intermareales. Debido a que la ocurrencia de imposex es un excelente indicador de la exposición al TBT, se obtiene un estimado indirecto de la magnitud de la contaminación por tributilo de estaño en zonas del Caribe colombiano influenciadas por actividades portuarias y de tráfico naviero. Por último, la información recopilada y la construcción de conocimientos, pueden ser utilizados por la comunidad científica y las autoridades encargadas de control y manejo de la calidad ambiental de las zonas costeras, para realizar programas de monitoreo y manejo ambiental que en últimas promuevan la conservación de las especies afectadas por la contaminación de TBT.

# 1. Variación morfológica de la concha en relación al grado de imposex en dos neogasterópodos del Caribe colombiano

## 1.1 Introducción

La imposición de caracteres masculinos en hembras de neogasterópodos, denominada Imposex, es la principal alteración endocrina causada por contaminación de tributilo de estaño (TBT) (Rodríguez *et al.*, 2008). El TBT es un compuesto organoestánico utilizado como agente biocida en las pinturas anti-incrustantes desde mediados del siglo pasado. Debido a su alta toxicidad y efectos letales y subletales comprobados (Brooke *et al.*, 1986; Austen y McEvoy, 1997; Graceli *et al.,* 2013; Alasonati *et al.,* 2015) su uso fue decreciendo desde los años 1980 hasta ser prohibido en el año 2008 por la Organización Marítima Internacional (OMI). A pesar de su prohibición, en muchas costas del mundo se sigue evidenciando la presencia de imposex y por consiguiente de TBT.

El imposex se caracteriza por el desarrollo de un pene en la región posterior al tentáculo derecho, deformación del gonoducto, y la formación del vaso deferente en las hembras de neogasterópodos. Debido a que imposex tiene diferentes grados de afectación se han propuesto esquemas de clasificación con base en lo observado en *Nucella lapillus* (Gibbs *et al*., 1987), *Ocinebrina aciculata* (Oehlmann *et al*., 1996) y *Stramonita haemastoma* (Queiroz *et al.*, 2007; Toste *et al*., 2013). La mayor afectación se presenta cuando hay un bloqueo del oviducto debido a las malformaciones y se produce esterilidad de la hembra, conllevando en algunos casos a que poblaciones de gasterópodos se extingan localmente (Oehlmann *et al*., 1996).

A demás de registrar las especies sensibles al TBT, el grado de desarrollo y la incidencia del fenómeno en todas las costas del mundo, en los últimos años se han realizado estudios

sobre los posibles efectos del TBT y del grado de imposex en la forma y tamaño de la concha de gasterópodos. Son y Hughes (2000) proponen que la asignación de energía a la reproducción es deprimida por el imposex; por lo tanto, se podría predecir que hembras que presentan este fenómeno mostrarían un incremento en la asignación energética somática y a su vez un incremento en el tamaño de la concha. Esta hipótesis ha sido evaluada para dos especies de neogasterópodos, *Nucella lapillus* y *Odontocymbiola magellanica,* comprobandose para la primera que el tamaño de la concha se incrementa con el aumento en el grado de imposex (Son y Hughes 2000). Para la segunda especie se determinó que el tamaño de la concha es menor en individuos expuestos a altas concentraciones de TBT y por lo tanto alto grado de imposex (Bigatti y Carranza, 2007; Márquez *et al.*, 2011). En relación con la forma de la concha se han observado variaciones significativas entre individuos con y sin imposex en *O. magellanica* (Márquez *et al*., 2011)*, N. napillus* (Son y Hughes 2000)*, Buccinanops globulosus* (Primost *et al*., 2016) y *Siphonaria lessoni* (Nuñez *et al.*, 2012).

Debido a que en Colombia no se tienen regulaciones para el uso del TBT, se tiene muy poca información sobre las especies sensibles al imposex y no se tiene registro de alteraciones fenotípicas ligadas a esta condición, es de gran importancia que se lleven a cabo estudios que combinen metodologías que permitan comprender las afectaciones que tiene la contaminación por TBT y conocer el estado de las poblaciones que habitan en zonas de posible contaminación. Determinar el grado de alteración en el tamaño, peso y la forma de la concha asociados al fenómeno de imposex en dos especies de neogasterópodos intermareales fue el objetivo que se desarrolló en este capítulo.

## 1.2 Metodología

### 1.2.1 Área de estudio

La franja costera del Caribe colombiano se caracteriza por presentar diferentes tipos de litorales, de los cuales el litoral rocoso domina en el sector del Parque Nacional Natural Tayrona (PNNT), mientras que en el resto de la línea costera se presentan de manera irregular (Díaz y Puyana, 1994; Díaz y Acero, 2003). La mayoría de los litorales rocosos son inestables, no obstante, en las ecorregiones Tayrona, San Bernardo y la subecorregión de Capurganá los sustratos rocosos son consolidados y estables (Díaz y Acero, 2003).

El presente estudio se realizó a lo largo de la costa central y norte del Caribe de Colombia, cubriendo áreas bajo la influencia de marinas y de los principales puertos comerciales establecidos en la región (Figura 1-1). Con base en este criterio (presencia/ausencia actividad marítima), se escogieron ocho estaciones de muestreo a lo largo de la costa en los departamentos de La Guajira, Magdalena y Bolívar (Figura 1-1, Tabla 1-1).

**Figura 1-1:** Sitios de muestreo en el Caribe continental central y norte de Colombia. CV Cabo de la Vela, BN Bahía Neguange, BC, Bahía Concha, PB Punta Betín, MS Marina de Santa Marta, TB Tierrabomba, ML Muelle de Tierrabomba, BH Bocachica.

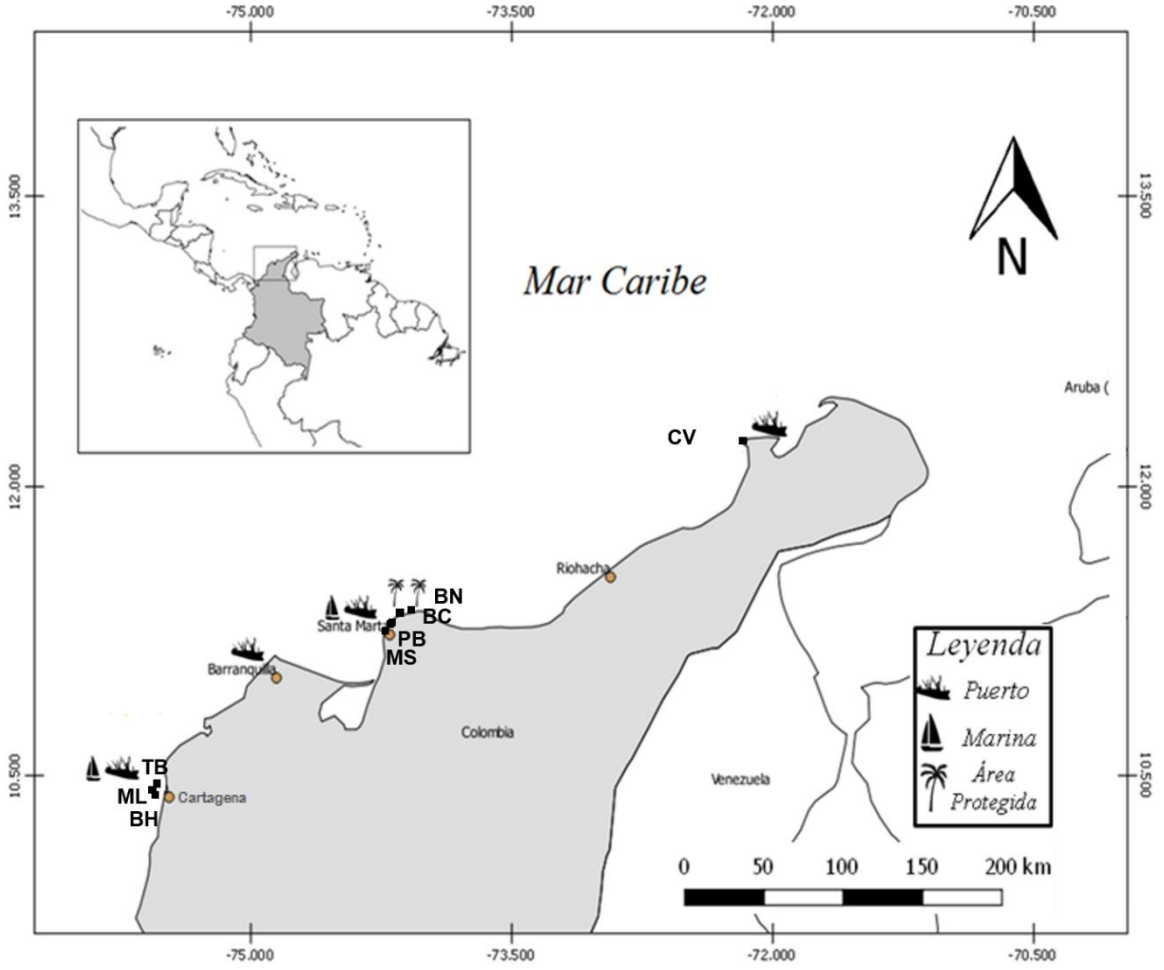


**Tabla 1-1:** Información de las estaciones de muestreo.

| Sector | Estación | Característica | Posición | Especie |
|---|---|---|---|---|
| La Guajira | Cabo de la Vela (CV) | FC | 72°10'42.3"W; 12°12'47.6"N | *P. patula* |
| Parque Nacional Natural Tayrona PNNT | Bahía Neguange (BN) | AP | 74°4'49,46"W; 11°19'20.27"N | *P. patula* *T. deltoidea* |
| | Bahía Concha (BC) | AP | 74°9'26.24"W; 11°18'38.74"N | *P. patula* *T. deltoidea* |
| Bahía de Santa Marta | Punta de Betín (PB) | P | 74°13'14.9"W; 11°15'01.8"N | *P. patula* *T. deltoidea* |
| | Marina de Santa Marta (MS) | M | 74°13'07.8"W; 11°14'35.2"N | *P. patula* *T. deltoidea* |
| Bahía de Cartagena | Tierrabomba (TB) | FC | 75°34'47.5"W; 10°22'11.1"N | *P. patula* |
| | Muelle Tierrabomba( ML) | FC | 75°35'28.2"W; 10°21'17.6"N | *P. patula* *T. deltoidea* |
| | Bocachica (BH) | P | 75°34'55.5"W; 10°19'07.06"N | *P. patula* |

AP: Área Protegida; P: Puerto; M: Marina; FC: franja costera.

En el departamento de La Guajira se encuentra la estación del Cabo de la Vela, que se caracteriza por ser un acantilado rocoso con una plataforma marina de abrasión conformada por rocas sedimentarias de tipo calcáreo (Afanador, 2009). En esta estación se presentan oleajes de intensidad intermedia, con periodos entre 6 a 12 segundos y altura promedio de 1.1 a 2.0 m (INGEOMINAS, 1998). En este departamento las condiciones oceanográficas están moduladas por el sistema de surgencia derivado de la presencia e intensidad de los vientos Alisios (Páramo *et al*., 2011).

En el departamento del Magdalena la configuración de la costa es variable y las características geomorfológicas y ecológicas están determinadas por las estribaciones noroccidentales de la Sierra Nevada de Santa Marta, que se proyectan hacia el mar configurando un litoral de tipo identado con cabos rocosos y ensenadas con playas (Osorno, 2005). Las estaciones de muestreo de este departamento se caracterizan por presentar oleaje suave, con periodos entre 4 y 8 segundos y alturas de ola del orden de 0.4 a 1.0 m y el sustrato está formado por roca metamórfica (Osorno, 2005), a excepción del litoral de la Marina de Santa Marta, que corresponde a un litoral artificial. Las estaciones de muestreo están influenciadas por descargas del río Magdalena y de la Ciénaga Grande de Santa Marta. Adicionalmente las estaciones de la bahía de Santa Marta se encuentran influenciadas hacia el norte por vertimientos en la zona portuaria y la descarga del emisario de aguas residuales (Fontalvo, 1998; Moscarella *et al.,* 2011; García *et al.,* 2012) y hacia el sur por la presencia de una marina. Mientras que las estaciones del PNNT, se

caracterizan por presentar tráfico de embarcaciones pequeñas para transporte de pasajeros.

En el departamento de Bolívar se hicieron muestreos en tres estaciones ubicadas en la bahía de Cartagena. Las estaciones de Tierrabomba y Muelle de Tierrabomba se caracterizan por presentar una geomorfología tipo terraza marina con sustratos de origen sedimentario (Carvajal y Jurado, 2009). Estas estaciones se ubican en la parte occidental de la isla y por lo tanto la intensidad del oleaje es intermedia. Por otro lado en la estación de Bocachica el litoral es artificial aunque la roca parece ser de origen sedimentario bioclástico. La bahía de Cartagena se encuentra influenciada por el gran aporte sedimentario del canal del Dique (Restrepo *et al*., 2013), presenta un tráfico naviero alto debido al canal navegable y al puerto marítimo que posee, adicionalmente se desarrollan actividades productivas relacionadas con la zona franca portuaria e industrial y el turismo (Carvajal y Jurado, 2009).

### 1.2.2 Muestreo

Los ejemplares de las dos especies fueron recolectados de forma manual, *Plicopurpura patula* a través de caminatas en la zona de marea del litoral roco y *Thais deltoidea* por buceo ABC. Los individuos fueron narcotizados y transportados al laboratorio del CECIMAR en una solución al 7% de $MgCl_2$ y agua de mar (1:1 Agua de mar/agua destilada) por 2 horas.

### 1.2.3 Biometría e imposex

Con ayuda de un calibrador vernier (0.01mm) se registraron los datos biométricos de la concha de cada individuo: longitud máxima (LS), altura máxima (HS), ancho máximo (DS) y con una balanza de precisión (0.001g) se registró el peso total (TW) (concha más cuerpo blando), el peso de la concha sin incrustaciones (WS) y el peso del cuerpo blando (WB). Para cada una de las variables se evaluaron los supuestos de normalidad y homocedasticidad, se hicieron comparaciones entre sexos dentro de cada estación. Las conchas fueron conservadas para estudios posteriores.

Se determinó el sexo de cada individuo de acuerdo con la coloración de la gónada, presencia/ausencia de un pene bien desarrollado y presencia de glándulas accesorias

(glándulas de la cápsula y albumen), y se determinó el desarrollo de imposex de las hembras de acuerdo a presencia del pseudopene y del vaso deferente. Se estimó la longitud promedio del pene en hembras afectadas con imposex (FPLI) y machos (MPL), el índice de la longitud relativa del pene de hembras (RPLI = [(longitud media del pene en hembras/longitud media del pene en machos) x 100]) (Bryan *et al*., 1987) y la incidencia o frecuencia de imposex para cada estación (I%= [(Número de hembras afectadas con imposex/Número total de hembras) x 100]). A cada hembra le fue asignado el estado de la secuencia del vaso deferente (VDS) de acuerdo con el esquema propuesto por *Toste et al.* (2013) y se estimó el índice de la secuencia del vaso deferente (VDSI) que corresponde a la media del estado de VDS de los individuos de cada sitio evaluado (Coray y Bard, 2007). Con el fin minimizar el efecto del tamaño de la concha en los parámetros de imposex, se estandarizó el FPLI y el RPLI, tal como indican Castro y Fillmann (2012): $FPLI_{estándar}$ = FPLI/LS hembras y $RPLI_{estándar}$ = [(longitud media del pene en hembras/LS promedio de hembras)/(longitud media del pene en machos/LS promedio de machos) x 100]).

## 1.2.4 Morfometría geométrica

Esta metodología solo fue aplicada a las conchas de *Plicopurpura patula* de cuatro estaciones debido al número de ejemplares por estación. No fue posible aplicar esta metodología a *Thais deltoidea* debido a que sus conchas se encontraban deformadas por la acción de algas coralinaceas y organismos bioerodadores dificultando la escogencia y ubicación de hitos anatómicos.

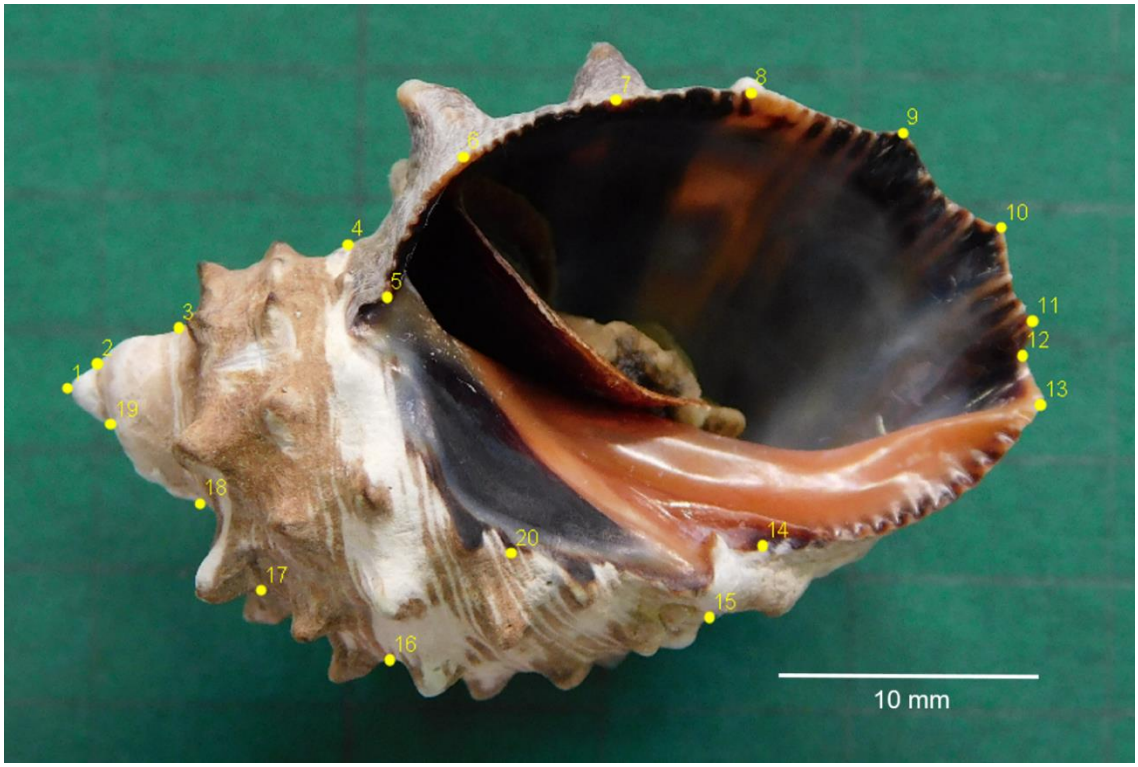
- **Digitalización de los hitos morfológicos**

De la concha de cada individuo se obtuvieron imágenes digitales con resolución de 16 megapíxeles, en formato raster JPEG, con una cámara NIKON B500. Las conchas fueron ubicadas con 20° de inclinación en el eje anteroposterior y 0° en el eje transversal de la concha, se fijaron en una placa con plastilina para evitar el cabeceo en dirección antero-posterior y la rotación en dirección ventral dorsal. Sobre cada imagen se digitalizaron 20 hitos morfológicos tipo I y II (Figura 1-2) haciendo uso del programa TPSdig2 de la serie TPS de Rohlf (2004).

- **Repetibilidad**

Para la prueba de repetibilidad se utilizó el software CLIC 98 de Dujardin (2012). En el módulo COO se hizo la digitalización de los hitos dos veces para cada una de las imágenes. En el módulo TET se concatenaron los dos archivos y posteriormente en el módulo MOG se hizo el análisis generalizado de Procrustes para remover los componentes no biológicos de la forma (escala, posición y orientación). En el módulo VAR se obtuvo el coeficiente de repetibilidad R, que corresponde a la varianza individual sobre la varianza total. El coeficiente va de cero a uno, donde cero indica que las medidas no son repetibles y un valor de uno indica que no hay error por parte del investigador y por lo tanto las medidas son consistentes y repetibles (Martínez, 2014). La repetibilidad fue estimada para las coordenadas alineadas, las deformaciones relativas (RW) y los tamaños promedio de los centroides (CS).

**Figura 1-2:** Ubicación de los 20 hitos anatómicos tipo I (1-5, 11, 13-20) y II (6-10, 12) empleados como coordenadas de referencia para las conchas de *P. patula* de cuatro estaciones de muestreo (Marina de Santa Marta, Punta de Betín, Bahía Concha y Bahía Neguange). La numeración de los puntos corresponde al orden seguido durante la digitalización de los hitos.



- **Variación del tamaño**

El tamaño del centroide (CS) se utilizó como estimador isométrico para comparar el tamaño de las conchas entre estaciones y sexos. El CS se calcula para cada individuo como la raíz cuadrada de la suma de las distancias cuadradas entre el centro de la configuración de los hitos y cada hito individual (Bookstein, 1991; Zelditch *et al*., 2004). Se comprobaron los supuestos de normalidad y homocedasticidad con los test de Shapiro-Wilks y Levene respectivamente, haciendo uso del software R versión 3.2.3. (The R foundation for Statistical Computing, 2015). Se comparó el tamaño del centroide entre las estaciones, y se evaluó el efecto del sexo en el tamaño del centroide por medio de ANOVAS a una vía si los datos fueron paramétricos. Cuando los datos no se ajustaron a una distribución normal se hicieron comparaciones entre las medias sobre 10000 permutaciones, estimando las diferencias entre grupos por contraste de medias mediante una prueba t con una corrección secuencial de Bonferroni (Dujardin, 2012).

- **Alometría**

Para evaluar y controlar factores alométricos y detectar y remover efectos del tamaño (Klingenberg, 2011; Márquez *et al.*, 2011), se hizo una regresión multivariada de la forma y el tamaño, teniendo como variables dependientes las coordenadas Procrustes y como variable independiente el tamaño del centroide, y un test de 10000 permutaciones. Cuando se encontró efecto alométrico se hizo un análisis multivariado de covarianza (MANCOVA) para determinar si existe un modelo alométrico común entre estaciones, la significancia estadística se obtuvo con el estadístico de Wilks.

- **Variación de la forma**

Para el análisis de la variación de la forma se utilizó el software MorphoJ versión 1.06d (Klingenberg, 2011). La configuración de hitos fue superpuesta mediante el análisis generalizado de Procrustes, retirando los componentes no biológicos de la forma: escala, orientación y posición. En el análisis se traslada y rota la configuración de hitos a un origen común y se escala a la unidad del tamaño del centroide. Posteriormente se creó la forma de la concha (Wireframe) uniendo los hitos en el orden de ubicación. En la opción Find outliers se buscaron datos atípicos y se observó la calidad de los datos. Se editaron los clasificadores Estación (MS: Marina, PB: Punta Betín, BC: Bahía Concha y BN: Bahía Neguange) y sexo (H: hembra sana, I: hembra con imposex y M: macho). Mediante la

prueba de Doornik y Hansen y la prueba M de Box, se evaluaron los supuestos de normalidad y homocedasticidad multivariada de las coordenadas Procrustes, estas pruebas se realizaron en el programa PAST versión 1.8 (Hammer *et al*., 2009).

A partir de las coordenadas Procrustes se generó la matriz de varianza-covarianza y sobre esta se hizo un análisis de componentes principales (PCA) por estación, obteniendo los componentes principales de la forma que describen mejor la variación en la forma de la concha. Para obtener un eje de máxima discriminación entre los individuos por estación, se hizo un análisis de variable canónica (CVA) con un test de 10000 permutaciones de distancias pareadas. Debido a la no normalidad multivariada de los datos, la validación estadística de las diferencias de la forma de la concha se llevó a cabo por medio de un análisis multivariado de varianza no paramétrico (MANOVA no paramétrico) con 10000 permutaciones, y comparaciones pareadas con corrección de Bonferroni. Adicionalmente, los datos fueron sometidos a un análisis de función discriminante con un test de 10000 permutaciones de distancias pareadas, y una prueba de asignación cruzada.

## 1.3 Resultados

### 1.3.1 Biometría e imposex

En total, se recolectaron 247 individuos de *Plicopurpura patula* distribuidos en ocho estaciones y 149 individuos de *Thais deltoidea* en cinco estaciones. La longitud de la concha promedio para hembras varió entre 22.48 y 37.57 mm y para los machos entre 24.75 y 33.65 mm para *P. patula*. Para *T. deltoidea* la longitud de la concha en hembras varió entre 28.30 y 40.82 mm y para los machos entre 32.04 a 38.83 mm. En las estaciones Marina de Santa Marta y Muelle de Tierrabomba se registraron las tallas más pequeñas (15-20 mm) de *P. patula* y (22-30 mm) de *T. deltoidea* respectivamente. Por otro lado las estaciones en las que se registraron las mayores tallas y un rango de tallas amplio fueron Punta Betín (PB) y Bahía Neguange (BN) para *P. patula* y Marina de Santa Marta (MS) y Bahía Concha (BC) para *T. deltoidea* (Figura 1-2, Tabla 1-2).

Las pruebas de normalidad (Shapiro-Wilks p-valor < 0.05) y de homocedasticidad (Levene p-valor < 0.05) indican que para cada una de las especies los datos no cumplen con los supuestos de normalidad. Las comparaciones de cada una de las variables biométricas

entre sexos, indican que no hay diferencias entre hembras y machos dentro de cada estación (Kruscal-Wallis, p-valores < 0.05 para todas las comparaciones). Por otro lado, las comparaciones entre estaciones para cada sexo indican que hay diferencias significativas para todas las variables biométricas (Kruscal-Wallis, p-valor< 0.05 para cada comparación).

**Figura 1-3:** Distribución de frecuencias de la longitud de la concha LS (mm) para hembras y machos *de Plicopurpura patula* y *Thais deltoidea* para las estaciones de muestreo. CV: Cabo de la Vela, BN: Bahía Neguange, BC: Bahía Concha, PB: Punta Betín, MS: Marina de Santa Marta, TB: Tierrabomba, ML: Muelle Tierrabomba, BH: Bocachica.

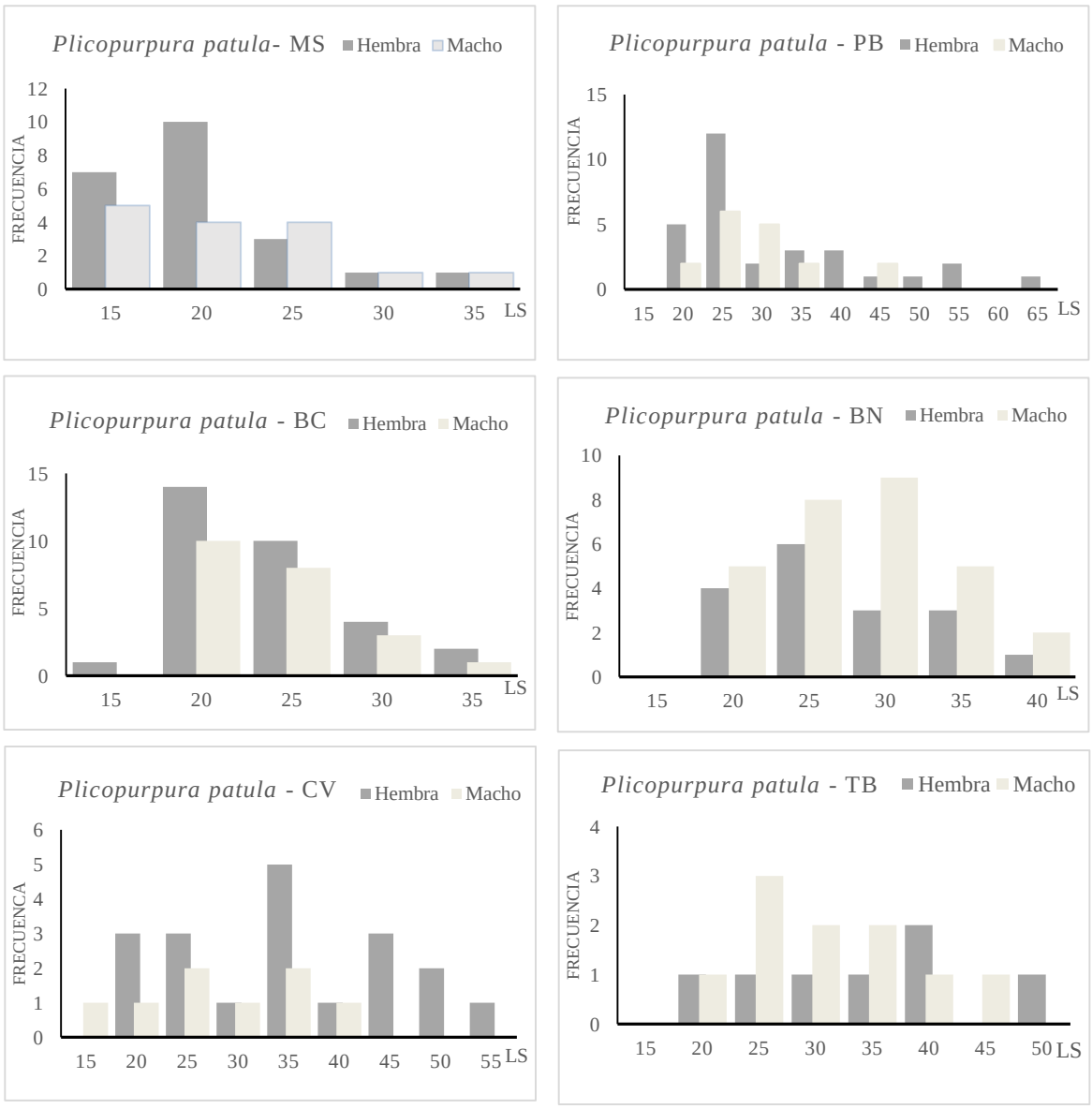


**Figura 1-3:** (Continuación)

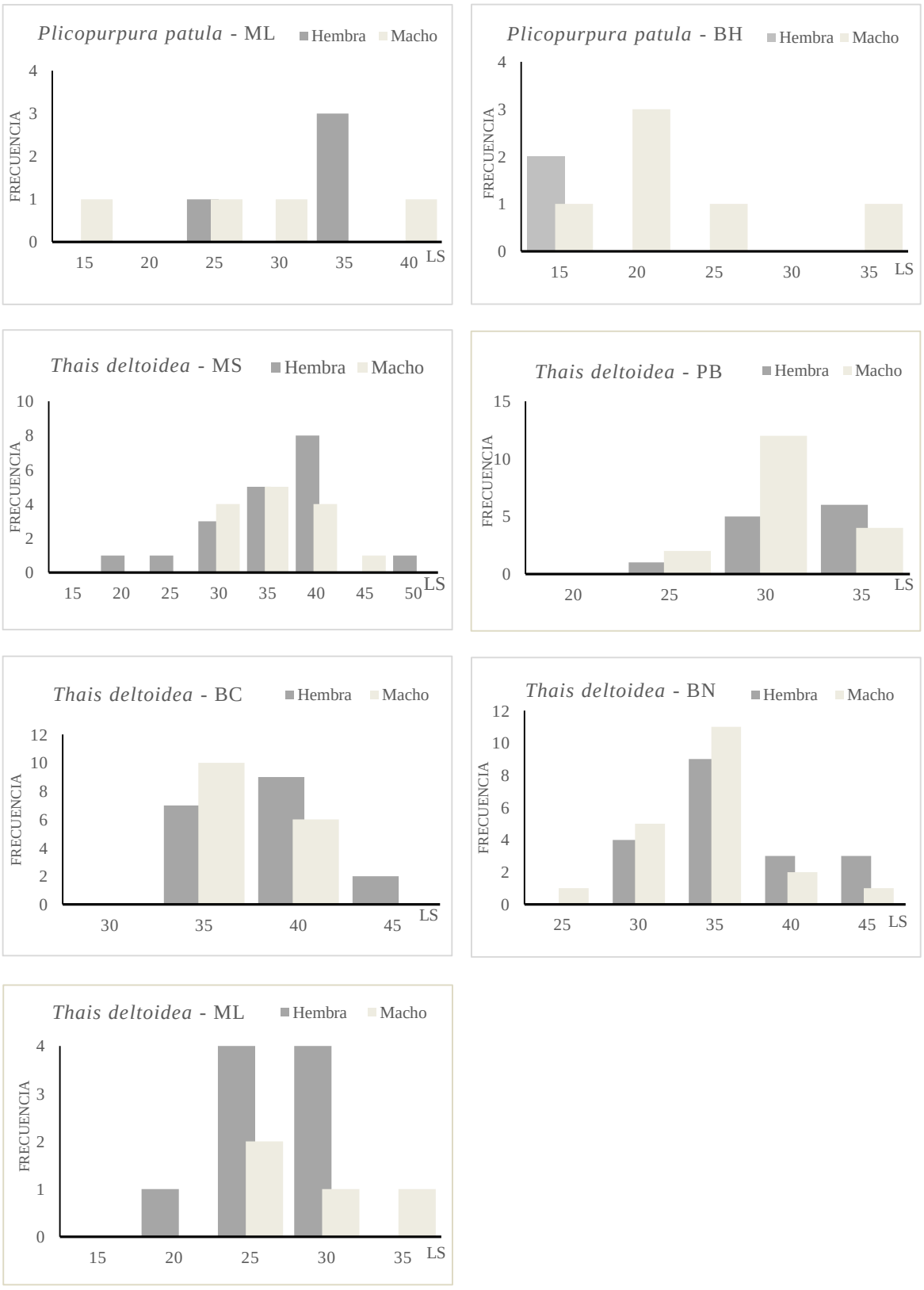


**Tabla 1-2:** Datos biométricos de *Plicopurpura patula* y *Thais deltoidea* para las estaciones de muestreo a lo largo del Caribe continental colombiano.

| ESPECIE | ESTACIÓN | N° ind | Sexo | LS ± ds | | DS ± ds | | HS ± ds | | TW ± ds | | WS ± ds | | WB ± ds | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *Plicopurpura patula* | CV | 19 | H | 37.34 | ±11.15 | 23.74 | ±7.66 | 17.36 | ±4.43 | 10.57 | ±8.32 | 6.18 | ±4.62 | 4.40 | ±3.72 |
| | | 8 | M | 30.84 | ±7.25 | 19.21 | ±5.18 | 15.65 | ±2.95 | 5.76 | ±3.84 | 3.74 | ±2.25 | 2.02 | ±1.67 |
| | BN | 21 | H | 34.82 | ±11.72 | 21.58 | ±7.53 | 16.44 | ±4.94 | 8.06 | ±8.61 | 4.83 | ±4.82 | 3.23 | ±3.82 |
| | | 29 | M | 30.63 | ±6.16 | 19.12 | ±3.35 | 14.89 | ±2.71 | 4.76 | ±2.35 | 3.08 | ±1.44 | 1.68 | ±0.98 |
| | BC | 31 | H | 26.81 | ±4.83 | 16.40 | ±3.49 | 13.18 | ±1.77 | 3.04 | ±1.56 | 2.04 | ±1.07 | 1.01 | ±0.56 |
| | | 22 | M | 26.43 | ±3.73 | 15.79 | ±2.30 | 12.99 | ±1.58 | 2.82 | ±0.98 | 1.99 | ±0.65 | 0.83 | ±0.36 |
| | PB | 30 | H | 34.80 | ±11.74 | 21.45 | ±7.38 | 17.00 | ±5.16 | 8.54 | ±9.68 | 5.28 | ±5.95 | 3.26 | ±3.75 |
| | | 17 | M | 32.34 | ±7.36 | 20.16 | ±4.78 | 16.22 | ±3.11 | 6.25 | ±4.89 | 4.06 | ±3.13 | 2.16 | ±1.76 |
| | SM | 1 | H | 15.76 | ±0 | 9.80 | ±0 | 8.19 | ±0 | 0.83 | ±0 | 0.48 | ±0 | 0.35 | ±0.00 |
| | | 21 | I | 22.80 | ±5.67 | 13.51 | ±3.16 | 10.58 | ±2.22 | 2.05 | ±1.70 | 1.41 | ±1.18 | 0.63 | ±0.53 |
| | | 15 | M | 23.71 | ±5.89 | 14.42 | ±3.34 | 11.22 | ±2.59 | 2.48 | ±1.81 | 1.75 | ±1.33 | 0.73 | ±0.50 |
| | TB | 7 | H | 37.22 | ±9.38 | 21.92 | ±5.66 | 16.34 | ±3.65 | 8.31 | ±5.17 | 4.84 | ±2.77 | 3.48 | ±2.41 |
| | | 10 | M | 33.65 | ±6.61 | 20.00 | ±4.32 | 15.18 | ±2.68 | 6.50 | ±3.68 | 3.95 | ±2.23 | 2.55 | ±1.47 |
| | ML | 3 | H | 34.29 | ±3.65 | 20.01 | ±2.14 | 14.92 | ±1.05 | 5.47 | ±1.38 | 3.09 | ±0.92 | 2.38 | ±0.52 |
| | | 1 | I | 37.57 | ±0.00 | 21.12 | ±0.00 | 15.64 | ±0.00 | 6.93 | ±0.00 | 3.54 | ±0.00 | 3.39 | ±0.00 |
| | | 4 | M | 29.88 | ±7.83 | 17.88 | ±5.66 | 13.57 | ±3.68 | 4.81 | ±4.04 | 2.59 | ±2.07 | 2.21 | ±1.97 |
| | BH | 2 | H | 19.45 | ±0.19 | 12.10 | ±0.06 | 9.63 | ±0.14 | 1.37 | ±0.00 | 0.96 | ±0.05 | 0.39 | ±0.06 |
| | | 6 | M | 24.78 | ±5.76 | 14.04 | ±3.71 | 11.21 | ±2.49 | 1.58 | ±0.53 | 1.83 | ±1.45 | 0.86 | ±0.51 |
| *Thais deltoidea* | BN | 19 | H | 38.92 | ±4.08 | 27.29 | ±2.17 | 24.92 | ±3.02 | 25.80 | ±7.90 | 22.88 | ±7.26 | 2.88 | ±1.18 |
| | | 20 | M | 37.20 | ±3.72 | 26.35 | ±2.51 | 23.85 | ±2.80 | 23.42 | ±6.47 | 20.39 | ±5.52 | 3.01 | ±1.56 |
| | BC | 18 | H | 40.82 | ±3.16 | 26.09 | ±1.94 | 24.66 | ±2.14 | 25.72 | ±6.47 | 21.48 | ±4.05 | 4.25 | ±4.18 |
| | | 16 | M | 38.83 | ±2.09 | 24.93 | ±1.81 | 23.66 | ±1.28 | 21.19 | ±4.27 | 18.28 | ±3.55 | 2.91 | ±1.32 |
| | PB | 12 | H | 34.34 | ±3.54 | 23.45 | ±1.80 | 22.35 | ±2.26 | 16.76 | ±4.51 | 14.54 | ±3.84 | 2.22 | ±1.06 |
| | | 18 | M | 32.94 | ±2.33 | 22.55 | ±1.81 | 20.83 | ±1.21 | 15.63 | ±3.34 | 13.91 | ±2.76 | 1.72 | ±0.74 |
| | MS | 19 | I | 37.67 | ±6.84 | 23.08 | ±4.09 | 21.97 | ±4.13 | 17.53 | ±8.25 | 15.14 | ±7.45 | 2.40 | ±0.80 |
| | | 14 | M | 38.12 | ±3.80 | 23.19 | ±2.57 | 22.24 | ±2.38 | 16.42 | ±4.51 | 14.13 | ±4.08 | 2.29 | ±0.44 |
| | ML | 8 | H | 28.00 | ±3.63 | 17.30 | 2.94 | 16.20 | ±2.51 | 7.19 | ±4.20 | 6.16 | ±3.72 | 0.71 | ±0.37 |
| | | 1 | I | 30.73 | ±0 | 17.30 | 0.00 | 16.98 | ±0.00 | 9.137 | ±0.00 | 7.98 | ±0.00 | 1.01 | ±0.00 |
| | | 4 | M | 32.04 | ±3.03 | 19.68 | 1.94 | 17.50 | ±1.66 | 11.44 | ±3.03 | 10.07 | ±2.72 | 1.18 | ±0.19 |

H: Hembra sana, M: macho, I: hembra con imposex, CV: cabo de la Vela, BN: Bahía Neguange, BC: Bahía Concha, PB: Punta Betín, MS: Marina de Santa Marta, TB: Tierrabomba, ML: Muelle Tierrabomba, BH: Bocachica, LS: longitud máxima de la concha, DS: ancho de la concha, HS: alto de la concha, WT: peso total, WS: peso de la concha, WB: Peso del cuerpo blando, ds: desviación estándar.

Sólo en las estaciones Marina de Santa Marta (MS) y Muelle de Tierrabomba (MT) se registraron hembras de las dos especies con imposex (Figura 1-4). En el caso de *P. patula* las hembras de las dos estaciones se caracterizaron por presentar un desarrollo de imposex grado I, en el cual se observa la presencia de un pequeño pseudopene sin el desarrollo aparente de un vaso deferente. En la MS se registraron hembras de *T. deltoidea* con diferente grado de expresión de imposex, desde hembras que sólo presentaron el desarrollo de un pseudopene y se catalogaron en estado I, a las que presentaron el pseudopene y el desarrollo del vaso deferente en dirección seudopene - poro vaginal que se catalogaron es estado II. En el ML sólo se registró una hembra con imposex en estado II de acuerdo con la SVD.

Los índices de imposex evidencian que el grado de desarrollo de la afectación es bajo para las dos especies, no obstante, la incidencia es alta en las estaciones en donde se registraron hembras con imposex (Tabla 1-3). Para *Plicopurpura patula* de MS y ML los índices FPLI (0.71 y 1) y RPLI (11.05 y 14.04) muestran que el pene desarrollado en hembras afectadas es muy pequeño en comparación del pene de los machos de la misma estación. A pesar de que el desarrollo del pseudopene en hembras de ML es mayor que en MS, se debe tener en cuenta que los machos de MS son de tallas pequeñas y por tanto también la longitud promedio del pene, además sólo se registró una hembra en ML con un pseudopene de 1 mm mientras que en MS se encontró una hembra con un pseudopene de 1.2 mm. Después de hacer la estandarización de la longitud del pene respecto a la longitud de la concha, se puede observar que el $FPLI_{estándar}$ (0.03) es mucho menor para las dos estaciones, mientras que el $RPLI_{estándar}$ (11.65 y 11.94) no varían significativamente (Tabla 1-3). Para *Thais deltoidea* el FPLI en la MS fue 0.88 y la longitud máxima registrada de 2 mm, la longitud promedio del VD de 0.99 mm y la longitud máxima de 1.5 mm. El RPLI y el $RPLI_{estándar}$ (8.60 y 8.70) son bajos y no difieren debido a que las hembras afectadas y los machos presentan tallas similares (Tabla 1-2). Para el análisis de los resultados no se tienen en cuenta las estimaciones de FPLI RPLI y sus cálculos estandarizados debido a que el pene de los machos se encontraba totalmente retraído y no se pudo conocer su tamaño real.

**Figura 1-4:** Cuerpo blando de ejemplares de *Plicopurpura patula* y *Thais deltoidea*. **a** Hembra, **b** macho, **c** y **d** hembras de *P. patula* y *T. deltoidea* afectadas con imposex de grado I, **e** hembra de *T. deltoidea* con imposex grado II. td: tentáculo derecho, g: gónada, gc: glándula de la cápsula, ga: glándula del albunen, p: pene, ps: pseudopene, vd: vaso deferente.

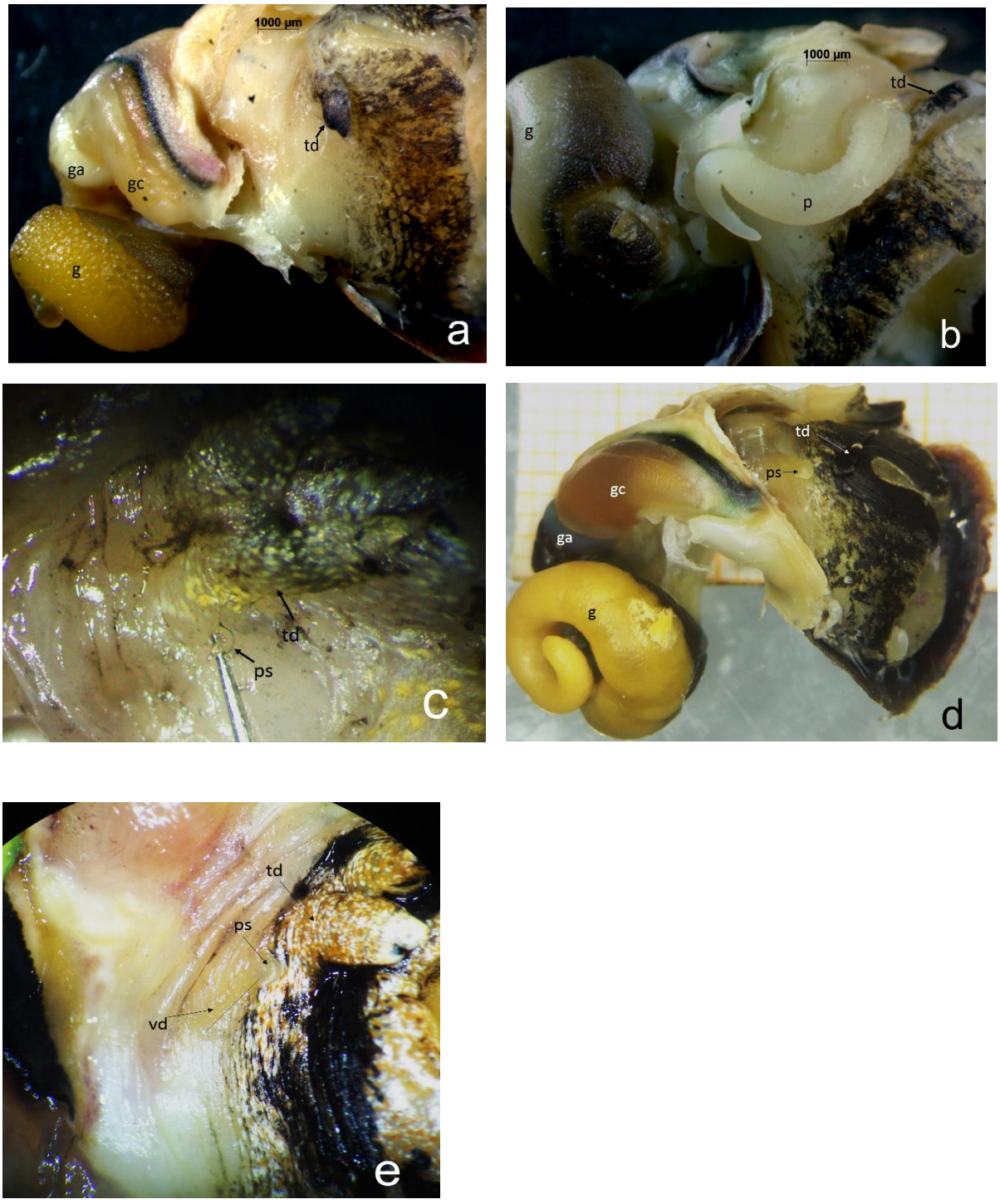


**Tabla 1-3:** Parámetros de imposex para *Plicopurpura* patula y *Thais deltoidea* del Caribe colombiano.

| ESPECIE | ESTACIÓN | Sexo | LS ± ds | | IFPL MPL | Promedio LVD | FPLI Estándar | RPLI | RPLI Estándar | IVDS | I% |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *Plicopurpura patula* | CV | H | 37.34 | ±11.15 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| | | M | 30.84 | ±7.25 | 11.63 | | | | | | |
| | BN | H | 34.82 | ±11.72 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| | | M | 30.63 | ±6.16 | 11.83 | | | | | | |
| | BC | H | 26.81 | ±4.83 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| | | M | 26.43 | ±3.73 | 10.59 | | | | | | |
| | PB | H | 34.80 | ±11.74 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| | | M | 32.34 | ±7.36 | 12.53 | | | | | | |
| | SM | H | 15.76 | ±0 | 0.00 | 0.00 | 0.03 | 11.05 | 11.65 | 1.00 | 95.45 |
| | | I | 22.80 | ±5.67 | 0.71 | 0.00 | | | | | |
| | | M | 23.71 | ±5.89 | 6.47 | | | | | | |
| | TB | H | 37.22 | ±9.38 | 0.00 | 0.00 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | M | 33.65 | ±6.61 | 7.10 | | | | | | |
| | ML | H | 34.29 | ±3.65 | 0.00 | 0.00 | 0.03 | 14.04 | 11.94 | 1 | 25 |
| | | I | 37.57 | ±0.00 | 1.00 | 0.00 | | | | | |
| | | M | 29.88 | ±7.83 | 7.13 | | | | | | |
| | BH | H | 19.45 | ±0.19 | 0.00 | 0.00 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | M | 24.78 | ±5.76 | 5.08 | | | | | | |
| *Thais deltoidea* | BN | H | 38.92 | ±4.08 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| | | M | 37.20 | ±3.72 | 10.10 | | | | | | |
| | BC | H | 40.82 | ±3.16 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| | | M | 38.83 | 2.09 | 11.25 | | | | | | |
| | PB | H | 34.34 | ±3.54 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| | | M | 32.94 | ±2.33 | 10.50 | | | | | | |
| | MS | I | 37.67 | ±6.84 | 0.88 | 0.99 | 0.02 | 8.60 | 8.70 | 1.74 | 100.00 |
| | | M | 38.12 | ±3.80 | 10.29 | | | | | | |
| | ML* | H | 28.00 | ±3.63 | 0.00 | 0.00 | 0.04* | 47.06* | 53.27* | 2.00* | 11.11* |
| | | I | 30.73 | ±0 | 1 | 1 | | | | | |
| | | M | 32.04 | ±3.03 | 2.13 | | | | | | |

H:hembra sana, I:hembra con imposex, M: macho, CV: cabo de la Vela, BN: Bahía Neguange, BC: Bahía Concha, PB: Punta Betín, MS: Marina de Santa Marta, TB: Tierrabomba, M:L Muelle Tierrabomba, BH: Bocachica, LS: longitud máxima de la concha, ds: desviación estándar, FPL: Longitud promedio del pene en hembras afectadas, MPL: longitud promedio del pene en machos, RPLI: índice de la longitud relativa del pene en hembras afectadas, I%: incidencia o frecuencia de imposex, IVDS: índice de la secuencia del vaso deferente. * El pene en los machos se encontraba retraído y no fue posible determinar la medida real ni estimar los índices con certeza.

## 1.3.2 Morfometría geométrica

- **Repetibilidad**

Los coeficientes de repetibilidad entre dos conjuntos de medidas del mismo set de imágenes de la concha fueron superiores al 0.9 para todas las coordenadas alineadas, las deformaciones relativas y el tamaño centroide (Tabla 1-4). Por lo tanto, se asume que todas las medidas son consistentes y repetibles.

**Tabla 1-4:** Coeficiente de repetibilidad R para las coordenadas alineadas, las deformaciones relativas (RW) y los tamaños promedio de los centroides (CS).

| COEFICIENTE DE REPETIBILIDAD R | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **COORDENADAS ALINEADAS** | | | | **RW** | | | | **CS** |
| X01 | 0.998423 | Y01 | 0.964767 | RW01 | 0.998567 | RW21 | 0.916365 | 0.999979 |
| X02 | 0.995267 | Y02 | 0.971518 | RW02 | 0.986493 | RW22 | 0.958810 | |
| X03 | 0.976547 | Y03 | 0.975042 | RW03 | 0.983671 | RW23 | 0.873736 | |
| X04 | 0.991759 | Y04 | 0.992821 | RW04 | 0.993058 | RW24 | 0.908206 | |
| X05 | 0.996365 | Y05 | 0.993479 | RW05 | 0.978093 | RW25 | 0.892076 | |
| X06 | 0.993942 | Y06 | 0.982054 | RW06 | 0.978806 | RW26 | 0.916311 | |
| X07 | 0.932087 | Y07 | 0.991322 | RW07 | 0.987545 | RW27 | 0.907634 | |
| X08 | 0.989458 | Y08 | 0.992489 | RW08 | 0.966281 | RW28 | 0.898960 | |
| X09 | 0.979205 | Y09 | 0.979048 | RW09 | 0.965494 | RW29 | 0.890683 | |
| X10 | 0.977394 | Y10 | 0.969934 | RW10 | 0.960932 | RW30 | 0.911401 | |
| X11 | 0.988782 | Y11 | 0.982689 | RW11 | 0.965172 | RW31 | 0.918024 | |
| X12 | 0.987934 | Y12 | 0.978836 | RW12 | 0.963479 | RW32 | 0.886779 | |
| X13 | 0.988629 | Y13 | 0.986423 | RW13 | 0.933441 | RW33 | 0.916644 | |
| X14 | 0.988172 | Y14 | 0.993946 | RW14 | 0.954123 | RW34 | 0.801323 | |
| X15 | 0.989049 | Y15 | 0.991944 | RW15 | 0.955258 | RW35 | 0.876935 | |
| X16 | 0.973790 | Y16 | 0.970185 | RW16 | 0.954396 | RW36 | 0.755787 | |
| X17 | 0.969419 | Y17 | 0.967818 | RW17 | 0.948496 | | | |
| X18 | 0.956356 | Y18 | 0.982514 | RW18 | 0.926347 | | | |
| X19 | 0.993642 | Y19 | 0.940408 | RW19 | 0.919657 | | | |
| X20 | 0.934436 | Y20 | 0.986000 | RW20 | 0.923005 | | | |

- **Alometría**

La regresión de la forma en el tamaño fue significativa (p-valor 0.0001), por lo tanto existe una relación alométrica entre la forma y el tamaño. No obstante, no fue posible hacer la corrección debido a que las pendientes alométricas entre las estaciones no siguen el mismo modelo (λ Wilks = 0.3031, F = 1.9595, p-valor = $1.1178e^{-006}$). Los análisis morfométricos se hicieron sin corrección alométrica.

- **Variación en el tamaño**

Las pruebas de normalidad y homogeneidad de varianzas evidencian que el tamaño del centroide cumple con los supuestos de normalidad sólo en la estación de la MS, en las demás estaciones los datos no se ajustan a una distribución normal (Tabla 1-5), por lo tanto, las pruebas de contraste de medias fueron no paramétricas, exceptuando la comparación entre sexos en la estación de la MS.

**Tabla 1-5:** Pruebas de normalidad y homocedasticidad para el tamaño del centroide.

| Estación | Media | Des. Estándar | Test Shapiro-Wilk | | Test Levene | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | W | p-valor | Estadístico | p-valor |
| Marina SM | 41.35 | 13.34 | 0.9452 | 0.0676 | 0.0035 | 0.9534 |
| Punta Betín | 66.59 | 24.30 | 0.8800 | 0.0002 | 0.7554 | 0.3894 |
| Bahía Concha | 50.45 | 9.31 | 0.8619 | 2.05e-02 | 0.1498 | 0.7003 |
| Bahía Neguange | 67.16 | 22.93 | 0.8071 | 1,28e-08 | 6.0733 | 0.0173 |

Entre las estaciones hay diferencias significativas en cuanto al tamaño del centroide (Tabla 1-6). Sólo entre las estaciones PB y BN no hay diferencias (p-valor= 0.9111). Al comparar entre sexos dentro de cada estación se encontró que no hay diferencias significativas entre machos y hembras (Tabla 1-7).

**Tabla 1-6:** Significancia estadística de la variación del tamaño del centroide entre estaciones.

| p-valor (10000 permutaciones) Bonferroni <0,0083333 | | | |
|---|---|---|---|
| | Marina SM | Punta Betín | Bahía Concha |
| Punta Betín | 0.0000 | | |
| Bahía Concha | 0.0001 | 0.0000 | |
| Bahía Neguange | 0.0000 | 0.9111 | 0.0000 |

**Tabla 1-7:** Variación del tamaño del centroide entre sexos dentro de cada estación de muestreo. La comparación de las medias en la estación de la Marina SM se hizo con un ANOVA y para las demás estaciones las comparaciones se hicieron sobre 10000 permutaciones con una prueba t con corrección secuencial de Bonferroni.

| Estación | Sexo | Media | p-valor | Bonferroni |
|---|---|---|---|---|
| Marina | Hembra | 38.9206 | 0.239 | |
| | Macho | 44.5335 | | |
| Punta Betín | Hembra | 68.9231 | 0.3943 | 0.05 |
| | Macho | 62.4781 | | |
| Bahía Concha | Hembra | 50.7966 | 0.7527 | 0.05 |
| | Macho | 49.9500 | | |
| Bahía Neguange | Hembra | 74.2341 | 0.0628 | 0.05 |
| | Macho | 62.0297 | | |

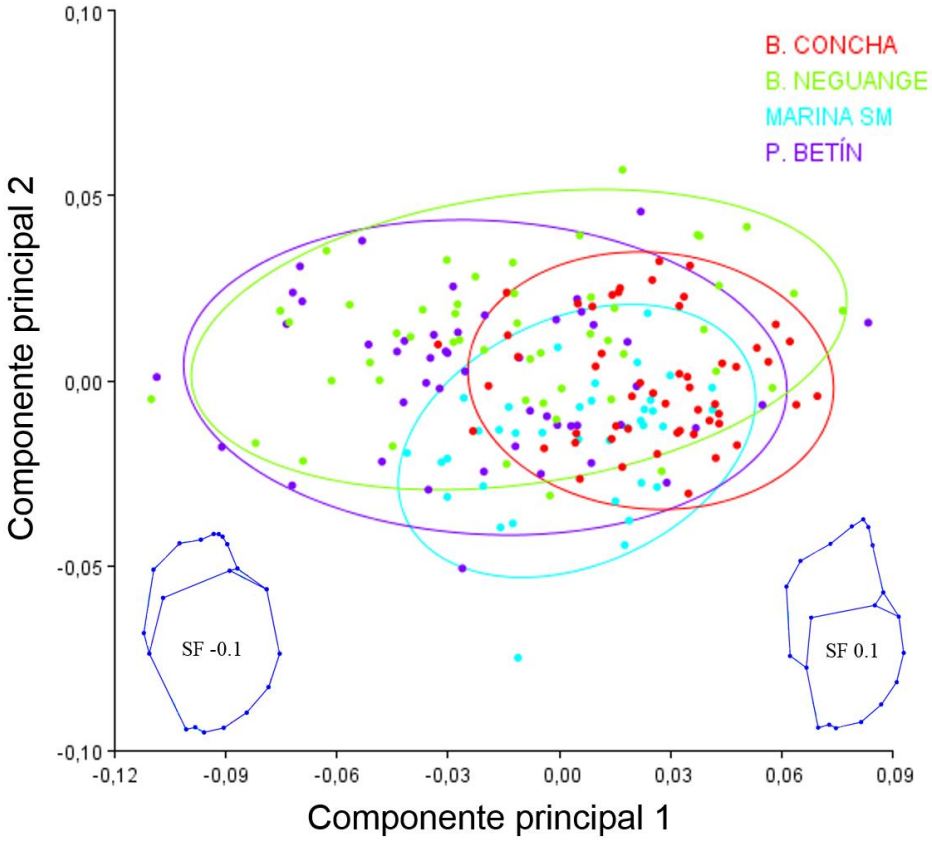
- **Variación de la forma**

El test de Doornik-Hassen (Ep= 370.2, p-valor <0.0001) y la prueba M de Box (M de Box= 4557.8, p-valor <0.0001) indican que las variables de conformación no se ajustan a una distribución normal multivariada.

Los primeros 10 componentes principales explican el 84.64% del total de la variación. El PC1 (37.34%) describe un rango mayor de ordenamiento respecto a los demás componentes. Los individuos de las estaciones de PB y BN describen un rango de ordenamiento amplio, que va desde los valores más negativos hasta los más positivos de

los PC 1 y 2, sin embargo, la mayoría de individuos se ubican en los valores negativos del PC1. Para las estaciones de la de la MS y BC el rango de ordenamiento es más reducido en los dos primeros componentes principales. La mayoría de los individuos de BC se ordenan en el eje positivo del PC1, y los individuos de la MS se ubican espacialmente en los ejes positivo y negativo menos extremos del PC1 (Figura 1-5). Se observa que la forma de la concha varía de un extremo al otro del eje del PC1. En el extremo positivo las conchas describen una forma más delgada, con la apertura de la concha más estrecha y el ápice un poco desplazado hacia la derecha. Mientras que las conchas del extremo negativo presentan una forma más globosa y la apertura de la concha más amplia.

**Figura 1-5:** Gráfico con los dos primeros componentes principales de la concha de *Plicopurpura patula*, mostrando la ordenación de la forma de la concha respecto al desarrollo de imposex. Los gráficos estructura de alambre (wireframe) representan las formas extremas positiva y negativa a lo largo del eje del PC1. Los cambios de la forma tienen un factor de escala (SF) de 0.1.



El análisis de variable canónica muestra una separación más clara entre los individuos de la MS y las demás estaciones (Figura 1-6). Se observa que los ejemplares tienen conchas que describen una forma más delgada y apertura estrecha. Los individuos de BN y PB comparten la misma ordenación y no son claramente diferenciables, estos ejemplares describen una forma más globosa y la apertura más ancha. BC forma un grupo separado, describiendo en su mayoría formas delgadas y algunos individuos de formas más globosas. Al hacer el test de comparaciones pareadas se estableció que sólo entre las estaciones de BN y PB hay similitudes en la forma de la concha (Tabla 1-8).

**Figura 1-6:** Análisis de variable canónica para la ordenación de conchas de *Plicopurpura patula* por estación. Los gráficos de estructura de alambre (wireframe) representan las formas extremas positiva y negativa a lo largo del eje del CV1. Los cambios de la forma tienen un factor de escala (SF) de 4.0.

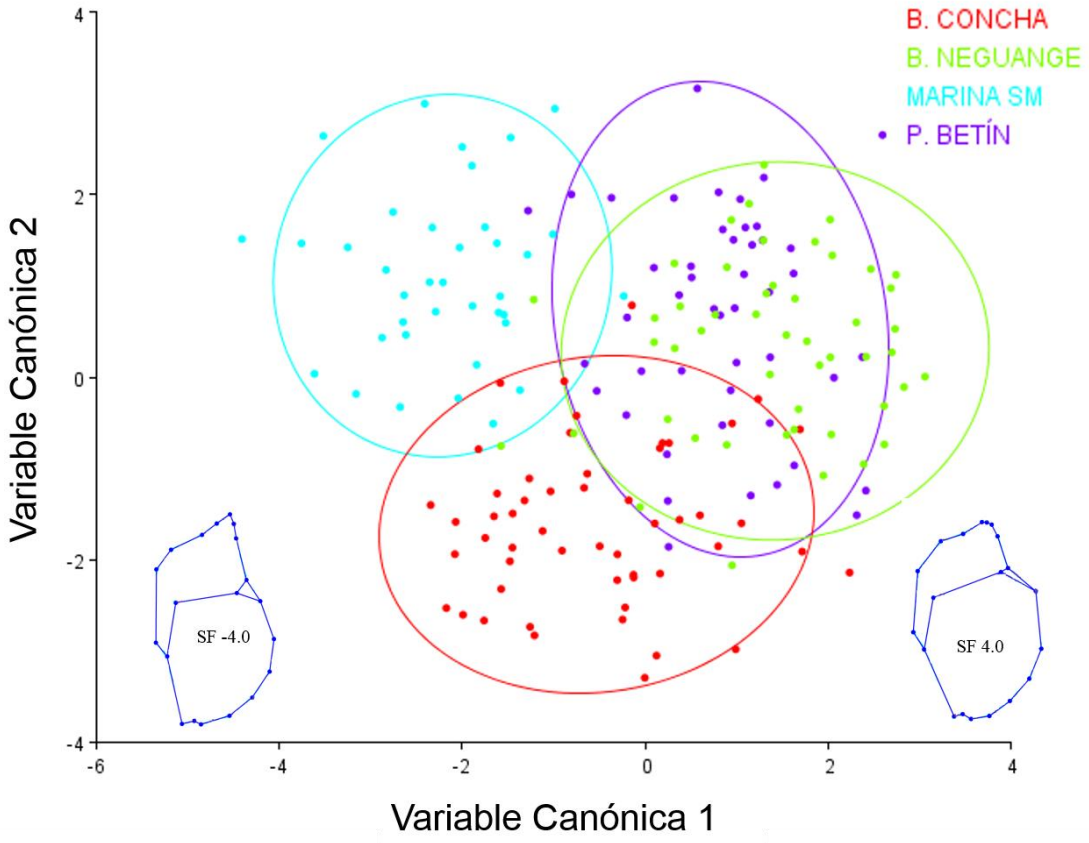


**Tabla 1-8:** Análisis de variable canónica con un test de 10000 permutaciones para distancias pareadas.

| Grupo | Distancias | | | | p-valor Test de permutaciones | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Procrustes | Mahalanobis | T-squaer | p-Valor | Procrustes | T-square |
| B. Concha - B. Neguange | 0.04097516 | 3.1745 | 259.2719 | <.0001 | <.0001 | <.0001 |
| B. Concha - Marina SM | 0.03266902 | 4.1486 | 374.9984 | <.0001 | <.0001 | <.0001 |
| B. Concha- P. Betín | 0.04672995 | 3.0230 | 227.6373 | <.0001 | <.0001 | <.0001 |
| B. Neguange - Marina SM | 0.03579795 | 4.3202 | 396.8823 | <.0001 | <.0001 | <.0001 |
| B. Neguange -P. Betín | 0.01935142 | 2.5596 | 158.7280 | 0.0002 | 0.0378 | 0.0002 |
| Marina SM - Punta Betín | 0.03571167 | 5.3798 | 599.1807 | <.0001 | <.0001 | <.0001 |

El análisis de función discriminante arroja resultados muy similares al ACV en cuanto a la ordenación de los grupos. La asignación cruzada para la mayoría de los grupos pareados presenta un porcentaje de asignación superior al 80%. Los individuos de la MS presentan una mayor diferencia en la forma de la concha respecto a los individuos de las demás estaciones (Tabla 1-9, Figura 1-7). Los porcentajes de similitud entre los individuos de la MS y las demás estaciones es muy bajo, 8.11% con BN, 12.92% y 18.92% con BC y PB respectivamente. Para cada una de las comparaciones pareadas, exceptuando PB - BN, los p-valor (< 0.0001) indican que las formas promedio de cada estación son distintas. Para la comparación PB - BN la asignación cruzada evidencia una similitud mayor (34- 29.79%), no obstante, el p-valor (0.0378) indica que son dos grupos.

**Tabla 1-9:** Análisis de función discriminante con asignación cruzada para comparaciones pareadas.

| Grupos | Asignación Cruzada | | | |
|---|---|---|---|---|
| | B. Concha | B. Neguange | Total | % |
| B. Concha | 44 | 9 | 53 | 83.02 |
| B. Neguange | 9 | 41 | 50 | 82.00 |
| | B. Concha | Marina SM | | |
| B. Concha | 49 | 4 | 53 | 92.45 |
| Marina SM | 7 | 30 | 37 | 81.08 |

**Tabla 1-9:** (Continuación)

| Grupos | Asignación cruzada | | | |
|---|---|---|---|---|
| | B. Concha | P. Betín | Total | % |
| B. Concha | 40 | 13 | 53 | 75.47 |
| Betín | 14 | 33 | 47 | 70.21 |
| | B. Neguange | Marina SM | | |
| B. Neguange | 44 | 6 | 50 | 88.00 |
| Marina SM | 3 | 34 | 37 | 91.89 |
| | B. Neguange | P. Betín | | |
| B. Neguange | 33 | 17 | 50 | 66.00 |
| P. Betín | 14 | 33 | 47 | 70.21 |
| | Marina SM | P. Betín | | |
| Marina SM | 32 | 5 | 37 | 86.486 |
| P. Betín | 6 | 41 | 47 | 87.234 |

**Figura 1-7:** Histogramas de validación cruzada para la comparación pareada entre los individuos de *Plicopurpura patula* de las cuatro estaciones de muestreo. Los gráficos de estructura de alambre (wireframe) representan las formas extremas positiva y negativa a lo largo del eje. Los cambios de la forma tienen un factor de escala (SF) de 3.0.

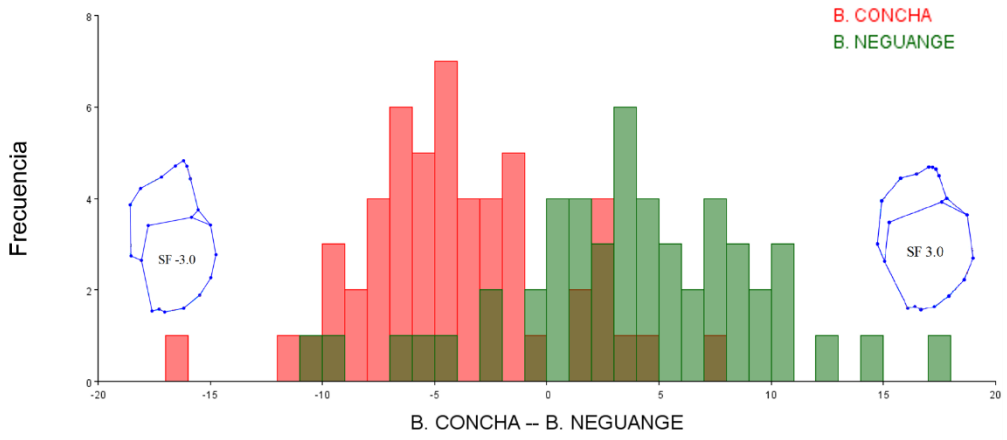


**Figura 1-7:** (Continuación)

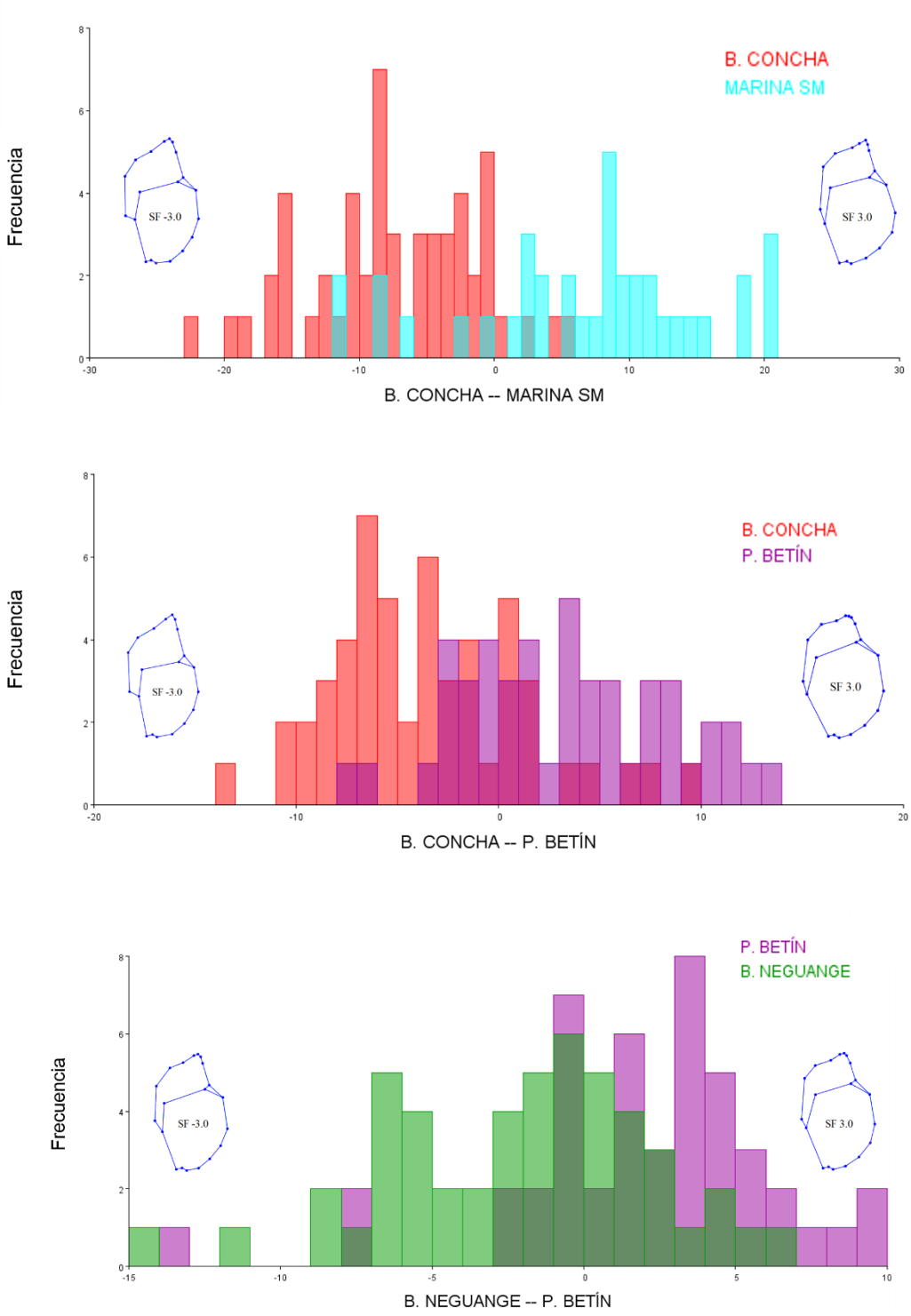
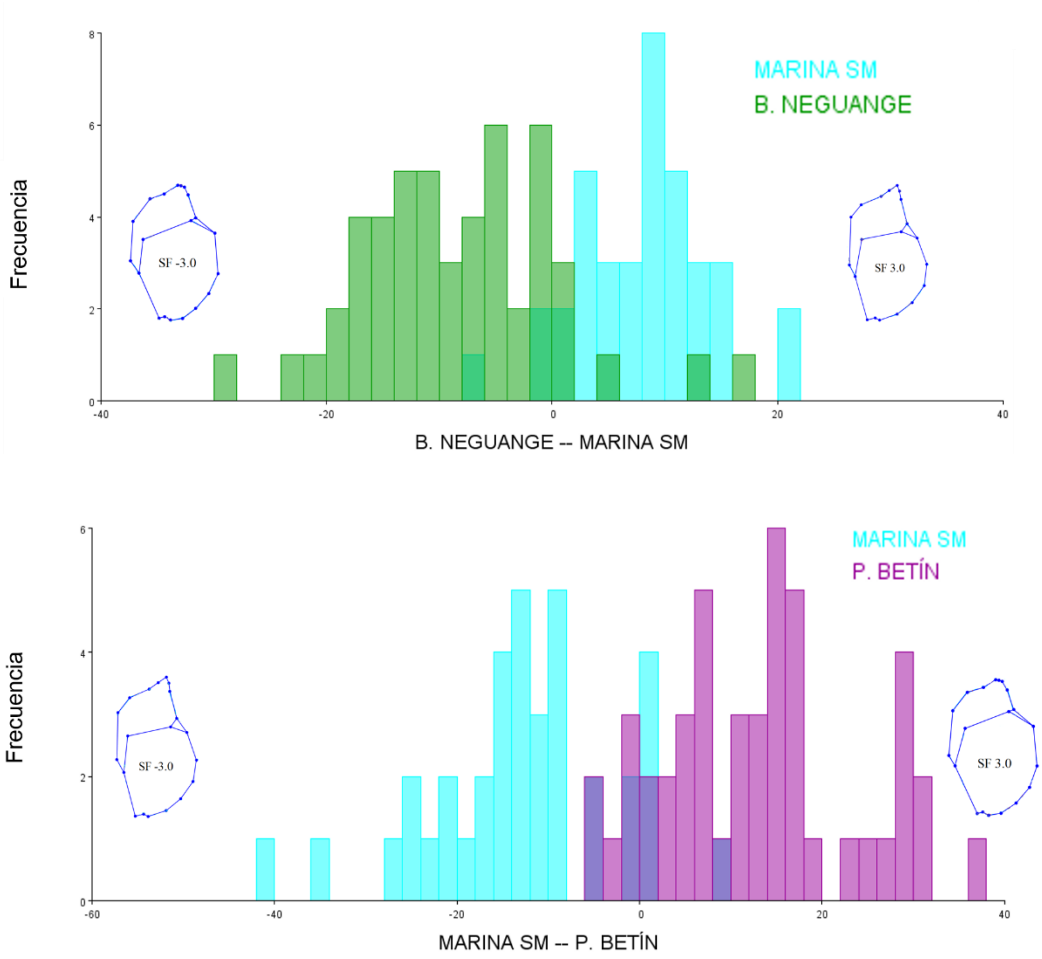


**Figura 1-7:** (Continuación)




El MANOVA no paramétrico con 10000 permutaciones indica que hay diferencias significativas en cuanto a las variables de conformación para las cuatro estaciones (Suma de cuadrados total = 8.471e4, suma de cuadrados entre grupos= 6.39e4, F= 19.87, p-valor < 0.0001). Las comparaciones pareadas evidencian que, entre la MS y las demás estaciones, al igual que entre BC y las otras estaciones, hay diferencias significativas en las variables de conformación, mientras que las estaciones PB y BN no hay diferencias significativas (Tabla 1-10). Estos resultados son concordantes con los resultados de los análisis de ordenamiento, de tal manera que se puede afirmar que la forma de la concha es diferente para las estaciones de la MS y BC mientras que las estaciones PB y BN comparten la misma forma de la concha.

**Tabla 1-10:** p valores de las Comparaciones pareadas con corrección secuencial de Bonferroni.

| Estación | Marina SM | P. Betín | B. Concha |
|---|---|---|---|
| **P. Betín** | < 0.0001 | | |
| **B. Concha** | 0.0024 | < 0.0001 | |
| **B. Neguange** | < 0.0001 | 0.999 | < 0.0001 |

# 1.4 Discusión

## 1.4.1 Biometría e imposex

El desarrollo de imposex en hembras de *Plicopurpura patula* y *Thais deltoidea* en la Marina de Santa Marta y el Muelle de Tierrabomba puede ser evidencia de la existencia de contaminación por TBT en aguas costeras del Caribe colombiano. La ausencia de imposex en las otras estaciones de muestreo puede deberse a que no hay contaminación, o ésta es mínima gracias a la lejanía de fuentes puntuales de contaminación, como las ubicadas en el PPNT, y/o a las condiciones ambientales de cada sitio. Adicionalmente, se debe tener en cuenta que estas especies son de litorales rocosos y el contaminante se acumula mayormente en fondos blandos. *P. patula* es una especie que habita en el supralitoral estando expuesto al contaminante de forma intermitente al igual que sus presas, y *T. deltoidea* a pesar de estar sumergida, los muestreos de esta especie se realizaron entre los 0 y 1.5 mm de profundidad. En la Bahía de Cartagena se registró imposex de grados I, II, III y IV en la especie *Stramonita haemastoma* que habita el infralitoral (Sierra-Márquez y Olivero-Verbel, 2014). Esto evidencia que otras especies de neogasterópodos en Colombia pueden presentar mayor incidencia de imposex, incluso en donde se asume que la contaminación es mínima.

A pesar de que en este estudio no se midieron las concentraciones de compuestos orgánicos de estaño se observó que estas especies presentan distintos grados de imposex en las mismas estaciones de muestreo y por consiguiente se puede pensar en que presentan sensibilidad diferencial al contaminante. Esto puede estar relacionado con diferencias en los hábitos alimentarios, micro-condiciones ambientales, la distribución

vertical en el litoral, además de posibles diferencias en las respuestas fisiológicas, Strand *et al.* (2009) menciona que estas especies pueden tener metabolismos y procesos de excreción distintos, permitiéndoles bioacumular mayor o menor cantidad TBT u otros contaminantes en sus tejidos.

La incidencia de imposex está directamente relacionada con las concentraciones de TBT en el medio (Matthiessen y Guibbs, 1998), incluso se presume que otros contaminantes como el cobre podrían inducir el desarrollo de imposex (Nias *et al*., 1993; Peralta *et al*., 2014). Para *Plicopurpura patula* se ha reportado que desarrolla imposex cuando las concentraciones en tejido de TBT son mayores a 3 ng $Sn.g^{-1}$ de peso seco y la frecuencia de imposex es del 90% cuando las concentraciones en tejido son de 11.5 - 13 ng $Sn.g^{-1}$ peso seco (Strand *et al.*, 2009; Paz-Villarraga *et al*., 2015). Por otro lado, *Thais deltoidea* desarrolla imposex cuando la concentración de TBT en tejido es de 8.1ng $Sn.g^{-1}$ de peso seco y la frecuencia de imposex es del 75% cuando las concentraciones de TBT en tejido son de 32 ng $Sn.g^{-1}$ de peso seco (Strand *et al*., 2009). Las observaciones del presente estudio podrían indican que los ejemplares de las estaciones de la Marina de Santa Marta y Muelle de Tierrabomba estarían expuestos a altas concentraciones de Sn. Paz-Villarraga *et al*., (2015) reportaron concentraciones en sedimento de más de 100 ng $Sn.g^{-1}$ peso seco, en localidades en donde las concentraciones en tejido son mayores a 3 ng $Sn.g^{-1}$ peso seco y dada la relación entre la concentración de TBT en tejido y la concentración de TBT en sedimentos (Castro *et al*., 2012a), es probable que la concentración en los sedimentos en estas estaciones sobrepase los 100 ng $Sn.g^{-1}$ peso seco. No obstante, es necesario hacer las respectivas mediciones de las concentraciones tanto en tejido como en sedimento para tener una medida exacta de la contaminación por compuestos orgánicos de estaño.

Las normativas internacionales que prohíben el uso de TBT en grandes embarcaciones han permitido que la contaminación por este compuesto y la incidencia de imposex hayan disminuido a lo largo del tiempo en muchas zonas costeras del mundo (Castro *et al*., 2012b; Wilson *et al*., 2015). Aunque Colombia no se encuentra adscrita a dichos convenios, estas medidas han favorecido a que en zonas aledañas a puertos o de alto tráfico naviero, como Punta Betín, no se registren hembras con imposex. La presencia de imposex en la Marina SM puede tener una estrecha relación con el uso libre de pinturas antiincrustantes a base

de TBT. En Brasil y Venezuela se ha observado algo similar, en donde los botes medianos y pequeños son la mayor fuente de contaminación de TBT (Castro y Fillmann, 2012; Borges *et al.*, 2013; Paz-Villarraga *et al.,* 2015).

Son y Hughes (2000) proponen que los organismos afectados por el imposex presentan una disminución de la asignación de recursos para el desarrollo sexual, de tal manera que se da una asignación somática mayor que se ve reflejada en el crecimiento del cuerpo. Según sus estudios, individuos de *Nucella lapillus* altamente afectados alcanzan grandes tamaños comparados con los que están menos afectados. No obstante, Bigatti y Carranza (2007) reportaron que los individuos de las zonas con afectación presentan reducciones del 10% del peso del cuerpo y no evidencian un aumento en el tamaño de la concha respecto a los que no presentan afectación. En el presente estudio se observa que la mayoría de los ejemplares afectados de *Plicopurpura patula* presentan tallas muy pequeñas en comparación con los individuos sanos, de igual manera, presentan reducciones en el peso del cuerpo y de la concha. Mientras que en *Thais deltoidea* no se presenta una reducción significativa en las tallas o en los pesos pero si un aumento aparente en estas variables tal como ocurre en *N. lapillus*. Esto evidencia que el imposex no sólo afecta la reproducción de los gasterópodos, sino que también puede estar afectando funciones somáticas que podrían conllevar a la pérdida o aumento de masa, disminución o aumento del crecimiento, descalcificación o fallas metabólicas en la formación de la concha.

### 1.4.2 Forma de la concha

Además de detectar el fenómeno del imposex en la zona costera de los departamentos del Magdalena y Bolívar, se observaron variaciones en la forma de la concha. Los ejemplares de la MS difieren por completo en su forma de los ejemplares de las demás estaciones. Márquez *et al*. (2011) y Primost *et al*. (2016) observaron cambios en la forma de la concha en dos especies de gasterópodos, *Odontocymbiola magellanica* y *Buccinanops globulosus*, respectivamente. Para el caso de *O. magellanica* los individuos de la zona contaminada presentan formas más delgadas y estrechas. Por otro lado, los individuos de *B. globulosus* de las zonas con afectación presentan formas más globosas, con la espira y el canal sifonal más corto y la apertura más pequeña. En este estudio pudimos observar

que los ejemplares de *P. patula* de la MS describen una forma de la concha similar a la de *O. magellanica* de las zonas contaminadas, presentando formas más delgadas, con la apertura más estrecha y la espira más alargada. Las diferencias entre especies en cuanto a la forma de la concha de individuos afectados podría estar relacionada con diferentes factores: la disrupción endocrina que estaría causando un crecimiento anormal de la concha afectaría de manera diferente a cada especie dependiendo del grado de sensibilidad al contaminante, presencia de otros contaminantes en el medio, incluso podrían estar relacionada con características físicas del hábitat. Para comprobar esto se deben ampliar los estudios.

Se esperaría que entre las estaciones más cercanas como Marina de Santa Marta y Punta Betín las diferencias en la forma fueran mínimas. No obstante, los resultados de morfometría geométrica muestran que la forma es completamente diferente entre MS y PB, mientras que PB comparte forma con BN pese a la distancia geográfica. Aunque la plasticidad fenotípica de los gasterópodos esté condicionada por factores físicos y ecológicos del medio (Vermeij, 1977; 1982; Parra-Carrillo, 2012), en este caso de estudio no se debe menospreciar que la presencia de hembras con imposex es indicativo de que los organismos han estado o están expuestos a contaminación por compuestos orgánicos de estaño y que este tipo de contaminación podría inducir alteraciones en el crecimiento de la concha y alterar su forma tal como se ha reportado en otras especies.

Parra-Carrillo (2012) observa dos morfotipos en cada una de las poblaciones de *P. patula* de Cartagena y ésta variación intrapoblacional la relaciona con la exposición al oleaje. Se considera que individuos que habitan en zonas de alto impacto al oleaje presentan conchas con abertura ancha para tener mejor agarre al sustrato, mientras que zonas con poco oleaje predominan las conchas con abertura estrecha como protección a la depredación y la desecación (Vermeij, 1977; 1982; Parra-Carrillo, 2012). En el presente estudio en todas las estaciones de muestreo se observa dos morfotipos, sin embargo, las proporciones entre estos difieren. En PB y BN predominan las conchas globosas con espira corta y apertura ancha, en MS más del 80% de las conchas presentan espira larga y apertura estrecha, y particularmente en BC, aunque hay una tendencia hacia las conchas con espira larga y apertura estrecha, hay una proporción importante de ejemplares con forma un poco más globosa. Estas diferencias posiblemente están relacionadas con la morfología del

litoral propia de cada estación de muestreo, y/o con la densidad poblacional de *P. patula* y de la fauna acompañante, de tal manera que estos factores puedan favorecer la presencia de ejemplares con conchas globosas o estrechas. Se observó que los litorales de PB BC y BN presentan el mismo tipo de sustrato con presencia de grietas y oquedades, pendiente variable a lo largo del litoral y la fauna acompañante es muy similar aunque no se estimó la densidad de esta, por otro lado el sustrato de la MS es diferente debido a su condición de litoral artificial conformado por rocas apiladas y pendiente poco variable a lo largo del litoral. En cuanto al oleaje BN y PB son más similares entre sí, mientras que BC y MS presentan un oleaje mucho más suave y en todos los sitios la mayoría de los ejemplares se encontraron en la zona expuesta del litoral. Particularmente, los ejemplares de la MS y BC se caracterizan por tener conchas delgadas con espira alargada y apertura estrecha, sin embargo, la forma de la concha de los individuos de la MS es estadísticamente diferente, presentan las menores tallas para los dos sexos, se observaron alteraciones en la microestructura de la concha (que se estudiarán en detalle en el capítulo II) y adicionalmente el porcentaje de hembras con imposex fue superior al 90% en las dos especies de estudio, siendo un indicativo de que en esta estación hay condiciones ambientales adicionales, como la contaminación, que están afectando características fenotípicas de los neogasterópodos que habitan allí.

Dado que *P. patula* es una especie que habita en la zona de marea de litorales rocosos y que las especies difieren entre sí en cuanto a la sensibilidad al contaminante, es muy posible que en el presente estudio no se evidencie por completo el grado de afectación real que podrían estar presentando los gasterópodos de la zona de estudio. Debido a que el TBT se acumula en los sedimentos es necesario incluir en estos estudios especies que se encuentren en el infralitoral, o que habiten en fondos blandos cercanos a la zona de estudio. De igual manera sería necesario aplicar estudios morfométricos a otras especies afectadas con el fin de establecer si se presentan las mismas variaciones en la concha.

## 1.5 Conclusiones y recomendaciones

### 1.5.1 Conclusiones

En el Caribe colombiano se presenta el fenómeno de imposex en las especies *Plicopurpura patula* y *Thais deltoidea* en zonas de marina y muelle de la ciudad de Santa Marta y

Tierrabomba. Dada la relación entre la concentración de TBT y el imposex, se presume que en esta zona se presenta alta contaminación por compuestos orgánicos de estaño.

Debido a que solo en dos de los sitios muestreados se registró imposex, se asume que en general la contaminación por TBT es baja en el Caribe continental colombiano, lo que puede relacionarse con la normativa internacional existente en torno al uso de este tipo de compuestos.

Los resultados de la presente investigación permiten concluir que en las especies de estudio ocurren cambios fenotípicos que podrían estar relacionados con la presencia de un contaminante como el TBT. De tal manera que el imposex no sería la única afectación que los compuestos organoestánicos generan en las especies de gasterópodos del Caribe colombiano, sino que pueden presentarse cambios a nivel somático como reducción o aumento del peso de la concha y del cuerpo blando, en el tamaño y alteraciones en la forma de la concha.

## 1.5.2 Recomendaciones

Debido a las malformaciones en el cuerpo blando (imposex) y en la concha por causa de contaminantes, se hace necesario que en Colombia se establezcan normas que prohíban el uso y aplicación de pinturas anti-incrustantes a base de TBT.

Se recomienda incluir los estudios de intensidad y prevalencia de imposex dentro de los programas de monitoreo de la calidad ambiental marina, tanto en las costas del Caribe como en las costas del Pacífico colombiano.

# 2. Variación estructural de la concha con relación al grado de imposex

## 2.1 Introducción

Los moluscos producen 21 tipos de minerales (amorfos y cristalinos) con una variedad amplia de funciones (Nudelman, 2015), siendo la formación de la concha una de las más estudiadas. La concha se forma por la mineralización del carbonato de calcio que la epidermis del manto secreta (Noshita, 2014). El borde del manto es la zona más activa de deposición permitiendo que la concha crezca, aumente de espesor y se acomode al crecimiento del animal (Nudelman, 2015). En los adultos el crecimiento de la concha ocurre por incremento y tiene lugar en el borde distal de la concha (Marin y Luquet, 2004).

La concha está constituida por dos capas; una superficial no mineralizada denominada periostraco y una interna mineralizada; esta última se puede dividir en varias capas de acuerdo con la organización de los cristales de carbonato de calcio, que en la mayoría de las especies de gasterópodos están en forma de aragonita y en algunas de calcita (Baqueiro y Aldana, 1995; Addadi *et al.*, 2006). El periostraco además de sellar el espacio extrapalial para que se puedan generar las condiciones de supersaturación requeridas para la formación de cristales, es el primer soporte para la formación de los cristales (Marin y Luquet, 2004). La formación de cristales de carbonato de calcio ocurre en la matriz orgánica extracelular, un complejo de proteínas, glicoproteínas, proteoglicanos, polisacáridos y quitina, que es secretada en el espacio extrapalial por células especializadas del manto calcificador. La matriz interactúa con los iones minerales formando cristales con orientación y morfologías bien definidas (Addadi y Weiner, 1985). La cinética de calcificación varía de una especie a otra, dentro de una sola especie es dependiente de la condición (Marin y Luquet, 2004).

La concha en los moluscos contiene información sobre la historia de vida, enfermedades, y condiciones ambientales en las que se dio el proceso de mineralización (Nuñez *et al*., 2012).

Factores ambientales como la temperatura, el tipo de sustrato, hidrodinámica y la salinidad pueden provocar cambios intraespecíficos en la forma, grosor y composición en las conchas (Begliomini *et al*., 2017). Se ha demostrado que cambios en la composición química y morfológica de la concha en bivalvos y gasterópodos también pueden ser causa de la exposición a contaminantes como el Cd, Pb y organoestánicos y organoclorados (Laitano *et al*., 2013). Se han registrado diferentes tipos de alteraciones en la concha relacionadas con la exposición al TBT, entre las que se encuentran cambios en el grosor o espesor, pérdida de la forma, pérdida o aumento de peso, cambios en la densidad, cambios microestructurales en la capa interna de la concha y pérdida de capas de carbonato de calcio (Alzieu *et al*., 1986; Almeida *et al*., 1998; Alzieu, 2000; Márquez *et al.*, 2011; Nuñez *et al*. , 2012; Avaca *et al*., 2013; Laitano *et al*., 2013).

El objetivo en esta parte de la investigación era identificar alteraciones en la estructura y densidad de la concha con relación a la intensidad de imposex en las especies intermareales *Plicopurpura patula* y *Thais deltoidea*. Para el desarrollo de este objetivo se utilizaron técnicas de microscopía electrónica de barrido (MEB) y tomografía computarizada (CT).

## 2.2 Metodología

Para esta parte del estudio se utilizaron las conchas de 247 individuos de *Plicopurpura patula* y 149 individuos de *Thais deltoidea* provenientes de las estaciones de muestreo descritas en el capítulo previo: Cabo de la Vela (CV), Bahía Neguange (BN), Bahía Concha (BC), Punta Betín (PB), Marina de Santa Marta (MS), Tierrabomba (TB), Muelle de Tierrabomba (ML) y Bocachica (BH).

### 2.2.1 Densidad de la concha

Se realizaron tomografías computarizadas simples (TC) de la concha de *Plicopurpura patula* y *Thais deltoidea*, en un tomógrafo helicoidal de 3$^{ra}$ generación Tomoscan AV

PHILPIS de la facultad de Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá. Para la toma de las imágenes se utilizó una configuración de 110 MA 120KV y un FOV variable. Se hicieron múltiples cortes transversales del labio de la concha y se registraron las densidades en unidades Hounsfield (HU) del punto más cercano al borde externo. Las imágenes fueron analizadas con el software Weasi versión 1.2.5. Debido la diferencia en número de cortes por individuo se seleccionaron cinco cortes por ejemplar que coincidieran en posición: uno cerca al canal sifonal, uno cerca al canal anal y tres intermedios.

### 2.2.2 Estructura de la concha

Para observar la estructura de la concha en las especies *Plicopurpura patula* y *Thais deltoidea*, se escogió el labio externo de la concha de cada individuo. Éste fue separado de la concha haciendo un corte longitudinal desde el borde del canal sifonal hasta el borde del canal anal. Márquez *et al.* (2011) indican que estas observaciones se hacen en el labio de la concha, ya que en esta estructura hay una secreción continua de concha, y se prefiere sobre otras estructuras debido a que está menos expuesta a procesos de erosión y a la formación de fouling o epibiosis. El labio fue fracturado debajo del cordón anterior al canal anal ya que en esta zona no se observaron cicatrices y/o perforaciones por organismos bioerodadores. Los fragmentos fueron transportados al Laboratorio de Microscopía Electrónica de la Universidad Nacional Sede Bogotá, en donde se procedió a metalizar las muestras con un recubrimiento de oro-paladio usando un Metalizador Quorum Q150R. Cada fragmento fue observado en el microscopio electrónico de barrido (MEB) Tescan Vega 3 SB del Departamento de Física de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá.

### 2.2.3 Análisis estadístico

Se evaluaron los supuestos de normalidad para los cinco cortes medidos en el labio de la concha para cada estación. Se hicieron comparaciones de medias entre hembras y machos dentro de cada estación de muestreo. Las densidades para cada corte fueron comparadas entre estaciones por sexo. Los análisis estadísticos se hicieron en el software R versión 3.2.3 (The R foundation for Statistical Computing, 2015), fueron independientes para cada especie y se utilizó un $\alpha = 0.05$ para la significancia estadística.

## 2.3 Resultados

### 2.3.1 Densidad de la concha

Las imágenes de las tomografías computarizadas revelan que los ejemplares de *Plicopurpura patula* de la Marina de Santa Marta y Muelle de Tierrabomba tienen conchas con menor densidad respecto a los ejemplares de las otras estaciones (Figuras 2-1, 2-2, 2-3). Machos y hembras describen el mismo patrón de densidad a lo largo de la concha dentro de cada estación de muestreo. Las conchas de MS y ML se caracterizaron por presentar espiras y canal sifonal con densidades bajas, un aumento leve de densidad en la parte dorso-lateral izquierda del el último giro y densidades muy bajas y bajas en el labio externo y la parte dorso-lateral derecha del último giro. Las mayores densidades se presentaron en la columnela y en algunos nódulos de los cordones espirales del último giro. Por otro lado, los ejemplares de CV, BN, BC, TB y BH presentan densidades intermedias a altas en la mayor parte de la concha y en PB las conchas se caracterizan por tener densidades altas en toda la concha (Figura 2-4, 2-5, 2-6). A diferencia de los ejemplares de la MS y ML, las espiras de estas conchas presentan densidades intermedias y altas, y gran parte del último giro presenta altas densidades, incluyendo el labio externo.

En la especie *Thais deltoidea* no se observó un cambio de densidad en los ejemplares de las estaciones en donde se registró imposex y dentro de las estaciones no se observan diferencias entre sexos. En términos generales las conchas en todas las estaciones presentan densidades altas desde el ápice hasta el canal sifonal. Las conchas de BN son las más gruesas, seguidas por las de la MS y el ML, en estas tres estaciones las conchas presentan una densidad uniforme en toda la concha (Figura 2-7, 2-8). Las conchas de PB y BC son muy similares en grosor y patrones de densidad, en éstas la mayoría de la espira presenta densidades altas y en algunos sectores muy pequeños densidades intermedias, el resto de la concha describe una densidad uniforme, incluyendo en las zonas en donde se presenta un adelgazamiento del labio externo (Figura 2-8).

**Figura 2-1:** Tomografía computarizada de la concha de cuatro hembras del caracol marino *Plicopurpura patula* afectadas con imposex. Los cuatro ejemplares pertenecen a la estación de la Marina de Santa Marta, Caribe colombiano. La escala de colores indica la densidad estimada en unidades Hounsfield, los colores del espectro del azul representan bajas densidades mientras que los del espectro del rojo densidades altas. De izquierda a derecha incrementa la longitud máxima de la concha.

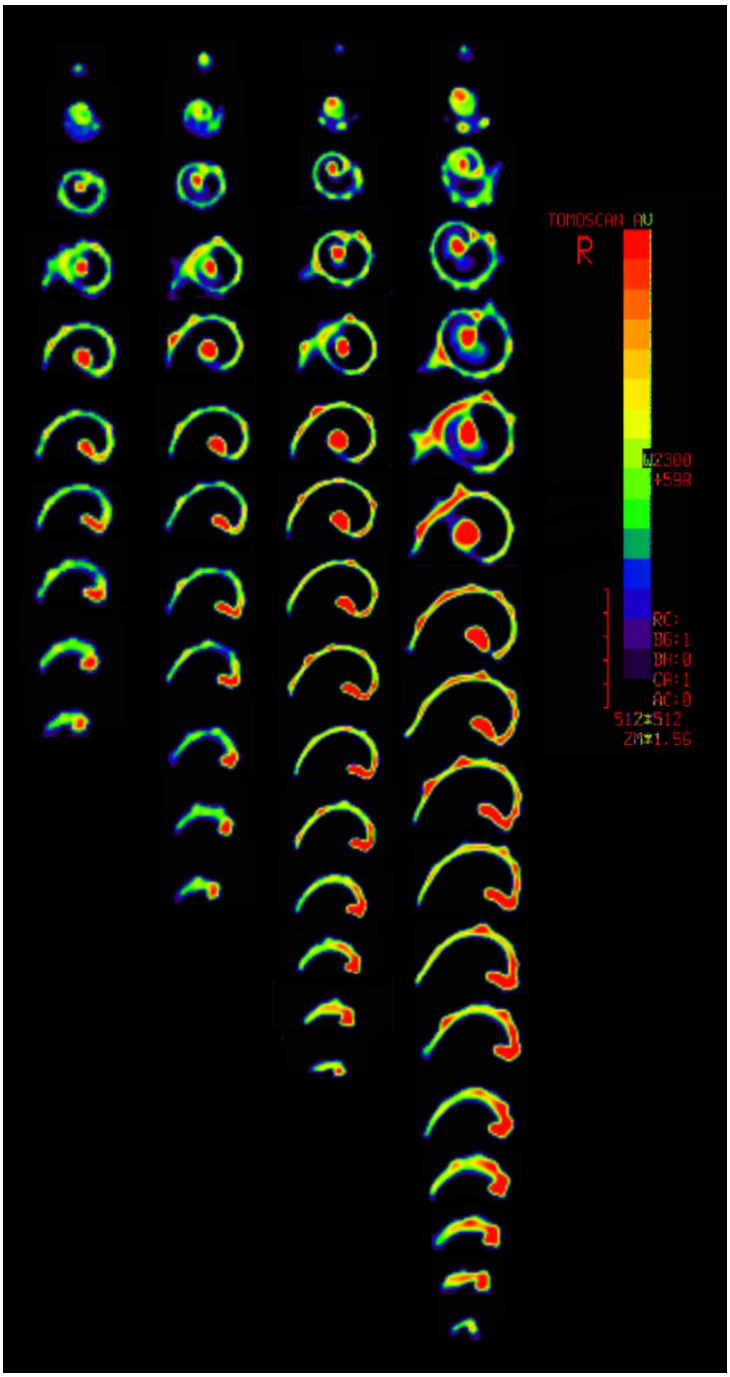


**Figura 2-2:** Tomografía computarizada de la concha de cuatro machos del caracol marino *Plicopurpura patula* de la estación de la Marina de Santa Marta, Caribe colombiano. La escala de colores indica la densidad estimada en unidades Hounsfield, los colores del espectro del azul representan bajas densidades mientras que los del espectro del rojo densidades altas. De izquierda a derecha incrementa la longitud máxima de la concha.

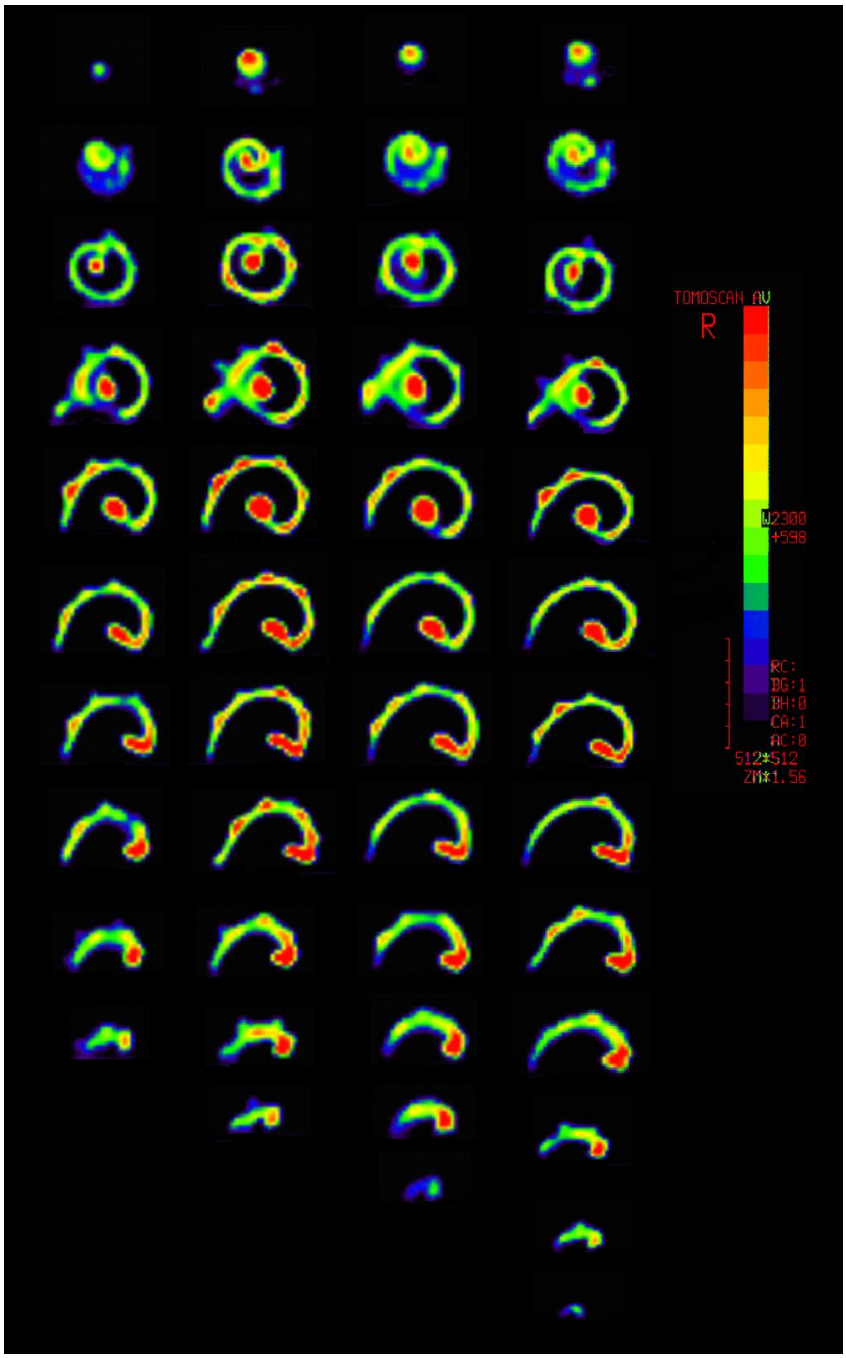


**Figura 2-3:** Tomografía computarizada de la concha de hembras y machos del caracol marino *Plicopurpura patula* de la estación Muelle de Tierrabomba, Caribe colombiano. M: macho, H: hembra sana. La escala de colores indica la densidad estimada en unidades Hounsfield, los colores del espectro del azul representan bajas densidades mientras que los del espectro del rojo densidades altas.

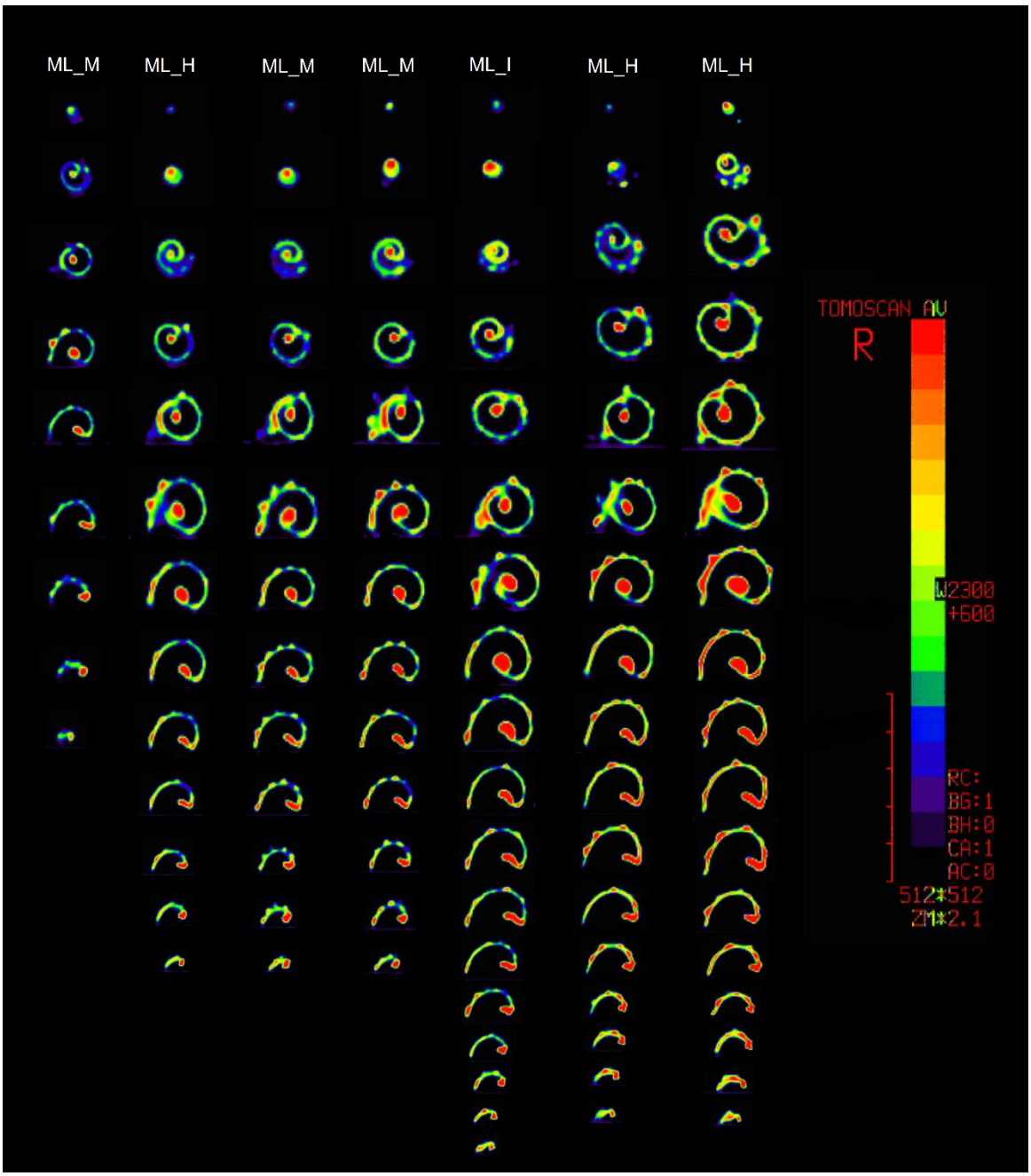


**Figura 2-4:** Tomografía computarizada de la concha de hembras (H) y machos (M) del caracol marino *Plicopurpura patula* de las estaciones Punta Betín (PB) y Bahía Concha (BC) del Caribe colombiano. La escala de colores indica la densidad estimada en unidades Hounsfield, los colores del espectro del azul representan bajas densidades mientras que los del espectro del rojo densidades altas.

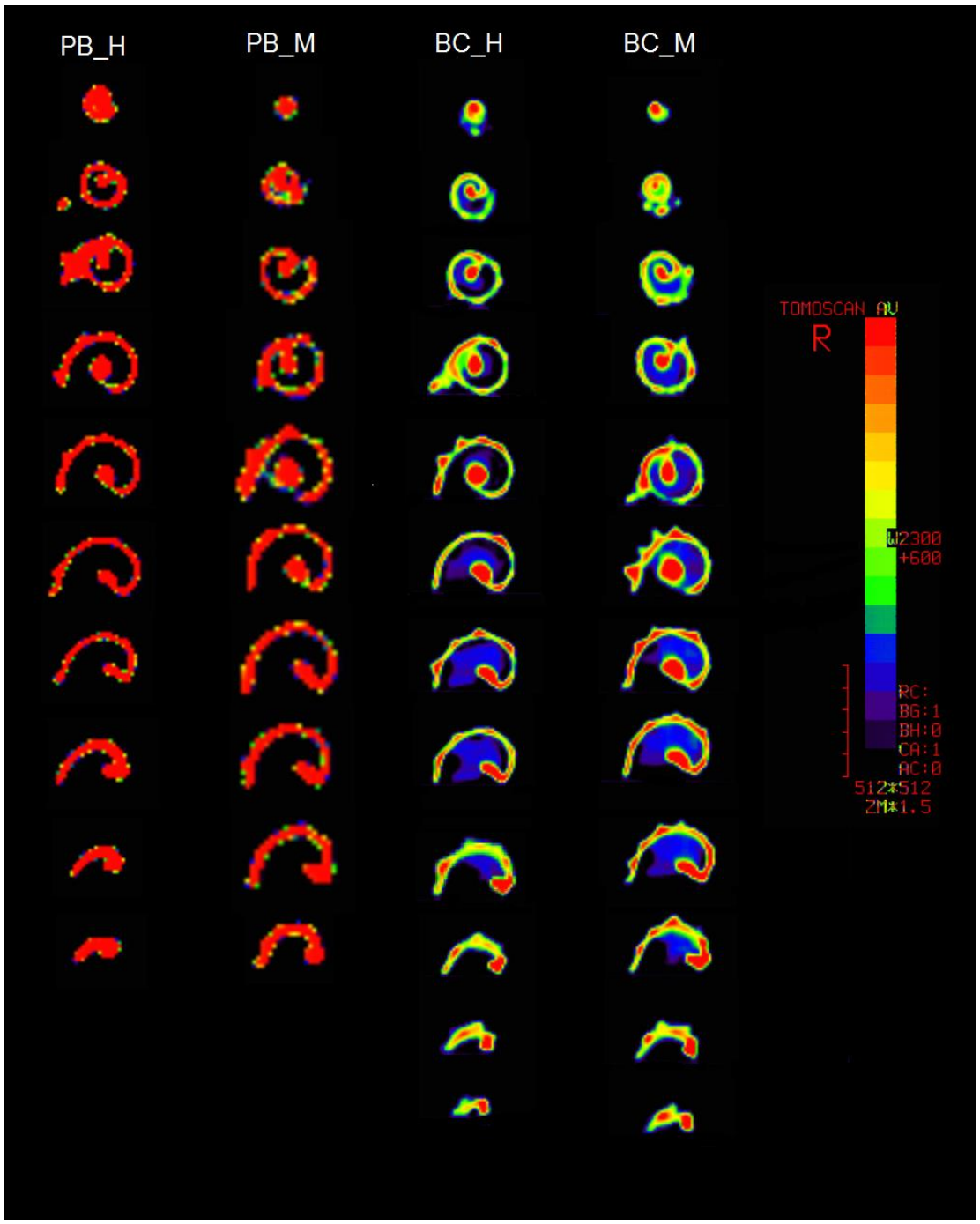


**Figura 2-5:** Tomografía computarizada de la concha de hembras (H) y machos (M) del caracol marino *Plicopurpura patula* de las estaciones Bahía Neguange (BN) y Cabo de la Vela (CV) del Caribe colombiano. La escala de colores indica la densidad estimada en unidades Hounsfield, los colores del espectro del azul representan bajas densidades mientras que los del espectro del rojo densidades altas.

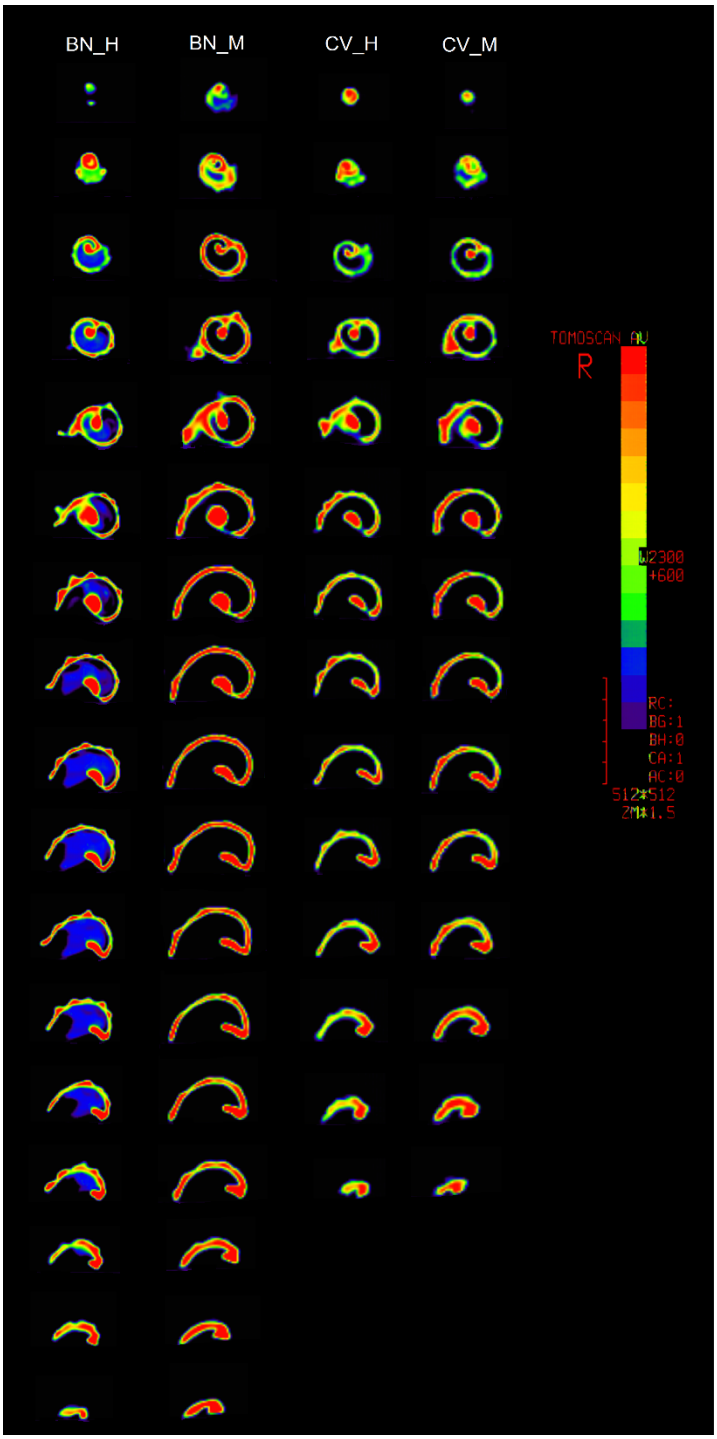


**Figura 2-6:** Tomografía computarizada de la concha de hembras (H) y machos (M) del caracol marino *Plicopurpura patula* de las estaciones Bocachica (BH) y Tierrabomba (TB) del Caribe colombiano. La escala de colores indica la densidad estimada en unidades Hounsfield, los colores del espectro del azul representan bajas densidades mientras que los del espectro del rojo densidades altas.

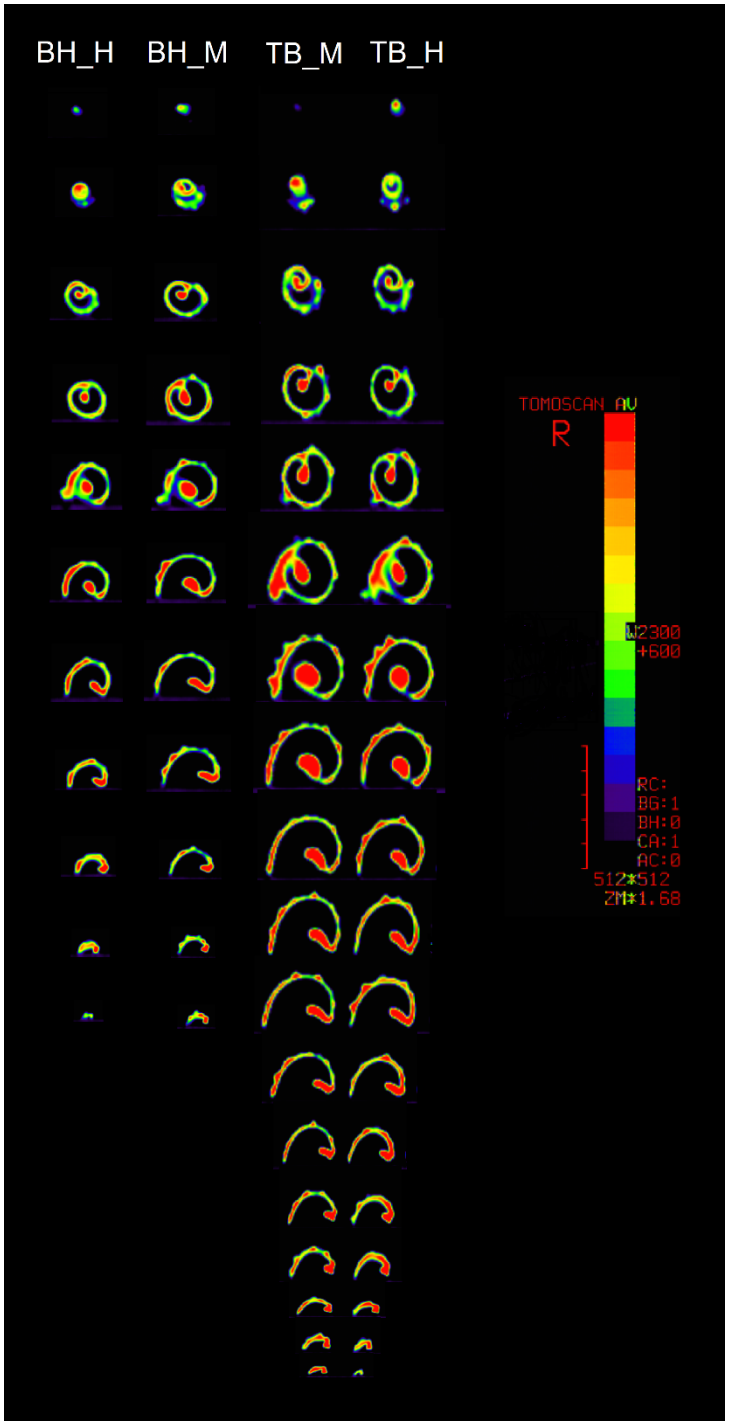


**Figura 2-7:** Tomografía computarizada de la concha de hembras con imposex (I) y machos (M) del caracol marino *Thais deltoidea* de las estaciones Marina de Santa Marta (MS) y Muelle de Tierrabomba (ML) del Caribe colombiano. La escala de colores indica la densidad estimada en unidades Hounsfield, los colores del espectro del azul representan bajas densidades mientras que los del espectro del rojo densidades altas.

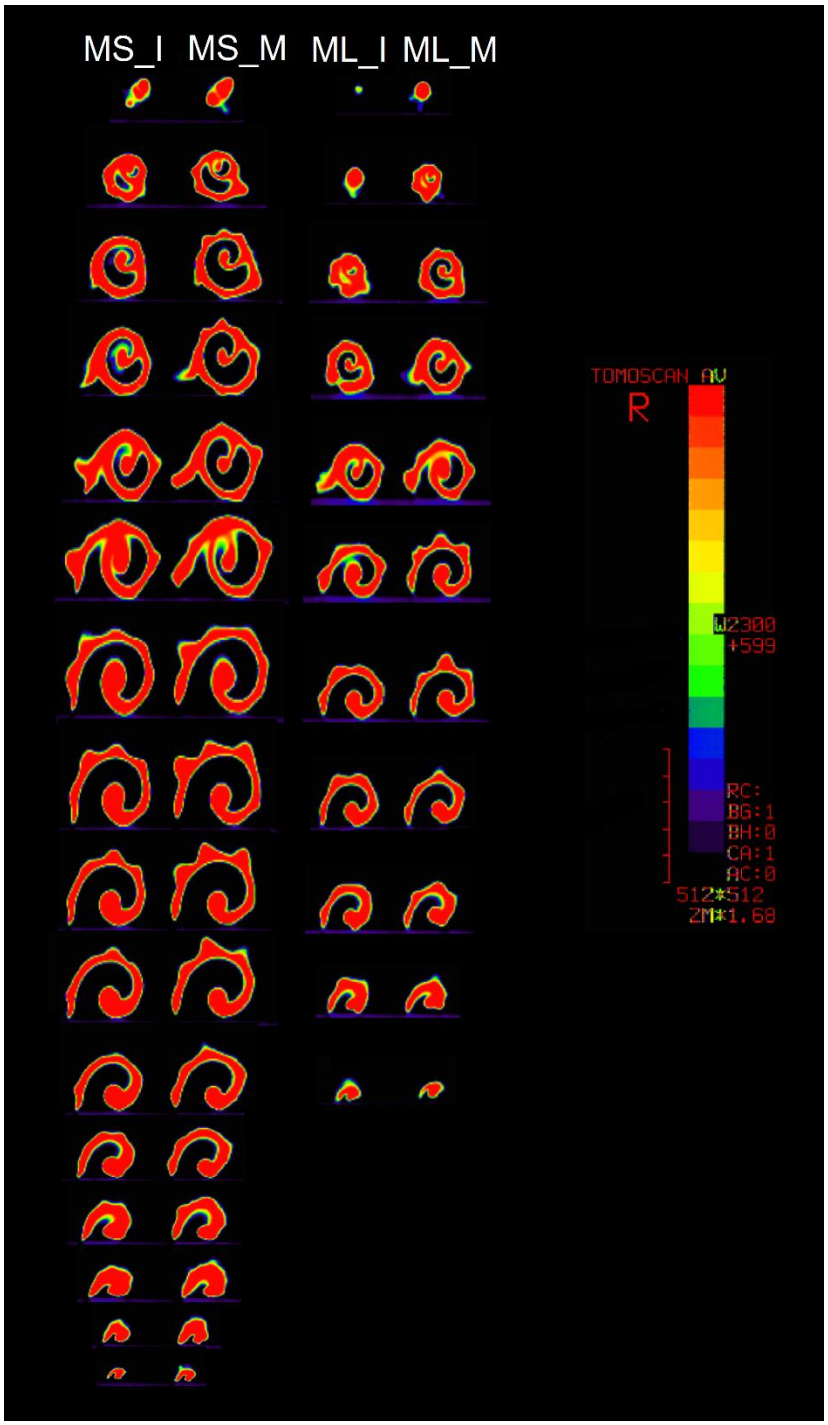
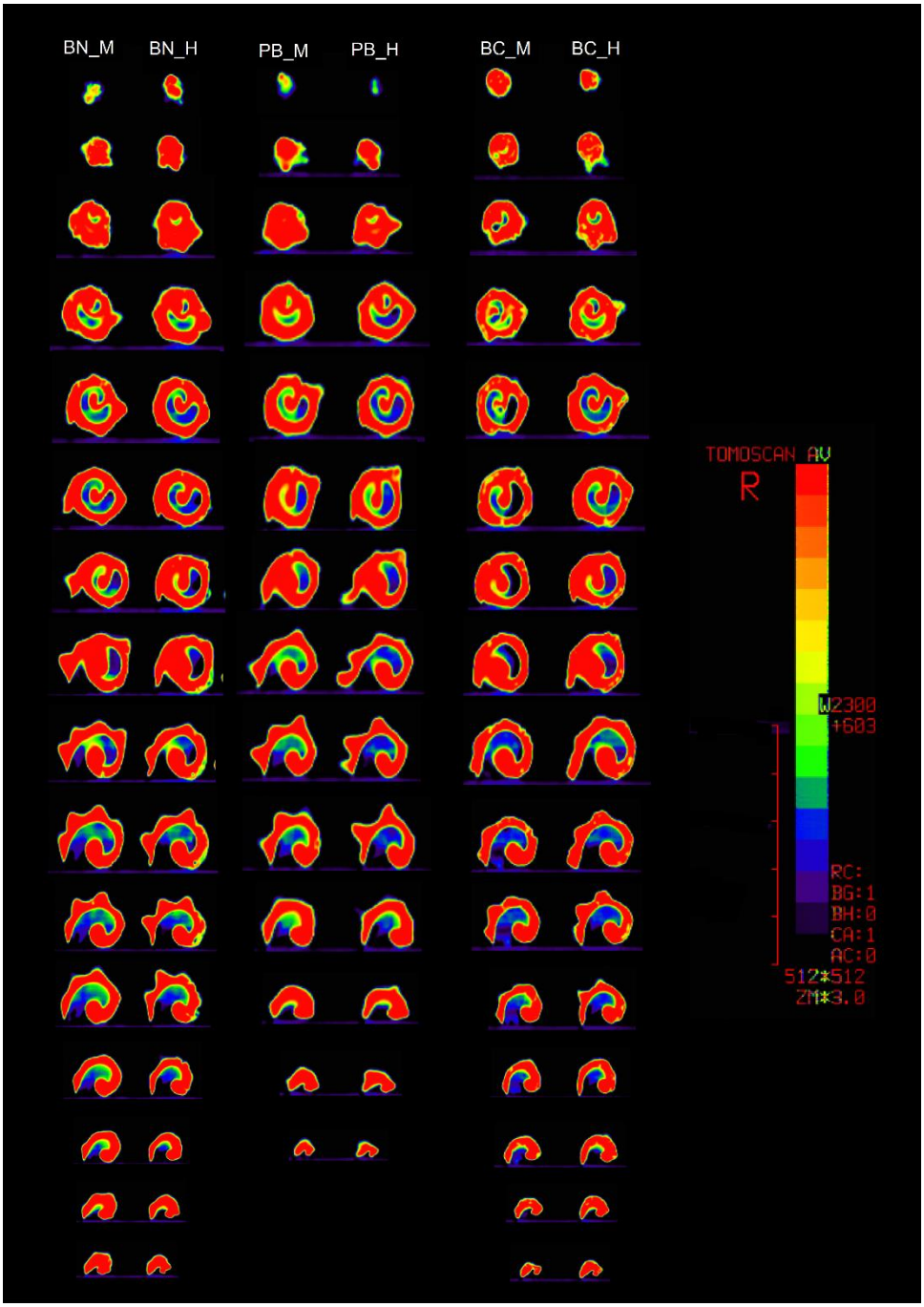


**Figura 2-8:** Tomografía computarizada de la concha de hembras (H) y machos (M) del caracol marino *Thais deltoidea* de las estaciones Bahía Neguange (BN), Punta Betín (PB) y Bahía Concha (BC) del Caribe colombiano. La escala de colores indica la densidad estimada en unidades Hounsfield, los colores del espectro del azul representan bajas densidades mientras que los del espectro del rojo densidades altas.



Cuantitativamente se analizaron cinco medidas de densidad (UH) a lo largo del labio externo de la concha en 247 ejemplares de *Plicopurpura patula* y 149 de *Thais deltoidea.* En *P. patula* la densidad a lo largo del labio es variable, la menor densidad se presenta cerca de la zona del canal sifonal y se da un aumento de la densidad en dirección al canal anal. Adicionalmente, se observa una disminución de la densidad en dos de las estaciones de muestreo, en MS la densidad promedio se reduce casi en un 50%, mientras que en ML las densidades promedio son entre el 20 y 35% más bajas que en las estaciones en donde no se registró imposex (Tabla 11, 12). En *T. deltoidea* no se presentó un patrón de variación tan marcado a lo largo del labio, no obstante, las mayores densidades se encuentran cerca de canal anal y las menores en la zona del canal sifonal. A diferencia de *P. patula*, las conchas de *T. deltoidea* de las estaciones en las que se registró imposex no presentan reducciones en la densidad promedio a lo largo del labio externo de la concha (Tabla 2-1, 2-2).

**Tabla 2-1:** Densidad promedio de cinco cortes transversales del labio externo de la concha de *Plicopurpura patula* y *Thais deltoidea* del Caribe colombiano.

| | | | | | DENSIDAD PROMEDIO (HU) | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **SP** | **ES** | **N° I** | **LS** | **± ds** | **C1** | **± ds** | **C2** | **± ds** | **C3** | **±ds** | **C4** | **± ds** | **C5** | **± ds** |
| *Plicopurpura patula* | MS | 37 | 22.97 | 5.91 | 698.03 | 394.36 | 645.97 | 349.83 | 624.57 | 416.20 | 633.42 | 334.66 | 559.49 | 294.51 |
| | PB | 47 | 33.91 | 10.55 | 1346.91 | 646.11 | 1130.68 | 533.52 | 1052.34 | 550.12 | 1036.53 | 539.94 | 997.55 | 524.27 |
| | BC | 52 | 26.74 | 4.45 | 1387.71 | 431.46 | 1160.10 | 379.68 | 1112.13 | 381.89 | 1014.25 | 345.05 | 897.96 | 328.85 |
| | BN | 50 | 32.39 | 9.26 | 1421.18 | 465.80 | 1390.90 | 488.53 | 1306.08 | 493.59 | 1287.20 | 438.19 | 1089.46 | 443.24 |
| | CV | 27 | 35.41 | 10.78 | 1650.30 | 558.29 | 1569.70 | 586.14 | 1564.96 | 645.77 | 1340.89 | 566.94 | 1353.70 | 626.77 |
| | TB | 17 | 35.12 | 8.31 | 1477.88 | 395.10 | 1469.65 | 473.06 | 1284.53 | 500.95 | 1171.06 | 507.13 | 1141.94 | 410.45 |
| | ML | 8 | 32.49 | 7.05 | 1121.50 | 615.80 | 1017.00 | 620.70 | 804.50 | 382.35 | 901.50 | 391.34 | 949.13 | 445.13 |
| | BH | 8 | 23.44 | 5.88 | 1367.38 | 339.78 | 1303.25 | 481.69 | 1170.88 | 610.69 | 1001.25 | 607.63 | 757.63 | 517.87 |
| *Thais deltoidea* | MS | 33 | 37.86 | 5.84 | 2614.48 | 560.18 | 2461.12 | 545.70 | 2465.56 | 496.73 | 2347.61 | 483.11 | 1711.27 | 440.71 |
| | PB | 30 | 33.50 | 3.01 | 2569.47 | 257.14 | 2567.80 | 246.66 | 2469.93 | 320.82 | 2512.10 | 184.21 | 2386.70 | 349.45 |
| | BC | 34 | 39.88 | 2.93 | 2099.94 | 422.69 | 2146.62 | 501.47 | 1943.09 | 398.96 | 2000.32 | 348.07 | 1830.32 | 331.91 |
| | BN | 39 | 38.09 | 4.00 | 2550.32 | 335.02 | 2645.36 | 403.93 | 2603.15 | 360.34 | 2451.44 | 298.62 | 2252.59 | 320.37 |
| | ML | 13 | 28.62 | 5.58 | 2445.85 | 709.60 | 2369.75 | 554.66 | 2249.92 | 622.93 | 2360.67 | 590.62 | 1463.33 | 440.60 |

HU: unidades Hounsfield, SP: especie, N°I: número de individuos, LS: longitud de la concha, ds: desviación estándar, MS: Marina de Santa Marta, PB: Punta Betín, BC: Bahía Concha, BN: Bahía Neguange, CV: Cabo de la Vela, TB: Tierrabomba, ML: Muelle Tierrabomba, BH: Bocachica.

**Tabla 2-2:** Parámetros de imposex y densidad promedio por sexos, de cortes transversales del labio externo de la concha de *Plicopurpura patula* y *Thais deltoidea* del Caribe colombiano.

| SP | ES | Sexo | LS ± ds | | IFPL MPL | FPLI Estándar | RPLI | RPLI Estándar | Corte1 Promedio | Corte1 ±ds | Corte2 Promedio | Corte2 ±ds | Corte3 Promedio | Corte3 ±ds | Corte4 Promedio | Corte4 ±ds | Corte5 Promedio | Corte5 ±ds |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Plicopurpura patula | CV | H | 37.34 | 11.15 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1664.11 | 543 | 1543.74 | 557.56 | 1557.11 | 573.27 | 1353.05 | 499.26 | 1412.53 | 634.93 |
| | | M | 30.84 | 7.25 | 11.63 | | | | 1617.5 | 557.83 | 1631.38 | 610.61 | 1583.63 | 757.82 | 1312 | 671.88 | 1214 | 539.94 |
| | BN | H | 34.82 | 11.72 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1275.05 | 526.39 | 1317.62 | 476.46 | 1268.33 | 549.22 | 1265.95 | 456.26 | 1012.38 | 441.86 |
| | | M | 30.63 | 6.16 | 11.83 | | | | 1527 | 373.21 | 1443.97 | 481.84 | 1333.41 | 437.55 | 1302.59 | 416.08 | 1145.28 | 427.95 |
| | BC | H | 26.81 | 4.83 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1347.43 | 404.64 | 1129 | 336.33 | 1076.7 | 344.61 | 1020.83 | 335.06 | 874.27 | 316.89 |
| | | M | 26.43 | 3.73 | 10.59 | | | | 1442.64 | 450.6 | 1202.5 | 420.49 | 1160.45 | 414.84 | 1005.27 | 350.38 | 930.27 | 334.59 |
| | PB | H | 34.8 | 11.74 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1274.53 | 709.87 | 1102.83 | 526.39 | 1002 | 606.8 | 1047.57 | 564.51 | 980.9 | 523.08 |
| | | M | 32.34 | 7.36 | 12.53 | | | | 1474.65 | 463.43 | 1179.82 | 526.72 | 1141.18 | 395.89 | 1017.06 | 475.29 | 1026.94 | 509.44 |
| | SM | H | 15.76 | 0 | 0 | | | | - | - | 755 | 0 | 654 | 0 | 647 | 0 | 469 | 0 |
| | | I | 22.8 | 5.67 | 0.71 | 0.03 | 11.05 | 11.65 | 642.9 | 362.58 | 694.76 | 292.01 | 641.86 | 410.07 | 626.33 | 287.61 | 568.81 | 237.72 |
| | | M | 23.71 | 5.89 | 6.47 | | | | 780.71 | 411.22 | 570.4 | 405.58 | 598.4 | 423.25 | 642.92 | 394.64 | 552.47 | 358.24 |
| | TB | H | 37.22 | 9.38 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1371.14 | 420.09 | 1544.14 | 481.65 | 1280 | 387.95 | 1179.29 | 433.77 | 1170.14 | 420.5 |
| | | M | 33.65 | 6.61 | 7.1 | | | | 1552.6 | 335.67 | 1417.5 | 434.81 | 1287.7 | 544.19 | 1165.3 | 528.86 | 1122.2 | 380.56 |
| | ML | H | 34.29 | 3.65 | 0 | | | | 819.33 | 151.99 | 847 | 115.04 | 709 | 333.54 | 747 | 214.09 | 770.33 | 181.18 |
| | | I | 37.57 | 0 | 1 | 0.03 | 14.04 | 11.94 | 989 | 0 | 899 | 0 | 1122 | 0 | 1357 | 0 | 1366 | 0 |
| | | M | 29.88 | 7.83 | 7.13 | | | | 1381.25 | 711.3 | 1174 | 783.89 | 796.75 | 374.56 | 903.5 | 404.79 | 979 | 503.8 |
| | BH | H | 19.45 | 0.19 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1301.33 | 252.01 | 1213.17 | 359.68 | 1019.33 | 520.58 | 816.17 | 477.05 | 605.83 | 437.4 |
| | | M | 24.78 | 5.76 | 5.08 | | | | 1565.5 | 401.5 | 1573.5 | 571.5 | 1625.5 | 465.5 | 1556.5 | 445.5 | 1213 | 297 |
| Thais deltoidea | BN | H | 38.92 | 4.08 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2464.61 | 361.94 | 2610.26 | 506.05 | 2511.63 | 434.26 | 2419 | 359.55 | 2268 | 341.37 |
| | | M | 37.2 | 3.72 | 10.1 | | | | 2627.45 | 285.22 | 2678.7 | 274.59 | 2690.1 | 241.92 | 2482.25 | 222.66 | 2237.95 | 298.33 |
| | BC | H | 40.82 | 3.16 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2142.22 | 362.39 | 2160.89 | 445.1 | 1889.72 | 330.09 | 1970.33 | 305.84 | 1860.89 | 344.32 |
| | | M | 38.83 | 2.09 | 11.25 | | | | 2052.38 | 465.28 | 2130.56 | 543.4 | 2003.13 | 445.97 | 2034.06 | 377.49 | 1795.94 | 302.66 |
| | PB | H | 34.34 | 3.54 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2617.25 | 284.57 | 2566.17 | 245.14 | 2437.67 | 298.07 | 2506.33 | 169.34 | 2424.33 | 273.21 |
| | | M | 32.94 | 2.33 | 10.5 | | | | 2537.61 | 223.62 | 2568.89 | 240.73 | 2491.44 | 324.71 | 2515.94 | 188.46 | 2361.61 | 381.32 |
| | MS | I | 37.67 | 6.84 | 0.88 | 0.02 | 8.6 | 8.7 | 2601.16 | 684.6 | 2395.63 | 656.65 | 2491.33 | 575.73 | 2316.11 | 579.6 | 1739.68 | 491.91 |
| | | M | 38.12 | 3.8 | 10.29 | | | | 2632.57 | 283.97 | 2550 | 285.92 | 2432.43 | 343.87 | 2390.36 | 272.74 | 1672.71 | 336.1 |
| | ML | H | 28 | 3.63 | 0 | | | | 2387.75 | 546.07 | 2198.25 | 607.25 | 2219.38 | 553.69 | 2191.5 | 595.25 | 1466 | 406.63 |
| | | I | 30.73 | 0 | 1 | 0.04 | 47.06 | 53.27 | 2941 | 0 | 2544 | 0 | 2456 | 0 | 2114 | 0 | 1680 | 0 |
| | | M | 32.04 | 3.03 | 2.13 | | | | 2335.14 | 819.81 | 2181.75 | 735.49 | 2113.68 | 765.51 | 2252.46 | 804.87 | 1224.27 | 509.84 |

**Tabla 2-2:** (Continuación)

SP: especie, ES: estación, HU: unidades Hounsfield, LS: longitud de la concha, DS: desviación estándar, FPL: Longitud promedio del pene en hembras afectadas, MPL: longitud promedio del pene en machos, RPLI: índice de la longitud relativa del pene en hembras afectadas, MS: Marina de Santa Marta, PB: Punta Betín, BC: Bahía Concha, BN: Bahía Neguange, CV: Cabo de la Vela, TB: Tierrabomba, ML: Muelle Tierrabomba, BH: Bocachica.

Los datos no presentaron una distribución normal para las dos especies (Shapiro-Wilks p-valores < 0.05, Levene p-valores < 0.05), por lo tanto, se hicieron comparaciones de medias no paramétricas. Para las dos especies se evidenció que dentro de las estaciones no hay diferencias significativas entre machos y hembras (Kruskal-Walis p valores > 0.05). Para *P. patula* se evidencian diferencias significativas entre la estación de la marina y las demás estaciones en los cinco cortes, excepto con ML en todos los cortes y con BH en el quinto corte (Tabla 2-3). Las conchas de CV presentan diferencias significativas con las estaciones MS y BC en todos los cortes, y con PB y ML en cuatro cortes. En general, en la mayoría de las comparaciones entre las estaciones PB, BN TB, ML y BH, no se presentaron diferencias estadísticamente significativas en la densidad promedio de todos los cortes. Estos resultados son congruentes con lo observado en las imágenes de TC, evidenciando que las conchas de la estación MS, en la que se registró un 95.45% de incidencia de imposex, tienen densidades diferentes en comparación con las demás estaciones en donde la incidencia de imposex es mínima o nula. Adicionalmente, las conchas de CV presentan las mayores densidades en el labio externo respecto a las demás estaciones libres de imposex, esto puede estar relacionado con condiciones ambientales propias del sector, tales como el oleaje. En esta estación se presentan fuertes impactos de ola y es posible que estos ejemplares desarrollen conchas más densas como mecanismo de protección a la erosión.

Para la especie *Thais deltoidea* se determinaron diferencias estadísticamente significativas entre las conchas de BC y las demás estaciones de muestreo para cuatro cortes (Tabla 2-4). En estos cortes las densidades promedio, incluyendo machos y hembras, fueron inferiores (máxima 2146.62 UH – mínima 1830.32 UH) respecto a las demás estaciones (máxima 2614.48 UH – mínima 2249.92 UH). Mientras que en el corte 5 las densidades promedio de MS, ML y BC son estadísticamente iguales y a su vez estas son significativamente diferentes de las densidades promedio de PB y BN (Tabla 14). En este

último corte se presentan las menores densidades para todas las estaciones, sin embargo, no se observa una relación con la presencia o ausencia del fenómeno de imposex. Por lo tanto, es posible que esto sea una característica intrínseca de la concha ya que en esta zona el labio se adelgaza para formar el canal sifonal.

**Tabla 2-3:** P valores de las comparaciones de medias de densidad del labio externo de la concha entre las estaciones de muestreo para *Plicopurpura patula* del Caribe colombiano.

| p-valores prueba Kruskal - Wallis | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | **MS** | **PB** | **BC** | **BN** | **CV** | **TB** | **ML** |
| **CORTE 1** | **PB** | 1.96E-06 | | | | | | |
| | **BC** | 6.82E-09 | 0.7954 | | | | | |
| | **BN** | 3.68E-09 | 0.6133 | 0.6109 | | | | |
| | **CV** | 6.85E-08 | 0.06805 | 0.02557 | 0.07462 | | | |
| | **TB** | 1.45E-06 | 0.4797 | 0.4396 | 0.6813 | 0.2235 | | |
| | **ML** | 0.05298 | 0.2326 | 0.09191 | 0.08251 | 0.02046 | 0.05455 | |
| | **BH** | 0.001306 | 0.9524 | 0.8962 | 0.6439 | 0.2714 | 0.4147 | 0.05871 |
| **CORTE 2** | **PB** | 9.29E-06 | | | | | | |
| | **BC** | 6.27E-08 | 0.7578 | | | | | |
| | **BN** | 7.08E-10 | 0.3863 | 0.02471 | | | | |
| | **CV** | 8.19E-08 | 0.00966 | 0.002105 | 0.1191 | | | |
| | **TB** | 6.92E-07 | 0.05078 | 0.02118 | 0.5261 | 0.4771 | | |
| | **ML** | 0.06567 | 0.3643 | 0.1707 | 0.0582 | 0.05935 | 0.03598 | |
| | **BH** | 0.000884 | 0.5667 | 0.5426 | 0.6198 | 0.2888 | 0.3822 | 0.1415 |
| **CORTE 3** | **PB** | 0.0001598 | | | | | | |
| | **BC** | 6.42E-07 | 0.5329 | | | | | |
| | **BN** | 7.56E-09 | 0.03262 | 0.05773 | | | | |
| | **CV** | 1.60E-07 | 0.0023442 | 0.002141 | 0.07121 | | | |
| | **TB** | 3.85E-05 | 0.1713 | 0.2257 | 0.954 | 0.1515 | | |
| | **ML** | 0.1914 | 0.1932 | 0.06146 | 0.008333 | 0.007556 | 0.02685 | |
| | **BH** | 0.01491 | 0.6674 | 0.9134 | 0.5278 | 0.1817 | 0.6412 | 0.2076 |
| **CORTE 4** | **PB** | 0.0002671 | | | | | | |
| | **BC** | 5.32E-06 | 0.9413 | | | | | |
| | **BN** | 6.23E-09 | 0.02363 | 0.001238 | | | | |
| | **CV** | 4.41E-06 | 0.0421 | 0.01006 | 0.7008 | | | |
| | **TB** | 0.0001191 | 0.5686 | 0.3508 | 0.2863 | 0.2522 | | |
| | **ML** | 0.07899 | 0.5115 | 0.421 | 0.3404 | 0.04513 | 0.2944 | |
| | **BH** | 0.1175 | 0.6761 | 0.7443 | 0.169 | 0.1753 | 0.4845 | 0.7527 |

**Tabla 2-3:** (Continuación)

| p-valores prueba Kruskal - Wallis | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | **MS** | **PB** | **BC** | **BN** | **CV** | **TB** | **ML** |
| **CORTE 5** | **PB** | 8.54E-06 | | | | | | |
| | **BC** | 2.95E-06 | 0.2548 | | | | | |
| | **BN** | 1.78E-08 | 0.5759 | 0.04357 | | | | |
| | **CV** | 4.73E-07 | 0.03882 | 0.001998 | 0.0847 | | | |
| | **TB** | 9.71E-06 | 0.4293 | 0.05377 | 0.6551 | 0.2624 | | |
| | **ML** | 0.019 | 0.6848 | 0.4865 | 0.7183 | 0.09896 | 0.3513 | |
| | **BH** | 0.4058 | 0.1207 | 0.2403 | 0.05385 | 0.0227 | 0.08052 | 0.5286 |

**Tabla 2-4:** P valores de las comparaciones de medias de densidad del labio externo de la concha entre las estaciones de muestreo para Thais deltoidea del Caribe colombiano.

| p-valores prueba Kruskal Wallis | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | **MS** | **PB** | **BC** | **BN** |
| **CORTE 1** | **PB** | 0.07584 | | | |
| | **BC** | 9.28E-06 | 1.09E-05 | | |
| | **BN** | 0.1123 | 0.9807 | 1.39E-05 | |
| | **ML** | 0.643 | 0.3149 | 0.00773 | 0.4159 |
| **CORTE 2** | **PB** | 0.9451 | | | |
| | **BC** | 0.003141 | 0.0003543 | | |
| | **BN** | 0.2513 | 0.1932 | 1.87E-05 | |
| | **ML** | 0.4489 | 0.4522 | 0.127 | 0.1368 |
| **CORTE 3** | **PB** | 0.4639 | | | |
| | **BC** | 1.14E-05 | 2.04E-06 | | |
| | **BN** | 0.3767 | 0.0782 | 7.31E-09 | |
| | **ML** | 0.2872 | 0.5001 | 0.04083 | 0.05858 |
| **CORTE 4** | **PB** | 0.554 | | | |
| | **BC** | 3.86E-04 | 1.15E-07 | | |
| | **BN** | 0.6883 | 0.533 | 6.86E-07 | |
| | **ML** | 0.7002 | 0.9113 | 0.02136 | 0.9557 |
| **CORTE 4** | **PB** | 0.554 | | | |
| | **BC** | 3.86E-04 | 1.15E-07 | | |
| | **BN** | 0.6883 | 0.533 | 6.86E-07 | |
| | **ML** | 0.7002 | 0.9113 | 0.02136 | 0.9557 |

**Tabla 2-4:** (Continuación)

| p-valores prueba Kruskal Wallis | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | **MS** | **PB** | **BC** | **BN** |
| **CORTE 5** | **PB** | 1.00E-07 | | | |
| | **BC** | 0.2538 | 3.67E-07 | | |
| | **BN** | 2.56E-07 | 0.2261 | 1.42E-06 | |
| | **ML** | 0.1949 | 2.90E-06 | 0.02137 | 5.31E-06 |

## 2.3.2 Estructura de la concha

El labio externo de la concha de los individuos de *Plicopurpura patula* en general tiene una microestructura conformada por tres capas de carbonato de calcio: capa lamelar externa, capa lamelar cruzada intermedia y una capa lamelar cruzada interna (Figura 2-9). En la mayoría de los cortes la capa más ancha es la lamelar intermedia y la más delgada la capa lamelar cruzada interna. En varios de los cortes se observó una zona de transición entre la capa lamelar externa e intermedia. El 90% de los ejemplares de MS presentaron conchas muy frágiles, las cuales se podían fracturar con la mano, siendo el último giro en dirección al labio externo la zona más frágil. Se observó que las capas externa e interna son más delgadas con relación al grosor total del corte en los ejemplares de MS. En los cortes de las estaciones MS, ML y BH la ordenación primaria de las lamelas no parece estar bien definida, de tal manera, que esta primera capa se percibe como amorfa en casi todo el corte de la mayoría de los ejemplares (MS: 90%, ML: 88%, BH: 75%), no obstante, se alcanzan a observar pequeñas zonas de transición (Figura 2-10). En la mayoría de las conchas de las otras cinco estaciones la capa lamelar cruzada externa es diferenciable en gran parte del corte. De igual manera se observaron pequeñas zonas de transición.

Para el caso de *Thais deltoidea* se observó que el labio externo de la concha está conformado por dos capas lamelares cruzadas de aproximadamente el mismo tamaño (Figura 2-11). Las capas externa e interna describen el mismo patrón de ordenamiento de las lamelas de primer y segundo orden de las capas externa e intermedia de *Plicopurpura patula*. No se encontraron diferencias entre la microestructura del labio entre estaciones.

Las observaciones sugieren que no hay diferencias en el número de capas entre sexos dentro de cada una de las estaciones para las dos especies de estudio.

**Figura 2-9: a**. Microestructura en un corte transversal del labio externo de la concha de *Plicopurpura patula*. **b**, **c** y **d**. Capas lamelar cruzada externa, intermedia e interna mostrando la orientación de las lamelas de primer orden. P: periostraco, 1: capa lamelar cruzada externa, 2: capa lamelar cruzada intermedia, 3: capa lamelar cruzada interna.

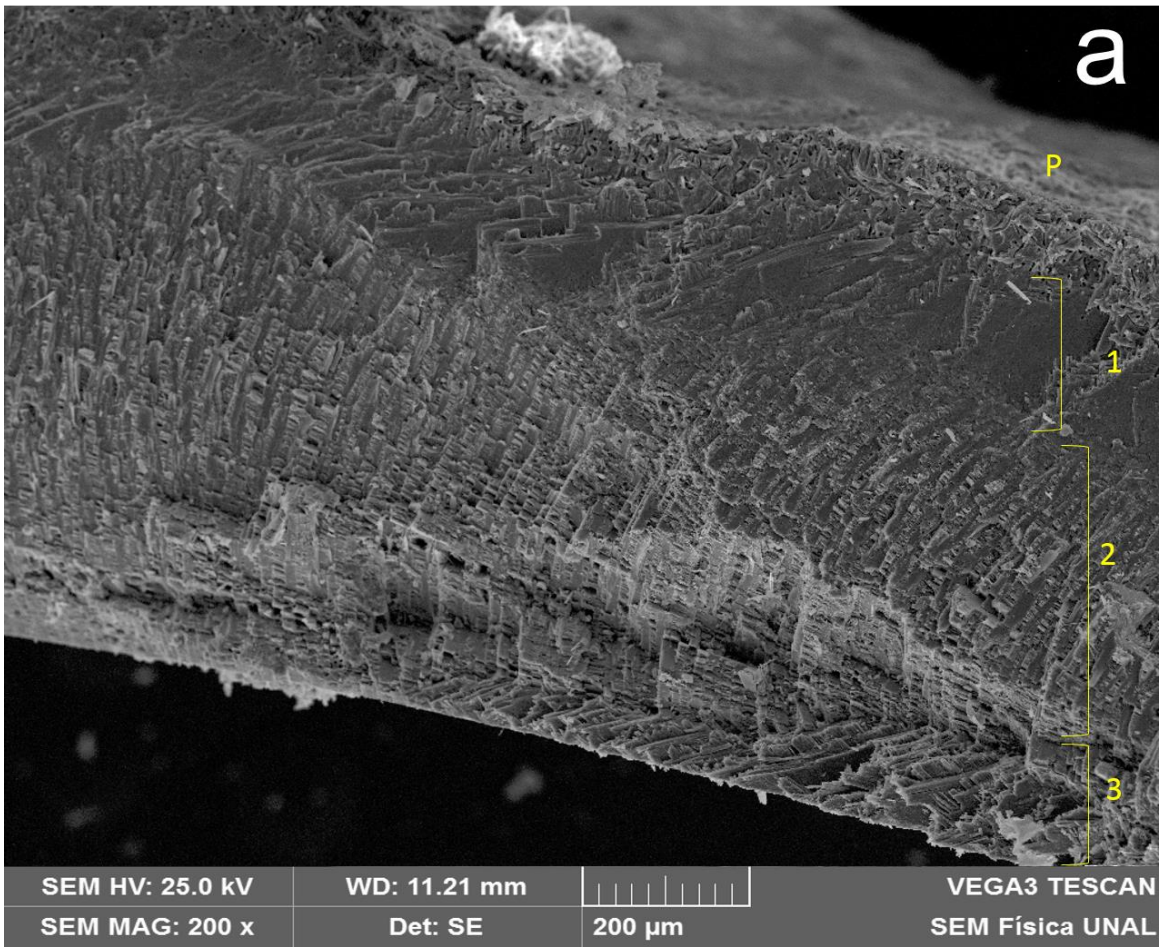
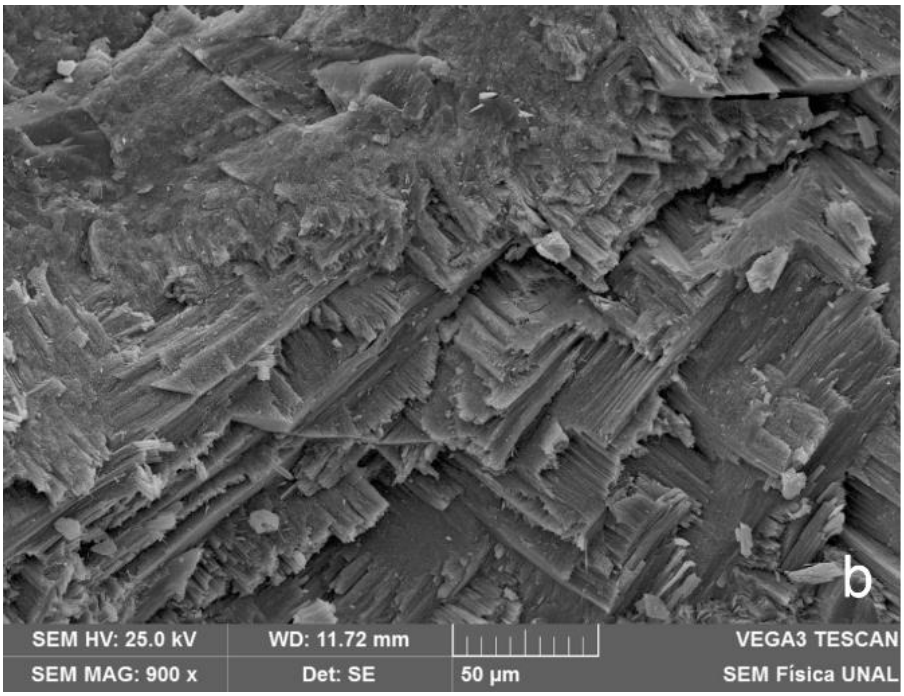


**Figura 2-9:** (Continuación)



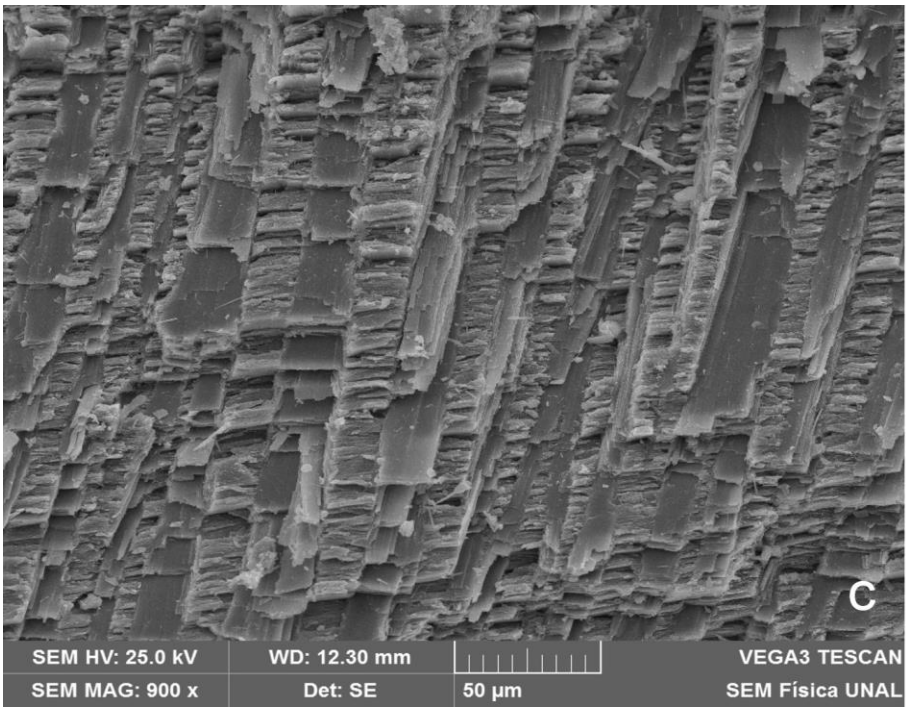



**Figura 2-9:** (Continuación)

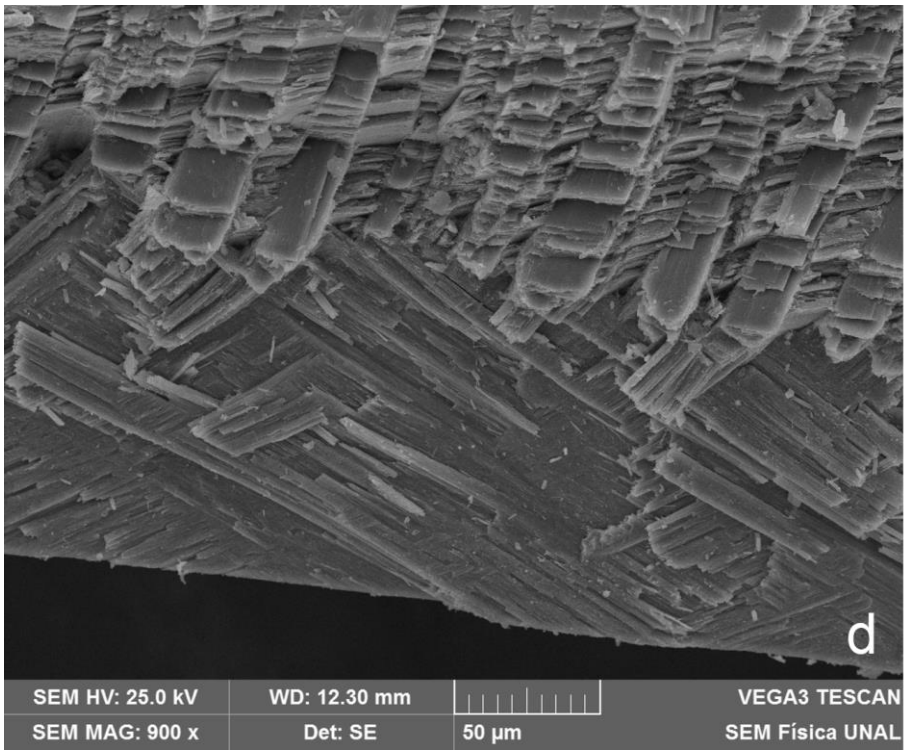
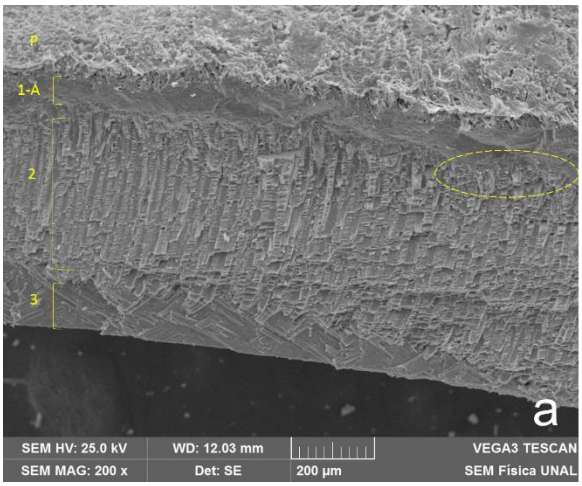



**Figura 2-10:** Microestructura de cortes transversales del labio externo de la concha de *Plicopurpura patula* del Caribe colombiano. **a** Marina de Santa Marta, **b** Punta Betín, **c** Bahía concha, **d** Bahía Neguange, **e** Cavo de la Vela, **f** Tierrabomba, **g** Muelle tierrabomba **h** Bocahica. La línea punteada demarca zonas de transición entre las capas externa e intermedia, P: periostraco, 1: capa lamelar cruzada externa, 2: capa lamelar cruzada intermedia, 3: capa lamelar interna.



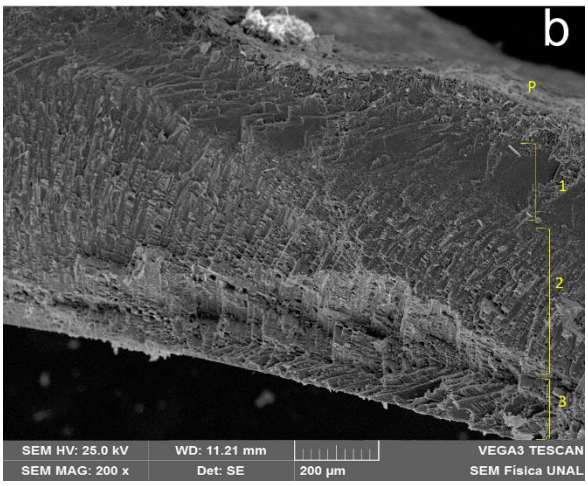



**Figura 2-10:** (Continuación)

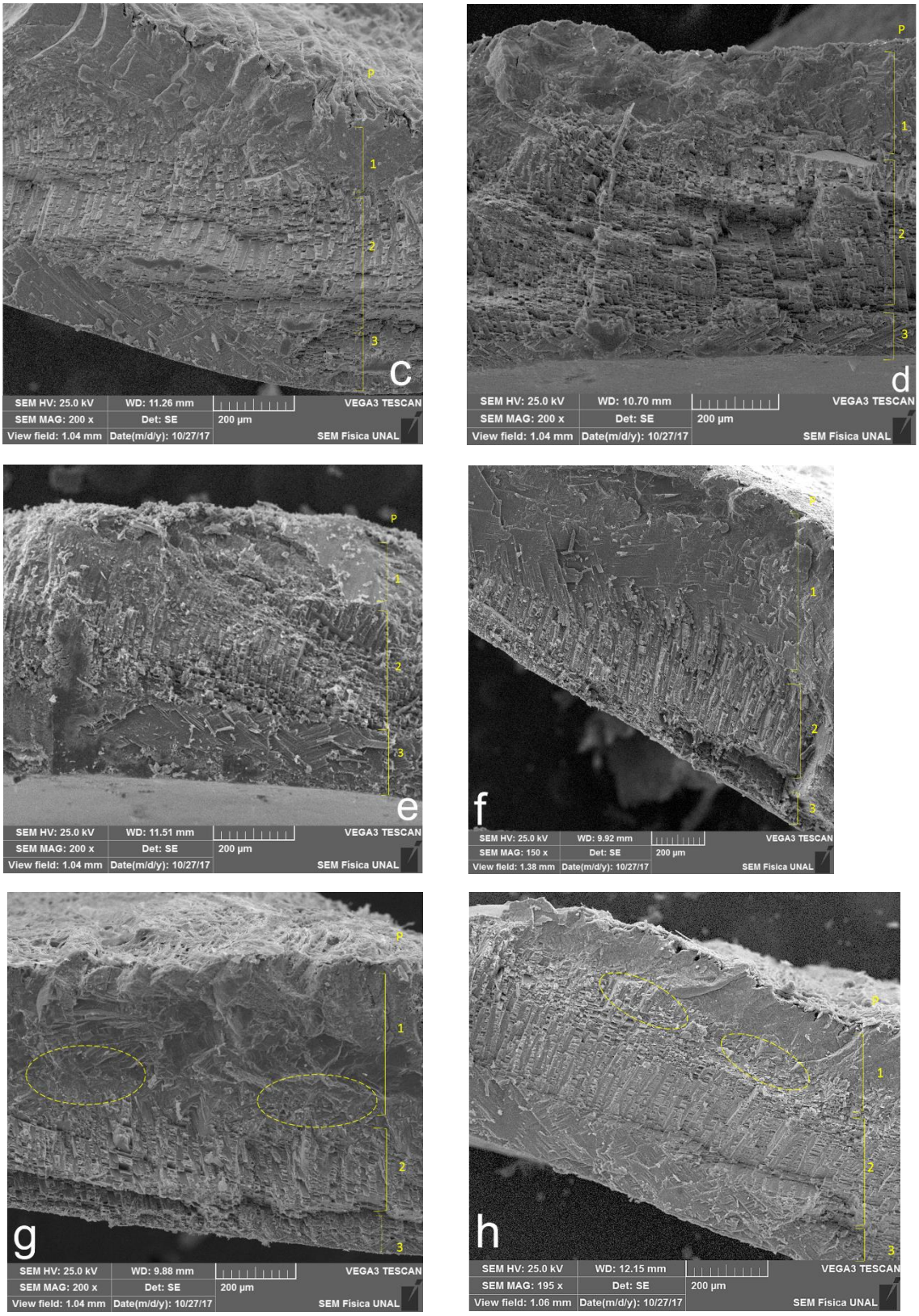


**Figura 2-11:** Microestructura de cortes transversales del labio externo de la concha de *Thais deltoidea* del Caribe colombiano. **a** y **b** Capas lamelar cruzada externa e interna mostrando la orientación de las lamelas de primer orden, **c** Marina de Santa Marta, **d** Punta de Betín, **e** Bahía concha, **f** Bahía Neguange, **g** Muelle de Tierrabomba,. P: periostraco, 1: capa lamelar cruzada externa, 2: capa lamelar cruzada interna.

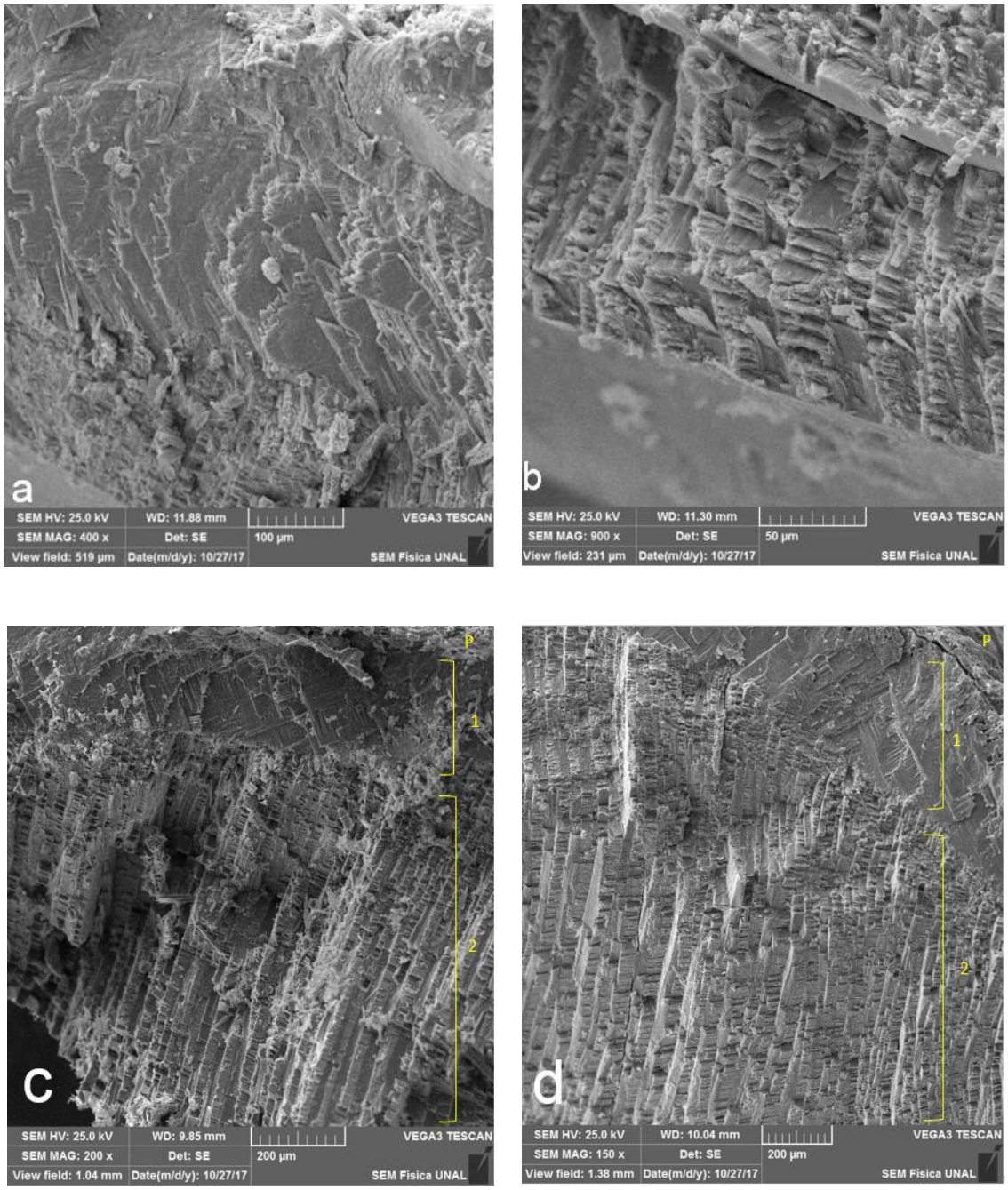
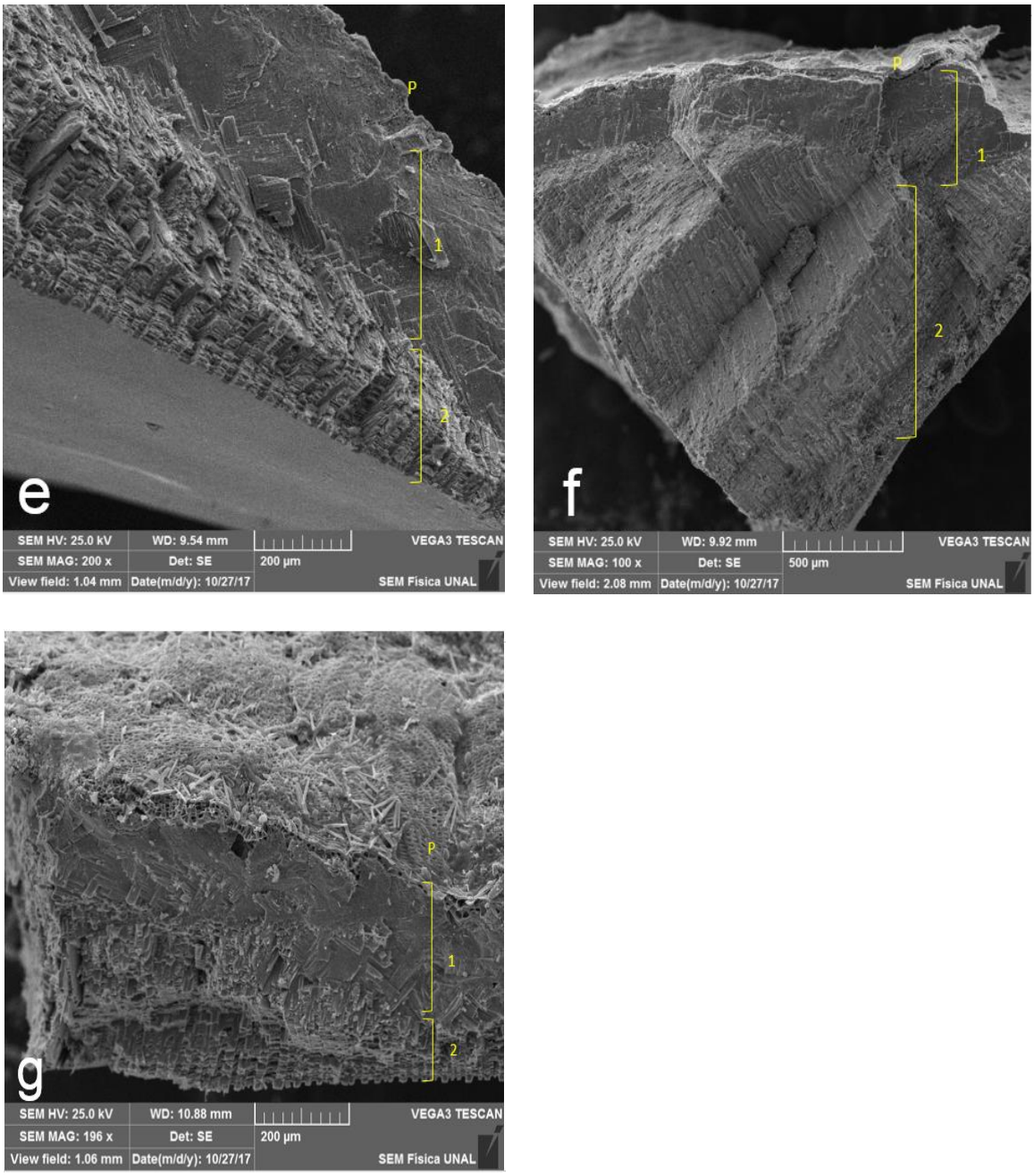


**Figura 2-11:** (Continuación)




## 2.4 Discusión

Los resultados de este estudio muestran que en las especies de neogasterópodos que habitan en zonas costeras expuestas a la contaminación se están presentando cambios estructurales en la concha. Tal es el caso de *Plicopurpura patula* de la estación de la Marina

de Santa Marta, que además de tener conchas menos gruesas también presenta un decrecimiento en la densidad. La relación entre cambios de densidad de la concha y la presencia de imposex podría ser indicativo de contaminación por compuestos orgánicos de estaño, especialmente TBT, de tal manera que la contaminación no solo estaría afectando el sistema reproductivo de las hembras, sino que también podría afectar otros procesos fisiológicos en hembras y machos.

Estos resultados son similares a los encontrados por Márquez *et al.* (2011) en la especie *O. magellanica* presente en zonas en las que se presenta imposex, los cuales muestran reducciones en la densidad del labio y conchas frágiles. Contrariamente en otras especies como *Bostricapulus odites* se registra un incremento en el grosor de la concha en zonas de contaminación (Laitano *et al*., 2013). Mientras que en otras especies como *Siphonaria lessoni* no hay diferencias significativas en cuanto al grosor de la concha de ejemplares de zonas contaminadas y no contaminadas (Nuñez *et al*., 2012). Lo anterior indica que las respuestas fisiológicas son diferentes entre las especies sensibles a la contaminación por TBT.

A diferencia de *Plicopurpura patula*, *Thais deltoidea* no muestra cambios de densidad en zonas en las que se comprobó la presencia de imposex. Por un lado, es posible que las afectaciones no sean observables debido a que el grado de imposex es bajo y por lo tanto los mecanismos fisiológicos del proceso de calcificación y formación de la concha se mantienen estables. Por otro lado, puede que las densidades altas que se registraron en ejemplares de la zona con afectación correspondan a una primera fase de engrosamiento de la concha y aumento de peso. En hembras de *Nucella lapillus* se registra un aumento en el peso, tamaño y espesor relativo de la concha a medida que el grado de imposex incrementa (Son y Hughes, 2000), y en bivalvos usualmente se registra un engrosamiento de la concha cuando son expuestos al TBT (Alzieu *et al*., 1986; Almeida *et al*., 1998).

Los cambios en la densidad y grosor de las conchas son perjudiciales para los individuos y en general para las poblaciones. Al ser menos densa la concha la probabilidad de fractura, no solo en labio externo sino en cualquier estructura, aumenta considerablemente. De tal manera que los individuos están expuestos a ser depredados con mayor facilidad, los procesos de erosión por acción de oleaje podrían ser más rápidos

e incluso organismos bioerodadores y/o ectoparásitos puedan perforar la concha de manera más eficiente.

Contrario a lo reportado por Márquez, *et al*. (2011), los resultados del presente estudio indican que en ninguna de las dos especies se presenta pérdida total de capas de carbonato de calcio con relación al desarrollo de imposex. No obstante, en *Plicopurpura patula* se evidencia una disminución en el grosor de las capas lamelares externa e interna de ejemplares de las estaciones en donde se registró hembras con imposex. Un menor tamaño y la aparente malformación de una de las capas de carbonato de calcio podrían explicar la disminución en la densidad y grosor del labio en estaciones como la Marina de Santa Marta. Gracias a que las fracturas se desvían entre los contactos de las lamelas de primer y segundo orden la microestructura lamelar cruzada es la más resistente (Checa-Gonzalez, 2014). La disminución en el grosor de estas capas y la pérdida del ordenamiento de las lamelas, tal como se observó en los ejemplares de MS, ML puede ser la causa de la fragilidad de las conchas.

En los ejemplares de *Thais deltoidea* no se registraron variaciones de la microestructura de del labio de la concha entre estaciones y presencia de imposex. De tal manera que se podría inferir que en esta especie el desarrollo de imposex no está ligado a cambios estructurales de la concha, o por lo menos, en grados bajos de desarrollo de imposex (I y II) no se evidencian variaciones estructurales que afecten el grosor o resistencia de la concha. De manera similar Laitano *et al*. (2013) evidencia que entre estaciones con diferente grado de contaminación no hay diferencias en el patrón de cristalización en cortes transversales de la concha de *Bostrycapulus odites.*

Para las especies *Siphonaria lessoni* (Nuñez et al., 2012) y *Bostrycapulus odites* (Laitano *et al*., 2013) se reportaron malformaciones globulares en la capa interna de la concha de ejemplares de sitios contaminados con TBT, metales pesados y organoclorados. Esto evidencia que aunque no se presenten pérdida de capas o variaciones en la microestructura en cortes transversales las especies de estudio podrían presentar otras alteraciones, lo cual debe ser considerado en estudios posteriores.

Es posible que en las estaciones en las que se registraron alteraciones en las conchas haya otro tipo de contaminantes que sean responsables de los cambios en la densidad y microestructura de la concha. No obstante, es necesario realizar estudios donde se midan las concentraciones de diferentes compuestos contaminantes como organoetánnicos, organoclorados y metales pesados.

## 2.5 Conclusiones

Gracias al uso de tomografías computarizadas se puede concluir que la especie *Plicopurpura patula* presenta alteraciones en la densidad de toda la concha cuando desarrollan imposex. Estas alteraciones se manifiestan en la reducción de la densidad en toda la concha, especialmente en la espira y en el labio externo de la concha provocando que ésta sea frágil y se fracture bajo poca presión.

La relación entre cambios de densidad de la concha y la presencia de imposex indican que la contaminación por compuestos organoestánicos, especialmente el TBT, no solo afectan el sistema reproductivo de las hembras, sino que también afecta otros procesos fisiológicos importantes tanto en machos como hembras de cualquier talla.

*Thais deltoidea* no muestra cambios de densidad en zonas en las que se registra imposex, es posible que las afectaciones no sean observables debido al grado de imposex que se presenta, o a una fase temprana de engrosamiento de la concha.

Las conchas de las especies *Plicopurpura patula* y *Thais deltoidea* no presentan pérdida total de capas de carbonato de calcio en relación al desarrollo de imposex. No obstante, la disminución en el grosor de las capas lamelar cruzada externa e interna puede estar relacionada con la presencia de imposex en *P. patula*, ya que este fenómeno se presentó en las estaciones donde se observó la disrupción endocrina.

La densidad y grosor bajos en las conchas de *P. patula* de la estación de la Marina de Santa Marta pueden estar relacionados con la disminución en el grosor de las capas lamelar cruzada externa e interna, que junto con la malformación de la capa lamelar cruzada externa provocan fragilidad alta en las conchas.

# 3. Conclusiones y recomendaciones

## 3.1.1 Conclusiones

Las especies *Plicopurpura patula* y *Thais deltoidea* que habitan en zonas de la Marina de Santa Marta y en el Muelle de Tierrabomba Caribe continental colombiano presentan el fenómeno de imposex, por tanto se presume que es estas zonas se presenta contaminación por tributilo de estaño (TBT).

Las normativas internacionales que regulan el uso de pinturas a base de TBT pueden ser un factor que favorezca la baja contaminación por TBT en el Caribe continental colombiano, que se ve reflejado en que en sólo dos de las estaciones de muestreo se hallan registrado hembras de las dos especies con la afectación del imposex.

Los resultados permiten concluir que en las especies de estudio ocurren cambios fenotípicos de la concha con relación al imposex. Estos cambios son diferentes entre las dos especies y se relacionan con la reducción o aumento del peso de la concha y del cuerpo blando, en el tamaño y alteraciones en la forma de la concha, cambios en la densidad de la concha y en el grosor de las capas de carbonato de calcio de la concha.

Las alteraciones fenotípicas de la concha son más evidentes en la especie *Plicopurpura patula*, por lo que se puede pensar que esta especie presenta mayor sensibilidad respecto a *Thais deltoidea*.

Las conchas de *Plicopurpura patula* de la Marina de Santa Marta describen una forma de la concha diferente respecto a las conchas de los ejemplares de las estaciones en donde no se registró imposex. Por lo tanto se puede concluir que hay una relación directa entre la presencia de imposex y alteraciones morfológicas de la concha.

Los resultados evidencian que en los ejemplares de *Plicopurpura patula* de las estaciones con imposex hay una reducción de la densidad en toda la concha, especialmente en la espira y en el labio externo de la concha provocando que ésta sea frágil y se fracture bajo poca presión. Mientras que en *Thais deltoidea* no se observan cambios de densidad en zonas en las que se registra imposex, es posible que las afectaciones no sean observables debido al grado de imposex que se presenta, o a una fase temprana de engrosamiento de la concha.

Aunque no se presentan pérdida total de capas de carbonato de calcio en relación al desarrollo de imposex, la disminución en el grosor de las capas lamelar cruzada externa e interna puede estar relacionada con el desarrollo de imposex en *P. patula.*

## 3.1.2 Recomendaciones

Debido a que se registra el desarrollo de imposex en dos especies de gasterópodos intermareales del Caribe colombiano y adicionalmente se evidencian alteraciones morfológicas y estructurales de la concha relacionadas con dicha disrupción endocrina, se hace necesario que en Colombia se establezcan normas que prohíban el uso y aplicación de pinturas anti-incrustantes a base de TBT.

Para tener una medida exacta de la contaminación por compuestos orgánicos de estaño es necesario hacer las respectivas mediciones de las concentraciones de TBT en tejido y sedimento.

Debido a que el TBT se acumula en los sedimentos es necesario incluir en estos estudios especies que se encuentren en el infralitoral, o que habiten en fondos blandos cercanos a

la zona de estudio. De igual manera sería necesario aplicar estudios morfométricos a otras especies afectadas con el fin de establecer si se presentan las mismas variaciones en la concha.

Es importante incluir dentro de los programas de monitoreo de la calidad ambiental marina estudios de la intensiadad y prevalencia de imposex.

# Bibliografía


Addadi, L., S. Weiner. 1985. Interactions between acidic proteins and crystals: stereochemical requirements in biomineralization. Proc. Natl. Acad. Sci., 82: 4110–4114.

Addadi, L., D. Joester, F. Nudelman y S. Weiner. 2006. Mollusk shell formation: a source of new concepts for understanding biomineralization processes. Chem. Eur. J. 12: 980-987.

Afanador, F. 2009. Caracterización físico-biótica del litoral del departamento de La Guajira. pp. 33-66.En: DIMAR-CIOH.2009. Caracterización físico-biótica del litoral Caribe colombiano. Tomo I. Dirección General Marítima-Centro de Investigaciones Oceanográficas e Hidrográficas. Ed. DIMAR, Serie Publicaciones Especiales CIOH Vol. 1. Cartagena de Indias, Colombia. 154 Pp.

Alasonati, E, B. Fabbri, I. Fettig, C. Yardin, M.E. Del Castillo Busto, J. Richter, R. Philipp y P. Fisicaro. 2015. Experimental desing for TBT quantification by isotope dilution SPE-GC-ICP-MS under the European water framework directive Talanta 134. 576-586.

Almeida, M.J., J. Machado, G. Moura, M. Azevedo y J. Coimbra. 1998. Temporal and local variations in biochemical composition of *Crassostrea gigas* shells. Journal of Sea Research, 40: 233-249.

Alzieu, C., Y. Thibaud, M. Heral y B. Boutier. 1980. Evaluation des risques dus a l'emploi des peintures anti-salissures dansales zones conchylicoles. Rev.Trav. Inst. Pêch. Marit, 40: 305-348.

Alzieu, C., M. Héral, Y. Thibaud, M.J. Dardignac y M. Feuillet. 1982. Influence des peintures anti-salissures a´base d´organostanniques sur la calcification de la coquille de. l´huître Crassostrea gigas. Rev. Trav. Inst. Pêches Marit, 45: 101-116.

Alzieu, C., J. Sanjuan, J.P. Deltreil y M. Borel. 1986. Tin contamination in Arcachon bay: Effects on oyster shell anomalies. Mar. Pollut. Bull., 17 (11):494-498.

Alzieu, C. 2000. Environmental impact of TBT: the French experience. The Science of the Total Environment, 258: 99 -102

Austen, M.C. y A.J. McEvoy. 1997. Experimental effects of tributyltin (TBT) contaminated sediment on a range of meiobenthic communities. Environmental Pollution 96: 435-444.

Avaca, M.S., M. Narvarte, P. Martín y S. van der Molen. 2013. Shell shape variation in the Nassariid *Buccinanops globulosus* in northern Patagonia. Helgol Mar Res, 67: 567-577.

Baqueiro, E. y D. Aldana. 1995. Mecanismo de formación de conchas de moluscos. Avance y Perspectiva 14: 231-236.

Bigatti, G. y A. Carranza. 2007. Phenotypic variability associated with the occurrence of imposex in *Odontocymbiola magellanica* (Gmelin, 1791) from Golfo Nuevo, Patagonia. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 87: 755-759.

Bigatti, G. y P.E. Penchaszadeh. 2005. Imposex in *Odontocymbiola magellanica* (Caenogastropoda: Volutidae) in Patagonia. Comunicaciones de la Sociedad Malacológica del Uruguay, 9 (88): 371–375

Blaber, S.J.M. 1970. The occurrence of a penis-like outgrowth behind the right tentacle in spent females of *Nucella lapillus* (L.). Journal of Molluscan Studies, 39: 231-233.

Bookstein, F.L. 1991. Morphometric tools for landmark data: Geometry and biology. Cambridge, Cambridge Unversity Press. 436 p.

Borges, C.L.L., M.A.S. Ferandez, I.B. Castro y G. Fillmann. 2013. Organotin pollution form pleasure craft at Paraty, a tourist area of Southeastern Brazil: a melioration or interference?. Braz. J. Oceanogr., 61: 177-186.

Brooke, L.T., D.J. Call, S.H. Poirier, T.P. Markee, C.A. Lindberg, D.J. McCauley y P.G. Simonson. 1986. Acute toxicity and chronic effects of bis(tri-n-butyltin) oxide to several species of freshwater organisms. Center for Lake Superior Environmental Studies, University of Wisconsin-Superior, Superior, WI. 20 p.

Bryan, G.W., P.E. Gibbs, G.R. Burt y L.G. Hummerstone. 1987. The effects of tributyltin (TBT) accumulation on adult dog-whelks, *Nucella lapilus* – long-term field and laboratory experiments. J. Mar. Biol. Ass. U.k., 67: 525-544.

Bushong, S.J., L.W. Hall, W.S. Hall, W.E. Johnson y R.L. Herman. 1988. Acute toxicity of tributyltin to selected Chesapeake Bay fish and invertebrates. Water Res., 22: 1027-1032.

Carvajal, A. y J. Jurado. 2009. Caracterización físico-biótica del litoral del departamento de Bolívar. pp. 13-38. En: DIMARCIOH. 2009. Caracterización físico-biótica del litoral Caribe colombiano. Tomo II. Dirección General Marítima-Centro Investigaciones Oceanográficas e Hidrográficas. Ed. DIMAR, Serie Publicaciones Especiales CIOH Vol. 2. Cartagena de Indias, Colombia. 100 p.

Castro, L., D. Limab, A. Machado, C. Melo, Y. Hiromori, J. Nishikawa, T. Nakanishi, M.A. Reis-Henriques y M.M. Santos. 2007. Imposex induction is mediated through the Retinoid X Receptor signalling pathway in the neogastropod *Nucella lapillus*. Aquatic Toxicology 85: 57-66.

Castro, I.B., H. Matthews-Cascon y M.A. Fernandez. 2000. Imposex em *Thais haemastoma* (Linnaeus, 1767) (Mollusca: Gastropoda) uma indicacao da cotaminacao por organoestânicos na costa do municipio de Fortaleza, Ceará, Brasil. Arq. Cien. Mar. Fortaleza, 33: 143-148.

Castro, I.B. y G. Fillmann. 2012. High tributyltin and imposex levels in the commercial muricid *Thais chocolata* from two peruvian harbor areas. Environ. Toxicol. Chem., 31:955–960.

Castro, I.B., M. Arroyo, P. Costa y G. Fillman. 2012a. Butyltin compounds and imposex levels in Ecuador. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 62: 68-67.

Castro, I.B., M. Rossato y G. Fillmann. 2012b. Imposex reduction and residual butyltin contamination in southern brazilian harbors. Toxicological environmental chemistry, 31 (5): 947–954.

Cervigón, F., R. Cipriani, W. Fischer, L. Garibaldi, M. Hendrickx, A.J.Lemus, R. Márquez, J.M. Poutiers, G. Robaina y B. Rordríguez. 1992. Fichas FAO de identificación de especies comerciales marinas y de aguas salobres de la costa septentrional del Sur de América. FAO. Roma. 513 p.

Coray, C. y S. Bard. 2007. Persistence of Tributyltin-Induced Imposex in Dogwhelks (*Nucella lapillus*) and Intersex in Periwinkles (*Littorina littorea*) in Atlantic Canada. Water Qual. Res. J. Canada, 42: (2), 111-122.

Crothers, J. H. 1989. Has the population decline due to TBT pollution affected shell-shape variation in the dog-whelk, *Nucella lapillus* (L.). Journal of Molluscan Studies, 55: 461-467.

Deutsch, U. y P. Fioroni. 1996. Effects of tributyltin (TBT) and testosterone on the female genital system in the mesogastropod *Littorina littorea* (Prosobranchia). Helgoländer Meeresunters, 50: 105-115.

Díaz, J.M. y A. Acero. 2003. Marine Biodiversity in Colombia: achievements, status of knowledge and challenges. Gayana, 67 (2): 261-274.

Díaz, J.M. y M. Puyana. 1994. Moluscos del Caribe Colombiano. Un catálogo ilustrado. Colciencias, Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras (INVEMAR), Fundación Natura. Bogotá. 291 p.

Domínguez-Ojeda, D., H. González -Vega, J.T. Nieto-Navarro y J.M.J. Ruiz-VelazcoArce. 2009. Aspectos biológicos de los caracoles *Plicopurpura pansa* y *Plicopurpura columellaris* mediante observaciones en condiciones de laboratorio. REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria, 10 (2): 1-7.

Dujardin, J.P. 2012. Clic package for Windows. Institut de Recherches pour le Développement (IRD. France). Available in htto://www.mpl.ird.fr/morphometrics

Evans S.M. y G.J. Nicholson. 2000. The use of imposex to assess tributyltin contamination in coastal waters and open seas. Sci. Total Environ., 258: 73-80.

Fontalvo, M.L. 1998. Análisis del impacto ambiental antrópico en las áreas arrecifales del PNNT, Caribe colombiano. Especialización en evaluación del impacto ambiental de proyectos. Universidad Jorge Tadeo Lozano. Bogotá. 75 p.

García F., C. Palacio y U. García. 2012. Calidad del agua en el área costera de Santa Marta (Colombia). DYNA, 79 (173): 85-94.

Gibbs, P.E., G.W. Bryan, P.L. Pascoe y G. R. Burt. 1987. The use of the dog-whelk *Nucella lapillus*, as an indicator of tributyltin (TBT) contamination. Journal of Marine Biological Association U.K., 69: 507-523.

Goldberg, E.D. 1986. TBT - an environmental dilemma. Environment, 28: 17-44.

Gooding, M., C. Gallardo, G. Leblanc. 1999. Imposex in three marine gastropod species in Chile and potential impact on muriciculture. Mar. Pollut. Bull., 38: 1227-1234.

Gooding, M.P., V.S. Wilson, L.C. Folmar, D.T. Marcovich y G.A. LeBlanc. 2003. The biocide tributyltin reduces the accumulation of testosterone as fatty acid esters in the mud snail (*Ilyanassa obsoleta*). Environ Health Perspect, 111: 426-430.

Graceli, J.B., G.C. Sena, P.F. Lopes, G.C. Zamprogno, M.B. da Costa, A.F. Godoi, D.M. Dos Santos, M.R. de Marchi y M.A. Dos Santos Fernandez. 2013. Organotins: a review of their reproductive toxicity, biochemistry, and environmental fate. Reprod Toxicol., 36: 40-52.

Hammer, Q., D.A.T. Harper y P.D Ryan. 2001. PAST: Palaeontological statistics software package for education and data analysis. Palaeontologia Electronica, 4(1): 9 p.

INGEOMINAS. 1998. Geomorfología y aspectos erosivos del litoral Caribe colombiano. Geomorfología y aspectos erosivos del litoral Pacífico colombiano. Publicación geológica especial No. 21. Bogotá. 112 p

Klingenberg, C.P. 2011. MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular Ecology Resources,* 11: 353-357

Laitano, M.V., J.D. Nuñez y M.Cledón. 2013. Shell alterations in the limpet *Bostrycapulus odites*: A bioindicator of harbour pollution and mine residuals. Ecological Indicators, 34: 345-351.

Lawler, I.F., J.C. Aldrich. 1987. The sublethal effects of bis(tri-N-butyltin) oxide on Crassostrea gigas spat. Mar. Pollut. Bull., 18: 274–278.

LeBlanc, G.A., M.P. Gooding y R.M. Sternberg. 2005. Testosterone-Fatty Acid Esterification: A Unique Target for the Endocrine Toxicity of Tributyltin to Gastropods. Integrative and Comparative Biology, 45(1): 81-87.

Lewis, J.B. 1960. The fauna of rocky shores of barbados, West Indies. Canadian Journal of Zoology, 38: 391-435.

Marin, F., G. Luquet. 2004. Molluscan shell proteins. C. R. Palevol, 3: 469-492.

Márquez, F., R. Gonzalez y G. Bigatti. 2011. Combined methods to detect pollution effects on shell shape and structure in Neogastropods. Ecological Indicators, 11: 248-254.

Martínez, B. 2014. Conectividad mediante variabilidad fenotípica del cangrejo rey, Mithrax spinosissimus (Lamarck) (Brachyura: Majoidea: Mithracidae), en el mar Caribe colombiano. Tesis de Maestría Ciencias - Biología. Universidad Nacional de Colombia. Santa Marta. 76 p

Matthiessen, P. y PE. Gibbs. 1998. Critical appraisal of the evidence for tributyltin-mediated endocrine disruption in mollusks. Toxicological environmental chemistry, 17: 37-43.

Miloslavich, P., P.E. Penchaszadeh y G. Bigatti. 2007. Imposex en gastrópodos de Venezuela. Ciencias Marinas, 33 (3): 319-324.

Moscarella, M., F. García y C. Palacio. 2011. Calidad microbiológica del agua de la bahía de Santa Marta, Colombia. DYNA, 78 (167): 132-141.

Nincao-Begliomini, F, D. Claudino-Maciel, S. Mendonça de Almeida, D. Moledo-Abessa, L. Alves-Maranho, C. Seabra-Pereira, G. Takeshi-Yogui, E. Zanardi-Lamardo y I.B. Castro. 2017. Shell alterations in limpets as putative biomarkers for multi-impacted coastal áreas. Environmental Pollution, 226: 494-503.

Noshita, K. 2014. Quantification and geometric analysis of coiling patterns in gastropod shells based on 3D and 2D image data. Journal of Theoretical Biology, 363: 93-104.

Nudelman, F., E. Shimoni, E. Klein, M. Rousseau, X. Bourrat, E. Lopez, L. Addadi y S. Weiner. 2008. Forming nacreous layer of the shells of the bivalves Atrina rigida and Pinctada margaritifera: An environmental- and cryo-scanning electron microscopy study. Journal of Structural Biology, 162: 290-300.

Nudelman, F. 2015. Nacre biomineralisation: A review on the mechanisms of crystal nucleation. Seminars in Cell & Developmental Biology, 46: 2-10.

Nuñez, J.D., M.V. Laitano y M. Cledón. 2012. An intertidal limpet species as a bioindicator: Pollution effects reflected by Shell characteristics. Ecological Indicators, 14: 178-183.

Oehlmann, J.E., P. Fioroni, E. Stroben y B. Market. 1996. Tributyltin (TBT) effects on *Ocinebrina aciculata* (Gastropoda: Muricidae): imposex development, sterilization, sex change and population decline. Sci. Total. Envir., 188: 205-223.

OMI. 2013. Status of multilateral conventions and instruments in respect of which the International Maritime Organization or its Secretary-General performs depositary or other functions. Sustainable Development: IMO´s Contribution Beyond RIO+20. Disponible en http://www.imo.org/About/Conventions/StatusOfConventions/Documents/Status%20-%202013.pdf.

Osorno, A. 2005. *Bioecología de la "cigua" o "burgao" Cittarium pica (linnaeus, 1758) (Mollusca: Gastropoda: Trochidae) en la costa continental del Caribe colombiano.* Tesis Biología Marina. Universidad Jorge Tadeo Lozano, Colombia. 140 p.

Páramo, J., M. Correa y S. Núñez. 2011. Evidencias de desacople físico-biológico en el sistema de surgencia en La Guajira, Caribe colombiano. Rev. biol. mar. Oceanogr, 46 (3): 421-430.

Parra-Carrillo, D.F. 2012. Aplicación de técnicas de morfometría geométrica en la diferenciación del tamaño y la forma de conchas de caracoles marinos *Plicopurpura patula* (Gould 1853) y *Plicopurpura pansa* (Linneo 1758). Tesis de Maestría en Ciencias-Biología. Universidad del Valle. Cali. Colomabia. 108 p.

Paz-Villarraga, C.A., I.B. Castro, P. Miloslavich y G. Fillmann. 2015. Venezuelan Caribbean sea under the threat of TBT. Chemosphere, 119: 704-710.

Penchaszadeh, P.E., A. Averbuj y M. Cledón. 2001. Imposex in gastropods from Argentina (South-Western Atlantic). Marine Poll. Bull., 42: 790-791.

Primost, M. A., G. Bigatti y F. Márquez. 2016. Shell shape as indicator of pollution in marine gastropods affected by imposex. Marine and Freshwater Research, 67 (12): 1948-1954.

Queiroz, L.R., I.B. Castro y C.A. Rocha-Barreira. 2007. New imposex development index (IDI) for *Stramonita haemastoma* (Mollusca: Muricidae): a transplantation experiment in the Brazilian Northeast. J. Braz. Soc. Ecotoxicol., 2 (3): 249-256.

Restrepo, J.C., D. Franco, J. Escobar, I.D. Correa, L. Otero y J. Gutiérrez. 2013. Bahía de Cartagena (Colombia): distribución de sedimentos superficiales y ambientes sedimentarios. Lat. Am. J. Aquat. Res., 41(1): 99-112.

Rodríguez, J.G., J. Franco, Á. Borja, V. Valencia. 2008. Estudio de la contaminación por TBT en la Costa Vasca. A. T. 2008. Gobierno Vasco, Dirección de Aguas, Departamento de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio, Viceconsejería de Ordenación del Territorio y Biodiversidad, Eusko Jaurlaritza – GobiernoVasco, 71 p.

Rodríguez-Grimón, R.O., M.F. Arroyo-Osorio, D.M de Freitas, I.B. Castro. 2016. Tributyltin impacts in Galapagos Islands and Ecuadorian shore: Marine protected areas under threat. Marine Policy, 69: 24-31.

Rohlf, F.J., 2004. Software TPSDig Version 1.40. Department of Ecology and Evolution. State University of New York

Sierra-Márquez L.I. y J. Olivero-Verbel. 2014. Prevalencia de imposex en el gasterópodo *Stramonita haemastoma*, encontrado en la ciudad de Cartagena de índias, Colombia. Memorias del II Seminario de Ciencias Ambientales Sue-Caribe y VII Seminario Internacional de Gestión Ambiental. 240-245 p.

Smith, B.S. 1971. Sexuality in the American mud snail, *Nassarius obsoletus* Say. Proc Malacol. Soc. Lond., 39: 377-378.

Smith, B.S. 1981. Male characteristics on female mud snails *Nassarius obsoletus* = *Ilyanassa obsoleta*. Journal of Applied Toxicology, 1: 15-21.

Son, M.H. y R.N. Hughes. 2000. Relationship between imposex and morphological variation of the shell in *Nucella lapillus* (Gastropoda: Thaididae). Estuarine, Coastal and Shelf Science, 50: 599-606.

Spooner, N., P.E. Gibbs, G.W. Bryan y L.J. Goad. 1991. The effect of tributyltin upon steroid titres in the female dogwhelk, *Nucella lapillus*, and the development of imposex. Mar Environ Res, 32: 37-49.

Stran, J., A. Jorgensen y Z. Tairova. 2009. TBT pollution and effects in molluscs at US Virgin Islands, Caribbean Sea. Environment International, 35: 707-711.

Thain, J.E., M.J. Waldock y M.E. Waite. 1987. Toxicity and degradation studies of tributyltin (TBT) and dibutyltin (DBT) in the aquatic environment. In: Oceans 87, Vol. 4. Proceedings International Organotin Symposium. Marine Technology Society, Washington, DC. 1398-1404 p

The R foundation for Statistical Compuing, 2015

Titley-O'Neal, C., K.R. Munkittrick y B. MacDonald. 2011. The effects of organotin on female gastropods. Journal of Environmental Monitoring, 13: 2360-2388.

Toste, R., I.A. Pessoa, M.P. Dore, M.A. Parahyba, y M.A. Fernandez. 2013. Is aphallic vas deferens development in females related to the distance from organotin sources? A study with *Stramonita haemastoma*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 91:162-170.

Vermeij, G.J., 1977. The Mesozoic marine revolution: evidence, snails, predators and grazer. Paleobiology, 3: 245-258.

Vermeij, G.J., 1982. Phenotypic evolution in a poorly dispersing snail after arrival of a predator. Nature, 299: 349-359

Wilson, J.G., D. Minchin, B. McHugh, E. McGovern, C.J. Tanner y M. Giltrap. 2015. Declines in TBT contamination in Irish coastal waters 1987–2011, using the dogwhelk (*Nucella lapillus*) as a biological indicator. Marine Pollut. Bull., 100: 289-296.

Yidi-Daccarett, E. y Sarmiento Rossio. 2011. Colombian seashells from the Caribbean Sea. Ed. Stampato. Italia. 384 p.

Zelditch, M.L., D.L. Swiderski, H.D. Sheets y W.L., Fink. 2004. Geometric morphometrics for biologists: a primer. Elsevier, San Diego. 407 p.

**Referencias electrónicas**

Checa-Gonzales, A. 2017. http://wpd.ugr.es/~litoraldegranada/el-litoral/el-litoral sumergido/fauna/moluscos/la-concha-de-los-moluscos/