

L'IMPOSEX: EL SEU ESTUDI I EVOLUCIÓ EN *Bolinus brandaris*

M. JOSÉ AMOR,^{1,5} MONTSERRAT RAMÓN,^{2,3,5} ALEXANDRA RICHTER⁴ I MERCÈ DURFORT^{1,5}

¹ *Departament de Biologia Cel·lular, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona.*

² *IEO-Centre Oceanogràfic de Balears.*

³ *CSIC-ICM.*

⁴ *Dipartimento di Biologia Animale e dell'Uomo, Università della Sapienza di Roma.*

Departamento de Biología, Universidad Autónoma de Madrid.

⁵ *Centre de Referència i Desenvolupament en Aqüicultura de la Generalitat de Catalunya.*

Adreça per a la correspondència: M. José Amor. Departament de Biologia Cel·lular, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona. Diagonal, 645. 08028 Barcelona.

Adreça electrònica: *mamor@ub.edu*.

RESUM

El seguiment del fenomen de l'*imposex* (aparició de caràcters masculins en les femelles a causa de la presència del tributilestany (TBT) a l'aigua del mar) ha estat estudiat durant onze anys, de 1999 a 2008, en el gasteròpode *Bolinus brandaris*, capturat principalment a la localitat de St. Carles de la Ràpita. Durant els primers set anys es van trobar anomalies anatòmiques en més d'un 90 % dels casos, malgrat les normes dictades per la Conselleria de Medi Ambient a partir de 1990 per evitar aquesta contaminació. Anatòmicament, es van observar petites diferències entre els conductes deferents i el penis del mascle respecte als de la femella. En els darrers tres anys aquest fenomen ha disminuït, i pràcticament ha desaparegut en els exemplars procedents de St. Carles de la Ràpita.

Paraules clau: gasteròpode, contaminació, tributilestany, masculinització, *imposex*.

THE IMPOSEX PHENOMENA: STUDY AND EVOLUTION IN *Bolinus brandaris*

SUMMARY

The present work represent a case study of the evolution of the imposex phenomena in the Mediterranean sea. The presence of males secondary sexual characters in females caused by the TBT pollution of the sea water has been monitored during the last 11 years in the gastropod *Bolinus brandaris*, a commercially exploited neogastropod species with a distribution area extending along the whole Mediterranean sea and nearby Eastern Atlantic coast. The provenience of the monitored animals were from St. Carles de la Ràpita

(Tarragona, Northeast coast of Spain). During the first seven years, females with imposex made up more than 90% of the population, in spite of the application of restrictive laws prohibiting the extensive usage of antifouling paints with TBT. The results of the study reveal the existence of some differences among functional males and imposex affected females in the histology and ultrastructural organization of the penis and vas deferent. The results also show a trend in the decrease of the percentage of females exhibiting imposex in the last three years. Besides, available data from the present year point to its almost complete disappearance in St. Carles de la Ràpita.

Key words: gastropoda, pollution, trybutiltin, sex-change, imposex.

INTRODUCCIÓ

En els cascos dels vaixells marins és habitual l'acumulació d'organismes: bacteris, protozous, algues, briozous i molluscs, entre altres. Normalment es reproduïxen a gran velocitat i provoquen la corrosió de la zona poblada, així com un excés de pes que podria arribar a alentir la velocitat del vaixell. Els fenicis ja idearen fer recobriments amb coure, la qual cosa es va utilitzar fins a finals del segle XVIII, quan van aparèixer els primers vaixells fets de ferro (abans només es feien amb fusta), i es van fer proves amb la finalitat de pintar aquestes estructures amb aliatges de diferents metalls, amb predilecció pels de coure. Més tard, s'hi afegiren pintures que tenien estany, i això donava un resultat aparentment més escaient, més eficient (Quintela Sánchez, 2002).

Des de la dècada dels setanta, els pescadors d'Arcachon (França) començaren a detectar el decreixement de la població d'ostres i d'altres espècies de molluscs marins, com *Nucella lapillus*, de les costes angleses, a la dècada dels vuitanta. Per fi es va comprovar que en aquest fenomen estaven implicades les pintures *antifouling* dels vaixells, preferentment el tributilestany (TBT) que, justament a causa de la presència de l'estany, alterava el sistema endocrí dels molluscs marins, i afectava principalment les

hormones femenines; apareixien òrgans sexuals masculins, com el conducte deferent i el penis en les femelles, i això provocava esterilitat (Bryan i Gibbs, 1991). Aquesta esterilitat era deguda al fet que el conducte deferent tapa la papilla genital femenina i bloqueja la vulva, i impedeix tant la copulació com la posta d'ous (Ramón i Amor, 2001).

Les concentracions del tributilestany (TBT) de l'aigua de mar estan molt relacionades amb el grau de desenvolupament de l'imposex, fins al punt que s'han pogut establir quocients TBT/grau imposex, per la qual cosa és un bon indicador de la contaminació de les aigües, i aquesta es pot quantificar en funció del desenvolupament dels òrgans masculins que presenten les femelles (Gibbs *et al.*, 1998; Oehlmann *et al.*, 1992; Stroben *et al.*, 1992).

MATERIALS I MÈTODES

Durant un període d'onze anys (de 1997 a 2008) hem fet un seguiment de la presència d'imposex en exemplars procedents de diferents punts de la costa catalana, principalment de Blanes i de St. Carles de la Ràpita. En els darrers tres anys ens hem centrat en l'estudi dels exemplars procedents de St. Carles de la Ràpita. El seguiment s'ha fet durant els mesos de primavera, principal-

ment abril i maig, època en què la majoria dels exemplars ja són sexualment madurs.

Els individus van ser anestesiats amb 7,67 g de $MgCl_2$ en 93 ml d'aigua destil·lada amb 93 ml d'aigua de mar, de manera que es va obtenir una solució de $MgCl_2$ isotònica amb l'aigua marina.

Una vegada anestesiats es van mesurar diferents paràmetres externs de la closca, que posteriorment es va trencar, amb el cos de l'exemplar al descobert; llavors es va fer l'estudi anatómic del penis i del conducte deferent de les femelles a fi d'observar el grau d'*imposex*. Aquestes parts van ser tot seguit processades per a l'estudi amb microscòpia òptica i electrònica (SEM i TEM).

Per a la fixació es va seguir el protocol de rutina: doble fixació amb glutaraldehid al 2,5 % tamponat amb PBS 0,1 M, a pH 7,4 a 4 °C durant dues hores; després d'un rentatge de trenta minuts en la solució tamponadora es va fer la postfixació amb tetraòxid d'osmi a l'1 %, igualment preparat amb PBS, a pH 7,4 i a 4 °C durant una hora. Després d'una acurada deshidratació amb acetones de graduació ascendent es van incloure les mostres amb la reina Spurr (1969). Els talls semifins de control es van tenyir amb blau de metilè a l'1% preparat amb bòrax al 10 %. Els talls ultrafins es van obtenir amb un Ultracut (Reichert), i es van contrastar rutinàriament amb acetat d'uranil i posteriorment amb citrat de plom, preparat segons la tècnica de Reynolds (1963). Les mostres a estudiar amb el microscopi de rastreig es van recobrir unes amb carboni i altres amb or.

Les observacions es van fer amb microscopis electrònics de transmissió i de rastreig, respectivament: un Hitachi 600 dels Serveis Científicotècnics de la Universitat de Barcelona i un Hitachi 570 de l'Institut de Ciències del Mar (CSIC, Barcelona).

RESULTATS I DISCUSSIÓ

De la gònada de *B. brandaris*, protegida per la cloaca, surten els corresponents conductes que realitzaran la funció de la conducció dels gàmetes i la copulació. Els òrgans destinats a tals efectes acaben a la regió cefàlica de l'individu, concretament a l'esquerra del tentacle dret (vegeu les figures 1 i 2).

Com s'ha dit a la introducció, es distingeixen diversos graus d'*imposex*, segons el grau de desenvolupament dels caràcters masculins en les femelles, que es podrien catalogar, segons Fioroni *et al.* (1991), en:

- Grau 1: absència de penis. Només un bocinet de conducte deferent.
- Grau 2: el vas deferent s'acosta a l'orifici de la vagina i entra en contacte directe amb l'aparell genital femení.
- Grau 3: petit penis sense conducte.
- Grau 4: penis amb un conducte penià curt que acaba en un *cul-de-sac*.
- Grau 5: el conducte penià contacta amb el vas deferent.
- Grau 6: el vas deferent, llarg, comunica amb el conducte penià i connecta amb l'orifici genital femení.

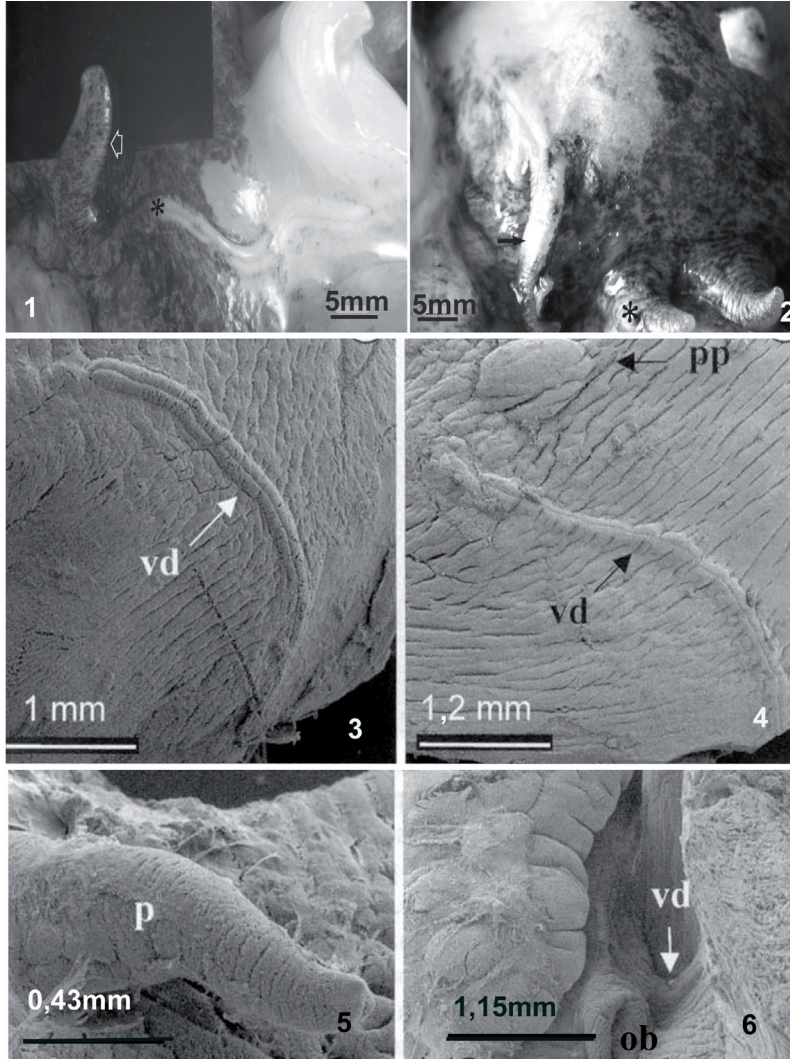
ESTUDI MACROSCÒPIC

En el nostre cas, i com hem mencionat, al llarg d'onze anys hem pogut diferenciar dos períodes en el grau de desenvolupament de l'*imposex*. Fins a l'any 2003 vam trobar un desenvolupament considerable. Quantificant aquesta anomalia anatómica tenim els resultats següents, seguint la classificació esmentada de Fioroni *et al.* (1991), la més admesa internacionalment:

- Grau 1: 3 %.
- Grau 2: cap.
- Grau 3: 4 %.
- Grau 4: 92 %.

Només un 1 % no va presentar cap anomalia (Amor *et al.*, 2003). En tots els casos, tant la copulació com la posta va ser viable (Ramón i Amor, 2001) i no en va que-

dar alterada l'oogènesi (Amor *et al.*, 2001). Per tant, no va haver-hi perill d'extinció d'aquesta espècie a la costa mediterrània, a diferència del que passa amb altres espèci-



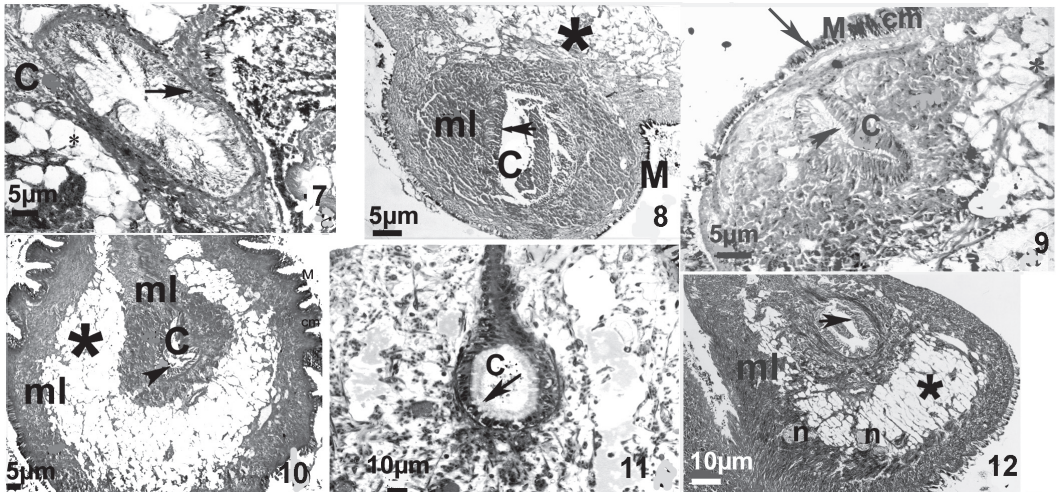
FIGURES 1-6. Vista macroscòpica de l'aparell reproductor masculí de *Bolinus brandaris* al cap, on es troben els òrgans copuladors. La figura 1 ens mostra el penis (fletxa) i el conducte deferent (asterisc). A la figura 2 es pot observar la disposició del penis (fletxes), situat a la dreta del tentacle dret (asterisc). Les figures 3, 4, 5 i 6 ens mostren diversos estadis del desenvolupament de l'imposex en la femella observats amb SEM. Les figures 3 i 4 mostren un grau 3 d'imposex i les figures 5 i 6 l'imposex en grau 4. p: penis; pp: esbós de penis; vd: conducte deferent; ob: obertura vaginal.

es de gasteròpodes (Gibas *et al.*, 1988). Recordem que aquesta espècie té un gran valor gastronòmic i, per tant, comercial.

ESTUDI MICROSCÒPIC I ULTRAESTRUCTURAL

Microscòpia òptica. Segons les nostres observacions, la llum, tant del conducte deferent com del penis masculí, és més gran que la de la femella (250-300 μm i 50 μm). Aquesta llum és recoberta per una mucosa amb un epitelí prismàtic ciliat i amb algunes glàndules mucoses (vegeu les figures 7, 8, 9, 10, 11 i 12). Aquest conducte està envoltat per musculatura llisa, que en el mascle

es conserva fins a arribar al penis; en la femella apareix una banda de teixit conjuntiu entre aquesta musculatura i la capa més externa (vegeu les figures 7, 8 i 11). En tots dos casos, la part externa també presenta una mucosa (vegeu les figures 8, 9, 10 i 11) (Amor *et al.*, 2003a, b). Concretament, en el penis masculí és freqüent trobar semen (vegeu la figura 8), i presenta espermatozoides tant del tipus eupirè com de l'apirè (Amor i Durfort, 1990a, b). Finalment, cal assenyalar el fet que en el penis masculí, on sí que hi ha abundant teixit conjuntiu entre la musculatura llisa que envolta el gonoducte i la musculatura externa, es detecta la presència de nervis (vegeu la figura 9) i espais hemolimfàtics, a fi de facilitar la

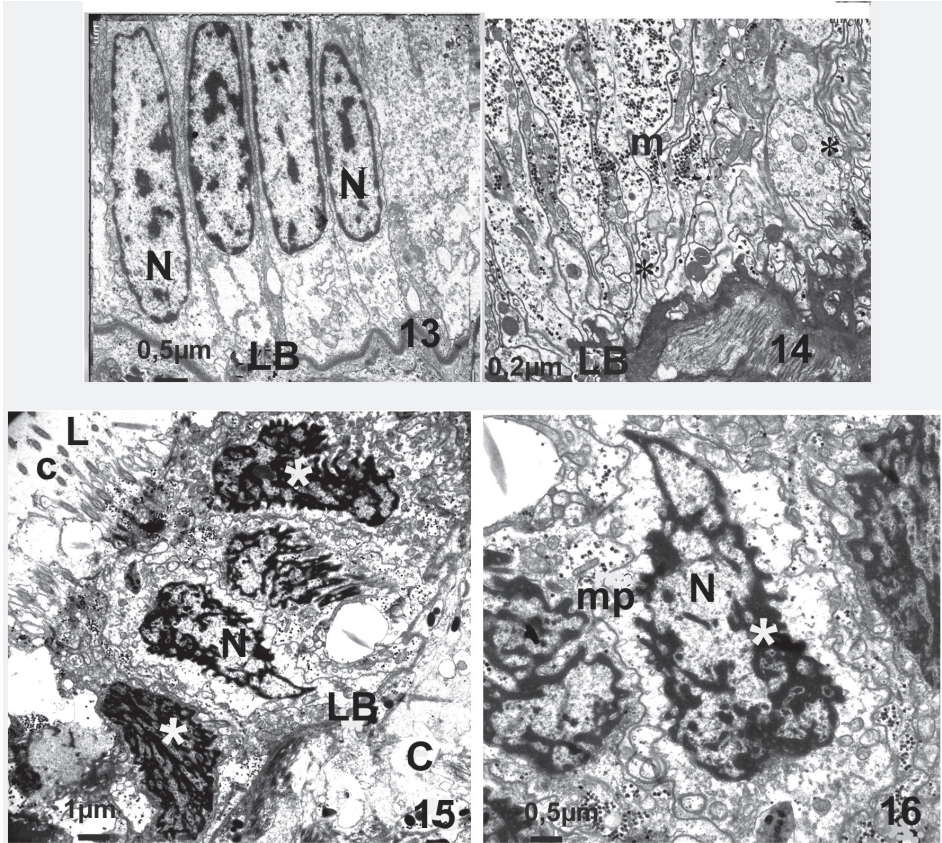


FIGURES 7-12. *Figura 7.* Tall transversal del conducte (C) del mascle a nivell alt, és a dir, a prop del testicle, amb la mucosa del conducte amb l'epitelí ciliat (fletxes) (MO). *Figura 8.* Tall transversal baix del conducte deferent del mascle (C). S'hi pot veure tot envoltat d'una musculatura llisa (ml), seguint la seva mucosa interna revestida per un epitelí ciliat (fletxa). Es pot veure teixit adipós (asterisc) de la massa visceral, així com un revestiment extern format per la mucosa del mantell (M), formada per epitelí ciliat i cèl·lules mucoses (MO). *Figura 9.* Imatge de microscòpia òptica d'un tall transversal del conducte deferent de la femella amb nivell 3 d'imposex (C). Es pot observar el grau de desenvolupament menor que en el cas del mascle, encara que la seva mucosa interna està revestida també per un epitelí ciliat (fletxa). Exteriorment, també està revestit per la mucosa del mantell que, igual que en el mascle, és ciliada (M) i amb cèl·lules mucoses (ms). *Figures 10, 11 i 12.* Estudi comparatiu de talls microscòpics del penis femení (figures 10 i 11) respecte al masculí (figura 12). Noteu que en tots dos casos el conducte intern (C), està revestit per un epitelí ciliat (fletxes), però la secció és diferent: més rodó en el cas del penis femení (figura 10) que no pas en el masculí, que presenta forma ovalada (figura 12). En tots dos casos, es mostra una musculatura llisa (ml), així com teixit alveolar (asteriscs). Noteu la presència de nervis (n) al mig de la musculatura llisa del penis masculí, que no apareixen en el femení.

copulació, que no s'observen en la femella (Amor, 1987).

Microscòpia electrònica. Les diferències cel·lulars més notables les trobem en l'epiteli de la mucosa del gonoducte. Així, trobem que el nombre de cilis és més irregular en les femelles (més o menys dos cilis per 1 µm de secció) que en els mascles, en què,

a part de ser més nombrosos, no tenen un valor per secció constant al llarg del conducte. En tots dos casos, aquestes cèl·lules presenten microvilli (vegeu la figura 16) i la proporció dels mateixos entre mascles i femelles també presenta diferències (Amor *et al.*, 2003a). També s'observa que, així com les membranes plasmàtiques laterals entre



FIGURES 13-16. *Figures 13 i 14.* Estudi comparatiu ultraestructural de les cèl·lules epitelials dels conductes del penis femení (figura 13) respecte del masculí (figura 14). Noteu que la gran diferència es presenta a la part basal de la cèl·lula. La cèl·lula en la femella té una làmina basal poc desenvolupada (figura 13), i no presenta cap invaginació. En canvi, la làmina basal (LB) de les cèl·lules dels exemplars masculins (figura 14) està molt més desenvolupada, i el citoplasma està pràcticament ple de repliegaments de la membrana plasmàtica basal (m). A causa dels augments, en aquest cas no apareixen els nuclis, que sí que es detecten a la figura 13 (N) però que, en realitat, serien molt semblants en aquest cas. *Figures 15 i 16.* Nuclis (N) de l'epiteli femení, que apareixen en ocasions, amb patró de cromatina molt peculiar (asterisc). C: estroma conjuntiu; c: bilis de la llum; L: llum; LB: làmina basal; mp: membrana plasmàtica que separa dues cèl·lules contigües.

dues cèl·lules veïnes són rectilínies i la làmina basal no està gaire desenvolupada en les femelles (vegeu la figura 13), en els mascles la làmina basal està molt desenvolupada i les membranes contigües entre dues cèl·lules presenten grans invaginacions. A la part basal és on es detecta la presència de gran nombre d'òrgànuls citoplasmàtics, com és habitual en les cèl·lules en què hi ha gran activitat d'intercanvi (vegeu la figura 14). Finalment, i com a cosa molt curiosa, cal assenyalar que, alhora que el patró de distribució de la cromatina nuclear en molts casos és semblant en els dos sexes, alguns nuclis de les cèl·lules de la mucosa femenina presenten una distribució de la cromatina força particular, molt irregular i d'aspecte inconfusible (vegeu les figures 15 i 16) (Amor *et al.*, 2007).

BIBLIOGRAFIA

- AMOR, M. J. (1987). *La espermatogènesis de Murex brandaris* Gastropoda, Prosobranchia. Estudio ultraestructural. Barcelona: Universitat de Barcelona. [Tesi doctoral]
- AMOR, M. J.; DURFORT, M. (1990a) «Changes in nuclear structure during eupyrene spermatogenesis in *Murex brandaris*». *Molecular Reproduction and Development*, 25: 348-356.
- (1990b). «Atypical spermatogenesis in *Murex brandaris*». *Molecular Reproduction and Development*, 25: 357-363.
- AMOR, M. J.; RAMON, M.; DURFORT, M. (2003a). «Estudio morfológico y ultraestructural del conducto deferente y del pene de la hembra del molusco *Bolinus brandaris* afectada por el síndrome del imposex (grado 3)». *Libro de Resúmenes del XII Congreso Nacional de Histología e Ingeniería Tisular*: 232.
- (2003b). «El fenomen de l'imposex en el gasteròpode *Bolinus brandaris* a la costa catalana». *Biologia de la Reproducció*, 8: 15-17.
- (2004). «Ultrastructural studies of oogenesis in *Bolinus brandaris* (Gastropoda, Muricidae)». *Scientia Marina*, 68: 343-353.
- BRYAN, G.; GIBBS, P. (1991). «Impact of low concentrations of tributyltin (TBT) on marine organisms: a review». A: NEWMANN, M. C.; MCINTOSH, A. W. [ed.]. *Metal ecotoxicology: concepts and applications*. Ann Arbor: Lewish: 323-361.
- FIORONI, P.; STROBEN, E.; OEHLMANN, J. (1991). «Fréquence et degré d'expression du pseudohermaphroditisme chez quelques Prosobranches stenoglosses de la Baies Morlaix et de la Manche. 1. Situation au printemps de 1998». *Cah. Biol. Mar.*, 32: 281-294.
- GIBBS, P. E.; BRYAN, G. W.; PASLOE, P. L.; BURT, G. R. (1988). «Sexe changes in the female dog-whelk *Nucella lapillus* induced by tributyltin from antifouling paint». *J. Mar. Biol. Ass. UK*, 68: 715-731.
- OEHLMANN, J.; STROBEN, J.; FIORONI, P. (1992). «The rough tingle *Ocenebra erinacea*: an exhibitor of imposex in comparison to *Nucella lapillus*». *Hellgoländer Meeresuntersuchungen*, 46: 311-328.
- QUINTELA SÁNCHEZ, M. [en línia]. (2002). «Cambio de sexo en moluscos gallegos». <www.consumaseguridad.com/ciencia-y-tecnologia2002/11/27/4248.php>
- RAMÓN, M.; AMOR, M. J. (2001). «Increasing imposex in populations of *Bolinus brandaris* (Gastropoda: Muricidae) in the north-western Mediterranean». *Marine Environmental Research*, 52: 463-475.
- (2002). «Reproductive cycle of *Bolinus brandaris* and penis and genital duct size variations in a population affected by imposex». *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 82: 435-442.
- REYNOLDS, E. S. (1963). «The use of lead citrate at high pH as electron opaque stain in electron microscopy» *J. Cell Biol.*, 17: 208-212.
- SPURR, A. R. (1969). «A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy». *Journal of Ultrastructure Research*, 26: 36-43.
- STROBEN, E.; OEHLMANN, J.; FIORONI, P. (1992). «The morphological expression of imposex in *Hinia reticulata* (Gastropoda, Buccinidae): a potential indicator of tributyltin pollution». *Marine Biology*, 113: 625-636.