



**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A.C.**

**EVALUACIÓN DE IMPOSEX EN EL GASTERÓPODO MARINO
Plicopurpura pansa (GOULD, 1853) EN MAZATLÁN SINALOA**

Por:

Ocean. Jesús González Jiménez

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN EN ACUICULTURA Y MANEJO AMBIENTAL

Como requisito para obtener el grado de

MAESTRÍA EN CIENCIAS

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Jesús González Jiménez la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias, con especialidad en Manejo Ambiental.



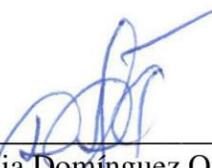
Dr. Miguel Betancourt Lozano
Director de Tesis



Dr. Marco Agustín Liñán Cabello
Co Director de Tesis



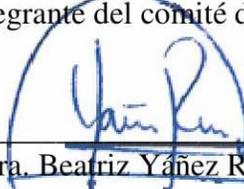
Dra. Silvia Alejandra García Gasca
Integrante del comité de tesis



Dra. Delia Domínguez Ojeda
Integrante del comité de tesis



Dr. Raúl Llera Herrera
Integrante del comité de tesis



Dra. Beatriz Yáñez Rivera
Integrante del comité de tesis

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis “Evaluación de Imposex en el Gasterópodo Marino *Plicopurpura pansa* (Gould, 1853) en Mazatlán, Sinaloa” es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor Jesús González Jiménez, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director(a) de tesis.

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.
Coordinación de Programas Académicos



Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para realizar los estudios de maestría y por el apoyo más allá de lo académico.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) Unidad Mazatlán, por el apoyo para la culminación de la tesis.

A la Dra. Herlinda Soto Valdez, Dra. Adriana Sañudo Barajas, M. C. Luz Estela Rodríguez Ibarra, Héctor Galindo Murrieta y al Dr. Miguel Betancourt Lozano por el apoyo recibido de CIAD ante CONACYT.

A la Dra. Beatriz Yáñez y a la Dra. Delia Domínguez y al resto de comité de tesis por haberme apoyado siempre incluso más allá de lo académico, en gran parte este trabajo es gracias a ellos.

Al Dr. José Salgado Barragán (ICML, Mazatlán) por la ayuda en la identificación de lapas y quitones.

Anthony Spyropoulos (Clemson University) por su interés y entusiasmo en el tema.

A la M.C. Selene María Abad Rosales por su paciencia y apoyo en el procesamiento de muestras histológicas.

A la M.C. Rubí Hernández Cornejo por la capacitación, paciencia y apoyo en el procesamiento de muestras para biología molecular.

L. I. A. Jorge Alberto Durán Niebla. Encargado de Cómputo y Biblioteca por su apoyo en la parte técnica y más allá de la parte académica.

A los estudiantes de licenciatura: Luis Antonio, María y Jesús por el entusiasmo y apoyo durante los muestreos de campo.

A Dios, a la Vida y a la Suerte.

DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedico a Dios principalmente por haberme permitido concluir esta meta profesional.

A mi hermano Rafael González Jiménez y Concepción Morales Gordillo, que, aunque ya no pueda verlos, sé que han estado conmigo en los momentos más difíciles.

A mi familia: Isabel, Rafael, Julia, Rafael G, Maricruz, Luis, Alex, Carlitos, Concepción, Eligio.

A mis amigos que, aunque pocos han estado durante estos años: Gerardo, Andrés, Omar, Mary.

A Dios y al Arcángel San Miguel, por cuidarme siempre.

CONTENIDO

APROBACIÓN	2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	3
AGRADECIMIENTOS	4
DEDICATORIA	5
CONTENIDO	6
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE CUADROS	11
RESUMEN	12
ABSTRACT	13
1. INTRODUCCIÓN	14
2. ANTECEDENTES	18
2.1. Imposex (Alteraciones Reproductivas en Gasterópodos Marinos).....	18
2.2. Monitoreo Ambiental.....	19
2.3. <i>Plicopurpura pansa</i> (Aspectos Biológicos)	21
2.4. Distribución Geográfica y Hábitat	22
2.5. Taxonomía y Sistemática	23
2.6. Importancia Cultural y Conservación	24
3. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN	25
4. HIPÓTESIS	26
5. OBJETIVOS	27
5.1. Objetivo General	27
5.2. Objetivos Específicos	27
6. METODOLOGÍA	28
6.1. Localidades	28
6.2. Descripción de los Sitios de Muestreo	29
6.3. Determinación de Imposex	32
6.4. Índice de Clasificación del Pene (PCI) (HELCOM 2010)	32
6.5. Caracterización Morfológica	33
6.5.1. Relación Longitud-Peso.....	35
6.5.2. Factor de Condición.....	36
6.6. Histología de Imposex.....	36
6.7. Expresión del Receptor X de Retinoides (RXR)	37
6.8. Experimento de Trasplante	38
6.9. Experimento de Reproducción.....	39
7. RESULTADOS	41

CONTENIDO (continuación)

7.1. Incidencia de Imposex en el Gasterópodo Marino <i>P. pansa</i> en Diferentes Localidades Costeras del Municipio de Mazatlán, Sinaloa.	41
7.2. Caracterización Morfológica, Histológica y Molecular de Expresión de RXR de los Organismos de <i>P. pansa</i>	43
7.2.1 Caracterización Morfológica.....	43
7.2.2. Relación Longitud-Peso.....	49
7.2.3. Factor de Condición.....	52
7.3. Caracterización Histológica.....	54
7.4. Expresión del Receptor X de Retinoides.....	59
7.5. Exposición de Hembras Morfológicamente Normales en Sitios Seleccionados de la Zona Costera de Mazatlán.	63
7.5.1. Resultados del Experimento de Trasplante.....	63
7.5.2. Caracterización Histológica de Hembras Trasplantadas.....	65
7.5.3. Expresión de RXR en Hembras Trasplantadas.....	67
7.6. Posible afectación en Cópula en la Conducta Reproductiva por Imposex.	68
7.6.1. Cópulas Observadas en Campo.....	68
7.6.3. Aspectos de Alimentación.....	71
7.6.4. Comportamiento y Desplazamiento.....	74
8. DISCUSIÓN.....	75
8.1. Incidencia de Imposex en el Gasterópodo Marino <i>Plicopurpura pansa</i> en Diferentes Localidades Costeras del Municipio de Mazatlán, Sinaloa.	76
8.1.1. Imposex en Cerro del Vigía y Escolleras.....	78
8.1.2. Imposex en Las Labradas y Mármol.....	79
8.2. Caracterización Morfológica, Histológica y Molecular (RXR) de los Organismos de <i>Plicopurpura pansa</i>	82
8.2.1 Caracterización Morfológica.....	82
8.2.2. Caracterización Histológica.....	84
8.2.3. Caracterización Molecular.....	86
8.3. Exposición de Hembras Morfológicamente Normales en Sitios Seleccionados de la Zona Costera de Mazatlán.	88
8.3.1. Resultados del Experimento de Trasplante.....	88
8.3.2. Caracterización Histológica de Hembras Trasplantadas.....	90
8.3.3. Expresión de RXR en Hembras Trasplantadas.....	91
8.4. Afectación en Cópula en la Conducta Reproductiva por Imposex.....	93
9. CONCLUSIÓN.....	96
9.1. Incidencia de Imposex en el Gasterópodo Marino <i>Plicopurpura pansa</i> en Diferentes Localidades Costeras del Municipio de Mazatlán, Sinaloa.	96
9.2. Identificar las Posibles Afectaciones del Imposex Mediante la Caracterización Morfológica, Histológica y Molecular (RXR) en <i>Plicopurpura pansa</i>	96
9.2.1 Caracterización Morfológica.....	96
9.2.2. Caracterización Histológica.....	97

CONTENIDO (continuación)

9.2.3. Caracterización Molecular	97
9.3.1. Experimento de Trasplante.....	98
9.3.2. Caracterización Histológica de Hembras Trasplantadas.....	98
9.3.3. Expresión de RXR en Hembras Trasplantadas	99
9.4. Determinar si Hembras de <i>Plicopurpura pansa</i> Presentan Afectaciones en Cópula Cuando Desarrollan Imposex.	99
10. REFERENCIAS.....	100
11. ANEXOS	116
11.1. Datos Histológicos	116
11.2. Datos Morfológicos de Hembras de <i>Plicopurpura Pansa</i> Colectadas en Las Labradas y Marcadas Utilizadas como Control de Trasplante en Octubre de 2017	118
11.3. Datos Morfológicos de Hembras de <i>Plicopurpura Pansa</i> Colectadas en Las Labradas y Marcadas Utilizadas como Control de Trasplante en Diciembre de 2017	121
11.4. Datos Morfológicos de Organismos De <i>Plicopurpura Pansa</i> Colectados en el Sitio “Las Labradas” para Análisis Histológico y de Expresión Génica de (RXR) en Febrero de 2018.	123
11.5. Extracción de RNA Total	127
11.6. Tratamiento con DNAsa I:.....	128
11.7. Síntesis de cDNA	129
11.8. PCR	130
11.9. Preparación de Gel de agarosa para Electroforesis	130

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Localización de las estaciones de muestreo en la zona costera de Mazatlán Sinaloa.....	29
2	Estación con alto imposex y afectaciones antrópicas cercanas “Cerro del Vigía”	30
3	Estación con alto imposex sin contaminación aparente visible “Mármol”	31
4	Estación con bajo imposex sin contaminación aparente visible “Las Labradas”.....	31
5	Caracterización de etapas imposex según el índice de clasificación del pene (PCI).....	33
6	Procedimiento de colecta de organismos de <i>P. pansa</i> a lo largo de la zona intermareal rocosa en distintas localidades costeras.....	33
7	Procedimiento de sexado de organismos de <i>P. pansa</i> en campo.....	34
8	Pesado de organismos de <i>P. pansa</i> en campo.....	35
9	Toma de parámetros biométricos de organismos de <i>P. pansa</i>	35
10	Procesamiento de muestras en el laboratorio de histología de CIAD Mazatlán.....	37
11	Diseño experimental utilizado en el trasplante de hembras morfológicamente normales de <i>P. pansa</i>	39
12	Diseño experimental para realizar el experimento de reproducción con hembras de <i>P. pansa</i> en condiciones de laboratorio.....	41
13	Hembra de <i>Plicopurpura pansa</i> con Imposex.....	42
14	Análisis morfométrico de <i>Plicopurpura pansa</i>	47
15	Proporción de sexos global (acumulado) en <i>Plicopurpura pansa</i> en cuatro localidades costeras de Mazatlán Sinaloa.....	49
16	Análisis multivariado entre hembras con y sin imposex de los sitios Escolleras, Cerro del Vigía, mármol y Las Labradas.....	50
17	Longitud promedio de organismos de <i>P. pansa</i> colectados de diferentes localidades costeras de Mazatlán Sinaloa.....	51
18	Peso promedio de organismos de <i>P. pansa</i> colectados de diferentes localidades costeras de Mazatlán Sinaloa.....	51

INDICE DE FIGURAS (continuación)

19	Relación Longitud-peso en organismos colectados de <i>P. pansa</i> en Las Labradas, Mármol y Cerro del Vigía.....	52
20	Relación longitud-peso de <i>P. pansa</i> entre sitios y sexos.....	53
21	Índice de condición calculado en organismos de <i>P. pansa</i> durante 2017 en tres localidades costeras de Sinaloa.....	54
22	Gónada masculina de <i>P. pansa</i>	56
23	Gónada masculina en etapa de maduración.....	57
24	Gónada femenina de <i>Plicopurpura pansa</i>	58
25	Comparación de gónadas femeninas de <i>Plicopurpura pansa</i>	59
26	Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las dos isoformas de <i>Plicopurpura pansa</i> encontradas.....	62
27	Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de RXR obtenidas de la expresión de clonas <i>Plicopurpura pansa</i>	63
28	Comparación de los residuos de aminoácidos de las secuencias de RXR de <i>Plicopurpura pansa</i> (PpRXR1 y PpRXR2) y las reportadas en otras especies de gasterópodos marinos.....	64
29	Hembras de <i>Plicopurpura pansa</i> provenientes de Las Labradas recuperadas después de tres meses de exposición a sitios con evidencia de imposex.....	65
30	Comparación de gónadas femeninas en etapa de proliferación de hembras trasplantadas.....	67
31	Observaciones en campo de cópulas de <i>Plicopurpura pansa</i> en el sitio Las Labradas.....	69
32	Tiempo de copulación de hembras de <i>Plicopurpura pansa</i>	70
33	Cópula de hembras de <i>Plicopurpura pansa</i>	71
34	Porcentaje de cópulas de <i>Plicopurpura pansa</i> observadas en laboratorio y campo durante el experimento de reproducción.....	72
35	Lapas comunes y quitones identificados en el Cerro del Vigía.....	73
36	Caracol intermareal y poliplacóforo identificado.....	73
37	<i>Plicopurpura pansa</i> alimentándose de una lapa común.....	74

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Tabla de clases de evaluación del imposex en cinco especies modelo para efectos biológicos específicos de TBT.....	20
2	Criterios de clasificación de estadios de imposex de acuerdo a HELCOM 2010.....	21
3	Parámetros poblacionales de <i>Plicopurpura pansa</i> en distintas zonas del territorio mexicano.....	23
4	Clasificación ecológica del imposex encontrado en <i>Plicopurpura pansa</i> de acuerdo a los criterios de evaluación ecológica de OSPAR 2005 y HELCOM 2010.....	43
5	Tallas del caracol <i>Plicopurpura pansa</i> por fechas de recolección en diferentes localidades costeras de Mazatlán Sinaloa México.....	45
6	Pesos del caracol <i>Plicopurpura pansa</i> por fechas de recolección en diferentes localidades costeras de Mazatlán Sinaloa México.....	47
7	Cuantificación de imposex en <i>Plicopurpura pansa</i> en los sitios de muestreo.....	49
8	Factor de condición (K) calculado y K=3, de los sitios costeros evaluados.....	54
9	Secuencias del receptor de retinoides X (RXR) reportadas en Gamban en especies de gasterópodos muricidos marinos	60
10	Expresión del receptor de retinoides (RXR) en organismos de <i>Plicopurpura pansa</i> colectados del sitio de referencia (Las labradas) vs hembras de <i>P. pansa</i> colectadas de (Las labradas) y trasplantadas en (Cerro del vigía y Mármol) durante tres meses.....	68

RESUMEN

El imposex es un síndrome caracterizado por el desarrollo de caracteres sexuales masculinos en hembras de gasterópodos marinos que ha sido asociado al compuesto biocida tributil estaño (TBT), prohibido en 2008 a nivel mundial por la Organización Marítima Internacional (IMO). En Europa el imposex es utilizado como indicador para el monitoreo en ecosistemas costeros afectados por el TBT en protocolos de la Convención para la Protección del Medio Ambiente Marino del Atlántico del Nordeste (OSPAR) y la Comisión de Helsinki (HELCOM). Dado que existen antecedentes recientes que reportan la presencia de imposex en gasterópodos del Pacífico mexicano, el objetivo de este trabajo fue corroborar su presencia en el gasterópodo marino *Plicopurpura pansa* en diferentes localidades costeras de la costa del municipio de Mazatlán Sinaloa, caracterizando sus afectaciones mediante evaluaciones morfológicas, histológicas, del receptor de retinoides (RXR), así como sus posibles consecuencias reproductivas. Los resultados indican un imposex mayor del 12% en Cerro del Vigía y Mármol y 3% en Las Labradas. Los pseudopenes se presentaron con longitudes < 1 mm, sin evidencias de vasos deferentes. De acuerdo a OSPAR las características del imposex no representan un peligro para la especie en relación al TBT y se encuentra clasificado en la etapa 1 según HELCOM. Se encontraron 2 isoformas de RXR: la isoforma 1 contiene seis polimorfismos una secuencia de 299 aminoácidos y la isoforma 2 contiene un polimorfismo, con una inserción de 15 pb y una secuencia de 304 aminoácidos. En experimentos de trasplante, no se observaron evidencias de imposex en tres meses de exposición (organismos provenientes de sitios con muy baja incidencia de imposex trasplantados a sitios con alta incidencia de imposex); tanto las hembras trasplantadas como las hembras morfológicamente normales expresaron la isoforma 1 y sólo una hembra trasplantada expresó la isoforma 2. Sin embargo, las hembras trasplantadas y las hembras con imposex colectadas presentaron alteraciones histológicas severas que suponen un riesgo para la especie. Las hembras con imposex de las localidades Mármol y Cerro del Vigía conservaron la capacidad de copular, pero registraron una disminución en el tiempo de cópula.

Palabras claves: *Plicopurpura pansa*; Imposex; Trasplante; Histología; RXR; Frecuencia de copula.

ABSTRACT

The imposex is a syndrome characterized by the development of male sexual characters in females of marine gastropods that has been associated with the biocide tributyl tin (TBT), banned in 2008 worldwide by the Organization International Maritime (IMO). In Europe, imposex is used as an indicator for monitoring in coastal ecosystems affected by TBT in protocols of the Convention for the Protection of the Marine Environment of the Northeast Atlantic (OSPAR) and the Helsinki Commission (HELCOM). Given that there is a recent history that reports the presence of imposex in gastropods of the Mexican Pacific, the objective of this work was to confirm its presence in the marine gastropod *Plicopurpura pansa* in different coastal towns along the coast of the municipality of Mazatlan Sinaloa, characterizing its effects through assessments morphological, histological, retinoid receptor (RXR), as well as its possible reproductive consequences. The results indicate an imposex greater than 12% in Cerro del Vigía y Mármol and 3% in Las Labradas. The pseudopenes were presented with lengths <1 mm, with no evidence of vas deferens. According to OSPAR, the characteristics of imposex do not represent a danger to the species in relation to TBT and is classified in stage 1 according to HELCOM. Two RXR isoforms were found: isoform 1 contains six polymorphisms with a sequence of 299 amino acids and isoform 2 contains a polymorphism, with an insertion of 15 bp and a sequence of 304 amino acids. In transplant experiments, no evidence of imposex was observed in three months of exposure (organisms from sites with very low incidence of imposex transplanted to sites with high incidence of imposex); both the transplanted females and the morphologically normal females expressed isoform 1 and only one transplanted female expressed isoform 2. However, the transplanted females and females with imposex collected presented severe histological alterations that pose a risk to the species. Females with imposex from the towns Marmol and Cerro del Vigia retained the ability to copulate, but recorded a decrease in copulation time.

Keywords: *Plicopurpura pansa*; Imposex; Trasplant; Histology; RXR; Frecuencia de copula.

1. INTRODUCCIÓN

El “imposex” se descubrió en la década de los setenta y se refiere al desarrollo de caracteres sexuales masculinos en hembras de gasterópodos marinos (Blaber, 1970; Gibbs *et al.*, 1987). La causa de esta masculinización se asoció principalmente a compuestos organoestañosos como el Tributil estaño y el Trifenil estaño (TBT y TPT por sus siglas en inglés), usados en pinturas antiincrustantes de embarcaciones y estructuras portuarias, desde la década de los cincuenta hasta finales de la década de los dos mil. Dependiendo de la concentración y sensibilidad en la especie estos compuestos provocan el desarrollo de un pseudo pene y/o un vaso deferente, que por su tamaño puede bloquear el oviducto y ocasionar la muerte de la hembra al no poder expulsar las cápsulas ovígeras, con importantes consecuencias poblacionales a lo largo del tiempo (Smith, 1971, 1981; Jenner, 1979).

Los primeros reportes de imposex se remontan a la década de los 70's en costas del Reino Unido, donde se comprobó que el imposex desarrollado en *Nucella lapillus* causó la extinción de esta especie a nivel local por falta de reclutamiento (Bryan *et al.*, 1986; Gibbs y Bryan, 1986) y fue atribuido al TBT a concentraciones de 0.5 ng/L (Bryan *et al.*, 1987). Los gasterópodos se consideran los organismos más sensibles y con mayores afectaciones (Fent, 1996; Solé *et al.*, 1998; Hoch, 2001); sin embargo, los compuestos organoestañosos ocasionan diversos daños en otras especies marinas como malformaciones en bivalvos en *Crassostrea gigas* a concentraciones de ~ 0.8 ng/L (Alzieu *et al.*, 1986) e inmunotoxicidad en peces y mamíferos (O'Halloran *et al.* 1998). Actualmente se tienen reportes de imposex en más de 260 especies de gasterópodos a lo largo del mundo (Sternberg *et al.*, 2010; Tittley-O'Neal *et al.*, 2011), incluso hay dos índices que permiten la evaluación de la intensidad de la afectación por imposex (Gibbs *et al.*, 1987): el Índice del Tamaño Relativo del Pene (RPSI) que cuantifica el tamaño del pene de las hembras, y el Índice de la Secuencia del Vaso Deferente (VDSI) basado en una valoración semicuantitativa del grado de desarrollo del vaso deferente. La evaluación del imposex se considera como un método rápido, económico y eficaz para el monitoreo de ecosistemas costeros expuestos a contaminación por compuestos organoestañosos (Sousa *et al.*, 2007).

En la década de los 80's en varios países de Europa se prohibió el uso de pinturas anti incrustantes en embarcaciones mayores y se consideró al TBT el compuesto organoestañoso más peligroso y

tóxico vertido en el ambiente marino (OSPAR Commission, 2000). De tal forma que, en 2003, la Organización Marítima Internacional (IMO por su siglas en inglés), adoptó una resolución en la que se acordó prohibir a nivel internacional la aplicación de pinturas con compuestos organoestañosos, con prohibición completa antes del 2008 (IMO, 2005).

Durante las décadas siguientes después de asociar al TBT como principal inductor de imposex en gasterópodos, las investigaciones se enfocaron en caracterizar los efectos androgénicos por exposición al TBT. Actualmente, este compuesto se considera un disruptor endocrino, ya que interrumpe algunos procesos fisiológicos controlados por hormonas, alterando el funcionamiento normal del organismo (Chacón *et al.*, 2007; Ketata *et al.*, 2008). Las hipótesis para explicar el imposex son diversas, enfocándose en tres grandes campos: esteroideas, neuroendocrinas y agonista del receptor X de retinoides (RXR).

Las hipótesis esteroideas sostienen que la masculinización se relaciona con alteraciones en la producción de hormonas. En *Littorina littorea* e *Ilyanassa obsoleta* el TBT disminuye la producción de sulfuros conjugados de testosterona, lo que provoca un aumento de testosterona libre en los tejidos y causa imposex (Oberdörster *et al.*, 1998; Ronis y Mason, 1996). Este planteamiento fue descartado años después por considerar que las concentraciones de TBT utilizadas durante los ensayos de laboratorio fueron demasiado altas y por lo tanto poco realistas, por lo cual nunca se iban a encontrar en campo (Gooding *et al.*, 2003). Otra explicación en cordados superiores como el humano es que el TBT provoca un incremento de andrógenos al inhibir el citocromo P450 aromatasa (CYP19), la cual está encargada de la aromatización de andrógenos a estrógenos (Santos *et al.*, 2005). Esta hipótesis ha sido ampliamente estudiada; sin embargo, existen estudios contradictorios al respecto, ya que hay poca reproducibilidad entre las distintas especies de gasterópodos. Por ejemplo, en *Buccinum undatum* se registró la inhibición de la aromatasa en poblaciones silvestres con presencia de imposex (Santos *et al.*, 2002). Por el contrario, en *Nucella lapillus* se registró un alto imposex con baja inhibición de la aromatasa; además, CYP19 parece ser específico de vertebrados superiores y en gasterópodos es aún desconocido y no hay ninguna evidencia que muestre la presencia de ortólogos del receptor de andrógenos (AR) de vertebrados y CYP19 en moluscos (Castro *et al.*, 2005; Markov *et al.*, 2009; Kaur *et al.*, 2015), aunque sí existen evidencias de que en moluscos existe un tipo de aromatasa similar al de los vertebrados, Zheng *et al.* (2014) demostraron que en ausencia de fuentes externas de estrógenos, se sintetizan esteroides sexuales de forma endógena en moluscos, reduciendo los niveles de estradiol (E2) y fecundidad

femenina en *Potamopyrgus antipodarum* utilizando fadrozol, un inhibidor específico de la aromatasa CYP19 en vertebrados.

Las hipótesis neuroendocrinas proponen que el imposex es causado por la interrupción de la síntesis de factores neuroendocrinos, los cuales están controlados por el ganglio pedal y cerebro pleural. Se ha propuesto que el neuropéptido APGW amida es uno de los factores neuroendocrinos causantes de imposex, ya que alteran el factor morfogénico del pene en especies como *Ilyanassa obsoleta* y *Ocenebra erinacea* (Oberdörster y McClellan-Green 2000; 2005; Féral y Le Gall, 1982); sin embargo, no existen estudios posteriores que validen esta hipótesis en otras especies de gasterópodos (Santos et al., 2002; Castro et al., 2007).

La hipótesis más aceptada actualmente es la relacionada a la alteración del RXR, el cual pertenece a una superfamilia de receptores nucleares y se ha demostrado está asociado a procesos fisiológicos, metabólicos, de inducción de apoptosis y de diferenciación sexual en invertebrados (Mark et al., 2006), incluidos los moluscos gasterópodos. A pesar de que se desconoce exactamente cómo se provoca el imposex, en estudios ambientales, la presencia de este fenómeno en gasterópodos marinos se toma normalmente como indicativo de presencia de TBT, TPT o sus subproductos de degradación en el ambiente y se utiliza para monitorear la presencia de estos contaminantes en las zonas de tráfico marítimo a nivel mundial. En la Unión Europea se establecen regulaciones estrictas y monitoreos permanentes del imposex, la implementación de una política integrada para la protección del medio ambiente marino se ha intentado durante las últimas décadas, creándose cuatro convenciones marinas regionales; el Convenio para la Protección del Medio Marino del Atlántico Nordeste (Convenio OSPAR), el Convenio para la Protección del Medio Marino del Mar Báltico (Convenio HELCOM), el Convenio para la Protección del Mar Mediterráneo contra la Contaminación (Convenio de Barcelona), y el Convenio para la Protección del Mar Negro contra la Contaminación (Convenio de Bucarest; 1992) Laranjeiro et al; 2018a.

En México la situación es distinta, existen solo dos estudios que abordan el tema del imposex: el primero realizado en 2007/2008 en la Laguna de Términos, Campeche, en una zona con alta actividad industrial, se encontró un 15% de incidencia de imposex en tres especies endémicas (*Nassarius vibex*, *Echinolittorina ziczac* y *Cerithium lutosum*) (Romero, 2010); el segundo estudio realizado en 2010/2011 en las costas de Nayarit y Sinaloa se encontró una incidencia del 21 al 28% en *Plicopurpura pansa* un gasterópodo marino intermareal de alto valor cultural para diversos grupos indígenas del sureste mexicano (Domínguez-Ojeda et al., 2015).

Este trabajo se enfocó en el gasterópodo marino *Plicopurpura pansa* debido a su importancia ecológica, cultural, antecedentes en la región y que se encuentra protegido por la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010 en la categoría de especie amenazada. Comprende tres objetivos complementarios, el primero fue el diagnóstico del imposex en tres localidades costeras de Mazatlán Sinaloa, incluyendo una caracterización histológica y a la expresión de RXR. El segundo objetivo fue un enfoque experimental en campo para evaluar el desarrollo de imposex por exposición a condiciones en sitios seleccionados por presentar alto nivel de imposex. El tercer objetivo fue la evaluación de la posible disfunción reproductiva en *P. pansa* relacionado al imposex bajo un seguimiento en condiciones de laboratorio.

2. ANTECEDENTES

2.1. Imposex (Alteraciones Reproductivas en Gasterópodos Marinos)

Desde la caracterización del imposex en los 70s en *Nucella lapillus* en las costas del Reino Unido por Blaber (1970) y Smith (1971), para los 90s ya se tenían registros en más de 72 especies de gasterópodos (Fioroni et al., 1991; Oehlmann et al., 1991) y antes de terminar la década el imposex se había reportado en más de 150 especies alrededor del mundo (Fent, 1996; Matthiessen et al., 1999). Actualmente se tiene registro de aproximadamente 260 especies de gasterópodos marinos afectados en algún grado por imposex (Sternberg et al., 2010; Titley-O'Neal et al., 2011; Lam et al., 2017; Cacciatore et al., 2018).

Está comprobado que el TBT y sus subproductos de degradación provocan la masculinización en hembras y el grado de severidad, estadio y clasificación son diferentes en cada especie (Rittschof y McClellan-Green, 2005; Chan et al., 2008; Giraud-Billoud et al., 2013; Grimón et al., 2016). Se ha postulado que los compuestos organoestañosos poseen una alta afinidad a RXR y pueden interferir en la ruta de retinoides mediante los receptores nucleares PPAR γ y RXR induciendo imposex (Nishikawa et al., 2004; Horiguchi et al., 2008; Amiard y Amiard-Triquet, 2015).

En el caso de gasterópodos como *Thais clavigera*, *Nucella lapillus* y *Leucozonia naza* tanto el TBT como el TPT son compuestos agonistas para los receptores nucleares RXR y PPAR γ (Blackmore, 2000; Meirelles et al., 2008; Titley-O'Neal et al., 2011; Horiguchi et al., 2012) lo que fortalece la hipótesis de que el imposex se produce después de la interrupción de la ruta de retinoides por compuestos organoestañosos (Nishikawa, 2006) y/o través de PPAR γ o la conformación del heterodímero RXR/PPAR γ (Pascoal et al., 2013). No obstante, el hecho que el imposex pueda ser inducido por más de un agonista en cualquiera de los receptores nucleares evidencia que aún falta clarificar detalles sobre el mecanismo que provoca el imposex en gasterópodos marinos.

Aunado a esto, se ha descubierto que existen otros compuestos químicos que provocan imposex como el cobre, matrices de pinturas e incluso el estrés ambiental (Nias et al., 1993). Se han encontrado evidencias que el nonilfenol funciona como un estrógeno y desarrolla imposex en *Nucella lapillus* cuando este es inyectado (Evans et al., 2000). En *Pomacea canaliculata*, el TBT

disminuye la frecuencia de copulación sin obstruir el oviducto ni alterar la morfología de la gónada (Giraud-Billoud *et al.*, 2013), en *Voluta musica* el imposex no parece desarrollar alteraciones histológicas en la gónada a diferencia de *Thaisella chocolata*, *Clibanarius vittatus*, *Adelomelon beckii*, *Thais clavigera* y *Plicopurpura pansa* donde sí existen alteraciones en el tejido gonadal, el desarrollo de un vaso deferente, generación de ovocitos, atresia folicular y modificación del epitelio del gonoducto (Blackmore, 2000; Chan *et al.*, 2008; Arrighetti & Penchaszadeh, 2010; Sant'Anna *et al.*, 2010; Domínguez-Ojeda *et al.*, 2014; Mattos & Romero, 2016).

2.2. Monitoreo Ambiental

Desde el descubrimiento de la alta toxicidad de los compuestos organoestañosos en los 70s hasta la prohibición del total del TBT en pinturas antiincrustantes a nivel internacional en 2008, el estudio del imposex sigue vigente y es de gran importancia ambiental. Actualmente es considerado un indicador confiable de contaminación por TBT o subproductos de degradación como el Dibutil estaño (DBT) o Monobutil estaño (MBT) en zonas costeras, (Laranjeiro *et al.*, 2018a; Jones and Ross, 2018).en el que se monitorea el grado de masculinización en hembras de moluscos gasterópodos debido a su alto grado de sensibilidad.

En Europa el monitoreo del imposex forma parte del plan de restauración de zonas costeras afectadas por el uso de TBT (Ruiz *et al.*, 2019), como parte la Directiva Europea de Estrategia Marina establecida en 2008, ley diseñada para hacer una contribución a la conservación, protección y restauración de los ecosistemas marinos en la Unión Europea antes del 2020. Para lograr este objetivo, cada país miembro de la Unión Europea debe de realizar las acciones pertinentes y en conjunto cumplir con otros convenios marinos en las regiones europeas. En España, por ejemplo, se monitorean dos especies altamente sensibles al TBT: el caracol de roca *Nucella lapillus* y el caracol de lodo *Nassarius reticulatus*.

El imposex también es utilizado como herramienta de control obligatoria en protocolos internacionales de la Convención para la Protección del Medio Ambiente Marino del Atlántico del Nordeste (OSPAR, por sus siglas en inglés) OSPAR (2000), la cual evalúa la calidad del ambiente

marino en relación a la concentración de TBT en el sedimento y la incidencia de imposex en hembras de cinco especies: *N. lapillus*, *N. reticulatus*, *Buccinum undatum*, *Neptunea antiqua* y *Littorina littorea*; clasificada en función del tamaño del vaso deferente y el tamaño del pene (Cuadro 1, OSPAR, 2004).

Cuadro 1. Tabla de clases de evaluación del imposex en cinco especies modelo para efectos biológicos específicos de TBT. Los valores del índice del vaso deferente son criterios que definen el grado de contaminación de la zona evaluada. A y B en verde significa que se cumple el objetivo de calidad ecológica. Índice de vaso deferente (VDSI); índice de clasificación de pene (PCI); Índice de intersex (ISI). (Tomado de OSPAR 2004).

Valoración de clase	<i>N. lapillus</i> VDSI	<i>N. reticulatus</i> VDSI	<i>B. undatum</i> PCI	<i>N. antiqua</i> VDSI	<i>L. littorea</i> ISI
A	<0.3			<0.3	
B	0.3 - <2.0	<0.3	<0.3	0.3 - <2.0	<0.3
C	2.0 - <4.0	0.3 - <2.0	0.3 - <2.0		
D	4.0 - 5.0	2.0 - 3.5	2.0 - <4.0	2.0 - <4.0	2.0 - <5.0
E					0.5 - 12
F	>5.0	>3.5	4.0		>1.2

Por otra parte, la Comisión de Helsinki (HELCOM, por sus siglas en inglés) una organización internacional que gobierna la Convención para la Protección del Medio Ambiente Marino del Área del Mar Báltico (Alemania, Dinamarca, Estonia, Finlandia, Letonia, Lituania, Polonia, Rusia y Suecia) establece los lineamientos para monitorear el imposex e intersex en *Nucella lapillus* y *Littorina littorea* para zonas intermareales, mientras que para muestreos en fondos blandos se evalúan *Nassarus nitidus* y *Peringia ulvae* en profundidades de 1 a 10 m y *Buccinum undatum* y *Neptunea antiqua* en profundidades de 15 a 100 m (cuadro 2, HELCOM, 2010).

Cuadro 2. Criterios de clasificación de estadios de imposex de acuerdo a HELCOM 2010.

Estadio	Características
0	Hembra normal sin características masculinas
1	a) Evidencia de formación de un pene pequeño sin un conducto deferente, detrás del tentáculo ocular derecho. b) No se observa pene, sino un pequeño vaso deferente distal detrás del tentáculo ocular derecho.
2	Conducto del pene cerrado detrás del tentáculo ocular derecho.
3	a) Pene con conducto que continúa en un tracto distal incompleto del vaso deferente que crece hacia la abertura vaginal. b) No se observa pene; el vaso deferente recorre continuamente desde el tentáculo ocular derecho sobre la parte inferior de la cavidad del manto hasta la abertura vaginal.
4	Se observa pene con conducto y vaso deferente continuo desde el pene hasta la abertura vaginal. En el estadio 4+, el conducto deferente pasa por la abertura vaginal y corre hacia el canal ventral de la glándula de la cápsula.
5	<i>Peringia ulvae</i> : una hembra estéril sin características sexuales masculinas, pero con aperturas genitales cerradas. <i>Nucella lapillus</i> : a) La vagina y generalmente, la bolsa copulatoria se reducen y la vulva está ausente. Se puede encontrar una glándula prostática más o menos extendida. b) La papila genital está demasiado cubierta y la abertura vaginal está ocluida por la proliferación de tejido del vaso deferente que a menudo forma "nódulos". Además de estos tejidos hiperplásicos, a veces se pueden encontrar inflamaciones llenas de líquido debajo del epitelio del manto. Ambas posibilidades conducen a una falla reproductiva y a la esterilidad, porque las cápsulas de huevo no pueden liberarse.
6	<i>Peringia ulvae</i> : una hembra estéril con aperturas genitales cerradas y características sexuales masculinas debe tener el valor 6x. Para diferenciar entre la etapa 1-4 de todas las hembras que presentan aperturas genitales cerradas, se utilizan los tipos a, b, c y d. Por ejemplo, una hembra virilizada de la Etapa 1 con apertura genital femenina cerrada debe recibir el valor 6a y una hembra virilizada de la Etapa 4 con apertura genital femenina cerrada debe recibir el valor 6d. <i>Nucella lapillus</i> : como en la etapa 5, se pueden distinguir los tipos a y b. Ambos representan la etapa final de imposex determinada con un ovario todavía intacto, puramente femenino. El lumen de la glándula de la cápsula y su vestíbulo se rellenan con una acumulación de cápsulas de huevo abortivas, que al principio son transparentes y luego forman una masa amorfa oscura o negra. Esto produce una hinchazón intensa de la glándula de la cápsula y, finalmente, a menudo una ruptura, causando la muerte del animal.

2.3. *Plicopurpura pansa* (Aspectos Biológicos)

Plicopurpura pansa (Gould, 1853) es un gasterópodo marino que pertenece a la familia Thaididae. Habita en la zona intermareal rocosa (Keen, 1971), es carnívoro, su alimentación se concentra en pequeños organismos intermareales con los que cohabita, incluyendo poliplacóforos como *Chiton spp.*, gasterópodos *Nerita spp.* y *Littorina spp.* (Turok *et al.*, 1988; Castillo-Rodríguez, 1992). Se reproduce durante todo el año, con un pico en los primeros meses del año, en temperaturas frías.

Es una especie dioica, el macho monta a la hembra y la fecundación es interna. Copula durante todo el año y las hembras depositan las cápsulas ovígeras entre las grietas de las rocas en la zona intermareal (Michel-Morfin, 2000).

Domínguez-Ojeda *et al.* (2015) documentaron que *Plicopurpura pansa* es afectado por el imposex, en la zona de Olas altas en Mazatlán, Sinaloa registraron una incidencia de 28% y en Santa Cruz, Nayarit de 21%.

2.4. Distribución Geográfica y Hábitat

La especie se distribuye en el océano Pacífico desde Baja California Sur hasta la parte norte de Perú; las corrientes de California y de Humboldt limitan su distribución (Keen, 1971; Acevedo y Hernández, 1988). Habita en la zona intermareal costera, principalmente en los orificios de rocas más expuestas de la zona costera y presenta un movimiento a lo largo de la distribución vertical de la zona intermareal sobre todo en época de calor, siempre en las zonas de alto oleaje (Garrity y Levings, 1981). Hay varios estudios que caracterizan la distribución y abundancia de la especie en diferentes localidades del país. En el cuadro 3 se presenta la información sobre parámetros poblacionales de *P. pansa* en México.

Cuadro 3. Parámetros poblacionales de *Plicopurpura pansa* en distintas zonas del territorio mexicano.

Sitio	N	P (H: M)	D (m ²)	T (mm)	P (g)	Referencia
Guerrero, México.	623 NR	0.70:1 1:0.80 0.87:1	5.19 ± 4.63 6.53	20.10 ± 6.01 4.02 ± 0.05	1.79 ± 1.68 NR	(Flores-Garza <i>et al.</i> , 2007) (Flores-Rodríguez, 1995)
Oaxaca, México	3145	1:1	NR	14.7 ± 2.83 18.7 ± 2.83	NR	(Naegel y García-Domínguez, 2006)
Baja California Sur, México	8903	1:0.8	NR	32 ± 3.5 27 ± 3.5	NR	(Ramírez-Rodríguez y Naegel, 2003)
Baja California Sur, Jalisco, Oaxaca e Isla Socorro, México	814	1:0.75	0.86 ± 0.26	40.7 ± 9.27	NR	(Michel-Morfín <i>et al.</i> , 2002)
Jalisco	964	1:0.75	1.7 ± 0.34	30.45 ± 2.19	NR	(Michel-Morfín <i>et al.</i> , 2000)
Sinaloa	250	0.71:1 0.82:1	1.15	6.5 ± 1.1	NR	(Enciso <i>et al.</i> , 1998) (Acevedo-García y Escalante, 1993)
	NR	0.55:1 1:1.2	3.35	32.5 ± 9.2	NR	
Archipiélago Revillagigedo	NR	1:2	0.28	35.42	11.18	(Holguín- Quiñones, 1993)

N = Número total de organismos colectados, P (H: M) = Proporción sexual Hembra: Macho, D (m²) = Densidad promedio por metro cuadrado, T (mm) = Talla promedio en milímetros, P (g) = Peso promedio en gramos, NR = No registrado.

2.5. Taxonomía y Sistemática

En las zonas costeras de México se encuentran tres especies del género *Plicopurpura* (Cossmann, 1903), en la costa del Pacífico: *Plicopurpura pansa* (Gould, 1853) y *Plicopurpura columellaris* (Lamarck, 1816) y en la zona del Golfo: *Plicopurpura patula* (Linnaeus, 1758). Diversos estudios ecológicos han reportado que *Plicopurpura pansa* y *Plicopurpura columellaris* cohabitan en la zona intermareal y se ha discutido si ambas especies son en realidad formas de crecimiento facultativo terminal de la misma especie, generando una controversia de carácter taxonómico (Clench 1947; Abbott 1974; Kool 1987, 1988; Castillo-Rodríguez, 1992; Acevedo *et al.*, 2000; Becerra, 2000). Por ejemplo, en la base de datos World Register of Marine Species (WORMS: www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=396993), el nombre de *P. pansa* aparece

como “NO VÁLIDO” e indica que el nombre “ACEPTADO” o “TAXONÓMICAMENTE CORRECTO” es el de *P. columellaris* debido al estudio de Claremont *et al.* (2013), donde consideraron a *P. pansa* como sinonimia menor de *P. collumellaris* con el análisis de cuatro marcadores moleculares. Cabe destacar que este trabajo es una revisión mundial donde el énfasis se dirige a aclarar las relaciones filogenéticas entre los géneros de la familia, no entre las especies, por lo que la especie *P. pansa* se considera válida. Esto está sustentado en varios estudios regionales donde se describen claramente las diferencias entre las dos especies y hablan de una posible hibridación, aunque es posible distinguir el morfotipo perteneciente a *P. pansa* (e.g. López-Chávez *et al.*, 2016). Además, las leyes mexicanas protegen a *P. pansa* bajo la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010 y la considera una especie diferente a *P. columellaris*.

2.6. Importancia Cultural y Conservación

Esta especie secreta a través de la glándula hipobranquial un fluido viscoso blanquecino como mecanismo de defensa ante depredadores (Naegel y Cooksey, 2002) y es empleado por grupos indígenas (Chontales, Huaves, Nahuas, Zapotecos y Mixtecos) para teñir textiles tradicionales (Ramírez-Rodríguez y Naegel, 2003; Vázquez-Gil *et al.*, 2004).

En la década de los 80s esta especie estuvo al borde de la extinción debido a la sobre explotación hecha por una compañía japonesa con el nombre comercial de “Púrpura Imperial”, hasta que las autoridades mexicanas prohibieron su explotación a nivel industrial y únicamente permiten la extracción artesanal por los grupos indígenas mexicanos (DOF, 1988). En lo que constituyó el primer Acuerdo Intersecretarial para el manejo de la especie, publicado en el Diario Oficial de la Federación el 3 de marzo de 1988, que daría las bases para la NOM-059-SEMARNAT-2001, actualmente la NOM-059-SEMARNAT-2010 se decreta a *P. pansa* como especie protegida en México con un estatus de “protección especial” y forma parte del listado de las 372 especies prioritarias para su conservación publicado en el DOF el 5 de marzo de 2014.

3. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

Diagnóstico del imposex

- ¿Cuál es la incidencia de imposex en el caracol púrpura de la zona costera de Mazatlán y cuáles son las características de los organismos con presencia de imposex?

Trasplante

- ¿Existen condiciones de contaminación que induzcan el imposex en diferentes localidades de la zona costera del municipio de Mazatlán Sinaloa?

Reproducción

- ¿El grado de imposex encontrado impide el proceso de cópula en hembras de *P. pansa*?

4. HIPÓTESIS

Diagnóstico

La alta incidencia de imposex será mayor en sitios costeros cercanos al recinto portuario y a zonas urbanas de Mazatlán.

Trasplante

Hembras morfológicamente normales de *Plicopurpura pansa* colectadas de un sitio con presencia baja de imposex (Las Labradas), desarrollarán imposex al ser trasplantadas a dos sitios con evidencia de imposex (Mármol y Cerro del Vigía) durante tres meses y por lo tanto existirá evidencia de que estos sitios son fuentes de contaminación que induzcan la condición de imposex.

Reproducción

Hembras de *Plicopurpura pansa* con imposex provenientes de los sitios Mármol y Cerro del Vigía en Mazatlán, Sinaloa tendrán disminución en frecuencia y duración de cópulas en condiciones de laboratorio.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General

Caracterizar la presencia de imposex en el gasterópodo marino *Plicopurpura pansa* (Gould, 1853) en diferentes localidades de la zona costera del municipio de Mazatlán Sinaloa y sus posibles consecuencias reproductivas.

5.2. Objetivos Específicos

Diagnóstico:

- 1) Determinar la incidencia de imposex en el gasterópodo marino *Plicopurpura pansa* en diferentes localidades costeras del municipio de Mazatlán, Sinaloa.
- 2) Identificar las posibles afectaciones del imposex mediante la caracterización morfológica, histológica y molecular (RXR) en *Plicopurpura pansa*.

Trasplante:

- 3) Demostrar experimentalmente si la exposición en diferentes sitios de la zona costera de Mazatlán produce imposex.

Reproducción:

- 4) Determinar si hembras de *Plicopurpura pansa* presentan afectaciones en cópula cuando desarrollan imposex.

6. METODOLOGÍA

Objetivo particular 1. Determinar la incidencia de imposex en el gasterópodo marino *P. pansa* en diferentes localidades costeras del municipio de Mazatlán, Sinaloa.

6.1. Localidades

Se realizaron 2 muestreos preliminares puntuales en octubre y noviembre de 2017 en distintas zonas costeras de Mazatlán Sinaloa, para ubicar y seleccionar las estaciones que presentaban organismos suficientes para muestreos posteriores. De los resultados preliminares se consideraron tres estaciones Cerro del Vigía, Mármol y Las Labradas. (Fig. 1). Los muestreos se realizaron desde octubre de 2017 hasta febrero de 2018 mensualmente.

Nota aclaratoria: El sitio Escolleras ubicado a 300 metros del centro UNAM Coordinación de la Investigación Científica BASE DE OPERACIONES "EL PUMA", fue descartado durante el transcurso de esta investigación, debido a múltiples alteraciones del medio por la colocación de escolleras de hormigón a lo largo de la zona, perdiéndose casi por completo el frágil ecosistema que ahí existía antes de esa alteración. Sin embargo, se presentan algunos resultados obtenidos de Escolleras antes de la afectación en la zona.

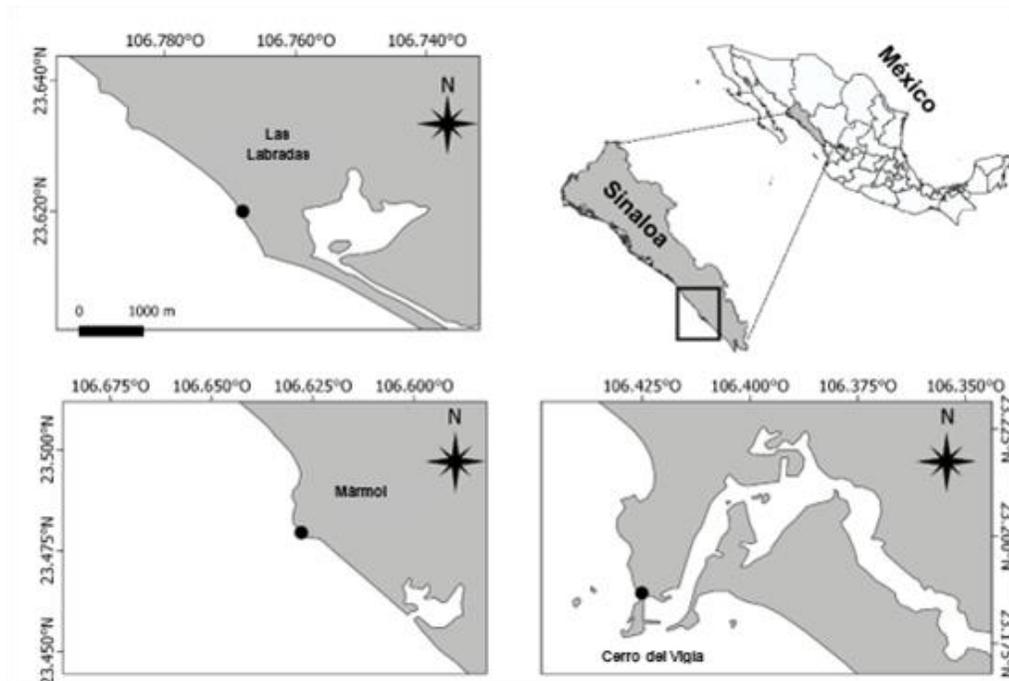


Figura 1. Localización de las estaciones de muestreo en la zona costera de Mazatlán Sinaloa.

6.2. Descripción de los Sitios de Muestreo

1) Cerro del Vigía

Se localiza entre $23^{\circ}11'12.33''$ latitud norte y $106^{\circ}25'29.77''$ longitud oeste a 3 kilómetros del puerto de Mazatlán Sinaloa. La zona de estudio está influenciada por diversos factores antropogénicos: la zona portuaria y la planta de tratamiento de aguas residuales “ el crestón” se encuentran ubicados a pocos metros de la estación, además de ser una zona con alta afluencia turística y diversas viviendas alrededor, es considerada una zona con alta influencia antropogénica. Aunque es una zona con pequeños acantilados y de oleaje fuerte durante la marea alta, es de fácil acceso durante todo el año (Fig. 2).



Figura 2. Estación con alto imposex y afectaciones antrópicas cercanas “Cerro del Vigía. A) y B) Vista general mostrando las zonas rocosas y pequeños acantilados. C) Muestreo durante marea baja en la zona intermareal. D) Pequeño grupo de organismos de *P. pansa* adheridos a las rocas durante la marea baja.

2) Mármol

Se localiza en 23°29'08.05'' latitud norte y 106°37'43.05'' longitud oeste a 40 kilómetros del puerto de Mazatlán Sinaloa, es un sitio que colinda con un pequeño pueblo conocido como Mármol de Salcido, donde la actividad predominante en la región es la agricultura. En la zona de estudio sólo es posible acceder en condiciones de marea baja, debido al fuerte oleaje y predominantes acantilados a lo largo de la playa. Es un lugar sin actividades portuarias cercanas y alteraciones antropogénicas visibles (Fig. 3).



Figura 3. Mármol. A) Estación con alto imposex sin contaminación aparente visible “Mármol”. B) Pozas de marea. C) Fotografía compuesta en donde se aprecia el oleaje intenso a pesar de estar en marea baja durante los muestreos.

3) Las Labradas

Se localiza en 23°37'11.79" latitud norte y 106°46'03.81 longitud oeste a 70 kilómetros del puerto de Mazatlán Sinaloa, forma parte del área natural protegida conocida como la Meseta de Cacaxtla. Es una zona arqueológica protegida, debido a que se han encontrado petroglifos en las rocas lo largo de la playa, es un sitio de fácil acceso durante todo el año, sin afectación antropogénica visible (Fig. 4).

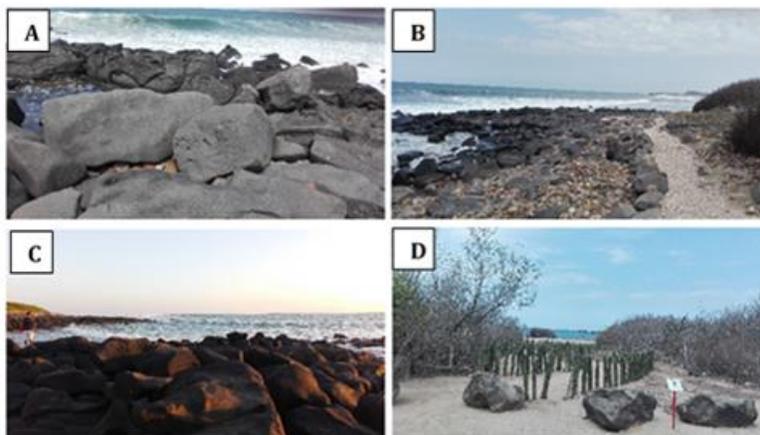


Figura 4. Estación con bajo imposex sin contaminación aparente visible “Las Labradas”. A) Petroglifos observados en las rocas a lo largo de la playa. B) Playa conformada de rocas basálticas y pequeños nichos de mangle. C) Sitio de colecta de organismos de *P. pansa*. D) Las labradas es una zona arqueológica perteneciente a la meseta de Cacaxtla.

6.3. Determinación de Imposex

La incidencia de imposex se determinó conforme a la metodología de Gibbs *et al.* (1987) modificada por Domínguez-Ojeda *et al.* (2015). Consiste en la recolección organismos a lo largo de la línea de costa en la zona rocosa intermareal, examinando *in situ* a *P. pansa*, los caracoles se regresaron vivos a la zona intermareal dado que es una especie que se encuentra en la NOM-059-SEMARNAT-2010. Por lo anterior, se contó con permiso SEMARNAT para colecta y estudios en laboratorio (oficio SGPA/DGVS/04783/17).

Para calcular el índice de imposex por zona se utilizará la siguiente fórmula:

$$I = \frac{\# \text{ hembras con imposex}}{\# \text{ hembras totales}} \times 100$$

6.4. Índice de Clasificación del Pene (PCI) (HELCOM 2010)

El índice de clasificación del pene (PCI) se basa principalmente en el grado de desarrollo del pseudo-pene (Figura 5). Basado en el método de clasificación de imposex en *Buccinum undatum*. La caracterización de casos límite entre diferentes etapas es difícil y se basa en la experiencia del observador. El PCI se calcula como el promedio de las etapas imposex en un grupo de gasterópodos. Si el vaso deferente está presente, el valor aumenta con 0.5.

$$\text{PCI} = \Sigma \text{ etapa de imposex de todas las hembras examinadas} / \text{número de hembras.}$$



Figura 5. Caracterización de etapas imposex según el índice de clasificación del pene (PCI). (tomado de Strand y Jacobsen 2002).

Objetivo particular 2. Identificar las posibles afectaciones del imposex mediante la caracterización morfológica, histológica y molecular (RXR) de los organismos de *Plicopurpura pansa*.

6.5. Caracterización Morfológica

Procedimiento:

1.- Colecta de *P. pansa* a lo largo de la zona intermareal utilizando la metodología de Domínguez-Ojeda *et al.* (2015) Figura 6.



Figura 6. procedimiento de colecta de organismos de *P. pansa* a lo largo de la zona intermareal rocosa en distintas localidades costeras. A) *P. pansa* en su ambiente natural; B) Búsqueda y colecta de *P. pansa* en las oquedades de las rocas; C) Organismos de *P. pansa* colectados listos para realizar biometría *in situ*.

2.- La identificación del sexo se realizó tomando dos caracoles y golpeando suavemente sus conchas entre sí, hasta que el cuerpo del organismo salga y se adhiera a la concha del otro caracol, observando la presencia del pene en machos detrás del tentáculo ocular derecho, la ausencia de éste en hembras morfológicamente normales y la presencia de una pequeña papila en hembras con imposex Figura 7.

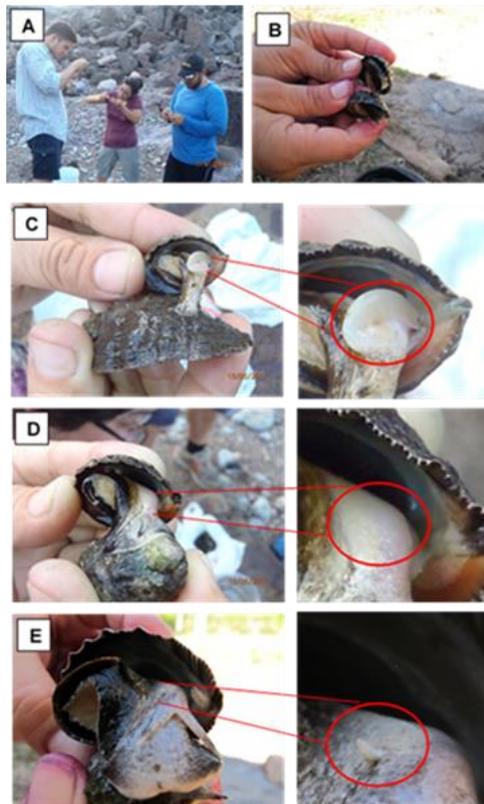


Figura 7. Procedimiento de sexado de organismos de *P. pansa* en campo. A) Sexado de organismos; B) Técnica de sexado (golpear suavemente las conchas); C) Macho; D) Hembra morfológicamente normal; E) Hembra con imposex.

3.-Se tomó el peso total de cada organismo vivo utilizando una balanza digital 0,01g. Figura 8.



Figura 8. Pesado de organismos de *P. pansa* en campo

4.- Se tomaron los parámetros biométricos de cada organismo colectado: largo total, ancho y alto de la concha utilizando un vernier digital 0,05 mm Figura 9.



Figura 9. Toma de parámetros biométricos de organismos de *P. pansa*. A) Largo; B) Ancho y C) Alto.

5.- Al finalizar la biometría se reunieron todos los organismos en una cubeta con agua de mar y se procedió a regresarlos a la zona intermareal, procurando esperar a que los organismos se adhirieran a la roca.

6.5.1. Relación Longitud-Peso

Se calculó la relación longitud - peso de 793 organismos de *P. pansa* colectados de los sitios Las labradas, Mármol y Cerro del vigía utilizando la ley del cubo mediante la ecuación (Cifuentes *et al*; 2012):

$$W = aL^b$$

Donde, W = Peso del gasterópodo (g), L = longitud total (mm), "a" es la intersección de regresión y "b" es la pendiente.

6.5.2. Factor de Condición

El factor de condición de Fulton (K) se calculó de acuerdo con la ecuación:

$$K = W \times 100 \frac{W \times 100}{L^3}$$

Donde, W = Peso del gasterópodo (g), L = longitud total (mm).

6.6. Histología de Imposex

Se realizó una caracterización histológica previa de gónadas hembras morfológicamente normales, hembras con imposex y machos obtenidos de las localidades evaluadas, basado en los trabajos de histología sobre *P. pansa* reportados por Torres-García *et al.* (2016) y Corona-Muñiz (2006), para obtener una histología general y posteriormente se comparó la histología de gónadas de hembras morfológicamente normales y hembras expuestas recuperadas del experimento de trasplante.

Las muestras de gónada colectadas se conservaron en solución Davidson durante 24 horas y posteriormente fueron transferidas a una solución de etanol al 70% hasta su procesamiento histológico. Se realizó una deshidratación seriada en alcoholes de 70, 80, 96 y 100% utilizando xilol como aclarante y embebió con parafina en un Histoembebedor Leica- Jung, USA en moldes tipo cassette (Tissue-Tek unicassette #4170-01). Se realizaron cortes de 5µm con un micrótopo rotatorio (Jung histocut #820) y se tiñeron los tejidos utilizando la técnica de hematoxilina-eosina, de acuerdo con lo establecido por (Bell & Lightner, 1988) y se montaron las láminas usando CYTOSEAL 60 y seco a temperatura ambiente Figura 10.

El trabajo de histología se realizó en el laboratorio de histología de CIAD Mazatlán.

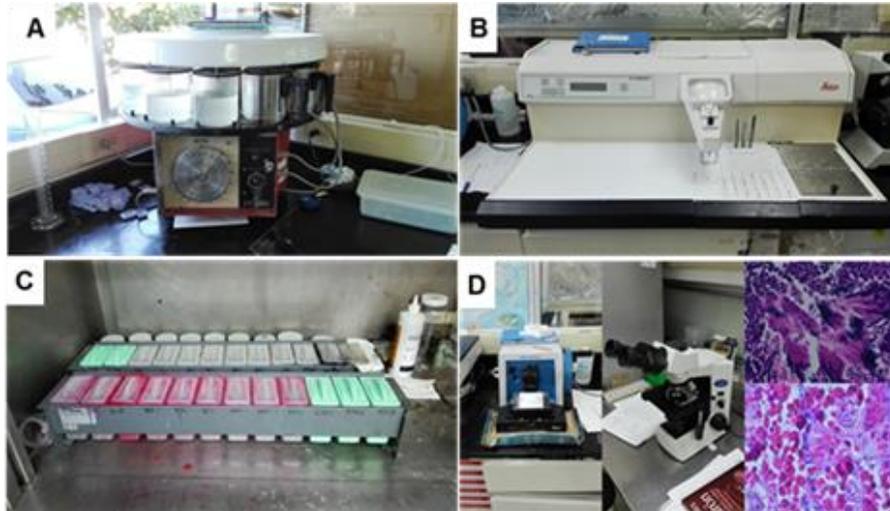


Figura 10. Procesamiento de muestras en el laboratorio de histología de CIAD Mazatlán. A) Histoquinnette; B) Embebedor de parafina; C) Equipo para tinción secuencial de Hematoxilina-Eosina-Floxina y D) Microtomo, microscopio óptico e imagen de muestras gonadales de *P. pansa*.

6.7. Expresión del Receptor X de Retinoides (RXR)

Las muestras para el análisis molecular se diseccionaron y fijaron *in situ* en tubos eppendorf de 1.5 ml con RNA later, se mantuvieron en condiciones de refrigeración hasta su procesamiento.

Para determinar la expresión del RXR en *P. pansa* se diseñaron primers degenerados a partir de secuencias conservadas de otras especies de gasterópodos disponibles en The National Center for Biotechnology Information (NCBI), utilizando secuencias reportadas del RXR en *Nucella lapillus* (**GenBank:** EU024473.1, EU024474.1), *Thais clavigera* (**GenBank:** AB594845.1, AB594846.1, AY704160.1), utilizando el software PRIMER3 (Rozen y Skaletsky, 2000).

El ARN total se obtuvo de tejido gonádico proveniente de tres organismos de *P. pansa*: macho, hembra y hembra con imposex, descritos en el apartado de análisis histológico y de hembras trasplantadas recuperadas de los tres sitios costeros evaluados.

La extracción se realizó con Trizol® (Invitrogen) según el protocolo establecido por el fabricante. Para eliminar contaminación por ADN genómico, las muestras se trataron con DNAsa I (Promega).

El RNA se mantuvo en condiciones de almacenamiento de -20°C para posteriormente ser utilizado en análisis de PCR. La síntesis de ADNc se llevó a cabo a 45°C con 5 µg de ARN total, transcriptasa reversa MMLV (Promega) y hexanucleótidos aleatorios (random primers).

Cuando la amplificación ha terminado el ADN es visualizado por electroforesis en gel de agarosa al 2 % en 30 ml buffer TAE (Tris-Acetato-EDTA) para visualizar los productos de PCR. Posteriormente se añadió 0.5 µl de red gel y se dejó gelificar. Los geles se corrieron en una cámara electroforética (Thermo EC Minicell EC320) a 90 V, 150 mA durante 30 minutos y se visualizó en un fotodocumentador Bio- Rad. El producto de PCR es de ~ 450 pares de bases.

6.8. Experimento de Trasplante

Procedimiento:

1. Se recolectaron 90 hembras morfológicamente normales de *Plicopurpura pansa* en las Labradas (N=90); (conforme a lo descrito anteriormente en apartado de caracterización morfológica y se realizaron biometrías in situ).
2. Se recolectaron 90 hembras sin imposex, con un tamaño mayor de 18 mm, considerados como organismos en edad reproductora (Naegel y Ludwig, 2004; Naegel y del Prado-Rosas, 2004).
3. Se marcaron individualmente los caracoles con pintura (barniz de uñas) en una parte visible de la concha (Ciocan et al., 2015; Wong *et al.*, 2013).
4. El manejo de organismos en experimentos realizados en campo se llevó a cabo en base a trabajos de trasplantes con gasterópodos similares reportados por Chapman, (1986); Rajasekharan y Crowe, (2007). Para descartar problemas de manejo se utilizó un control de manipulación (**Las labradas-Las labradas**). El tratamiento experimental consistió en trasplantar hembras morfológicamente normales de *Plicopurpura pansa* de las Labradas a los sitios Cerro del vigía y Mármol considerados zonas contaminadas. El diseño experimental se describe en la Fig. 11.
5. Los caracoles se monitorearon mensualmente durante tres meses para evaluar el posible desarrollo de imposex en los organismos trasplantados basado en estudios similares como los realizados por Bighiu *et al.* (2017); Ho y Leung, (2016).

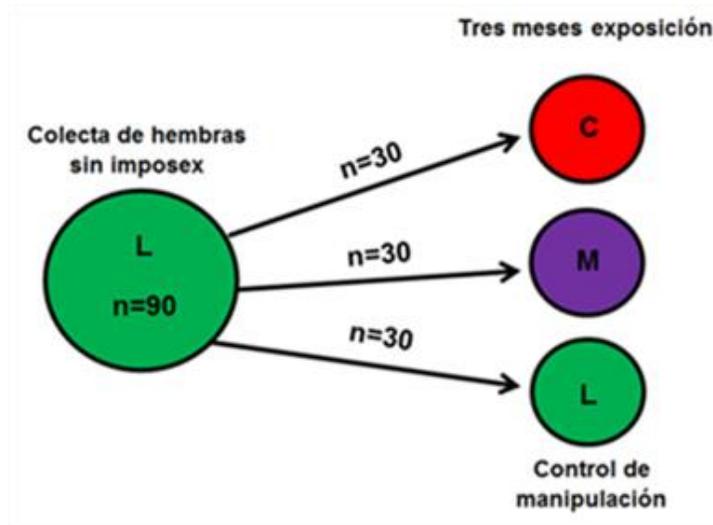


Figura 11. Diseño experimental utilizado en el trasplante de hembras morfológicamente normales de *P. pansa*. L= las Labradas, M= Mármol, C= Cerro del vigía, monitoreo mensual durante tres meses.

Objetivo particular 4. Reproducción: Determinar si hembras de *Plicopurpura pansa* presentan afectaciones en cópula cuando desarrollan imposex.

6.9. Experimento de Reproducción

Procedimiento:

1. Se recolectaron un total de 80 organismos de *P. pansa* procedentes de las localidades costeras evaluadas. En los sitios Cerro del Vigía y Mármol se colectaron 6 hembras morfológicamente normales, 6 hembras con imposex y 18 machos y en el sitio Las Labradas se colectaron 6 hembras morfológicamente normales, 2 hembras con imposex y 12 machos. Posteriormente se realizaron biometrías *in situ*.
2. Los organismos se transportaron vivos en un recipiente con agua de mar al laboratorio húmedo en CIAD Mazatlán.
3. En cada pecera se colocaron dos hembras y tres machos (Fig. 12) para mantener una proporción cercana a la observada en el campo (ver Cuadro 2).

4. Las condiciones experimentales para promover la actividad se fijaron a 28 °C y aireación constante basados en Naegel y Aguilar-Cruz (2006); Naegel y García-Domínguez (2006) y en observaciones personales realizadas previamente en laboratorio.
5. En un principio se intentó alimentar con trozos de calamar, pero *P. pansa* no consumió alimento por una semana, por lo que se ofreció alimento vivo (quitones y lapas) cada dos días y observando que prefiere el alimento vivo.
6. Se realizó recambio de agua de los acuarios cada tercer día, se utilizó agua salada durante el experimento.
7. Los caracoles se observaron durante tres meses para registrar si los individuos con imposex podían presentar copula bajo las condiciones de laboratorio: durante el día se tomaron datos observacionales diarios utilizando una bitácora, anotando se el número de cópulas observadas en cada pecera, así como datos de alimentación y comportamiento y por la noche se utilizó como herramienta de apoyo un DVR y cámaras de video para monitorear el comportamiento nocturno de *Plicopurpura pansa*.
8. Para corroborar lo observado en laboratorio se realizaron observaciones en campo de cópulas de *P. pansa* mensualmente.

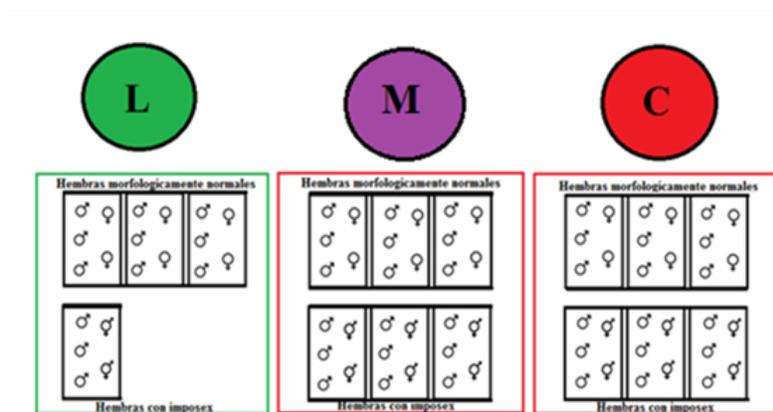


Figura 12. Diseño experimental para realizar el experimento de reproducción con hembras de *P. pansa* en condiciones de laboratorio.

♀ = Hembra., ♂ = Macho., ♀ = imposex. M= Mármol; C= Cerro del Vigía; L= Las Labradas; CT= control.

7. RESULTADOS

Los resultados se presentan por secciones de acuerdo con los objetivos.

7.1. Incidencia de Imposex en el Gasterópodo Marino *P. pansa* en Diferentes Localidades Costeras del Municipio de Mazatlán, Sinaloa.

En total se revisaron 793 caracoles, de los cuales 312 fueron hembras y sólo 35 presentaron imposex (Fig. 8A). Estas hembras masculinizadas se encontraron en las cuatro localidades evaluadas, la estación con la menor incidencia fue Las Labradas (3% de 89 hembras), mientras que en las demás estaciones la incidencia fue mayor al 10% (Fig. 13B), en Cerro del Vigía se revisaron 107 hembras, en Mármol 56 y en Escolleras 60.

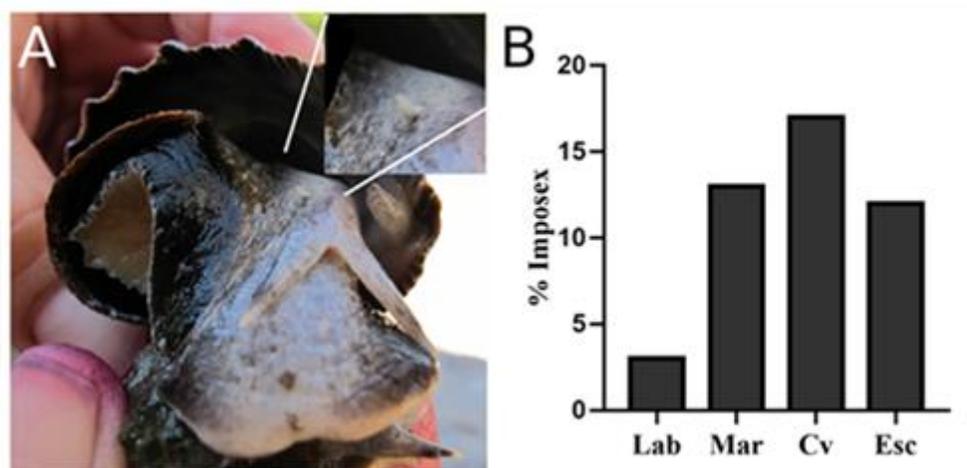


Figura 13. Hembra de *Plicopurpura pansa* con Imposex. A) Hembra con imposex, el pseudo pene se observa como una papila que sobresale justo detrás del tentáculo ocular derecho. B) Incidencia porcentual de imposex en cuatro localidades costeras de Mazatlán Sinaloa. Lab: Las Labradas, Mar: Mármol, Cv: Cerro del Vigía, Esc: Escolleras.

Las hembras con imposex colectadas de las cuatro localidades costeras, presentaban un pseudo pene de un tamaño < 1 mm de longitud, de apariencia similar a una pequeña papila, ubicada detrás del tentáculo ocular derecho (Fig. 9A). No se observó evidencia de la formación de un vaso deferente visible en ninguna de las hembras con imposex colectadas. De acuerdo con las clasificaciones vigentes de imposex utilizadas por OSPAR (2005) las características del imposex encontrado en *P. pansa* en las cuatro localidades costeras evaluadas estaría en categoría A, indicando que no representa un peligro para la especie y para la zona, en relación a la posible evidencia de TBT en las zonas y se encontraría clasificado en la etapa 1 de imposex (Evidencia de formación de un pene pequeño sin un conducto deferente, detrás del tentáculo ocular derecho) bajo la clasificación de HELCOM (2010), lo que indica baja contaminación de TBT en la zona o resistencia de la especie en comparación con otras que son más sensibles a este tipo de compuestos. Lo resultados sobre el diagnóstico de imposex en las localidades costeras evaluadas se presentan en la cuadro 4.

Cuadro 4. Clasificación ecológica del imposex encontrado en *Plicopurpura pansa* de acuerdo a los criterios de evaluación ecológica de OSPAR 2005 y HELCOM 2010. Índice de vaso deferente (VDSI); Índice de clasificación del pene (PCI).

Fecha	Sitio	VDSI (mm)	Pseudo pene (mm)	Clasificación OSPAR	Clasificación HELCOM (PCI)
Jun. 07	Labradas	0	< 1	A (Verde)	3.33
Jun. 07	Cerro del vigia	0	< 1	A (Verde)	16.82
Jun. 07	Escolleras	0	< 1	A (Verde)	11.67
Oct. 07	Mármol	0	< 1	A (Verde)	12.50

7.2. Caracterización Morfológica, Histológica y Molecular de Expresión de RXR de los Organismos de *P. pansa*

7.2.1 Caracterización Morfológica

La longitud promedio de los organismos fue de 28.42 ± 0.89 mm y la mayor variación de tamaño se observó en las hembras de Mármol (Fig. 14B). Se obtuvieron diferencias significativas entre hembras de Las Labradas en relación a los machos del mismo sitio y machos de mármol ($p < 0.001$). Las tallas observadas en las hembras de *P. pansa* presentaron promedios mayores en comparación con los machos en todos los sitios muestreados, siendo Mármol el sitio con la talla promedio mayor (32.44 ± 6.06 mm) y las tallas más pequeñas se encontraron en Las Labradas (29.38 ± 5.50 mm) y Escolleras (29.67 ± 6.23 mm). La hembra más pequeña se encontró en Las Labradas (13.32 mm) y la hembra más grande colectada se encontró en la estación de Cerro del Vigía con una talla de 74.63 mm. Respecto a las tallas observadas en los machos, el sitio Cerro del Vigía presentó los mayores promedios (28.43 ± 3.88 mm) y Mármol las tallas más pequeñas (23.72 ± 5.85 mm). El macho más pequeño se encontró en Mármol de 12 mm y el más grande fue colectado en Las Labradas de 55.71 mm. En los sitios Cerro del Vigía, Escolleras y Mármol se observó que las hembras con imposex presentaban tallas promedio mayores que las hembras morfológicamente normales, mientras que en Las Labradas las hembras con imposex presentaron tallas promedio menores que las hembras morfológicamente normales; sin embargo, al aplicar la prueba estadística de Wilcoxon entre las tallas promedio de hembras morfológicamente normales y hembras con imposex totales colectadas, no se encontraron diferencias significativas ($P < 0.001$). El imposex estuvo presente en hembras con tallas mínimas de entre 23.81 mm y 26.30 mm y tallas máximas de entre 30.95 y 47.39 mm. Los resultados totales sobre las estructuras de talla encontradas en los distintos sitios se presentan en la cuadro 5.

Cuadro 5. Tallas del caracol *Plicopurpura pansa* por fechas de recolección en diferentes localidades costeras de Mazatlán Sinaloa México.

SITIO	Fecha	Sexo	N	LONGITUD (MM)			
				Media	Mínimo	Máximo	CV (%)
LAS LABRADAS	Jun. 17	Macho	111	26.49±4.96	13.32	55.71	0.19
		Hembra	89	29.38±5.50	13.86	39.94	0.19
		Imposex	3	26.22±4.10	23.81	30.95	0.16
		Total	203	27.73±5.36	13.32	55.71	0.19
ESCOLLERAS	Jun. 17	Macho	94	26.91±3.90	14.53	36.65	14.94
		Hembra	60	29.67±6.23	20.64	54.13	21.00
		Imposex	7	31.65±5.20	24.10	38.88	16.43
		Total	161	28.14±5.14	14.53	54.13	18.00
CERRO DEL VIGÍA	Jun. 17	Macho	209	28.43±3.88	15.61	42.3	13.65
		Hembra	107	31.71±6.63	14.90	74.63	20.91
		Imposex	18	34.94±6.40	24.77	47.39	18.32
		Total	316	29.73±5.32	14.90	74.63	17.89
MÁRMOL	Oct. 17	Macho	57	23.72±5.85	12.00	36.00	24.66
		Hembra	56	32.44±6.06	21.00	50.00	18.68
		Imposex	7	33.15±5.73	26.30	43.1	17.29
		Total	113	28.09±7.37	12.00	50.00	26.24

n: número de organismos; CV: coeficiente de variación.

En general los organismos más pequeños se encontraron en las Labradas con un peso promedio de 4.49 ± 2.54 g y los más grandes en Mármol con un peso promedio de 9.49 ± 9.62 g (Kruskal-Wallis=55.15, $p < 0.001$), con diferencias significativas respecto a las hembras de la misma localidad y los organismos del Cerro del Vigía (Fig. 14A). Las hembras de *Plicopurpura pansa*

colectadas de Las Labradas, Escolleras y Cerro del Vigía fueron más pesadas que los machos, con un promedio de 5.23 ± 2.75 g en Las Labradas y 5.51 ± 3.42 g en Cerro del Vigía. Sin embargo, los machos y hembras colectados de Mármol representan a los organismos más pesados de todas en las estaciones muestreadas, siendo el peso promedio en hembras de 5.62 ± 3.90 g y en machos de 13.24 ± 11.95 g. Los machos menos pesados se encontraron en las Labradas y Escolleras con un peso de 1 g y el macho más pesado colectado se encontró en la estación de Mármol con un peso de 34 g. La hembra menos pesada se colectó de Cerro del Vigía con un peso de 0.50 g y la más pesada fue encontrada en Cerro del Vigía con un peso de 29 g.

Las hembras con imposex colectadas de Cerro del Vigía, Escolleras y Mármol presentaron pesos promedio mayores que las hembras morfológicamente normales, con excepción de las hembras con imposex de Las Labradas que presentaron menor peso que las hembras morfológicamente normales. El imposex estuvo presente en hembras con pesos mínimos de entre 2 y 3 g y pesos máximos de entre 9 y 18 g. Los resultados totales sobre las estructuras de pesos encontradas en los distintos sitios se presentan en el cuadro 6.

El ancho promedio fue de 10.28 a 50 mm donde las hembras y las hembras con imposex presentaron los valores más altos (Fig. 14C), las diferencias significativas ($KW=103.3$, $p<0.001$) se observaron entre hembras morfológicamente normales procedentes de Las Labradas en relación a hembras con imposex procedentes del mismo sitio ($p<0.001$), además de diferencias entre el ancho de hembras morfológicamente normales de Mármol, Cerro del Vigía y hembras con imposex del Cerro del Vigía ($p<0.001$).

Cuadro 6. Pesos del caracol *Plicopurpura pansa* por fechas de recolección en diferentes localidades costeras de Mazatlán Sinaloa México.

Sitio	Fecha	Sexo	n	Peso (g)			
				Media	Mínimo	Máximo	CV (%)
Las Labradas	Jun. 17	Macho	111	3.94±2.23	1.00	14.00	56.60
		Hembra	89	5.23±2.75	1.00	13.00	52.58
		Imposex	3	3.33±1.53	2.00	5.00	34.08
		Total	203	4.49±2.54	1.00	14.00	56.57
Escolleras	Jun. 17	Macho	94	4.27±1.85	1.00	11.50	43.63
		Hembra	60	5.25±3.45	1.28	23.20	65.71
		Imposex	7	5.37±2.23	2.80	9.30	41.53
		Total	161	4.68±2.61	1.00	23.20	55.77
Cerro del Vigía	Jun. 17	Macho	209	4.7±1.84	1.84	13.00	39.15
		Hembra	107	5.51±3.42	0.50	29.00	62.07
		Imposex	18	7.56±4.18	3.00	18.00	55.29
		Total	316	5.09±2.63	0.50	29.00	51.67
Mármol	Oct. 17	Macho	57	13.24±11.95	1.8	34	90.26
		Hembra	56	5.62±3.90	1.3	25	69.40
		Imposex	7	5.83±3.20	2.5	13	54.89
		Total	113	9.49±9.62	1.3	34	101.37

n: número de organismos; CV: coeficiente de variación.

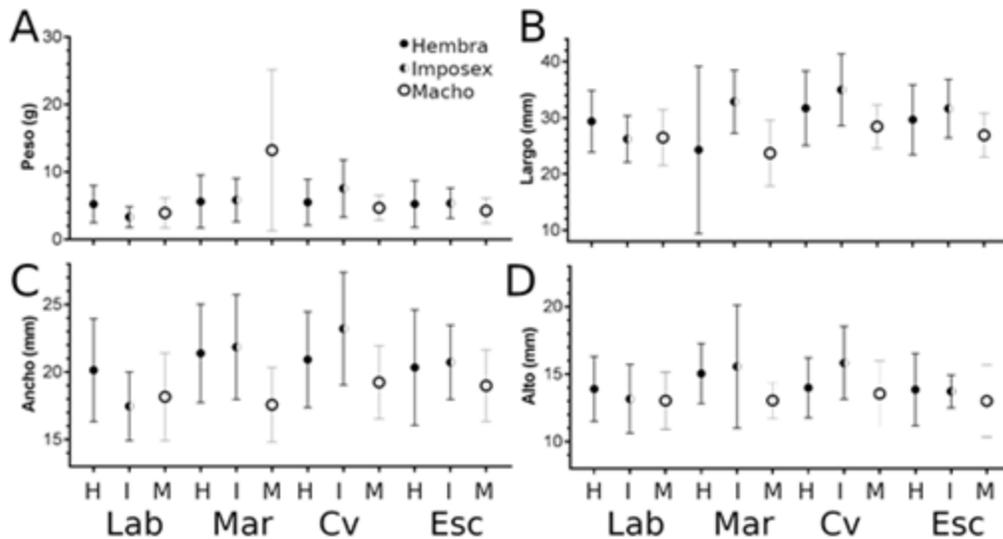


Figura 14. Análisis morfométrico de *Plicopurpura pansa*: A) Peso; B) Largo; C) Ancho; D) Alto. Lab: Las Labradas; Mar: Mármol; Cv: Cerro del Vigía; Esc: Escolleras; H: Hembra; I: Imposex; M: Macho.

La proporción sexual H: M en las cuatro localidades costeras evaluadas fue variable, en Las Labradas fue de 0.8:1, en Cerro del Vigía de 0.6:1, en Mármol de 1.1:1 y en Escolleras de 0.7:1. Se realizó un ANOVA de dos vías entre los sitios y la proporción sexual encontrada, no encontrándose diferencias significativas entre sitios. Los resultados se muestran en el cuadro 7 y figura 15.

Cuadro 7. Cuantificación de imposex en *Plicopurpura pansa* en los sitios de muestreo. Lab: Las Labradas; Cv: Cerro del Vigía; Mar: Mármol; T: total; M: Machos; HN: Hembras normales; HI: Hembras con imposex; HT: Hembras totales; P H: M: proporción sexual macho: hembra; %I: Porcentaje de imposex.

Fecha	Sitio	(T)	(M)	(HN)	(HI)	HT	P H:M	% I
Jun. 17	Lab	203	111	89	3	92	0.8:1	3.33
Jun. 17	Cv	316	209	107	18	125	0.6:1	16.82
Jun. 17	Esc	161	94	60	7	67	0.7:1	11.67
Oct. 17	Mar	113	57	56	7	63	1.1:1	12.50

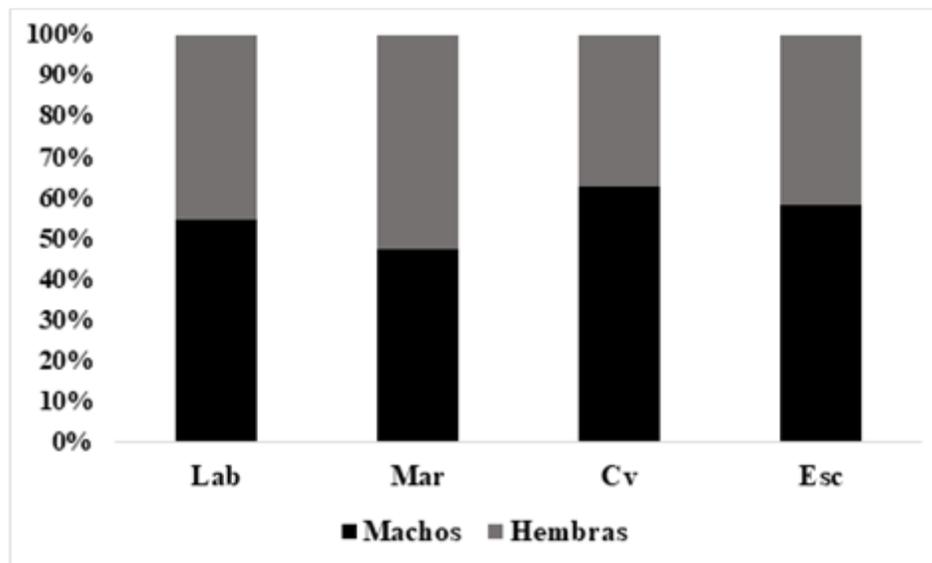


Figura 15. Proporción de sexos global (acumulado) en *Plicopurpura pansa* en cuatro localidades costeras de Mazatlán Sinaloa.

Lab: Las Labradas; Mar: Mármol; Cv: Cerro del Vigía; Esc: Escolleras.

El análisis morfométrico mediante componentes principales con la integración de las cuatro medidas evaluadas en todas las hembras, no indica que exista alguna diferencia entre las que presentan imposex y las que no (Fig. 16).

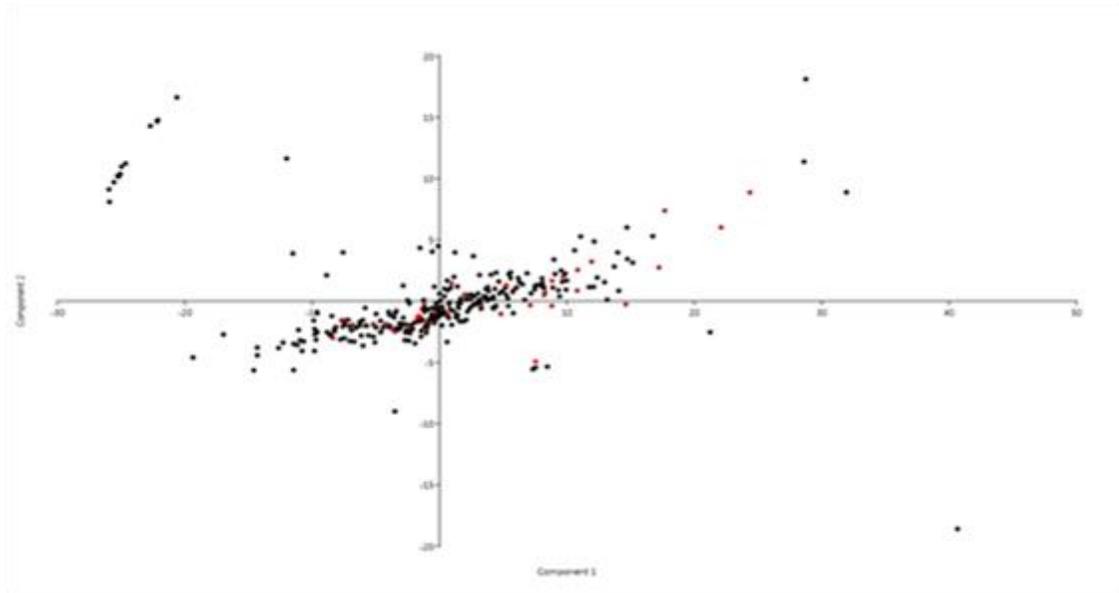


Figura 16. Análisis multivariado entre hembras con y sin imposex de los sitios Escolleras, Cerro del Vigía, mármol y Las Labradas, no se observaron diferencias entre parámetros morfométricos en las hembras muestreadas. En rojo hembras con imposex y en negro hembras morfológicamente normales.

7.2.2. Relación Longitud-Peso

La talla promedio de los organismos de *P. pansa* encontrada en las localidades costeras evaluadas fue de 12 a 74.63 mm. El tamaño promedio de las hembras con imposex osciló entre 23 y 43 mm de longitud, encontrándose los más pequeños en las Labradas y los más grandes en Mármol. Las hembras con imposex y hembras normales de Mármol y Cerro del vigía presentaron tallas mayores en relación a los machos de Las labradas, mármol y Cerro del vigía $p < 0.0001$. Los machos de Las labradas y Mármol fueron más grandes que los del cerro del vigía $p < 0.0001$ los resultados se muestran en la figura 17.

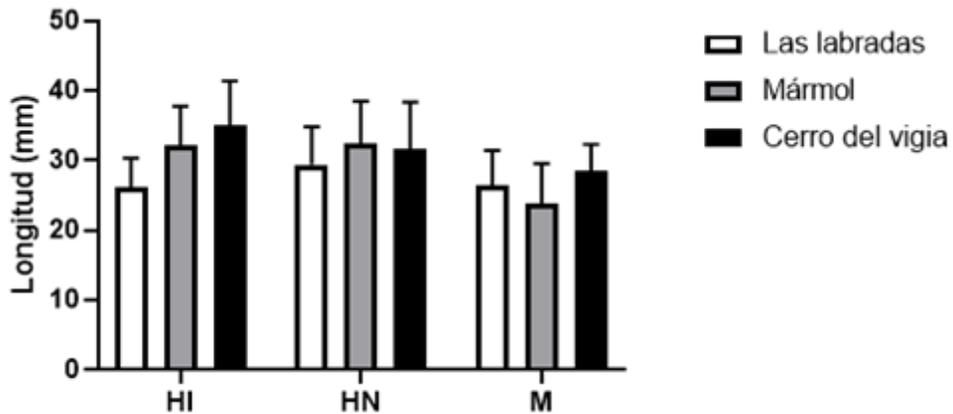


Figura 17. Longitud promedio de organismos de *P. pansa* colectados de diferentes localidades costeras de Mazatlán Sinaloa. HI: Hembras con imposex; HN: Hembras normales; M: Machos.

El peso de promedio total entre los organismos de *P. pansa* colectados en las cuatro localidades costeras evaluadas estuvo entre de 4.49 y 9.49 g.

El análisis estadístico no mostro diferencias significativas entre hembras con imposex y hembras sin imposex en relación al peso. Las hembras con imposex y las hembras normales de Cerro del vigía fueron más pesadas que los machos de Las labradas, Mármol y Cerro del vigía $p < 0.0001$. Los machos de Mármol fueron más pesados en relación con los machos de Cerro del vigía $p < 0.0001$, los resultados se observan en la figura 18.

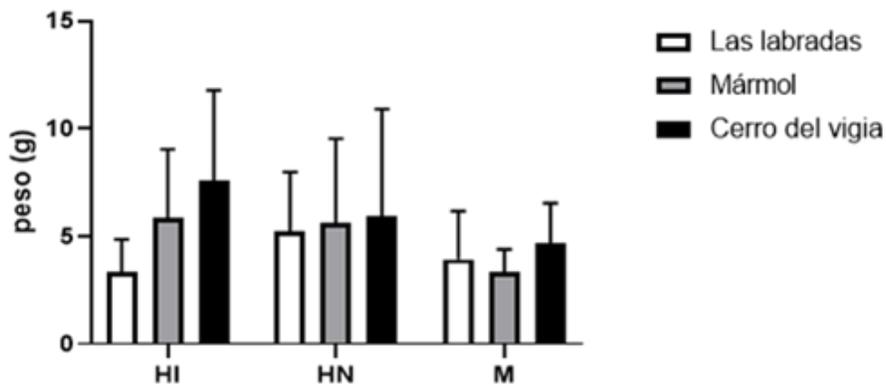


Figura 18. Peso promedio de organismos de *P. pansa* colectados de diferentes localidades costeras de Mazatlán Sinaloa. HI: Hembras con imposex; HN: Hembras normales; M: Machos.

Los organismos de *P. pansa* en las tres zonas costeras evaluadas, tienen un crecimiento de tipo alométrico negativo $b < 3$, indicando que tienden a aumentar en peso, pero no así en longitud, en determinado momento. Las Labradas obtuvo una $b = 2.33$, Mármol $b = 1.15$ y Cerro del Vigía 2.42 . Se observa que el valor más cercano a $b = 3$ es el sitio Cerro del Vigía y el valor más bajo de “ b ” es Mármol lo que implicaría que los organismos tienden a ser más grandes en longitud, pero menos pesados en comparación con los demás sitios. Los resultados se observan en la grafica19.

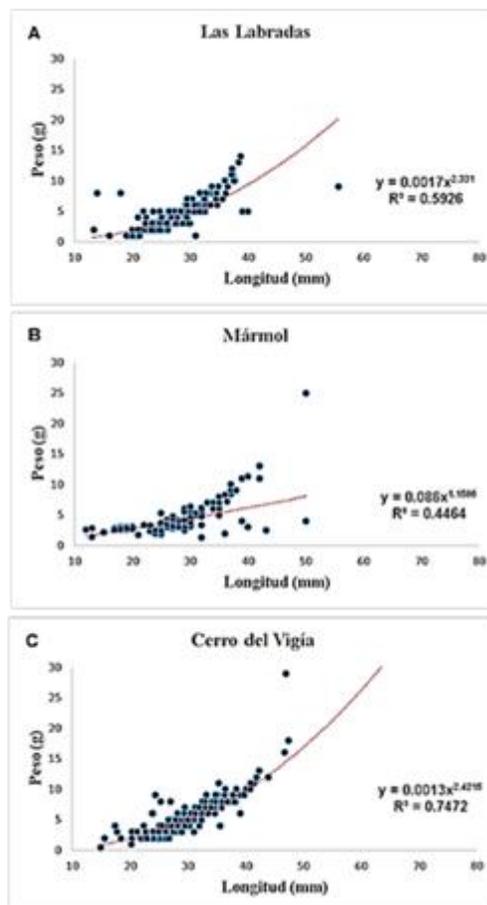


Figura 19. A) Relación Longitud-peso en organismos colectados de *P. pansa* en Las Labradas. B) Relación Longitud-peso en organismos colectados de *P. pansa* en Mármol y C) Relación Longitud-peso en organismos colectados de *P. pansa* en Cerro del Vigía.

La relación existente entre la longitud y el peso de los organismos se muestra en la figura 20. Se observa que la curva que mejor se ajusta es de tipo potencial, con un valor de $R^2 = 0.5951$. El valor de la pendiente de la relación potencial es de $b = 1.9697$. El tipo de crecimiento que presenta la

especie es del tipo alométrico negativo, lo que indica que los organismos incrementan su longitud más que su peso.

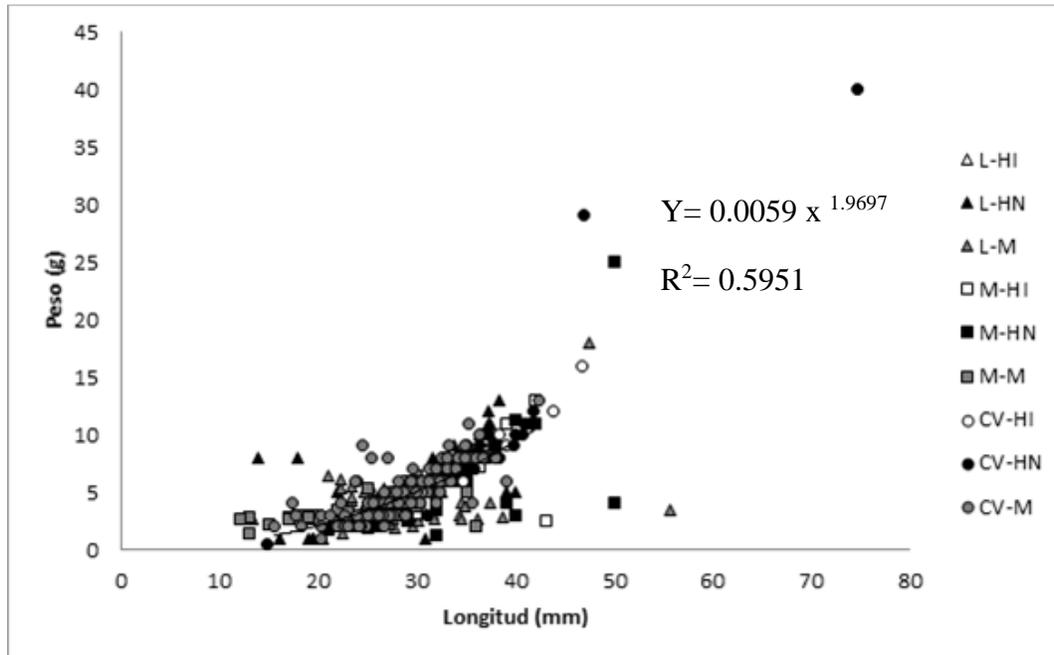


Figura 20. Relación longitud-peso de *P. pansa*. L- HI: Las labradas- Hembra con imposex; L-HN: Las labradas- Hembras normales; L-M: Las labradas- Machos; M-HI: Mármol-Hembras con imposex; M-HN: Mármol- Hembras normales; M-M: Mármol- Machos; CV-HI: Cerro del vigía- Hembras con imposex; CV-HN: Cerro del vigía- hembras normales; CV-M: Cerro del vigía- Machos.

7.2.3. Factor de Condición

Se calculó el factor de condición de 793 organismos de *P. pansa* en tres localidades costeras durante los muestreos realizados en octubre y noviembre de 2017, los resultados presentan solo un acercamiento al estado de salud de los organismos, dado que no se tiene datos de un ciclo anual cuadro 8.

Cuadro 8. Factor de condición (K) calculado y $K=3$, de los sitios costeros evaluados. CV-HI: Cerro del Vigía- Hembra con imposex; CV-HN: Cerro del Vigía- Hembra Morfológicamente normal; CV-M: Cerro del Vigía Mármol; L-HI: Las Labradas-Hembra con imposex; L-HN: Las Labradas-Hembra Morfológicamente normal; L-M: Las Labradas-Macho; M-HI: Mármol- Hembra con imposex; M-HN: Mármol-Hembra Morfológicamente normal y M-M: Mármol- Macho.

	Prom kcalc	Desv kcalc		Prom k=3	Desv k=3
CV-HI	0.63164094	0.11772284	CV-HI	0.01628755	0.00167653
CV-HN	0.58379182	0.15255215	CV-HN	0.0166041	0.00284728
CV-M	0.62835309	0.17479599	CV-M	0.0204132	0.0076926
L-HI	0.51525109	0.10989776	L-HI	0.01788557	0.00368661
L-HN	0.66973436	0.51059809	L-HN	0.02292827	0.03332543
L-M	0.5832713	0.1846779	L-M	0.02035363	0.00827841
M-HI	0.58001316	0.18317795	M-HI	0.01619763	0.00484726
M-HN	0.56218917	0.1859809	M-HN	0.01593161	0.00484623
M-M	0.71674985	0.31050309	M-M	0.03256465	0.02580272

El factor de condición calculado no mostro diferencias significativas entre los sitios evaluados, salvo en los machos de Las Labradas y los Machos de Mármol ($p > 0.0001$). Observando que los machos de Mármol son más pesados y grandes en comparación con los machos de Las labradas. La grafica del Índice de condición calculado se observa en la figura 21.

K calculada

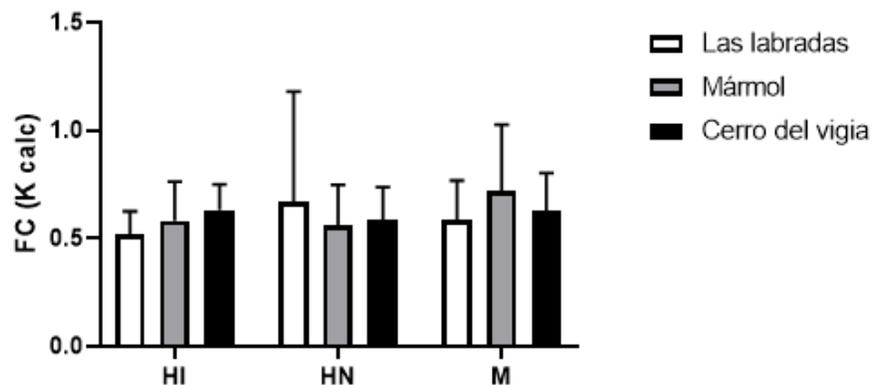


Figura 21. Índice de condición calculado en organismos de *P. pansa* durante 2017 en tres localidades costeras de Sinaloa.

7.3. Caracterización Histológica

Se analizaron un total de 52 gónadas de *Plicopurpura pansa*, cuyos intervalos de longitud estuvieron entre 18.53 y 44.05 mm y un peso entre 2.15 y 15.14 g, de los cuales 10 corresponden a machos y 42 hembras. Dentro de las hembras sólo 10 corresponden a hembras con imposex y 10 hembras morfológicamente normales. Se determinó el estadio gonádico mediante estudios histológicos reportados por Quiroz-Rocha (1992), González-Flores (1997), Muñoz-Mancilla (2003) y Corona-Muñiz (2006).

Descripción de la gónada de *P. pansa*

La gónada de *P. pansa* se puede observar a simple vista en la disección, se encuentra en forma de espiral junto con el hepatopáncreas cubierto por el caparazón y presenta una coloración amarillenta en hembras y naranja en los machos.

Se realizaron cortes transversales de tejido gonadal, en los cortes histológicos se distingue un epitelio cúbico simple y tejido conjuntivo fibroso.

Ciclo gonadal de machos de *P. pansa*

Se procesaron 10 muestras de tejido gonadal de machos de *P. pansa* y se identificaron 3 etapas gonadales que fueron: Etapa temprana, etapa de proliferación y etapa de maduración.

La gónada de los machos colinda con el hepatopáncreas, está delimitada por trabéculas de tejido conjuntivo laxo, formando túbulos seminíferos, alrededor de los cuales se observa tejido gonadal en donde se desarrollarán las diferentes células sexuales como espermatogonias, espermatoцитos primarios, espermatoцитos secundarios y espermatozoides maduros (Fig. 22).

Etapa temprana

Los folículos están delimitados por tejido conjuntivo laxo en forma de trabéculas, se observa la formación de cordones seminíferos y carecen de lumen. Las células germinales que predominan son espermatogonias y espermatoцитos (Fig. 22A y 22B).

Etapa de proliferación

En esta etapa se observa la predominancia de folículos con lumen definido y la formación de cordones seminíferos, dentro de los túbulos seminíferos las células germinales empiezan a madurar observándose la formación de espermatoцитos primarios y secundarios (Fig. 22C y 22D).

Etapa de maduración

Se observan espermatozoides maduros con flagelos bien desarrollados que cubren la totalidad del folículo y están orientados hacia el lumen como indicativo típico de su próxima expulsión (Fig. 23).

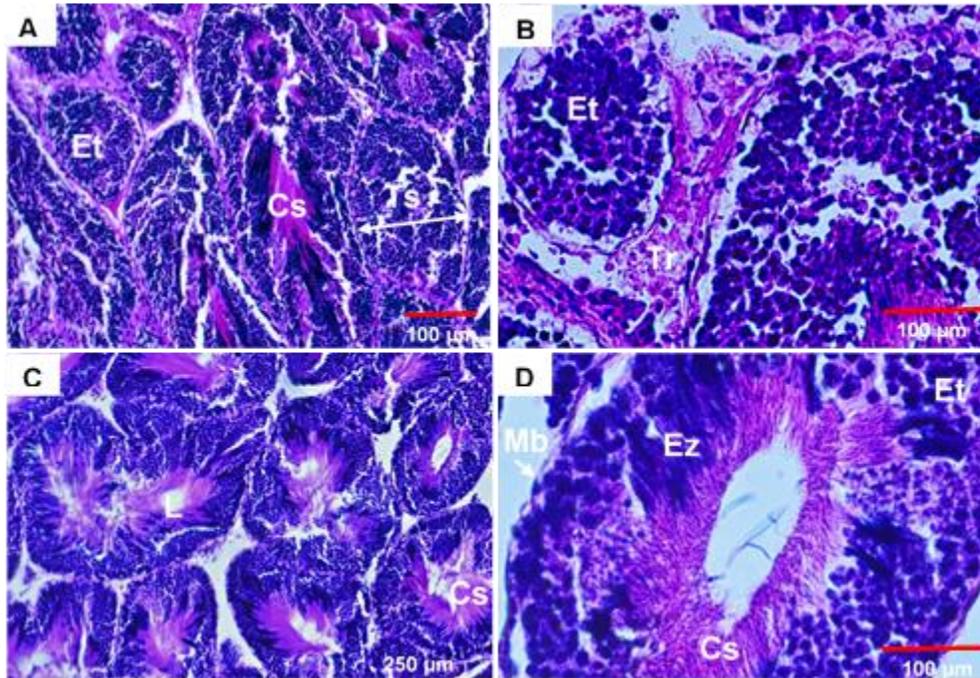


Figura 22. Gónada masculina de *P. pansa*. A) Etapa temprana. B) Acercamiento al folículo masculino, ausencia de lumen y predominan espermatogonias. C) Etapa de proliferación. D) Acercamiento al folículo masculino, se observa con detalle el lumen y cordones seminíferos, algunos espermatozoides maduros y células germinales inmaduras. Tr: Trabéculas; Ts: Túbulo seminífero; Et: Espermatogonias; Mb: Membrana basal; Cs: Cordones seminíferos; Ez: Espermatozoides; Ec: Espermatocitos.

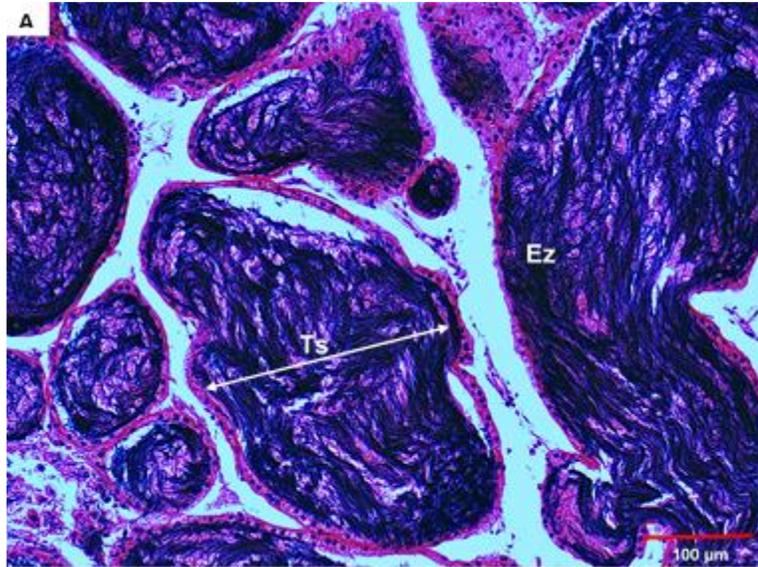


Figura 23. Gónada masculina en etapa de maduración. Ts: Túbulo seminífero; Ez: Espermatozoides.

Ciclo gonadal de hembras de *P. pansa*

En las 42 muestras de tejido gonadal de hembras de *P. pansa*, se identificaron 2 etapas gonadales que fueron: Etapa de proliferación y etapa de desove.

Etapa de proliferación

Se observan folículos bien delimitados por tejido conjuntivo laxo. Dado que *P. pansa* es un organismo de desarrollo asincrónico, se logró observar diferentes tipos de células germinales en un mismo corte; sin embargo, se puede diferenciar claramente el estadio debido a la cantidad de células germinales predominantes en el corte histológico (Fig. 24A).

En esta etapa la cantidad de folículos aumenta, los ovocitos se encuentran en proceso de diferenciación, se observa la formación de pequeñas vesículas de micro vitelo y citoplasma. Al final de esta etapa se observan vesículas de mayor tamaño que forman el macro vitelo como señal del inicio de la fase de maduración (Fig. 24B).

Etapa de desove

En esta etapa se observa predominancia de ovocitos maduros, la hembra al desovar deja espacios vacíos dentro de los folículos y como resultado el tejido conjuntivo se pliega. Debido a que *P. pansa* se reproduce todo el año, se pueden observar células germinales inmaduras como ovogonias, los macrófagos se alimentan de los residuos dentro de los folículos hasta dejar un espacio vacío (Fig. 24C).

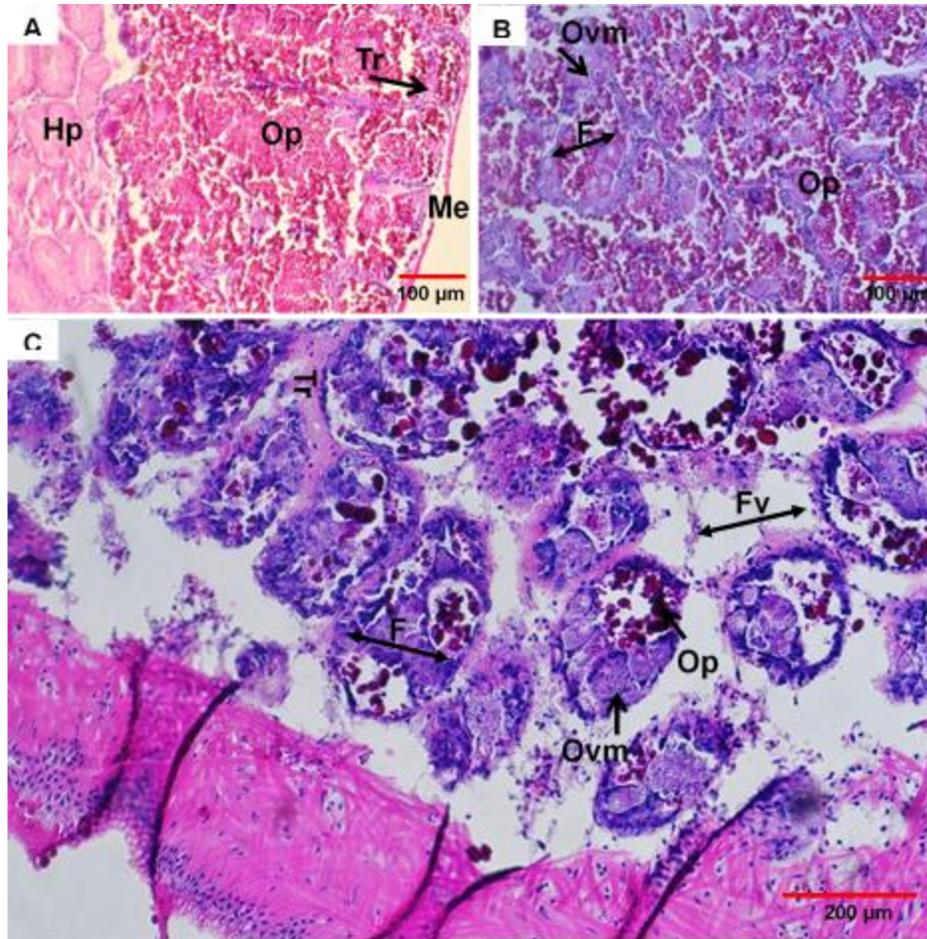


Figura 24. Gónada femenina de *Plicopurpura pansa*. A) Etapa de proliferación predominan ovocitos inmaduros, los folículos están delimitados por una capa muy fina de tejido conjuntivo que separa la gónada del hepatopáncreas. B) Etapa de proliferación presenta asincronía celular, se observan distintas células germinales, predominando ovocitos con macro y micro vitelo inmaduros C) Etapa de desove, presenta folículos y algunos con ovocitos maduros vacíos y ovocitos previtelogenicos. Op: Ovocitos previtelogenicos; Ovm: Ovocitos maduros; Me: Membrana externa; F: Folículos; Fv: Folículos vacíos; Tr: Trabéculas de tejido conectivo.

Ciclo gonadal de hembras con imposex de *P. pansa*

Se analizaron 13 muestras de tejido gonadal de hembras de *P. pansa* con imposex, todas las hembras con imposex se encontraban en etapa de proliferación.

En tejido gonadal de hembras con imposex colectadas de los sitios Las Labradas, Mármol y Cerro del Vigía se puede observar un patrón similar en todas las muestras, los folículos no están delimitados claramente, en algunos casos se encuentra fracturado y presenta infiltración celular, se observa una menor cantidad de ovocitos en vitelogénesis, en algunas muestras se observan

ausencia células germinativas en el epitelio germinativo y predomina un tejido conectivo desordenado. No se encontró evidencia de desarrollo de células germinales masculinas en ninguna muestra de hembras con imposex (Fig. 25 B y C). Sin embargo, en comparación con el tejido gonadal de hembras colectadas en Las Labradas sin imposex, hay diferencias porque éstas tienen los folículos bien delimitados por tejido conjuntivo laxo en forma de trabéculas, los ovocitos en vitelogénesis cubren en su totalidad el folículo, se observa tejido germinativo bien delimitado, ovogonias y ovocitos primarios (Fig. 25A).

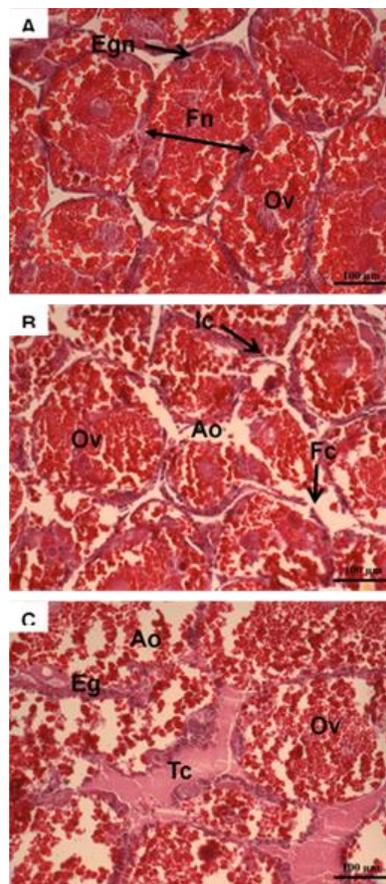


Figura 25. Comparación de gónadas femeninas de *Plicopurpura pansa*. A) **Hembra morfológicamente normal en etapa de proliferación colectada de las labradas**, se observan folículos bien delimitados por el tejido germinativo, ovocitos en vitelogénesis homogénea. B) **Hembra con imposex en etapa de proliferación colectada de Mármol**, se observan folículos, infiltración celular hacia ambos lados del límite entre el tejido germinativo y el espacio folicular, mayor ausencia de ovocitos dentro de los folículos y menor homogeneidad. C) **Hembra con imposex en etapa de proliferación colectada del Cerro del Vigía**, se aprecian alteraciones en la forma y consistencia en las trabéculas de tejido conectivo, los folículos parecen carecer tejido germinativo, se observa heterogeneidad y menor densidad entre los ovocitos. Egn: Epitelio

germinativo normal; Fn: Folículo normal; Ovi: Ovocitos inmaduros; Ic: infiltración celular; Ao: Ausencia de ovocitos.

7.4. Expresión del Receptor X de Retinoides

En la base de datos del National Center for Biotechnology Information (**NCBI**) se han reportado dos isoformas de RXR en gasterópodos muricidos marinos correspondientes a *Reishia clavigera* (AB 594845.1, isoforma 1) y (AB 594846.1, isoforma 2), *Nucella lapillus* (EU 024473.1, isoforma a) y (EU 024474.1, isoforma b). La secuencia de RXR en *Plicopurpura pansa* se obtuvo diseñando primers degenerados a partir de las secuencias de RXR en *T. clavigera* y *N. lapillus* reportadas en NCBI y se lograron obtener dos isoformas (isoforma 1 de 900 pb e isoforma 2 de 915 pb). En el cuadro 9 se presentan las secuencias de RXR reportadas en NCBI y las encontradas en *Plicopurpura pansa* en este trabajo. (CIAD: Centro de Investigación y Desarrollo A.C; NP: no publicado).

Cuadro 9. Secuencias del receptor de retinoides X (RXR) reportadas en Gamber en especies de gasterópodos muricidos marinos.

Genbank	Especie	Isoforma	# de aminoácidos	Pares de base
CIAD NP	<i>Plicopurpura pansa</i>	Pp_RXR1	299	900
CIAD NP		Pp_RXR2	304	915
EU24473.1	<i>Nucella lapillus</i>	NI_RXRa	441	1934
EU024474.1		NI_RXRb	446	1949
AB594845.1	<i>Thais clavigera</i>	Tc_RXR1	442	1412
AB594846.1		Tc_RXR2	447	1427

Los resultados de la expresión de RXR en gónada de *Plicopurpura pansa* muestra una predominancia de la isoforma 1 en el 100% de las hembras muestreadas: Hembras morfológicamente normales, hembras con imposex, hembras trasplantadas y machos, en comparación a la isoforma 2 que solo fue expresada en una hembra morfológicamente normal proveniente de Cerro del Vigía y una hembra trasplantada de Mármol.

La isoforma 1 contiene seis polimorfismos en los nucleótidos 181, 202, 364, 757, 769 y 877 y una secuencia de 299 aminoácidos. La isoforma 2 contiene un polimorfismo en el nucleótido 54, con una inserción de 15 pb en el nucleótido 460, y una secuencia de 304 aminoácidos.

En la figura 26 se presenta el alineamiento de nucleótidos realizado a las dos isoformas de *Plicopurpura pansa* encontradas en este trabajo y se enmarca con rojo el área en donde se encuentra la inserción/delección de 15 pares de bases en ambas isoformas.

PpRXR-1	GATTGACATCAAGCCCGACATTTCCACCCTCAATCCCCCTTCTCCACACATCCAGGGTT	60
PpRXR-2	GATTGACATCAAGCCCGACATTTCCACCCTCAATCCCCCTTCTCCACACATCTAGGGTT *****	60
PpRXR-1	CTCTACCCAGGCTATGGAGGCATGCCAGGCATGCCAGTTCTACACAGGCCTCCCCAGG	120
PpRXR-2	CTCTACCCAGGCTATGGAGGCATGCCAGGCATGCCAGTTCTACACAGGCCTCCCCAGG *****	120
PpRXR-1	TGGGCCAACATGACCTCACCCAGATGCACTCACCCACGTCCTCACTTGGCTCCCCAAC	180
PpRXR-2	TGGGCCAACATGACCTCACCCAGATGCACTCACCCACGTCCTCACTTGGCTCCCCAAC *****	180
PpRXR-1	TATGATGTGTCTCAGCCCCACGGGACCTCATCCCCAGGCATGCCTCATTCTGGACTTAG	240
PpRXR-2	TATGATGTGTCTCAGCCCCACGGGACCTCATCCCCAGGCATGCCTCATTCTGGACTTAG *****	240
PpRXR-1	CAAGCACATCTGCGCCATCTGCGGGGACCGAGCATCTGGAAAACATTATGGCGTTTACAG	300
PpRXR-2	CAAGCACATCTGCGCCATCTGCGGGGACCGAGCATCTGGAAAACATTATGGCGTTTACAG *****	300
PpRXR-1	TTGTGAAGGCTGCAAAAGGGTTTTTCAAAGAACAGTTCGCAAGGACCTGACATACGCCTG	360
PpRXR-2	TTGTGAAGGCTGCAAAAGGGTTTTTCAAAGAACAGTTCGCAAGGACCTGACATACGCCTG *****	360
PpRXR-1	CCGTGATGACAAGAAGTGCATGATTGACAAGCGCCAGCGCAATAGATGTCAGTACTGCCG	420
PpRXR-2	CCGTGATGACAAGAAGTGCATGATTGACAAGCGCCAGCGCAATAGATGTCAGTACTGCCG *****	420
PpRXR-1	CTACATGAAATGTCTTGCCAGGGCATGAAAAGGGAAGCTGT-----ACA	465
PpRXR-2	CTACATGAAATGTCTTGCCAGGGCATGAAAAGGGAAGCATGCTGTCTTCAGCTGTACA *****	480
PpRXR-1	GGAGGAGAGGCAGCGGGTAAAGGAGAAGGGGGA--TGGGGAAGTGSAGAGCACCTCGGGC	523
PpRXR-2	GGAGGAGAGGCAGCGGGTAAAGGAGAAGGGGATGGGG--AAGTGGAGAGCACCTCGGGC *****	538
PpRXR-1	GCCAACAGTGACATGCCTGTGGAGCAGATACTGGATGCCGAGATTGCTGTGGAACCCAAG	583
PpRXR-2	GCCAACAGTGACATGCCTGTGGAGCAGATACTGGATGCCGAGATTGCTGTGGAACCCAAG *****	598
PpRXR-1	ATCGACACCTATATTGATGCGCAGAAAGAGCCAGTGACCAACATTTGCCAGGCAGCAGAC	643
PpRXR-2	ATCGACACCTATATTGATGCGCAGAAAGAGCCAGTGACCAACATTTGCCAGGCAGCAGAC *****	658
PpRXR-1	AAACAGCTGTTCACTCTGGTGGACTGGGCCAAGCGGATCCCTCACTTCGTTGAACTGCCG	703
PpRXR-2	AAACAGCTGTTCACTCTGGTGGACTGGGCCAAGCGGATCCCTCACTTCGTTGAACTGCCG *****	718
PpRXR-1	CTGGAGGATCAGGTATTCTCCTGCGAGCAGGTTGGAATGAACTTCTGATTGGAGGCTTC	763
PpRXR-2	CTGGAGGATCAGGTATTCTCCTGCGAGCAGGTTGGAATGAACTTCTGATTGGAGGCTTC *****	778
PpRXR-1	TCACACCGCTCCACGCAAGTGACAGACGGCATCCTGCTGGCCACGGGACTGCACGTGCAC	823
PpRXR-2	TCACACCGCTCCACGCAAGTGACAGACGGCATCCTGCTGGCCACGGGACTGCACGTGCAC *****	838
PpRXR-1	CGCAGTTCAGCCCACAGGCAGGCGTCGGCACCATCTTCGACCGCGTCTGACAGAGCTG	883
PpRXR-2	CGCAGTTCAGCCCACAGGCAGGCGTCGGCACCATCTTCGACCGCGTCTGACAGAGCTG *****	898
PpRXR-1	GTGGCCAAGATGAAATC 900	
PpRXR-2	GTGGCCAAGATGAAATC 915 *****	

Figura 26. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las dos isoformas de *Plicopurpura pansa* encontradas. Se remarca en rojo una inserción de 15 pares de bases en la isoforma 2.

En la figura 27 se presenta la alineación de las secuencias de aminoácidos de las dos isoformas de RXR en *Plicopurpura pansa* encontradas y se enmarca en rojo el sitio en donde se observa la inserción/delección de 5 aminoácidos en ambas isoformas.

Pp-RXR1	IDIKPDISTLNPPSSTHPGFSYPGYGGMPGMPSSSTQASPGGPNMTSPQMHSPTSSLGSPT	60
Pp-RXR2	IDIKPDISTLNPPSSTHLGFSYPGYGGMPGMPSSSTQASPGGPNMTSPQMHSPTSSLGSPT	60

Pp-RXR1	MMCLSPGTSSPGMPHSGLSKHICAICGDRASGKHVGVYSCGCKGFFKRTVRKDLTYAC	120
Pp-RXR2	MMCLSPGTSSPGMPHSGLSKHICAICGDRASGKHVGVYSCGCKGFFKRTVRKDLTYAC	120

Pp-RXR1	RDDKNCMIDKRQRNRCQYCRYMKCLAQGMKREA-----VQEEQRVKEKGDGEVESTSGA	175
Pp-RXR2	RDDKNCMIDKRQRNRCQYCRYMKCLAQGMKREACLSSAVQEEQRVKEKGDGEVESTSGA	180

Pp-RXR1	NSDMPVEQILDAEIAVEPKIDTYIDAQKEPVTNICQAADKQLFTLVDNAKRIPHFVELPL	235
Pp-RXR2	NSDMPVEQILDAEIAVEPKIDTYIDAQKEPVTNICQAADKQLFTLVDNAKRIPHFVELPL	240

Pp-RXR1	EDQVILLRAGWNEILLGGFSHRSTQVTDGILLATGLHVHRSSAHQAGVGTIFDRVLTSLV	295
Pp-RXR2	EDQVILLRAGWNEILLGGFSHRSTQVTDGILLATGLHVHRSSAHQAGVGTIFDRVLTSLV	300

Pp-RXR1	AKMK	299
Pp-RXR2	AKMK	304

Figura 27. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de RXR obtenidas de la expresión de clonas *Plicopurpura pansa*. Se remarca en rojo la inserción de 5 aminoácidos en la isoforma 2.

Al realizar el alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos entre las isoformas reportadas en gasterópodos marinos en NCBI y las encontradas en *Plicopurpura pansa* en este trabajo, se observó que ambas isoformas son expresadas en gasterópodos marinos.

En la figura 28 se presentan los resultados del alineamiento múltiple de las isoformas reportadas en gasterópodos marinos.

```

[PpRXR-1 -----DIKPDISTLNPPSSTRHGPFYFGYGGMPMPSSSTOASPGGF 42
[NlRXR-a MDRSDMDTLENNGPPGG-MFGGMHMGVFMGGMGGGPQQDIKPDISTLNPPSSTRHGPFYFGYGGMPMPSSSTOASPGGF 78
[TcRXR-1 MDRSDMDTLENNGPPGGMFGGMHMGVFMGGMGGGPQQDIKPDISTLNPPSSTRHGPFYFGYGGMPMPSSSTOASPGGF 80
[PpRXR-2 -----DIKPDISTLNPPSSTRHGPFYFGYGGMPMPSSSTOASPGGF 42
[NlRXR-b MDRSDMDTLENNGPPGG-MFGGMHMGVFMGGMGGGPQQDIKPDISTLNPPSSTRHGPFYFGYGGMPMPSSSTOASPGGF 78
[TcRXR-2 MDRSDMDTLENNGPPGGMFGGMHMGVFMGGMGGGPQQDIKPDISTLNPPSSTRHGPFYFGYGGMPMPSSSTOASPGGF 80

[PpRXR-1 NMTSPQHSPPSSLSPTDMCLSPGMPHSGLSKHICAICGDRASGKHYPVYSCGCKGFFKRTVRKIDTYACRD 122
[NlRXR-a NMTSPQHSPPSSLSPTDMCLSPGMPHSGLSKHICAICGDRASGKHYPVYSCGCKGFFKRTVRKIDTYACRD 158
[TcRXR-1 NMTSPQHSPPSSLSPTDMCLSPGMPHSGLSKHICAICGDRASGKHYPVYSCGCKGFFKRTVRKIDTYACRD 160
[PpRXR-2 NMTSPQHSPPSSLSPTDMCLSPGMPHSGLSKHICAICGDRASGKHYPVYSCGCKGFFKRTVRKIDTYACRD 122
[NlRXR-b NMTSPQHSPPSSLSPTDMCLSPGMPHSGLSKHICAICGDRASGKHYPVYSCGCKGFFKRTVRKIDTYACRD 158
[TcRXR-2 NMTSPQHSPPSSLSPTDMCLSPGMPHSGLSKHICAICGDRASGKHYPVYSCGCKGFFKRTVRKIDTYACRD 160

[PpRXR-1 DKNCMIDKQRNRCCRYMECLAQGMKREA-----FQEEQRVKEKGDGEVESTSGANSDMPVEIILDAEVAVVKPIDT 197
[NlRXR-a DKNCMIDKQRNRCCRYMECLAQGMKREA-----FQEEQRVKEKGDGEVESTSGANSDMPVEIILDAEVAVVKPIDT 233
[TcRXR-1 DKNCMIDKQRNRCCRYMECLAQGMKREA-----FQEEQRVKEKGDGEVESTSGANSDMPVEIILDAEVAVVKPIDT 235
[PpRXR-2 DKNCMIDKQRNRCCRYMECLAQGMKREALSSAFQEEQRVKEKGDGEVESTSGANSDMPVEIILDAEVAVVKPIDT 202
[NlRXR-b DKNCMIDKQRNRCCRYMECLAQGMKREALSSAFQEEQRVKEKGDGEVESTSGANSDMPVEIILDAEVAVVKPIDT 238
[TcRXR-2 DKNCMIDKQRNRCCRYMECLAQGMKREALSSAFQEEQRVKEKGDGEVESTSGANSDMPVEIILDAEVAVVKPIDT 240

[PpRXR-1 YIDAQKFPVTNICQAADKQLFTLVWAKRIPIHFVLEPLEDOVILLRAGWNELLIGGFSHRSTQVTDGILLATGLMHVHRSS 277
[NlRXR-a YVDWQKFPVTNICQAADKQLFTLVWAKRIPIHFVLEPLEDOVILLRAGWNELLIGGFSHRSTQVTDGILLATGLMHVHRSS 313
[TcRXR-1 YIDAQKFPVTNICQAADKQLFTLVWAKRIPIHFVLEPLEDOVILLRAGWNELLIGGFSHRSTQVTDGILLATGLMHVHRSS 315
[PpRXR-2 YIDAQKFPVTNICQAADKQLFTLVWAKRIPIHFVLEPLEDOVILLRAGWNELLIGGFSHRSTQVTDGILLATGLMHVHRSS 282
[NlRXR-b YVDWQKFPVTNICQAADKQLFTLVWAKRIPIHFVLEPLEDOVILLRAGWNELLIGGFSHRSTQVTDGILLATGLMHVHRSS 318
[TcRXR-2 YIDAQKFPVTNICQAADKQLFTLVWAKRIPIHFVLEPLEDOVILLRAGWNELLIGGFSHRSTQVTDGILLATGLMHVHRSS 320

[PpRXR-1 AHQAGVGTIFDRVLTELVAKME----- 299
[NlRXR-a AHQAGVGTIFDRVLTELVAKMEEMKMDKTELGLCLRAIVLFPDAKGLQAVQEVEQLREKVASLEEYCKQRYPDEPGRFA 393
[TcRXR-1 AHQAGVGTIFDRVLTELVAKMEEMKMDKTELGLCLRAIVLFPDAKGLQAVQEVEQLREKVASLEEYCKQRYPDEPGRFA 395
[PpRXR-2 AHQAGVGTIFDRVLTELVAKME----- 304
[NlRXR-b AHQAGVGTIFDRVLTELVAKMEEMKMDKTELGLCLRAIVLFPDAKGLQAVQEVEQLREKVASLEEYCKQRYPDEPGRFA 398
[TcRXR-2 AHQAGVGTIFDRVLTELVAKMEEMKMDKTELGLCLRAIVLFPDAKGLQAVQEVEQLREKVASLEEYCKQRYPDEPGRFA 400

[PpRXR-1 ----- 299
[NlRXR-a KLLLRPALRSIGLKCLENLFFFKLIQDTPIDTFLEMEMLESFSTQLAT 441
[TcRXR-1 KLLLRPALRSIGLKCLENLFFFKLIQDTPIDTFLEMEMLESFSPH-AT 442
[PpRXR-2 ----- 304
[NlRXR-b KLLLRPALRSIGLKCLENLFFFKLIQDTPIDTFLEMEMLESFSTQLAT 446
[TcRXR-2 KLLLRPALRSIGLKCLENLFFFKLIQDTPIDTFLEMEMLESFSPH-AT 447

```

Figura 28. Comparación de los residuos de aminoácidos de las secuencias de RXR de *Plicopurpura pansa* (PpRXR1 y PpRXR2) y las reportadas en otras especies de gasterópodos marinos, *Thais clavigera* (TcRXR-1 y TcRXR-2), *Nucella lapillus* (NlRXRa y NlRXRb). Los residuos idénticos entre secuencias se presentan en fondo negro y los similares en fondo gris, los restantes en fondo blanco. Se marcó en recuadro rojo el área correspondiente a las isoformas.

7.5. Exposición de Hembras Morfológicamente Normales en Sitios Seleccionados de la Zona Costera de Mazatlán.

7.5.1. Resultados del Experimento de Trasplante

Durante el primer mes de monitoreo se obtuvieron bajos resultados de recuperación de organismos cercanos al 30% en cada sitio, por lo que se realizó una segunda colecta en el sitio control y se aumentó la cantidad de organismos trasplantados para mejorar los resultados de recuperación en

los meses posteriores. Ninguna de las hembras trasplantadas desarrollo imposex después de 30,60 y 120 días de exposición y no se observó mortalidad en organismos trasplantados.

Las tasas de recuperación de hembras marcadas fueron de 65 % en Las labradas, 40% en Cerro del Vigía y 50% en Mármol. Las labradas fue el sitio con mejor recuperación de organismos marcados con un total de 39 hembras trasplantadas recuperadas, las condiciones climáticas, la extensión del terreno y su irregularidad afectaron la recolecta en Mármol, siendo el sitio con la mayor pérdida de organismos marcados, con solo 24 hembras trasplantadas recuperadas.

En la figura 23 se muestran los organismos recuperados en el transcurso de los tres meses del experimento de trasplante. Los sitios Mármol y Cerro del vigía son los sitios con alta incidencia de imposex, Las labradas es el sitio control, en el cual se colectaron y trasplantaron hembras del mismo sitio para utilizarlo como control de trasplante y descartar errores de manipulación en el experimento de campo.

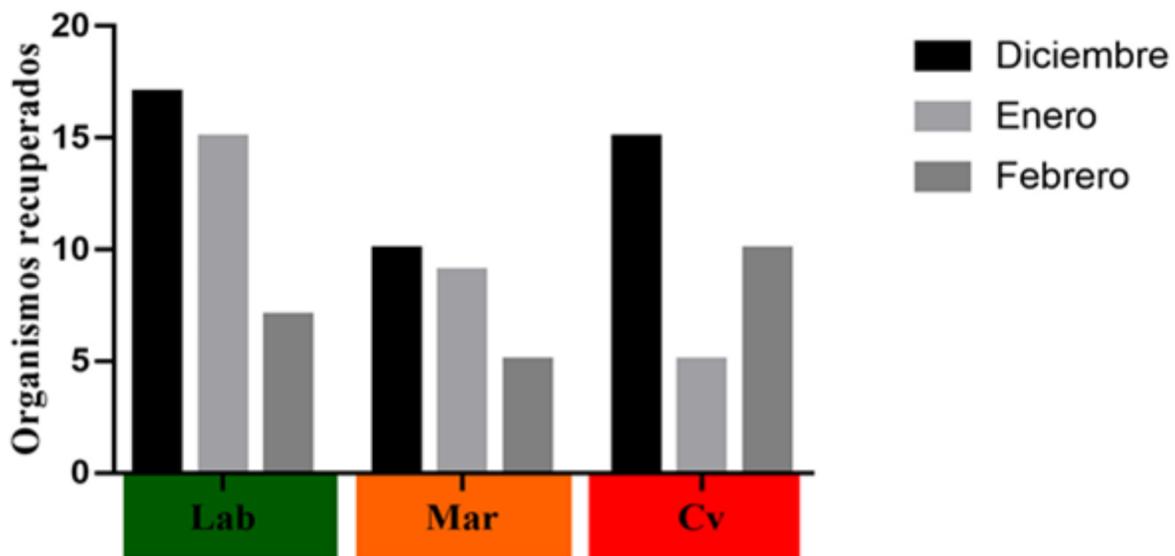


Figura 29. Hembras de *Plicopurpura pansa* provenientes de Las Labradas recuperadas después de tres meses de exposición a sitios con evidencia de imposex (Mar: Mármol y Cv: Cerro del Vigía), se utilizó un control de trasplante (Lab: Las Labradas).

7.5.2. Caracterización Histológica de Hembras Trasplantadas

Los resultados muestran una predominancia de estadios inmaduros en todas las hembras transplantadas, aunque esta especie se reproduce todo el año y es común encontrar diferentes estados gonadales en la misma muestra, siempre predomina una sobre otra, en las muestras colectadas de hembras transplantadas a los sitios Cerro del vigía y Mármol se observó la predominancia de ovocitos inmaduros previtelogénicos, vitelogénesis, una aparente variabilidad en el tamaño (no medida en este estudio) y un alto grado de alteraciones histológicas principalmente en la delimitación folicular, deformidades en el tejido conjuntivo y tejido germinativo alrededor del folículo. En la figura 30 se describen las alteraciones histológicas encontradas en las hembras transplantadas.

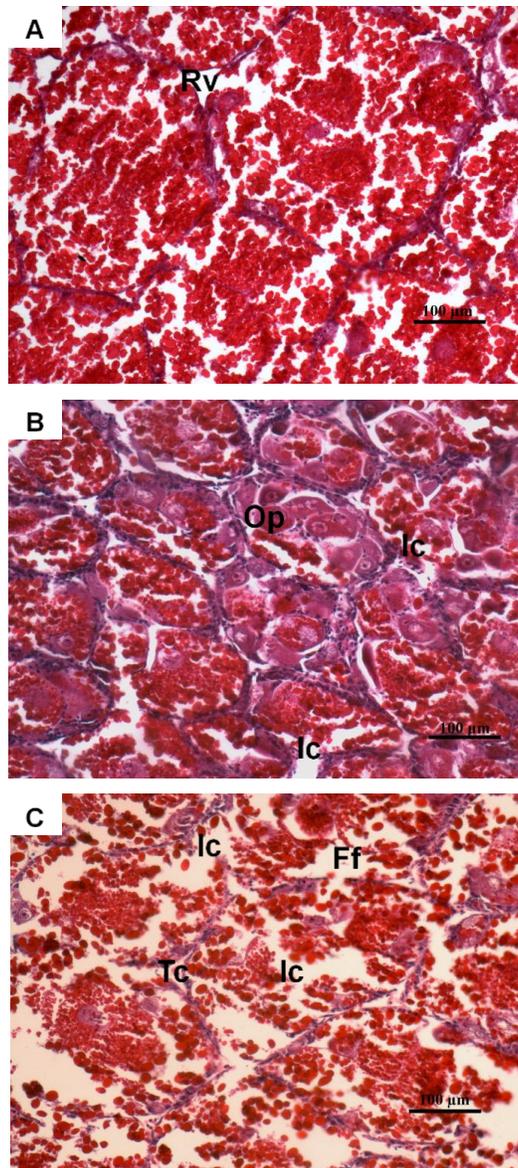


Figura 30. Comparación de gónadas femeninas en etapa de proliferación. A) **Hembra trasplantada a Las Labradas**, se observan ovocitos inmaduros llenos de vitelo dentro de folículos bien delimitados, el tejido conjuntivo es homogéneo y consistente, se observan algunos rastros de reabsorción temprana de vitelo. B) **Hembra trasplantada a Mármol** con ovocitos vitelogénicos y ovocitos primarios de mayor tamaño, se observan folículos en mayor proporción bien delimitados, con aparente homogeneidad celular, algunos rastros de infiltración celular y reabsorción del vitelo. C) **Hembra trasplantada a Cerro del Vigía**, se aprecian alteraciones claras en la delimitación folicular, el tejido conectivo es irregular y se encuentra fracturado, se observa una gran cantidad de infiltración celular y una alta reabsorción del vitelo. Rv: Reabsorción de vitelo; Op: Ovocitos primarios; Ic: Infiltración celular; Ff: Folículo fracturado; Tc: Tejido conectivo.

7.5.3. Expresión de RXR en Hembras Trasplantadas

Se analizó la expresión de RXR en 30 organismos de *P. pansa*, tomando como referencia a machos, hembras morfológicamente normales y hembras con imposex colectados de los sitios evaluados. RXR estuvo expresado en todos los sitios con alta incidencia de imposex, sin embargo, no se expresó en todas las hembras trasplantadas. La mayor frecuencia de hembras trasplantadas que expresaron RXR fue en Las Labradas, con un 60%, mientras que en Mármol fue de 50% y en el Cerro del Vigía se registró 20 %.

El sitio Las Labradas presentó 60% de hembras expresando RXR, proporción mayor a lo encontrado en Cerro del Vigía, que fue el sitio con alta incidencia de imposex.

Por si misma, la frecuencia de hembras expresando RXR no indica una relación directa con el sitio de trasplante o el desarrollo de imposex, dado que tanto en hembras morfológicamente normales y hembras con imposex se encontró evidencia de la expresión de RXR, predominando la expresión de la isoforma 1 la cual se encontró en el 100% de las hembras analizadas, mientras que isoforma 2 solo fue encontrada en una hembra procedente del Cerro del Vigía, los resultados se presentan en el cuadro 10.

Cuadro 10. Expresión del receptor de retinoides (RXR) en organismos de *Plicopurpura pansa* colectados del sitio de referencia (Las Labradas) vs hembras de *P. pansa* colectadas de (Las Labradas) y trasplantadas en (Cerro del Vigía y Mármol) durante tres meses.

Tratamiento	Sitio	Sexo	# org	RXR %	Isoforma
Referencia	Las Labradas	Hembra	3	0	
Referencia	Las Labradas	Macho	3	0	
Referencia	Las Labradas	Imposex	2	0	
Referencia	Cerro del Vigía	Hembra	4	25	I, II
Referencia	Cerro del Vigía	Macho	4	0	
Referencia	Cerro del Vigía	Imposex	2	0	
Trasplante	Las Labradas	Hembra	5	60	I
Trasplante	Cerro del Vigía	Hembra	5	20	I
Trasplante	Mármol	Hembra	4	50	I, II

Org: número de organismos; %RXR: Porcentaje de RXR expresado; Ref: Organismo de referencia; Trasp: Organismo trasplantado; H: Hembra; M: Macho; I: Imposex.

7.6. Posible afectación en Cópula en la Conducta Reproductiva por Imposex.

El objetivo de este apartado fue observar si existía alguna alteración reproductiva en hembras con imposex de *P. pansa*, teniendo como variable de respuesta el número de cópulas y compararlo con hembras morfológicamente normales; se registraron pocos datos al respecto, pero se recabaron otros datos relevantes sobre el comportamiento de *P. pansa* en cautiverio.

7.6.1. Cópulas Observadas en Campo

Se realizaron observaciones periódicas en los sitios Las Labradas, Mármol y Cerro del Vigía, se monitoreó el número de cópulas de *P. pansa* en campo y se comparó con las cópulas observadas en laboratorio obteniendo los siguientes resultados.

En campo, en los sitios monitoreados durante 3 meses los resultados fueron similares en cuanto al número de cópulas totales observadas: 16 en Las Labradas, 15 en Mármol y 13 en Cerro del Vigía. Mármol presentó mayor registró de cópulas durante diciembre y enero; mientras que en Las Labradas se observaron 8 cópulas en febrero, siendo de esta manera fue el sitio con mayor número de cópulas (Fig. 31).



Figura 31. Observaciones en campo de cópulas de *Plicopurpura pansa* en el sitio Las Labradas.

7.6.2. Cópulas Observadas en Laboratorio

Los resultados obtenidos demuestran que las hembras con imposex provenientes de Mármol y Cerro del Vigía conservan la capacidad de copular, pero con una disminución en el tiempo de cópulas con respecto a las hembras sin imposex. Se observó que en promedio las hembras sin imposex duraban en cópula entre 48 y 36 horas y las hembras con imposex apenas llegaron a 6 y 8 horas (Fig. 32).

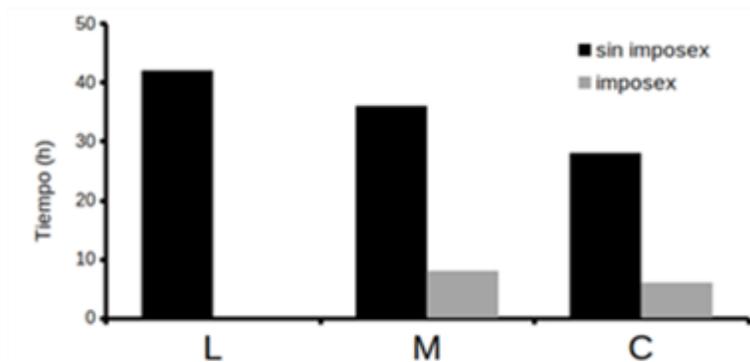


Figura 32. Tiempo de copulación de hembras de *Plicopurpura pansa*.

En la figura 33 se observan organismos de *P. pansa* con imposex en proceso de copula.

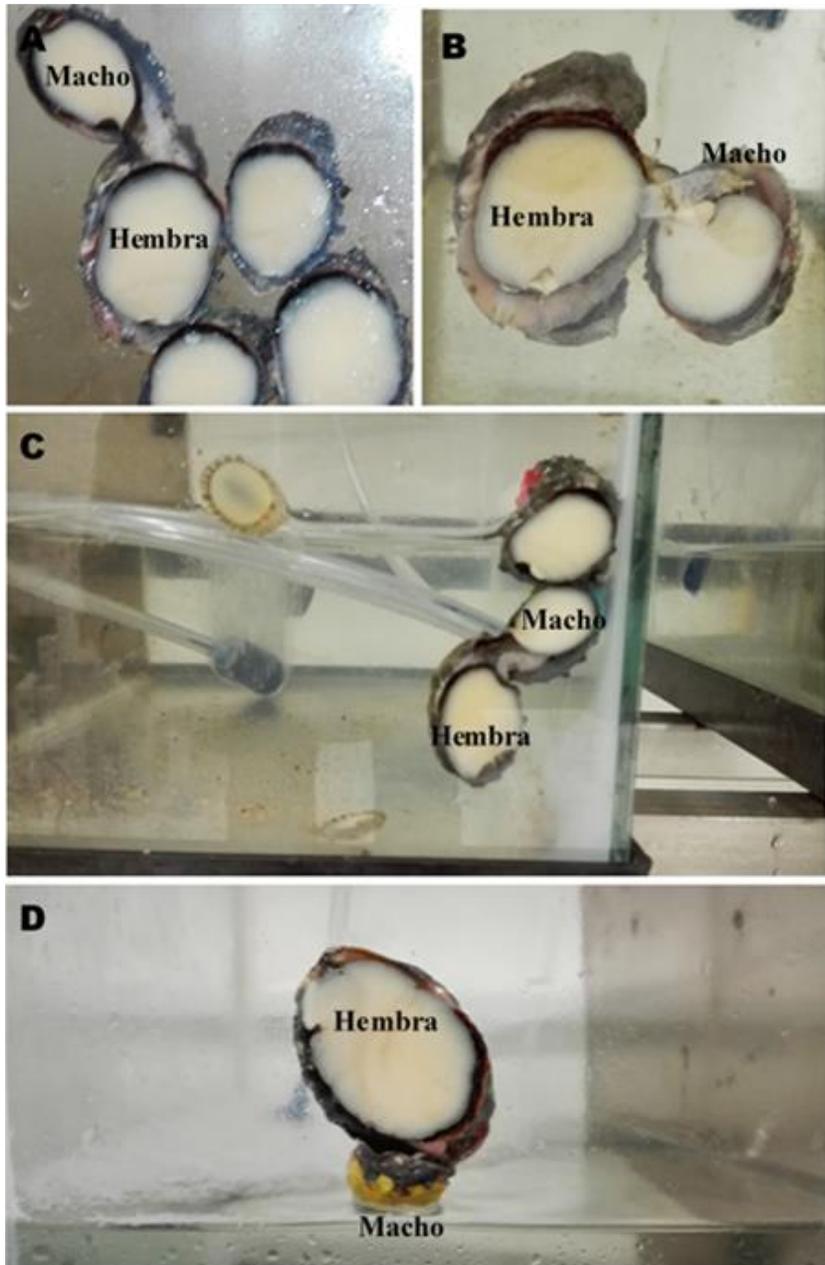


Figura 33. Cópula de hembras de *Plicopurpura pansa*. A) Hembra sin imposex de Mármol en cópula. B y C) Hembra con imposex de Mármol en cópula. D) Hembra con imposex de Cerro del Vigía en cópula.

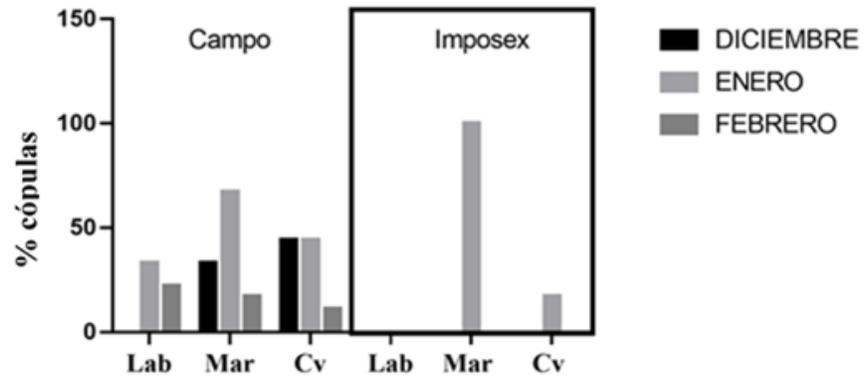


Figura 34. Porcentaje de cópulas de *Plicopurpura pansa* observadas en laboratorio y campo durante el experimento de reproducción. Lab: Las Labradas; Mar: Mármol; Cv: Cerro del Vigía.

7.6.3. Aspectos de Alimentación

En principio se intentó alimentar con pequeños trozos de calamar crudo como se reporta en algunas investigaciones; sin embargo, después de una semana de observación, *Plicopurpura pansa* no consumió nada de este alimento proporcionado, por lo que se procedió a coleccionar pequeños organismos vivos de la zona de estudio. Diariamente por la mañana se alimentó con pequeños moluscos gasterópodos conocidos como “lapas comunes” y ocasionalmente de “quitones”, colectados de la zona intermareal en el Cerro del Vigía. La identificación de las especies que se utilizaron como alimento vivo a *Plicopurpura pansa* durante el experimento de laboratorio, fue realizado por el Dr. José Salgado Barragán en el Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la Unidad Mazatlán. La metodología consistió en agrupar a los organismos por similitud y posteriormente identificarlos, se realizó un grupo de 14 ejemplares y se logró identificar las familias *Lottidae* y *Siphonariidae* figura 35 y caracoles de la especie *Nerita funiculata* y un poliplacóforo conocido como *Chitón articulatus*. figura 36.

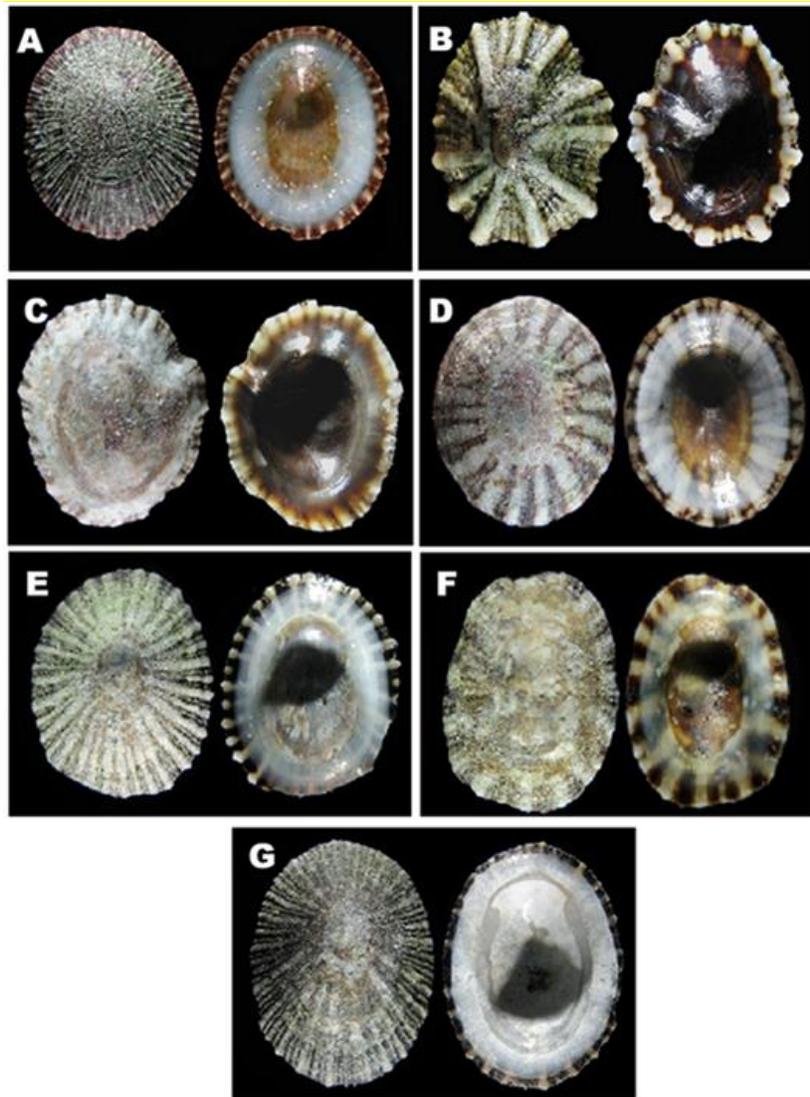


Figura 35. Lapas comunes y quitones identificados en el Cerro del Vigía. A) *Lottia mesoleuca*. B) *Siphonaria palmata*. C) *Siphonaria maura*. D) *Lottia strigatella*. E) *Lottia mitella*. F) *Lottia strongiana*. G) *Lottia acutapex*.

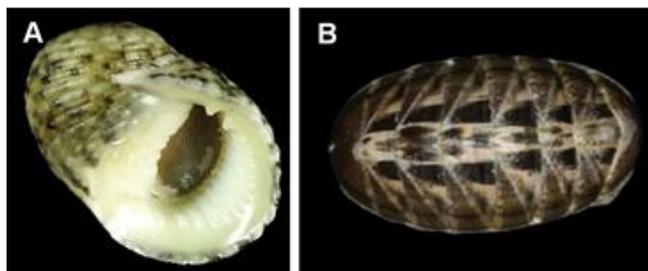


Figura 36. Caracol intermareal y poliplacóforo identificado. A) *Nerita funiculate* y B) *Chiton articulatus*.

Se observó que *P. pansa* se alimentó en condiciones de laboratorio durante la noche, los caracoles inician una especie de reconocimiento previo del sitio donde se encuentra (pecera), desplazándose a lo largo y ancho, con una velocidad calculada 5 m/h, hasta casi 7 m/h, con eventuales períodos de descanso cada 15 minutos aproximadamente. Al localizar a su presa inicia un periodo de acecho que toma alrededor de 1 a 3 horas dependiendo del tamaño de la presa y la distancia a la que se encuentra, hasta acercarse completamente, cubriendo con su cuerpo a la presa, cuando esto sucede segrega un poco de su tinte sobre la presa y posteriormente, en el caso de las “lapas comunes”, las voltea para tener acceso al cuerpo blando y empieza a digerirlo durante horas (Fig. 37). Se calculó que el tiempo necesario desde la captura hasta la digestión completa del cuerpo blando de una presa de alrededor de 0.5 g (incluyendo el peso de la concha) es de alrededor de 24 horas, mostrando que después de comer tarda 2 días para volver a cazar. En el caso de presas más grandes como los quitones el tiempo que necesita para comerlo completamente es de aproximadamente 48 h y en ocasiones, la presa es compartida por varios caracoles.

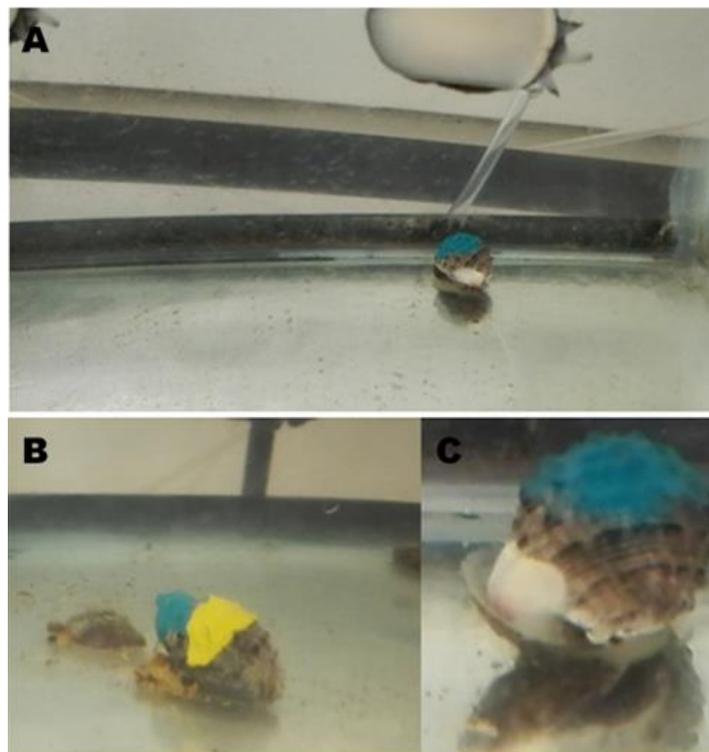


Figura 37. *Plicopurpura pansa* alimentándose de una lapa común. A) En principio *P. pansa* se coloca encima de su presa. B) posteriormente suelta tinte actuando como anestésico y voltea a su presa para tener acceso al cuerpo blando. C) La digestión completa de la presa puede llevar más de 24 h.

Después del primer mes de observación se ajustó la cantidad de alimento diario, se consideró que lo mejor era suministrar una lapa por organismo cada tercer día y que esta debe de estar viva, ya que al parecer *P. pansa* prefiere acechar y cazar a su presa.

7.6.4. Comportamiento y Desplazamiento

Se sabe que *Plicopurpura pansa* es un organismo de hábitos nocturnos, durante el día permanece la mayor parte del tiempo adherido a las rocas más cercanas a la dinámica oceánica, entre fisuras, protegido del sol y por la noche se dispone a cazar su alimento (Flores-Garza, 2004). En las observaciones de laboratorio se pudo corroborar su comportamiento nocturno, mientras que durante el día *P. pansa* no presentaba ningún movimiento, siempre estuvo adherido a la pared del acuario, sobre el nivel del agua, y cuando la temperatura aumentaba por arriba de los 30°C, éste se sumergía.

La velocidad máxima de desplazamiento fue de 7 m/h durante la noche. En cada acuario se colocaron tres parejas de *P. pansa*. En un principio se distribuyeron las parejas separadas alrededor del acuario, aunque posteriormente se agregaron, como lo observado en el medio natural.

8. DISCUSIÓN

Desde su descubrimiento en los 70s el imposex ha sido relacionado con la presencia de Tributil estaño (TBT) en el ambiente marino y a partir de su prohibición a nivel mundial en 2008 por la Organización Marítima Internacional (IMO) en gran parte de Europa bajo distintos protocolos internacionales como el de la Convención para la Protección del Medio Ambiente Marino del Atlántico del Nordeste (OSPAR), la Comisión de Helsinki (HELCOM) por nombrar algunos, el imposex es empleado como un método de monitoreo rápido, económico y eficaz para evaluar la calidad ambiental del ambiente marino en relación a la concentración de TBT y subproductos de degradación en el sedimento y monitorear la recuperación de las zonas costeras más afectadas.

La presencia de imposex fue descubierta hace casi 50 años y actualmente se pueden encontrar innumerables artículos de investigación sobre la presencia de imposex en alguna especie de gasterópodo marino para determinar que en el sitio existe o existió contaminación por algún compuesto organoestañoso, aunque los resultados no demuestren presencia de TBT o algún subproducto de degradación; sin embargo otros trabajos no encuentran relación entre la incidencia de imposex y la presencia de compuestos organoestañosos en el sitio. Existen estudios que justifican el no analizar TBT en el ambiente (como en el caso de zonas en recuperación), por ejemplo el trabajo de Ayari *et al.* (2018) quienes utilizaron a *Stramonita haemastoma* para determinar la incidencia de imposex en distintas zonas costeras del Mediterráneo y el Atlántico, basándose en los criterios desarrollados por la OSPAR y Laranjeiro *et al.* (2018b) quienes a su vez evaluaron el estado de la costa portuguesa después de 15 años de la prohibición del TBT utilizando a *Nucella lapillus* y *Nassarius reticulatus*. Sin embargo, otras investigaciones han intentado relacionar sus resultados con conjeturas vagas, tal es el caso de estudios como el de Grimón *et al.* (2016), en donde se asume que el imposex encontrado en las islas Galápagos en diversas especies de gasterópodos marinos es una clara indicación de que existe contaminación por TBT, a pesar de no haberse medido ningún tipo de compuesto organoestañoso y de ser una zona natural protegida y alejada de actividades antropogénicas. De los resultados más controversiales está el de Strand *et al.* (2006) quienes encontraron imposex en el Ártico en *Buccinum finmarkianum*; sin embargo, el análisis de compuestos organoestañosos en el sedimento y en las muestras de tejido proporcionó

valores por debajo del límite de detección analítica. En este sentido son necesarios nuevos enfoques para investigar el tema del imposex, abiertos a explorar nuevas posibilidades del fenómeno, con el fin de aportar nuevo conocimiento. Lo anterior debe tomar en cuenta que diariamente se producen miles de nuevos compuestos químicos (en 2015 el *Chemical Abstract Service* reportó haber llegado a los cien millones de compuestos químicos en el mundo), muchos con implicaciones en el ambiente y a la salud humana todavía no evaluadas.

8.1. Incidencia de Imposex en el Gasterópodo Marino *Plicopurpura pansa* en Diferentes Localidades Costeras del Municipio de Mazatlán, Sinaloa.

El estudio confirmó que las hembras de *P. pansa* con imposex colectadas de cuatro localidades costeras de Mazatlán Sinaloa presentan un pseudo pene - una pequeña proyección del tejido, prácticamente una protuberancia, sin embargo en ninguna hembra se observó la presencia o formación de un vaso deferente visible, corroborando lo reportado por Domínguez-Ojeda (2015), quien reportó que las hembras de *P. pansa* presentaban un pseudo pene de tamaño siempre menor al de los machos, pero ninguna hembra con imposex presentó un vaso deferente visible.

En Europa existen protocolos de monitoreo como el de la comisión OSPAR y HELCOM, las especies de gasterópodos modelo para evaluar el imposex son *Nucella lapillus*, *Nassarius reticulatus*, *Buccinum undatum*, *Neptunea antiqua* y *Littorina littorea*, todas desarrollan un pseudo pene y un vaso deferente en mayor o menor grado y está relacionado a la alta sensibilidad de TBT en el ambiente, sin embargo existen reportes de especies de gasterópodos en donde el índice del vaso deferente no tiene una relación con la concentración de TBT en el medio; tal es el caso de *Marisa cornuarietis* en donde se expuso a concentraciones de TBT de 50 y 200 ng l⁻¹ durante seis meses y no desarrolló más del estadio 3 en la clasificación de imposex en ambas concentraciones, lo que estaría indicando un bajo imposex (Schulte-Oehlmann *et al.*, 1995); existen además evidencias de que en *Nucella lapillus* (Oehlmann *et al.*, 1988; 1991) *Ocenebra erinacea* (Oehmann *et al.*, 1992) *Hinia reticulata* (Stroben *et al.*, 1992b), *Hinia incrassata*, *Buccinum undatum* (Stroben, 1994), *Trivia arctica* y *Trivia monacha* (Stroben *et al.*, 1992a), a nivel histológico el imposex desarrollado en estas especies en los estadios (1 a 4) mostraron las mismas estructuras

anatómicas e histológicas que hembras morfológicamente normales (estadio 0). En este sentido el imposex encontrado en *P. pansa* parece no mostrar una relación entre la concentración de TBT y el índice de vaso deferente (VDS); como lo demuestra Domínguez-Ojeda, (2014; 2015) en donde en estudios en campo como no se logró observar un VDS en *P. pansa* y en laboratorio solo fue visible en cortes histológicos un vaso deferente no desarrollado en organismos expuestos a concentraciones de 10 µg Sn/L of Tributyltin (TBTCl) durante seis meses.

Nuestros resultados sugieren que se deben hacer adecuaciones a los protocolos de la comisión OSPAR y HELCOM para determinar imposex en especies no modelo como *Plicopurpura pansa* y evitar generar interpretaciones erróneas sobre el grado de contaminación en la zona.

Todas las estaciones muestreadas presentaron en mayor o menor grado imposex, hembras de *P. pansa* colectadas de Cerro del Vigía y Escolleras presentaron incidencias de imposex, encontrándose los más pequeños en Las Labradas y los más grandes en Mármol.

La alta tasa de imposex en las estaciones de Cerro del Vigía y Escolleras sugiere la presencia de TBT o subproductos de degradación en el ambiente como lo relacionaron Smith (1981), Gibbs y Bryan (1986) y Gibbs *et al.* (1987) siendo además las zonas con mayor interacción antropogénica, ambas estaciones se encuentran cercanas a la zona portuaria, a la planta de tratamiento de aguas residuales “El Crestón” y es una zona con alta afluencia turística, los resultados difieren de lo reportado por Domínguez-Ojeda *et al.* (2015) en la zona del Cerro del Vigía en donde en 2009 encontró una alta incidencia de imposex del 28%, similar al 17% encontrado en este estudio. Sin embargo el haber encontrado imposex en 2017, implica que existe una fuente de contaminación actual, dado que se ha demostrado que la vida promedio de una hembra de *P. pansa* en condiciones silvestres es de 3.5 años como lo reporta Vázquez-Gil *et al.* (2004), por lo tanto ninguna de las hembras colectadas por Domínguez-Ojeda en 2010 podrían haber sido colectadas en este estudio, por otra parte Acevedo *et al.* (1996), Michel-Morfín *et al.* (2009) y Ramírez *et al.* (2003) estimaron el crecimiento promedio diario de *P. pansa* es de 0.03 mm/día en condiciones silvestres y 0.01 mm/día en condiciones de laboratorio, utilizando tasas de crecimiento para caracoles entre 20 y 40 mm y asumiendo que después de 90 mm el crecimiento es nulo, sugiriendo además un crecimiento diferencial según la latitud, aumentando hacia el sur del país y concluyendo que los estados de Jalisco, Nayarit y Sinaloa presentan las mejores condiciones en cuanto a densidad de crecimiento; los datos de longitud promedio obtenidos en este estudio de hembras con imposex en las distintas localidades costeras obtenidos sugieren que la edad aproximada promedio de las hembras con

imposex, en Escolleras es de 2.9 años, Cerro del Vigía 3.2 años, Mármol de 0.5 años y Las Labradas 2.4 años y que las hembras con imposex colectadas en el Cerro del Vigía y las Escolleras han estado expuestas durante los últimos tres años y podrían corresponder a las hembras más longevas de las estaciones muestreadas. De acuerdo a las estimaciones anteriores es probable una exposición reciente incluso en un periodo menor a un año.

8.1.1. Imposex en Cerro del Vigía y Escolleras

El TBT es un compuesto que puede permanecer en la columna de agua durante 9 meses, para después precipitarse al fondo marino y persistir hasta 15 años, sobre todo en lugares cerrados como puertos interiores o lagunas (Stewart y de Mora 1990; Sarradin *et al.*, 1991). El TBT solo puede volver a la columna de agua cuando los sedimentos son removidos natural o artificialmente. Desde 2008, el TBT está prohibido a nivel mundial (IMO 2005).

Nuestros resultados indican por lo tanto que el imposex encontrado en las estaciones Cerro del Vigía y Escolleras podría ser provocado por eventos de contaminación antropica, considerando que *P. pansa* es un gasterópodo marino intermareal y no está expuesto a los sedimentos de la zona, los eventos de imposex pueden haber sucedido por la remoción de sedimentos en la zona portuaria donde se realizan trabajos de dragado y pudo ser arrastrado hacia los sitios Cerro del Vigía y Escolleras.

Por otro lado la planta de tratamiento de aguas residuales “El Crestón” podría estar involucrada en los eventos recientes de imposex en la zona, debido a los diversos reportes sobre el desborde de aguas residuales a lo largo de los años por estar rebasada en su capacidad en el manejo de residuos, además de antecedentes sobre incumplir la norma Oficial Mexicana NOM-001-ECOL-1996, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales y carecer del manejo apropiado de residuos en puerto de Mazatlán (Luján A. 2009; Ortega N. 2014; Ceballos N. 2016). Así pues existen investigaciones que soportan esta teoría ya que se ha encontrado una alta concentración de compuestos androgénicos como 5 α -dihidrotestosterona (DHT), androsterona (ADR) (Kirk *et al.*, 2002; Fan *et al.*, 2011) y estrógenos naturales como el β estradiol (E2; excretados en la orina), Estronas (E1), estrógenos sintéticos

como el 17 α -etinilestradiol (EE2; píldoras anticonceptivas), glucocorticoides como cortisona (CRN) y progesterona (PGT) en los desechos tratados en las plantas residuales, (Chang *et al.*, 2011; Fan *et al.*, 2011; Jarosová *et al.*, 2014) lo que podría explicar los eventos de imposex si en la zona no existiera presencia de TBT. Recientemente Zhou *et al.* (2019) se encontraron evidencia de presencia de retinoides en efluentes de plantas de tratamiento de aguas en Hong Kong y consideran la posibilidad de que gasterópodos marinos puedan ser afectados por este tipo de compuestos y desarrollar imposex.

8.1.2. Imposex en Las Labradas y Mármol

Los resultados encontrados en las estaciones de Las Labradas y Mármol se diferencian de la mayoría de los trabajos de imposex, que buscan relacionar la presencia de TBT en el medio en zonas con alto tráfico marítimo, ya que en el presente estudio ambas zonas están alejadas de zonas urbanas o zonas portuarias cercanas y no presentan contaminación aparente. Notablemente en Mármol (localizado a 40 km de Mazatlán) se observó una incidencia de imposex del 13%, superior a lo encontrado en la estación Escolleras que es un sitio afectado por diversos factores antropogénicos. Para Las Labradas, la incidencia de imposex fue de 3%, un porcentaje bajo. Estos resultados son similares a los reportados en diversos estudios de imposex en los que no se pudo relacionar la presencia de imposex con la presencia de TBT en la zona, como en los estudios realizados por Strand *et al.* (2006); Grimón *et al.* (2016), lo que sugiere hipótesis alternativas sobre la etiología del imposex.

Mármol es un pequeño pueblo con una población de 787 personas (INEGI, 2015), lo que reduce las posibilidades de que el imposex esté relacionado con factores de tipo antropogénico; sin embargo, es una zona dedicada principalmente a la agricultura y ganadería.

De acuerdo con lo reportado por CODESIN en 2017, en el municipio de Mazatlán del cual forma parte Mármol, se produjeron alrededor de 507 toneladas de carne provenientes de ganado bovino, porcino, ovino, caprino y una producción agrícola de 273, 934 toneladas.

En el caso de San Ignacio, el cual forma parte la zona de Las Labradas, se produjeron 258 toneladas de carne provenientes de ganado bovino, porcino, ovino, caprino y de aves con una clara tendencia

al alta y una producción agrícola de 55, 419 toneladas.

En la ganadería intensiva es común adicionar nutrientes extras al alimento, usando químicos orgánicos endógenos, incluidas las hormonas estrogénicas y androgénicas (Soto *et. al.*, 2004; Johnson, 2006). Derby *et al.* (2011) y Zhang *et al.* (2019) han encontrado la presencia de diversos compuestos androgénicos como: Androsterona (ADR), Testosterona (TTR), 17 α -Boldenona (17 α -BOL), Metil testosterona (MT), androstenediona (ADD), Epi-androsterona (EADR), estrógenos como 17 β -estradiol y estrona, progestágenos y glucocorticoides en el estiércol de cerdos y aves cultivados en granjas en China. En el caso del ganado vacuno se han encontrado rastros de acetato de 7 β -trembolona (TBA) una hormona esteroide androgénica sintética administrada para promover el crecimiento, por tanto, este tipo de compuestos al llegar al suelo en forma de estiércol se puede lixiviar y contaminar el suelo, los acuíferos, y por este medio llegar a la zona costera. Por otro lado, la agricultura utiliza diversos productos químicos como fertilizantes y pesticidas en los cultivos, algunos de los cuales tienen actividades como alteradores endocrinos (Camino- Sánchez *et al.*, 2016) que potencialmente pueden producir alteraciones como el imposex (André *et al.*, 2019; Wong *et al.*, 2019; Mnif *et al.*, 2011; Broséus *et al.*, 2009). Así, considerando los resultados de este trabajo y los antecedentes sobre compuestos químicos con capacidad androgénica se puede hipotetizar que el imposex registrado en Mármol puede estar relacionado con alteradores diferentes al TBT, ya que este sitio no se encuentra cercano a zonas portuarias.

Las Labradas, por otro lado, se encuentra dentro el área natural conocida como la meseta de Cacaxtla con una extensión total de 50 mil hectáreas y menor incidencia de factores antropogénicos (incluyendo agricultura y ganadería como en el caso de Mármol). Algunos estudios han propuesto que el imposex se puede presentar por otros factores, sobre todo cuando se presenta en niveles bajos. Schulte-Oehlmann *et al.* (1995) describen el imposex desarrollado en *Marisa cornuarietis* como bajo e independiente de la exposición a TBT por lo que sugieren esta especie desarrolla imposex natural. Spooner *et al.* (1991) plantea al estrés experimental como un factor causal en el desarrollo del imposex en gasterópodos, observando que al exponer a narcotización continua con cloruro de magnesio a *Nucella lapillus* se desarrolla imposex. Así mismo, Yinhan Gong *et al.* (2014) encontraron evidencia de que especies de fitoplancton (*Gymnodinium catenatum*, *Prorocentrum mínimo*, y *Alexandrium leei*) productoras de mareas rojas en la zona de Singapur producían fitotoxinas que presentaban actividad androgénica, mientras que *Fibrocapsa japonica* y *Chattonella marina* mostraron fitotoxinas con una alta actividad estrogénica; esta última produjo

un incremento significativo de la proliferación de células de cáncer de mama humano (MCF-7) a una dosis de 1 ng/ ml tomando el rol de un carcinogénico. En el contexto del presente estudio el imposex tanto en Mármol como en Las Labradas pudiese estar relacionado potencialmente a la presencia de mareas rojas que se presentan de manera común, aunque estacional, en la zona.

En las costas de Mazatlán Sinaloa existen evidencias claras sobre la presencia de “mareas rojas”, las cuales se presume son estacionales y están relacionadas a surgencias en invierno-primavera y por fenómenos como “El Niño” (Cortés-Altamirano *et al.*, 1995; Ochoa, 2003), con amplios estudios desde los años 80s, después de que la especie *Gymnodinium catenatum* provocara una gran mortandad de invertebrados marinos e intoxicación en seres humanos en las costas Sinaloa (Mee *et al.*, 1986).

Las especies que han sido identificadas en estos eventos de proliferaciones algales han sido: *Prorocentrum balticum*, *Prorocentrum mexicanum*, *Prorocentrum donghaiense*, *Prorocentrum triestinum*, *Prorocentrum compressum*, *Ceratium furca*, *Mesodinium rubrum*, *Gymnodinium sanguineum*, *Gymnodinium catenatum*, *Gymnodinium instritatum*, *Cochlodinium polykrikoides*, *Akashiwo sanguinea*, *Scrippsiella trochoidea*, *Mesodinium rubrum*, *Noctiluca scintillans*, *Pseudonitzschia pseudodelicatissima*, *Protoperidinium quinquecorne*, *Tripobalechii*, *Pentaparsodinium trachodium*, *Tripes furca*, *Gonyaulax turbynei*, *Heterosigma akashiwo*, *Chattonella marina*, *Chattonella ovata*, *Margalefidinium fulvescens*, *Margalefidinium polykrikoides*, *Trichodesmium erythraeum*, *Polykrikos kofoidii*, de las que se han reportado toxinas nocivas como: toxinas paralizantes (Saxitoxina), diarreas (Ácido okadaico), amnésicas (Ácido domoico), neurotóxico (Brevetoxinas), neurológico y gastrointestinal (Ciguatoxina) y veneno por Azaspirácidos (Manrique & Luna-Soria, 1995; Altamirano y Rodríguez, 1997; Altamirano, Durán y Gómez-Aguirre, 1999; Coats y Park, 2002; Cortés-Altamirano Cortés- Altamirano y Sierra-Beltrán, 2003; Ochoa, J. L. 2003; Rodríguez, 2004)

En este estudio se observó que en general las hembras con imposex colectadas de Cerro del Vigía, Escolleras y Mármol presentaban pesos y tallas promedio mayores que las hembras morfológicamente normales. Dichos resultados son similares a lo reportado por Otegui *et al.* (2019) en dos especies de gasterópodos marinos, en donde encontró que hembras de *Leucozonia nassa* y *Stramonita brasiliensis* afectadas por imposex eran mayores a las hembras y los machos sanos, sugiriendo que las hembras afectadas por imposex adquieren cierta plasticidad que les permite superar los efectos de otros factores estresantes ambientales y proponen el estudio de parámetros

morfológicos como una alternativa efectiva, rápida y de bajo costo para monitorear la contaminación de organismos marinos. Como dato relevante el imposex de Las Labradas parece ser diferente, ya que las hembras eran más pequeñas y menos pesadas que en los demás sitios, además de ser un sitio con baja prevalencia de imposex y con condiciones ecológicas adecuadas para la especie, aunque por el tamaño de muestra colectado no se observaron diferencias significativas del imposex entre sitios.

8.2. Caracterización Morfológica, Histológica y Molecular (RXR) de los Organismos de *Plicopurpura pansa*.

8.2.1 Caracterización Morfológica

La proporción sexual (PS) Hembra: Macho (H: M) en *P. pansa* fue variable en las cuatro localidades costeras evaluadas, siendo Las Labradas y Mármol los sitios con la PS más balanceada (0.8:1 y 1.1:1 respectivamente). Estos resultados se asemejan con lo reportado en poblaciones de *P. pansa* en Guerrero (0.7:1; 1.:8; 0.8:1) por Flores-Rodríguez (1995) y Flores-Garza *et al.* (2007), en Oaxaca (1:1) por Naegel (2006) y en Baja California Sur (1:0.8) por Ramírez-Rodríguez y Naegel (2003). En este sentido, Las Labradas y Mármol son sitios con aparente baja perturbación antropogénica, con alta disponibilidad de alimento, por lo que se pueden considerar ambientes ecológicamente adecuados para la especie.

Los sitios que presentaron las PS más divergentes de la proporción 1:1 fueron Cerro del Vigía (0.6:1) y Escolleras (0.7:1). La mayor proporción de machos coincide con lo reportado por Acevedo-García y Escalante (1993) y Enciso *et al.* (1998), con PS de 0.7:1, 0.8:1 y 1:1.2 en costas de Mazatlán Sinaloa. Otros estudios en el Pacífico mexicano también reportan mayores proporciones de machos de *P. pansa* (Holguín, 1993; Acevedo *et al.*, 1996).

Los resultados indican que, en las cuatro localidades costeras evaluadas, las poblaciones de *P. pansa* se encuentran dentro de los valores normales reportados en la literatura. Sin embargo, estos estudios no incluyen al imposex como variable, la cual podría influir en las poblaciones silvestres

y podría explicar la variabilidad en las proporciones sexuales observadas en campo.

Dentro del contexto de este trabajo, el imposex en la zona cercana al Cerro del Vigía había sido reportada por Domínguez-Ojeda (2015) en 28% en 2010 y había encontrado una PS de (1.1:1) en una muestra de 675 organismos. Sin embargo, los resultados de PS en este trabajo se encontró una variación de la PS en la zona con 0.6:1 y un imposex del 12%, lo que parece indicar una relación entre imposex y una menor proporción de hembras, sugiriendo una posible alteración reproductiva en las zonas con mayores impactos por factores antropogénicos, como la zona portuaria, la planta de tratamiento de aguas “El Crestón”, agricultura, entre otros.

La talla promedio de los organismos de *P. pansa* encontrada en las cuatro localidades costeras evaluadas fue de 12 a 74.63 mm. En diversos estudios de *P. pansa* a lo largo del Pacífico mexicano se han reportado las tallas entre 10.5 y 27 mm en Guerrero (Flores-Garza *et al.*, 2007) y valores mayores a 20 mm en Oaxaca (Acevedo y Hernández, 1988), Jalisco (León, 1989), Nayarit (Acevedo *et al.*, 1990) y Mazatlán, Sinaloa (Enciso *et al.*, 1998). En el presente estudio la población de *P. pansa* en Mármol presentó tallas mayores en comparación con los demás sitios, mientras que Las Labradas y Escolleras presentaron organismos más pequeños. Ramírez-Rodríguez y Naegel (2003) señalan que las tallas disminuyen con el incremento a la latitud y están relacionadas a las condiciones ambientales de la zona, señalando que la diferencia de tallas también puede estar influenciada por el nivel de afectación antropogénica en la zona. Por otra parte, Koch y Wolff (1996) mencionan que especies como *P. pansa* que habitan en la zona intermareal, presentan mecanismos fisiológicos que le permiten adaptarse a ambientes extremos, por lo que la zonación de tallas puede estar influenciada por la disponibilidad de alimento, la depredación, las zonas de protección, entre otros factores. Así, se puede inferir que Mármol posee las condiciones ambientales más favorables para el desarrollo de *P. pansa*, mientras que Cerro del Vigía y Escolleras las menos favorables. En contraste Las Labradas presentó tallas pequeñas a pesar de ser un sitio aparentemente favorable para su desarrollo, por lo que se necesitan estudios ecológicos adicionales que estimen la densidad de organismos en la zona para saber si *P. pansa* en Las Labradas sigue un patrón de alta densidad de organismos y tallas pequeñas como lo han reportado Flores-Garza *et al.* (2007, 2012) y Flores (1995) en otras zonas costeras de México.

El peso promedio total entre los organismos de *P. pansa* colectados en las cuatro localidades costeras evaluadas fue entre de 4.49 y 9.49 g, Las Labradas fue el sitio con organismos de menor peso y Mármol presentó los organismos de mayor peso, en todos los sitios se encontraron

coeficientes de variación (CV) mayores al 30% en relación al peso, lo que indicaría organismos con pesos heterogéneos, diferentes edades o diferentes grados de desarrollo ya que cambios en el peso pueden indicar etapas de desarrollo diferentes como lo señala Ehrhardt (1981), así Mármol fue el sitio con el mayor CV con 90.26% en machos y 69.40% en hembras, lo que estaría indicando que los organismos de este sitio en particular estarían siendo afectados por algún proceso dinámico de la zona como época de desove, migración, disponibilidad de alimento etc, de acuerdo a lo observado por Flores-Garza *et al.* (2007) en organismos de *P. pansa* en costas de Guerrero. Como evidencia previa se encontró una incidencia de imposex de 12.5% en Mármol mayor que lo encontrado en el sitio Escolleras 11.67% la cual es una zona con alta afectación antropogénica; sin embargo, para determinar esto se necesitan estudios ecológicos en la zona y determinar si existe algún evento natural o antropogénico que afecte al sitio.

8.2.2. Caracterización Histológica

En general la estructura de la gónada de *P. pansa* tanto en machos como hembras fue semejante a lo reportado por varios autores sobre esta especie Quiroz-Rocha (1992); González-Flores (1997); Muñoz-Mancilla (2003); Corona-Muñiz, 2006) y similar a la disposición de órganos reproductores y órganos sexuales en otras especies de la misma familia de muricidos como *Nucella lapillus*, *Littorina littorea* y *Ocenebra erinacea* (Fretter, 1980; Soliman, 1987; Fretter y Graham, 1994; Voltzow, 1994).

La colecta de organismos se realizó entre octubre y noviembre de 2017 y febrero de 2018. En machos se identificaron tres etapas gonadales: etapa temprana, etapa de proliferación y etapa de maduración. En hembras se identificaron etapa de proliferación mayoritariamente y etapa de desove.

Nuestros resultados indican que los estadios inmaduros de *P. pansa* en zonas costeras de Sinaloa predominan entre octubre y febrero, similar a lo reportado por González-Flores (1997) en zonas costeras del norte de Sinaloa, en donde observó que los estadios tempranos y de proliferación ocurren entre septiembre y octubre, pero pueden extenderse hasta diciembre. Por otra parte, Quiroz-Rocha (1992) en Nayarit, reportó que de diciembre a enero los machos de *P. pansa* están en etapas

mayormente inmaduras. Dado que *P. pansa* es un organismo con desarrollo gonádico asincrónico, es común encontrar distintos estadios gonadales, pero con predominancia de uno sobre los demás. Así, en este estudio se encontró evidencia de machos en etapa de madurez en los meses de octubre y noviembre, aunque se ha reportado que estos estadios predominan de agosto a septiembre. Acevedo-García *et al.* (1993) de igual modo observaron que las hembras de más de 20 mm ponen cápsulas ovígeras entre diciembre y septiembre. Sin embargo, en los muestreos de campo y los monitoreos mensuales realizados en este estudio no se observaron puestas de cápsulas ovígeras en ninguno de los sitios evaluados, aunque sí se observaron cópulas entre diciembre y febrero, lo que podría indicar un desfase estacional en las zonas costeras de Mazatlán.

Este es el segundo trabajo que aborda la estructura histológica gonadal de *P. pansa* en Mazatlán, Sinaloa. El primero fue realizado entre 1993 y 1995 por González-Flores (1997), en los sitios de Paseo del Centenario, Isla Pájaros y Punta Cerritos, observándose madurez entre marzo y julio, la etapa de desove entre mayo y julio, el proceso de reposo o reabsorción durante septiembre y octubre y la etapa de proliferación durante todo el año.

En base a lo reportado en este estudio se considera que el hecho de que en Cerro del Vigía se haya observado una predominancia del estadio de proliferación en hembras, aunado a la proporción sexual H:M 6:1 y un imposex del 17%, con antecedentes previos de H:M 1.1:1 y un imposex del 28% en esta zona reportado por Domínguez-Ojeda (2015), un coeficiente de variación del 62% en relación al peso y un 20.91% respecto a su longitud, sugiere que la población de Cerro del Vigía está siendo afectada por algún evento presumiblemente antropogénico, que provoca que gran parte de las hembras del sitio tengan alteraciones histológicas evidentes, como folículos rotos, infiltración celular visible y tejido conectivo laxo deforme, lo que implicaría una baja tasa de hembras en etapa de maduración y por ende una disminución en la población a lo largo del tiempo. Además, el hecho de la alta variación en el peso, y no así en las tallas, también sugiere que las hembras ocupan sus reservas energéticas para producir gametos, sacrificando crecimiento, lo que fortalece la hipótesis de que esta población en particular está bajo eventos antropogénicos que ponen en riesgo la sobrevivencia de la especie en la zona. Sin embargo, para corroborar esta hipótesis es necesario realizar estudios eco toxicológicos más profundos.

8.2.3. Caracterización Molecular

El ácido retinoico (RA) desempeña funciones importantes en la proliferación, diferenciación y desarrollo de células en vertebrados (Ross et al., 2000), tiene efectos pleiotrópicos (fenómeno por el cual un solo gen es responsable de efectos fenotípicos o caracteres distintos y no relacionados), a través de dos clases de receptores nucleares, receptor de ácido retinoico (RAR) y el receptor X retinoide (RXR) (Blumberg *et al.*, 1997; Chambon, 1996).

RAR se activa mediante el ácido todo-trans-retinoico (ATRA) y el ácido 9-cis-retinoico (9cRA) heterodimerizados con RXR, mientras que RXR sólo se activa con 9cRA (Bastien y Rochette-Egly, 2004). En vertebrados, se han reportado tres isoformas de RAR α , β , γ y tres isoformas de RXR α , β , γ .

La caracterización de RXR en gasterópodos marinos es aún limitada, pero los estudios realizados sugieren que especies de esta familia de muricidos presentan 2 isoformas, que difieren en una inserción o delección de cinco aminoácidos. Actualmente existen reportadas en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI), dos isoformas de (RXR) obtenidas de tres especies de gasterópodos marinos *Thais clavigera* ((TcRXR1 y TcRXR2) Urushitani et al., (2011), *Nucella lapillus* (NIRXRa y NIRXRb) Castro et al., (2007) y *Babylonia japonica* (BjRXR1 y BjRXR2) Urushitani et al., (2018). En este estudio se lograron identificar dos ADNc que codifican el RXR de *P. pansa* denominados como isoforma 1 (Pp-RXR1) obtenidas de hembras morfológicamente normales y trasplantadas y la isoforma 2 (Pp-RXR2) obtenidas de una hembra morfológicamente normal colectada del sitio de Cerro del Vigía y de una hembra trasplantada de Mármol. Ambas isoformas tienen una alta similitud con las reportadas en otros gasterópodos marinos.

Nuestros resultados sugieren que las isoformas encontradas en este estudio podrían ocurrir por splicing alternativo en la T-box, como se ha reportado en *Nucella lapillus* y *Thais clavigera* (Castro *et al.*, 2007; Urushitani et al., 2011; Urushitani *et al.*, 2018). En *Thais clavigera* la isoforma 2 (TcRXR2) tiene una inserción de 5 aminoácidos y presenta menor actividad en comparación con la isoforma 1 (TcRXR1). Se conoce que la T-box es esencial para la formación del complejo homodímero RXR en repeticiones directas (DR1), en la formación de otros complejos heterodímeros e influye en la respuesta hormonal en interacciones con RXR (Rastinejad *et al.*,

2000; Zhao *et al.*, 2000). El análisis filogenético mostró que los homólogos de RXR forman un grupo monofilético agrupadas en racimos, donde las isoformas de *P. pansa* están más relacionadas a las de *Thais clavigera* y las isoformas de *Nucella lapillus* muestran mayor distancia genética entre las especies evaluadas.

La Pp-RXR -1 tiene una secuencia parcial de 299 aminoácidos. Es una secuencia más corta en comparación con TcRXR1 con 442, NIRXRa con 441 y BjRXR1 con 442 aminoácidos, Urushitani *et al.* (2011) observó en *Thais clavigera* que la inducción de la actividad transcripcional de TcRXR1 es causada por 9-cis ácido retinoico (9cRA), cloruro de tributilestaño (TBTCl) y cloruro de trifenil estaño (TPTCl), pero no por el ácido docosaheptaenoico (DHA), un ligando natural en los mamíferos (Ulven *et al.*, 2001; Werner y De Luca, 2001).

La Pp-RXR2 tiene una secuencia parcial de 304 aminoácidos, diferente a lo reportado en TcRXR1 con 447 y NcRXR2 con 446; sin embargo, todas tienen una inserción de 5 aminoácidos adicionales. Nishikawa *et al.* (2004) y Urushitani *et al.* (2011) reportan la transcripción dependiente de 9-cis ácido retinoico (9cRA), donde TcRXR2 produce una proteína con cinco aminoácidos adicionales y ésta era expresada en menor medida que TcRXR1; pero cuando TcRXR2 está sobre expresada, TcRXR1 disminuye su transcripción. Se ha observado que esta inserción de aminoácidos provoca un cambio en la capacidad de respuesta del receptor de la ecdisona (EcR) en el cangrejo violinista (Hopkins *et al.*, 2008) y en el camarón los patrones de expresión de las isoformas de RXR difieren a lo largo del ciclo de muda dependiendo de la presencia o ausencia de los cinco aminoácidos en la T-box (Priya *et al.*, 2009). En *Nucella lapillus* se midió la expresión basal de RXR en varios tejidos, demostrando que RXR se expresa de forma ubicua en tejidos de moluscos, con los niveles de expresión más altos registrados en gónadas femeninas y masculinas (Castro *et al.*, 2007)

Urushitani *et al.*, (2018) aisló dos ADNc de RXR en *Babylonia japonica* y comparó la transcripción con las isoformas reportadas en *Thais clavigera* y *Nucella lapillus*, encontró que todas las isoformas de RXR fueron inducidas significativamente por el agonista de RXR de mamíferos, ácido 9-cis retinoico (9cRA). Además, observó que al utilizar elementos de respuesta a ácido retinoico X (RXRE) y elementos responsivos de la hormona tiroidea (TRE_{pal}), las actividades transcripcionales de las isoformas RXR de las tres especies de gasterópodos (TcRXR-1, BjRXR-1 y NIRXRa), fueron inducidas significativamente por 9cRA y 4 compuestos organoestañosos (TBT, TPhT, TPrT, y TcHT) y que las actividades transcripcionales de TcRXR-1, BjRXR-1 y NIRXRa fueron suprimidas significativamente por el antagonista de RXR, HX531, implicando que

las isoformas de RXR de gasterópodos podrían regular la transcripción del gen formando un complejo heterodímero con otros receptores nucleares desconocidos.

En este estudio se caracterizaron los dominios teóricos de RXR para las dos isoformas encontradas de *P. pansa*. Los resultados indican que ambas isoformas presentan los mismos dominios, identificándose el perfil de dos dominios de receptores nucleares de hormonas de unión a ADN. Estos son factores de transcripción que regulan la expresión génica al interactuar con secuencias de ADN específicas en sentido ascendente de sus genes diana. En vertebrados, se sabe regulan diversos procesos biológicos (Evans, 1988; Stunnenberg 1993; Laudet y Gronemeyer, 2002). También se encontraron receptores nucleares tipo 4 con dedos de zinc (ZN_FING: NR C4). Los dedos de zinc son diversos y tienen diversas funciones, desde la unión de ADN o ARN a interacciones proteína-proteína y asociación de membrana, los de tipo C4 tienen 4 residuos de cisteína que coordinan el zinc y no comparten una similitud de secuencia adicional; se encuentran dentro de las regiones de unión al ADN de algunas familias de receptores nucleares bien caracterizadas.

8.3. Exposición de Hembras Morfológicamente Normales en Sitios Seleccionados de la Zona Costera de Mazatlán.

8.3.1. Resultados del Experimento de Trasplante

Los gasterópodos marinos se han utilizado ampliamente como bioindicadores de contaminación en experimentos de trasplante en investigaciones eco toxicológicas (Rodríguez et al., 2010; Ho et al., 2016b) y el fenómeno de imposex es uno de los más estudiados, considerado el mejor indicador biológico de la contaminación por TBT en aguas marinas (Svavarsson et al., 2001). Debido a la alta sensibilidad en algunas especies de gasterópodos marinos

Diversas especies de gasterópodos marinos han sido utilizadas como modelo de estudio en experimentos de trasplante para estudiar el imposex en zonas costeras, *Nassarius reticulatus* (Rodríguez et al., 2010); *Nucella lapillus* (Quintela et al., 2000; Giltrap et al., 2009); *Hexaplex*

trunculus (Lahbib *et al.*, 2008); *Thais clavigera* (Shim *et al.*, 2000; Chan *et al.*, 2008); *Buccinum undatum* (Svavarsson *et al.*, 2001); *Thais orbita* (Foale, 1993; Gibson y Wilson, 2003); *Thais distinguenda* (Bech *et al.*, 2002); *Lepsiella scobina* y *Lepsiella albomarginata* (Smith y McVeagh, 1991) y *Nassarius obsoletus* (Jenner, 1979).

Es necesario investigar si el enfoque de trasplante es útil con otras especies, con una distribución latitudinal más amplia dado que existe evidencia de que muchas de las especies de gasterópodos marinos modelo utilizadas en Europa están ausentes en otras zonas costeras Rodríguez *et al.* (2010) El objetivo de esta parte del trabajo fue evaluar si hembras morfológicamente normales de *P. pansa* desarrollaban imposex al ser trasplantadas de un sitio con baja incidencia de imposex a sitios seleccionados de la zona costera de Mazatlán con evidencia de imposex.

Existen evidencias que en condiciones controladas de laboratorio se puede inducir imposex en *P. pansa* a concentraciones de 10 µg Sn/L de TBTCI durante dos meses de exposición (Domínguez-Ojeda *et al.*, 2014) y en otras especies como *Nucella lapillus*, *Thais clavigera*, *Hexaplex trunculus* y *Bolinus brandaris* se ha observado que lo desarrollan en periodos de entre dos y tres meses a concentraciones de 5 a 50 ng TBT L⁻¹ (Santos *et al.*, 2005; Horiguchi *et al.*, 2010; Abidli *et al.*, 2012).

En experimentos de trasplante lado existen controversias respecto al tiempo de exposición necesario para que un organismo trasplantado desarrolle imposex, en algunos experimentos se han obtenido resultados en el primer mes, por ejemplo *Nassarius reticulatus* y *Stramonita haemastoma* desarrollaron imposex desde los primeros 15 días y posteriormente a los 56, 75 y 90 días con concentraciones de 203–571 ng g⁻¹ de TBT en sedimento expresado en Estaño (Sn) (Rodríguez *et al.*, 2010; Rossato *et al.*, 2014). Sin embargo, existen otras investigaciones donde parecen no ser suficientes de tres a cinco meses de trasplante para observar imposex, como es el caso de *Thais Orbita* (Foale, 1993), *Nucella. lapillus* (Quintela *et al.*, 2000) y *Thais clavigera* (Chan *et al.*, 2008). El presente estudio demostró que tres meses no son suficientes para detectar imposex hembras morfológicamente normales de *P. pansa* trasplantadas de un sitio no impactado a dos sitios con evidencia de imposex. En este sentido es posible que el tiempo de exposición fue insuficiente para la especie y para comprender mejor las variables ambientales de la zona y la posible fuente de contaminación, se debe de extender la duración de los experimentos de trasplante; Ho *et al.*, (2016) señala que un año sería suficiente para obtener resultados confiables.

Por otro lado, de acuerdo a la evaluación preliminar de imposex en las zonas costeras evaluadas en

este estudio y con los resultados del experimento de trasplante obtenidos posteriormente, basados en la clasificación OSPAR (2005) y HELCOM (2018) las características del imposex encontradas en *P. pansa* no representan un riesgo para la especie, además de indicar baja contaminación de TBT en la zona. Sin embargo, es importante recalcar que *P. pansa* no es una especie modelo utilizada por estos organismos internacionales y no se cuenta aún con indicadores confiables para esta especie, por lo que estos resultados basados en OSPAR y HELCOM deben tomarse con prudencia hasta adecuar un protocolo para esta especie.

8.3.2. Caracterización Histológica de Hembras Trasplantadas

Los resultados del experimento de trasplante en hembras morfológicamente normales de *P. pansa* no mostraron presencia de imposex durante tres meses de exposición en los sitios Mármol y Cerro del Vigía, infiriendo que existe una baja contaminación de TBT y que esta no representa un riesgo para la especie, si bien estos resultados indican una conclusión ecológicamente favorable para las zonas costeras evaluadas, los análisis histológicos de las hembras expuestas sugieren algo diferente. El análisis histológico arrojó resultados interesantes, todas las hembras morfológicamente normales trasplantadas mostraron alteraciones histológicas muy marcadas y similares en los sitios Mármol y Cerro del Vigía en comparación con las hembras trasplantadas en Las Labradas utilizadas como control. Las hembras trasplantadas de Mármol y Cerro del Vigía presentaron en su mayoría una fragmentación de los folículos, observándose una infiltración del medio extracelular hacia el interior, una desorganización de ovocitos vitelogenicos y previtelogenicos, además de grandes zonas de absorción de estos, estos resultados son similares a lo reportado en otras especies; Sant'Anna *et al.*, (2012) encontró alteraciones histológicas similares en hembras del cangrejo ermitaño *Clibanarius vittatus* al exponerlas durante nueve meses a concentraciones de 180 ng Sn/g TBT/día, por su parte Revathi *et al.*, (2013) observó afectaciones en el desarrollo ovárico, una disminución en el diámetro de los ovocitos, daño en el hepatopáncreas y abundancia de ovocitos inmaduros en el camarón de río *Macrobrachium rosenbergii* a concentraciones de TBT de 10, 100 y 1000 ng/l durante tres meses, similar a los resultados obtenidos en nuestro estudio en donde predominaron estadios inmaduros en la mayoría de las hembras colectadas de los sitios con alto

imposex y de las hembras trasplantadas. En el caso de gasterópodos marinos se ha observado que en *Thais sp.* con imposex en etapa 2, el tejido gonadal no desarrolla algún tipo de alteración histológica y en las etapas 3 y 4 se ha observado apoptosis celular en los ovarios, en donde el daño se incrementa en relación al estadio de imposex encontrado (Mohamat *et al.*, 2014).

Si bien existe evidencia de alteraciones histológicas provocadas por la exposición de TBT en diversas especies, en este trabajo no se pudo relacionar la presencia de imposex con TBT en la zona y las alteraciones histológicas encontradas en hembras trasplantadas. Existen investigaciones que arrojan resultados similares, Rumampuk *et al.* (2018) encontró daño gonadal, encogimiento de ovocitos, apoptosis y picnosis en gónada de *Thalessa aculeata*, sin embargo, no hubo una correlación entre el daño histológico y la presencia de TBT en la zona, aunque sí evidencia de imposex, por otra parte Peralta *et al.* (2014) no encontró daño de tejido gonadal a concentraciones de TBT de 3.9 ngSn/g en *Voluta musica* pero si imposex de 24 y 12% en algunas zonas evaluadas. Diversos autores atribuyen daños histológicos severos a la presencia de metales pesados en el medio, Rodríguez *et al.* (2000), Guzmán-García *et al.* (2009) Revathi *et al.* (2011) han encontrado alteraciones histológicas graves en tracto digestivo, divertículo digestivo, gónada, tejido conectivo y necrosis en *Macrobrachium rosenbergii*, *Uca pugilator* y *Crassostrea virginica* causado por Cadmio, Plomo y Cromo en el ambiente, con similitudes en lo encontrado en *Plicopurpura pansa* en este estudio. Por otro lado, se conocen los efectos sobre ovocitos y lesiones ováricas de los hidrocarburos policíclicos aromáticos en diversas especies *Mytilus edulis*, *Littorina littorea* y *Psammechinus miliaris* (Aarab *et al.*, 2004; Cajaraville *et al.*, 1990; Schäfer *et al.*, 2009). Lo que sugiere la posibilidad de que el imposex y las alteraciones histológicas sean eventos independientes y se deban a presencia de metales pesados o hidrocarburos policíclicos aromáticos, principalmente en la zona del Cerro del Vigía que es el sitio con mayor presión antropogénica. Es necesario determinar las causas del imposex en los sitios Mármol y Cerro del Vigía y determinar si el imposex es causado por compuestos organoestañosos o está asociado a otro tipo de contaminantes en la zona.

8.3.3. Expresión de RXR en Hembras Trasplantadas

El papel de RXR en el desarrollo de imposex en gasterópodos marinos ha sido estudiado

ampliamente a lo largo de los años, la mayoría de estos estudios se han enfocado en experimentos controlados en laboratorio, induciendo el imposex con TBT, ácido retinoico 9-cis, ácido metopreno o testosterona, observando que en hembras con imposex la expresión de RXR era similar a la de los machos y menor en hembras normales (Mark et al., 2006; Horiguchi *et al.*, 2007, 2010; Nishikawa *et al.*, 2004; Pascoal *et al.* 2013 y Giraud-Billoud *et al.*, 2019) soportando la hipótesis de que RXR estaría involucrado en el desarrollo de imposex inducido por compuestos organoestañosos.

En este estudio la expresión de RXR en gónada de *P. pansa* fue variable, se observó expresión de RXR en los tres sitios evaluados incluidos el sitio control, con una incidencia de 40% en Las labradas, 75% en Mármol y 20% en el Cerro del Vigía, lo que sugiere que en estos sitios existe algún evento que esté activando a RXR, aunque esto por sí solo no indica desarrollo de imposex. Los muestreos preliminares de los sitios Cerro del Vigía y Mármol demostraron una alta incidencia de imposex en la zona. Sin embargo, se esperaría que los sitios identificados con mayor incidencia de imposex presentaran una mayor incidencia en la expresión de RXR, como lo señalan otros autores (Nishikawa et al., 2004; Castro *et al.*, 2007; Horiguchi *et al.*, 2010). Esto puede deberse a diversos efectores biológicos y ambientales que no pudieron ser medidos o identificados debido a la complejidad que representa un experimento de campo, sin embargo existen reportes de que el grado de severidad de imposex está relacionado al incremento en la expresión de RXR; Lima *et al.* (2011) observó en hembras de *Nucella lapillus* con un índice de vaso deferente (VDS) de 3 y 4 un aumento en la transcripción de RXR similar al de los machos en comparación con hembras menos afectadas con un VDS de 1 y 2 y sugiere que RXR presenta un papel funcional en el pene de machos y hembras con imposex.

Por otra parte Giraud-Billoud *et al.* (2019) indujo imposex en *Pomacea canaliculata* un molusco que en hembras presenta un primordio de pene, utilizó TBT, ácido retinoico 9-cis y TPT a concentraciones de entre 1 y 2 $\mu\text{g/g}$ durante cuatro meses, encontrando que la edad de la hembra puede influir en el desarrollo y crecimiento del aparato copulador, observando que hembras de entre 7 y 8 meses tendían a incrementar la longitud del pene en comparación con hembras más jóvenes de entre 4 y 5 meses de edad, aunque estos cambios no indujeron ningún cambio en la expresión de RXR.

Se ha demostrado que RXR interactúa con el receptor activado por proliferador de peroxisoma (PPAR) y una variedad de otros receptores nucleares como el del ácido retinoico (RAR), que

incluye la dimerización, la transactivación, las acciones sinérgicas entre sus vías de señalización las cuales son esenciales para la regulación, el mantenimiento de las funciones biológicas y son objetivos de compuestos antropogénicos (Brtko y Dvorak, 2015; André *et al.*, 2019). RXR está involucrado en la etapa de reproducción tanto en vertebrados (Durica *et al.*, 2002) como en invertebrados como *Ilyanassa obsoleta* y *Nucella lapillus* con una correlación entre el grado de maduración de la gónada y la disminución en la expresión de RXR en animales silvestres (Sternberg *et al.*, 2008b).

Todo esto implica que la expresión de RXR por sí sola no es suficiente para asociarlo directamente a la presencia de TBT en el medio y mucho menos al imposex en gasterópodos marinos en experimentos de campo, en donde RXR puede dimerizar con cualquier otro agonista natural o sintético lo que implicaría a su vez diferencias en la expresión y podría generar resultados aparentemente contradictorios.

8.4. Afectación en Cópula en la Conducta Reproductiva por Imposex

En este objetivo se investigó si el imposex acarrea problemas reproductivos en hembras de *P. pansa* y si además existía alguna variación entre sitios, realizando un seguimiento de video continuo durante tres meses.

La temporada de cópulas de *P. pansa* se presenta durante todo el año, con picos máximos en los primeros meses del año y está relacionada a la baja en las temperaturas (Acevedo, 1995; Morfin *et al.*, 2002; Flores-Garza *et al.*, 2007, 2012) en este estudio se utilizó una temperatura de 28 °C, alimentación a saciedad y recambio de agua constante, similar a los trabajos realizados con *P. pansa* por (Morfín *et al.*, 2002; Ramírez-Rodríguez *et al.*, 2003; Domínguez-Ojeda *et al.*, 2009) por lo que se puede considerar que las condiciones de laboratorio fueron óptimas para realizar el proceso de cópula y por lo tanto la ausencia, disminución de frecuencia y duración de cópulas en hembras con imposex de *P. pansa* se puede atribuir al imposex.

Los resultados obtenidos en este estudio indican que las hembras con imposex de *P. pansa* colectadas de los distintos sitios evaluados no presentaban un vaso deferente visible y solo se ha reportado un vaso deferente no desarrollado a través de cortes histológicos por Domínguez-Ojeda

et al., (2014), lo que indica en principio que el riesgo de que el oviducto se bloquee por la presencia de un vaso deferente es poco probable en esta especie y no afecta su capacidad reproductiva.

La duración y el número de cópulas fue muy diferente entre las hembras con y sin imposex, observando que una hembra sin imposex podía durar hasta 48 hrs en cópula en comparación con una hembra con imposex que solo permanecía en cópula por entre 3 y 5 horas, en el caso de Las Labradas la hembras sin imposex presentaron entre el 33 y 22% de actividad diaria de cópulas en comparación con las hembras del mismo sitio en las que no se observó ninguna cópula durante la duración del experimento, en el caso de Mármol y Cerro del Vigía presentaron entre el 11 y 66 % mayor actividad de cópula en las hembras sin imposex en comparación con las hembras con imposex en donde solo se observaron 2 cópulas en enero en ambos sitios. Estos resultados sobre el tiempo de duración de cópula en *P. pansa* difieren de lo reportado en otras especies de gasterópodos como en el caso de *Pomacea canaliculata* con una duración media de 7.98 hr y prefiere la noche para iniciar el proceso de copulación y en *Pomacea maculata* se ha reportado su duración media es de entre 9 y 13.3 hr y se ha observado copular tanto de día como de noche (Burela & Martín 2005; Gilal *et al.*, 2015) y de *Viviparus ater* que el tiempo máximo registrado fue de 2.5 hr (Staub & Ribí 1995), en el caso de *P. pansa* parece preferir el día para iniciar el proceso de apareamiento y la cópula, diversos autores plantean que la duración de la cópula está relacionada a la transferencia de espermatozoides suficiente y se requiere un mínimo de 20% del tiempo de copulación para un contacto genital adecuado entre los caracoles macho y hembra (Burela & Martín 2010) además, se ha reportado que durante la cópula no solo se transfieren espermatozoides, sino también nutrientes del macho a la hembra durante o directamente después del apareamiento o la cópula denominada como “alimentación nupcial” (Vahed, 1998) a través de los conductos seminales del macho (Andersson, 1994; Vahed, 1998) por lo que en *P. pansa* podría inferirse que hembras con imposex la cantidad de espermatozoides transferida podría no ser suficiente al tener una duración mucho menor al de hembras morfológicamente normales y en el caso de “alimentación nupcial” no se puede asegurar que ocurra en esta especie por lo que podría ser motivo de estudios posteriores.

Se obtuvieron datos relevantes sobre el comportamiento de *P. pansa* con respecto a su alimentación, observando que prefiere las presas vivas, en este estudio se alimentó con lapas y quitones colectados de las zonas de estudio, se logró identificar la preferencia nocturna de *P. pansa* para alimentarse y desplazarse, de hecho durante el día no se observó movimiento en el acuario y

solo mantuvo agregado junto a otros caracoles de la misma especie, en principio realiza un reconocimiento por el sitio, desplazándose a lo largo y ancho del acuario el cual puede durar varias horas, esto podría explicarse por el instinto depredador de la especie. Hughes & Dunkin (1984) observaron que *Nucella lapillus* requería de alrededor de dos horas para evaluar a la presa y tendían a descartarla si esta era demasiado grande, en *P. pansa* por el contrario se observó que en presas grandes como quitones varios caracoles rodeaban a la presa a la vez hasta devorarla por completo. Otro dato relevante es que tanto en hembras con y sin imposex el instinto voraz no parece haber sido afectado, ya que consumían la misma cantidad de alimento por día.

En otro contexto, se conoce que el receptor nuclear de retinoides (RXR) está involucrado en los procesos reproductivos y en el desarrollo de los órganos sexuales de los gasterópodos (Nishikawa *et al.*, 2004; Pascoal *et al.*, 2013). Por lo que cambios en la expresión de RXR en hembras con imposex, podrían influir en algunos cambios conductuales en las hembras masculinizadas, Giraud-Billoud *et al.* (2019) plantea el hecho de que los mecanismos moleculares fundamentales de RXR podrían encontrarse en los órganos sexuales, por lo que una alteración molecular, también podría influir en su fisiología y conducta, como lo observado en *P. pansa*.

9. CONCLUSIÓN

Las conclusiones se presentan en base a los objetivos establecidos en este trabajo.

Diagnóstico:

9.1. Incidencia de Imposex en el Gasterópodo Marino *Plicopurpura pansa* en Diferentes Localidades Costeras del Municipio de Mazatlán, Sinaloa.

Se determinó la incidencia de imposex en *P. pansa* en cuatro localidades costeras de Mazatlán Sinaloa entre octubre y noviembre de 2017 obteniendo los siguientes resultados:

Las Labradas: 3.33%, Mármol: 12.50%, Cerro del Vigía: 16.82% y Escolleras: 11.67%.

De acuerdo con las clasificaciones vigentes de imposex utilizadas por OSPAR (2005) las características del imposex encontrado en *P. pansa* en las cuatro localidades costeras evaluadas estaría en categoría A, indicando que no representa un peligro para la especie y para la zona, en relación a la posible evidencia de TBT en las zonas y se encontraría clasificado en la etapa 1 de imposex bajo la clasificación de HELCOM (2018), lo que indica baja contaminación de TBT en la zona.

9.2. Identificar las Posibles Afectaciones del Imposex Mediante la Caracterización Morfológica, Histológica y Molecular (RXR) en *Plicopurpura pansa*.

9.2.1 Caracterización Morfológica

Las hembras con imposex de Cerro del Vigía, Escolleras y Mármol presentan pesos promedio mayores que las hembras morfológicamente normales, en el caso del sitio Las Labradas las

hembras con imposex presentaron tallas promedio menores que las hembras morfológicamente normales.

La proporción sexual encontrada en este estudio corresponde en general a lo reportado en la literatura para la especie. Sin embargo, nuestros resultados también sugieren un cambio en la proporción sexual de *P. pansa* en los últimos 8 años, disminuyendo la población de hembras y este puede tener relación con el imposex.

El imposex desarrollado en hembras de Las Labradas y el encontrado en hembras de Cerro del Vigía y Mármol, presentan diferencias entre los parámetros morfológicos evaluados, lo que sugiere que los eventos de imposex son causados por factores antropogénicos diferentes.

9.2.2. Caracterización Histológica

En machos se identificaron 3 etapas gonadales: Etapa temprana, etapa de proliferación y etapa de maduración.

En hembras se identificaron 2 etapas gonadales: Etapa de proliferación y etapa de desove.

Las hembras con imposex presentan alteraciones histológicas, infiltración celular, fragmentación del folículo, alteraciones en la forma y consistencia en las trabéculas de tejido conectivo, carencia en algunos casos de tejido germinativo, predominancia de estadios inmaduros y aparente variación en el tamaño de los ovocitos.

9.2.3. Caracterización Molecular

Se encontraron 2 isoformas de RXR en *Plicopurpura pansa*.

La isoforma 1 contiene seis polimorfismos en los nucleótidos 181, 202, 364, 757, 769 y 877.

La isoforma 2 contiene un polimorfismo en el nucleótido 54, una inserción de 15 pb en el nucleótido 460.

La isoforma 2 contiene 5 aminoácidos más que la isoforma 1, aunque ambas isoformas codifican

para la misma proteína.

Trasplante:

9.3. Demostrar Experimentalmente si la Exposición en Diferentes Sitios de la Zona Costera de Mazatlán Producen Imposex.

En base a los resultados obtenidos se puede concluir lo siguiente:

9.3.1. Experimento de Trasplante

P. pansa no desarrolló imposex en tres meses de exposición en los sitios Mármol y Cerro del Vigía, lo que indica una baja concentración de TBT en los sitios y/o una alta tolerancia de la especie. Es necesario considerar la capacidad de desplazamiento, pérdida y mortalidad de *P. pansa* para experimentos posteriores, además de usar técnicas de marcaje que soporten las condiciones ambientales de la zona intermareal rocosa.

9.3.2. Caracterización Histológica de Hembras Trasplantadas

Todas las hembras trasplantadas en los sitios Mármol y Cerro del Vigía presentaban alteraciones histológicas severas, similar a lo encontrado en la histología de hembras con imposex: infiltración celular, fragmentación del folículo, alteraciones en la forma y consistencia en las trabéculas de tejido conectivo, carencia en algunos casos de tejido germinativo, predominancia de estadios inmaduros y aparente variación en el tamaño de los ovocitos.

9.3.3. Expresión de RXR en Hembras Trasplantadas

La variabilidad en la expresión de RXR observada en machos, hembras morfológicamente normales y hembras con imposex, implica que la sola expresión de RXR no es suficiente para determinar la relación entre imposex y la presencia de compuestos organoestañosos, debido a la capacidad de RXR para dimerizar con múltiples compuestos naturales y sintéticos, además de estar implicado en etapas reproductivas, lo que conlleva a variabilidad en la expresión de RXR y una posible interpretación errónea en los resultados.

Reproducción:

9.4. Determinar si Hembras de *Plicopurpura pansa* Presentan Afectaciones en Cópula Cuando Desarrollan Imposex.

En base a los datos recabados durante el experimento de reproducción en laboratorio se puede concluir lo siguiente:

Las hembras con imposex conservan la capacidad de copular, pero disminuye su duración y frecuencia en relación a hembras morfológicamente normales.

Las hembras con y sin imposex presentan la misma voracidad en relación a la cantidad y tiempo en el que consume sus presas.

Las hembras con imposex presentan menor capacidad de desplazamiento que las hembras morfológicamente normales.

10. REFERENCIAS

- Abidli, S., Santos, M. M., Lahbib, Y., Castro, L. F. C., Reis-Henriques, M. A., & El Menif, N. T. (2012). Tributyltin (TBT) effects on *Hexaplex trunculus* and *Bolinus brandaris* (Gastropoda: Muricidae): imposex induction and sex hormone levels insights. *Ecological Indicators*, *13*(1), 13-21.
- Abott, R. T. (1974). *American Seashells; The Marine Molluska of the Atlantic and Pacific Coasts of North America* (No. Edn 2). Van Nostrand Reinhold.
- Acevedo, J., Escalante, M., & López, C. (1990). Aspectos poblacionales del caracol de tinte *Purpura pansa* Gould, 1853 en las costas de Nayarit. *Inter UAS*, *1*(1), 18-22.
- Acevedo, J., & Escalante, M. A. (1993). Análisis de la población de *Purpura pansa* en la costa de Sinaloa. In *Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, Sociedad Mexicana de Zoología. XII del Congreso Nacional de Zoología, Resúmenes. San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México* (Vol. 31).
- Acevedo-García, J., Escalante-Cavazos, M. A., & Turok-Wallace, M. (1993). El caracol púrpura. Su uso y manejo en México. *Resumen. III. Reunión Nacional para el Estudio del Caracol Púrpura Plicopurpura pansa. Universidad Autónoma de Nuevo León, México*.
- Acevedo, J., & Hernández, C. (1988). *Aspectos poblacionales y etnobiológicos del caracol Purpura pansa Gould, 1853 en la costa de Oaxaca* (Tesis de licenciatura). Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. 147 p.
- Acevedo, G. J., & Turok, M. (2000). Plan de Manejo para el aprovechamiento del caracol púrpura (*Plicopurpura pansa*) en la costa de Oaxaca. Informe técnico, AMACUP-CRIP-Pátzcuaro, Michoacán, México.
- Acevedo, J., M. A. Escalante & M. Turok. 1996. El caracol Púrpura. p. 1071-1100. In *Pesquerías Relevantes de México. XXX Aniversario del Instituto Nacional de la Pesca. 1962-1992. Secretaría del Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca. México DF*.
- Acuerdo del Acuífero Río Quelite, clave 2508. Diario Oficial de la Federación, 21 de octubre de 2015.
- Aizieu, C. (1986, September). TBT detrimental effects on oyster culture in France-evolution since antifouling paint regulation. In *OCEANS'86* (pp. 1130-1134). IEEE.
- André, A., Ruivo, R., Fonseca, E., Froufe, E., Castro, L. F. C., & Santos, M. M. (2019). The retinoic acid receptor (RAR) in molluscs: Function, evolution and endocrine disruption insights. *Aquatic Toxicology*, *208*, 80-89.
- Arrighetti, F., & Penchaszadeh, P. E. (2010). Gametogenesis, seasonal reproduction and imposex of *Adelomelon beckii* (Neogastropoda: Volutidae) in Mar del Plata, Argentina. *Aquatic Biology*, *9*(1), 63-75.
- Ayari, T., Bierne, N., & El Menif, N. T. (2018). Imposex incidence in *Stramonita haemastoma* (Gastropoda: Muricidae) from the Mediterranean and Atlantic coast after tributyltin global ban. *Journal of sea research*, *134*, 10-15.

- Barreiro, R., Quintela, M., & Ruiz, J. M. (2004). TBT e imposex en Galicia: los efectos de un disruptor endócrino en poblaciones de gasterópodos marinos. *Revista Ecosistemas*, 13(3).
- Bastien, J., & Rochette-Egly, C. (2004). Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes. *Gene*, 328, 1-16.
- Becerra, D. *Algunos parámetros poblacionales del caracol Purpura pansa y su fauna asociada en la Isla Isabel, Nayarit, México.* (Tesis Licenciatura. Facultad de Ingeniería Pesquera UAN). 2000.140 pp.
- Bech, M. (2002). A survey of imposex in muricids from 1996 to 2000 and identification of optimal indicators of tributyltin contamination along the east coast of Phuket Island, Thailand. *Marine Pollution Bulletin*, 44(9), 887-896.
- Bech, M., Strand, J., & Jacobsen, J. A. (2002). Development of imposex and accumulation of butyltin in the tropical muricid *Thais distinguenda* transplanted to a TBT contaminated site. *Environmental Pollution*, 119(2), 253-260.
- Bell, T. A., & Lightner, D. V. (1988). *A handbook of normal penaeid shrimp histology* (No. 595.3843 B4).
- Bighiu, M. A., Watermann, B., Guo, X., Almroth, B. C., & Eriksson-Wiklund, A. K. (2017). Mortality and histopathological effects in harbour-transplanted snails with different exposure histories. *Aquatic toxicology*, 190, 11-20.
- Blaber, S. J. (1970). The occurrence of a penis-like outgrowth behind the right tentacle in spent females of *Nucella lapillus* (L.). *Journal of Molluscan Studies*, 39(2-3), 231-233
- Blackmore, G. (2000). Imposex in *Thais clavigera* (Neogastropoda) as an indicator of TBT (tributyltin) bioavailability in coastal waters of Hong Kong. *Journal of Molluscan Studies*, 66(1), 1-8.
- Blumberg, B., Bolado, J., Moreno, T. A., Kintner, C., Evans, R. M., & Papalopulu, N. (1997). An essential role for retinoid signaling in anteroposterior neural patterning. *Development*, 124(2), 373-379.
- Broséus, R., Vincent, S., Aboufadel, K., Daneshvar, A., Sauvé, S., Barbeau, B., & Prévost, M. (2009). Ozone oxidation of pharmaceuticals, endocrine disruptors and pesticides during drinking water treatment. *Water research*, 43(18), 4707-4717.
- Bryan, G. W., Gibbs, P. E., Hummerstone, L. G., & Burt, G. R. (1986). The decline of the gastropod *Nucella lapillus* around south-west England: evidence for the effect of tributyltin from antifouling paints. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 66(3), 611-640.
- Bryan, G. W., Gibbs, P. E., Burt, G. R., & Hummerstone, L. G. (1987). The effects of tributyltin (TBT) accumulation on adult dog-whelks, *Nucella lapillus*: long-term field and laboratory experiments. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 67(3), 525-544.
- Cacciatore, F., Brusà, R. B., Noventa, S., Antonini, C., Moschino, V., Formalewicz, M. & Marin, M. G. (2018). Imposex levels and butyltin compounds (BTs) in *Hexaplex trunculus* (Linnaeus, 1758) from the northern Adriatic Sea (Italy): Ecological risk assessment before and after the ban. *Ecotoxicology and environmental safety*, 147, 688-698.

- Camino-Sánchez, F. J., Zafra-Gómez, A., Dorival-García, N., Juárez-Jiménez, B., & Vílchez, J. L. (2016). Determination of selected parabens, benzophenones, triclosan and triclocarban in agricultural soils after and before treatment with compost from sewage sludge: A lixiviation study. *Talanta*, *150*, 415-424.
- Castillo-Rodríguez, Z. G., & Amezcua-Linares, F. (1992). Biología y aprovechamiento del caracol morado *Plicopurpura pansa* (Gould, 1853) (Gastropoda: Neogastropoda) en la costa de Oaxaca, México. *In Anales del Instituto de Ciencias Del Mar y Limnología* (Vol. 19, No. 2, pp. 223-234). México: UNAM.
- Castro, L. F. C., Santos, M. M., & Reis-Henriques, M. A. (2005). The genomic environment around the Aromatase gene: evolutionary insights. *BMC evolutionary biology*, *5*(1), 43.
- Castro, L. F. C., Lima, D., Machado, A., Melo, C., Hiromori, Y., Nishikawa, J. & Santos, M. M. (2007). Imposex induction is mediated through the Retinoid X Receptor signalling pathway in the neogastropod *Nucella lapillus*. *Aquatic Toxicology*, *85*(1), 57-66.
- Ceballos, N. PUNTO MX. (24, 08,2016). Carece Mazatlán de apropiado manejo de aguas residuales: Cemaz [Comunicado de prensa]. Recuperado de: <http://punto.mx/publicacion/carece-mazatlan-de-apropiado-manejo-de-aguas-residuales-cemaz-5949>.
- Chacón, Ó., Cuevas, F., De La Fuente, C., Díaz, F., & Huaquín, L. (2007). Disrupción endocrina e imposex. *Avances en Ciencias Veterinarias*, *22*(1-2).
- Chambon, P. (1996). A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *The FASEB Journal*, *10*(9), 940-954.
- Chan, K. M., Cheung, S. G., Cai, Z., & Qiu, J. W. (2008). Sensitivity of different biological responses to accumulation and depuration of butyltins in the neogastropod *Thais clavigera*: implications for biomonitoring. *Ecotoxicology*, *17*(8), 860-868.
- Chang, H., Wan, Y., Wu, S., Fan, Z., & Hu, J. (2011). Occurrence of androgens and progestogens in wastewater treatment plants and receiving river waters: comparison to estrogens. *water research*, *45*(2), 732-740.
- Chapman, M. G. (1986). Assessment of some controls in experimental transplants of intertidal gastropods. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, *103*(1-3), 181-201.
- Cifuentes, R., González, J., Montoya, G., Jara, A., Ortíz, N., Piedra, P., & Habit, E. (2012). Relación longitud-peso y factor de condición de los peces nativos del río San Pedro (cuenca del río Valdivia, Chile). *Gayana (Concepción)*, *76*, 86-100.
- Ciocan, C. M., Cubero-Leon, E., Langston, W. J., Pope, N., Cornelius, K., Hill, E. M., Rotchell, J. M. (2015). Intersex related gene expression profiles in clams *Scrobicularia plana*: Molecular markers and environmental application. *Marine Pollution Bulletin*, *95*(2), 610-617.
- Claremont, M., Vermeij, G. J., Williams, S. T., & Reid, D. G. (2013). Global phylogeny and new classification of the Rapaninae (Gastropoda: Muricidae), dominant molluscan predators on tropical rocky seashores. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *66*(1), 91-102.
- Clench, W. J. (1947). The genera *Purpura* and *Thais* in the western Atlantic. *Johnsonia*, *2*(23), 61-91.
- Coats, W. D., & Park, M. G. (2002). Parasitism of photosynthetic dinoflagellates by three strains

- of *Amoebophrya* (dinophyta): Parasite survival, infectivity, generation time, and Host specificity. *Journal of phycology*, 38(3), 520-528.
- Consejo para el desarrollo Económico de Sinaloa. CODESIN (2017). Índice de Competitividad Global 2016-2017 vía Foro Económico Mundial. Recuperado de <http://codesin.mx/news/indice-competitividad-global2016-2017-via-foro-economico-mundial>.
- Corona Muñiz, M. (2006). Ciclo reproductivo del caracol *Purpura pansa*, Gould 1853, de la Bahía de Huatulco, Oaxaca, México (Licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Ciencias.
- Cortés-Altamirano, R., & Alonso-Rodríguez, R. (1997). Mareas rojas durante 1997 en la bahía de Mazatlán, Sinaloa, México. *Ciencias del Mar*, UAS, 15, 31-37.
- Cortés-Altamirano, R., Manrique, F. A., & Luna-Soria, R. (1995). Presencia de mareas rojas en la costa este del Golfo de California. *Rev. Lat.-Amer. Microbiol*, 37, 337-342.
- Cortés-Altamirano, R., Licea-Durán, S., & Gómez-Aguirre, S. (1999). Evidencias de aumento de microalgas nocivas en la Bahía de Mazatlán, Sin., México. In VIII Congreso Latinoamericano sobre Ciencias del Mar (COLACMAR). Libro de resúmenes ampliados (pp. 343-345).
- Cortés-Altamirano, R., & Sierra-beltrán, A. P. (2003). Morphology and taxonomy of *Prorocentrum mexicanum* and reinstatement of *Prorocentrum rathymum* (dinophyceae). *Journal of phycology*, 39(1), 221-225.
- De Castro, E., Sigrist, C. J., Gattiker, A., Bulliard, V., Langendijk-Genevaux, P. S., Gasteiger, E., & Hulo, N. (2006). ScanProsite: detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins. *Nucleic acids research*, 34(suppl_2), W362-W365.
- Derby, N. E., Hakk, H., Casey, F. X., & DeSutter, T. M. (2011). Effects of composting swine manure on nutrients and estrogens. *Soil science*, 176(2), 91-98.
- Diario Oficial (1988). Diario Oficial de la Federación. Órgano del Gobierno Constitucional de los Estados Mexicanos. Secretaría de Pesca. Marzo 30, 1988, pp. 10-12.
- Domínguez-Ojeda, D. González-Vega, H., Nieto-Navarro, J. T., Ruiz-Velazco-Arce, J. M. D. J. (2009). Aspectos biológicos de los caracoles *Plicopurpura pansa* y *Plicopurpura columellaris* mediante observaciones en condiciones de laboratorio. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 10(2).
- Domínguez-Ojeda, D., Rojas-García, A.E., Robledo-Marengo, M.L., Barrón-Vivanco, B.S., Medina-Díaz, I.M., 2014. Exposure to tributyltin chloride induces penis and vas deferens development and increases RXR expression in females of the purple snail (*Plicopurpura pansa*). *Invertebrate Survival Journal* 11, 204-212.
- Domínguez-Ojeda, D., Patrón-Soberano, O. A., Nieto-Navarro, J. T., de Lourdes Robledo-Marengo, M., & Velázquez-Fernández, J. B. (2015). Imposex in *Plicopurpura pansa* (Neogastropoda: Thaididae) in Nayarit and Sinaloa, Mexico. *Revista mexicana de biodiversidad*, 86(2), 531-534.
- Ehrhardt, N. M. (1981). Curso sobre métodos de evaluación de recursos y dinámica de poblaciones. Parámetros poblacionales. *FAO-CICIMAR*. México DF. 134 p.

- Enciso, C., Ramírez, V. M., Tirado, A. R., & Vallarta, A. (1998). Evaluación de la población y épocas de reproducción del caracol *Purpura pansa* (Gould, 1853) en Mazatlán, Sinaloa, México. (Tesis de Licenciatura). *Universidad Autónoma de Sinaloa, Sinaloa, México*. 56 p.
- Evans, S. M., Kerrigan, E., & Palmer, N. (2000). Causes of imposex in the dogwhelk *Nucella lapillus* (L.) and its use as a biological indicator of tributyltin contamination. *Marine Pollution Bulletin*, 40(3), 212-219.
- Evans, R. M. (1988). The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*, 240(4854), 889-895.
- Fan, Z., Wu, S., Chang, H., & Hu, J. (2011). Behaviors of glucocorticoids, androgens and progestogens in a municipal sewage treatment plant: comparison to estrogens. *Environmental science & technology*, 45(7), 2725-2733.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39(4), 783-791.
- Fent, K. (1996). Ecotoxicology of organotin compounds. *Critical reviews in toxicology*, 26(1), 3-117.
- Féral, C., & Le Gall, S. (1982). Induction expérimentale par un polluant marin (le tributylétain), de l'activité neuroendocrine contrôlant la morphogenèse du pénis chez les femelles d'*Ocenebra erinacea* (Mollusque, Prosobranchie gonochorique). *Comptes rendus des séances de l'Académie des Sciences. Serie III. Sciences de la Vie*. 295:627-630.
- Fioroni, P., Oehlmann, J., & Stroben, E. (1991). The pseudohermaphroditism of prosobranchs; morphological aspects. *Zoologischer Anzeiger* (1-2).
- Flores-Garza, R. (2004). *Aspectos ecológicos y parámetros poblacionales en el caracol de tinte Plicopúrpura patula pansa (GOULD, 1853), en el litoral rocoso del Estado de Guerrero, México*. (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Ciencias Biológicas).
- Flores-Garza, R., González, A. V., Flores-Rodríguez, P., García-Ibáñez, S., & Cruz-Ramírez, N. L. (2012). Density, Sex Ratio, Size, Weight, and Recruitment of *Plicopurpura pansa* (Gastropoda: Muricidae) in Costa Chica, Guerrero, México. *Open Journal of Marine Science*, 2(04), 157.
- Flores-Garza, R., Flores-Rodríguez, P., García-Ibáñez, S., & Valdés-González, A. (2007). Demografía del caracol *Plicopurpura pansa* (Neotaenioglossa: Muricidae) y constitución de la comunidad malacológica asociada en Guerrero, México. *Revista de Biología Tropical*, 55(3-4), 867-878.
- Flores, R. P. (1995). Evaluación Biológico-Pesquera del caracol de tinte *Purpura pansa* (Gould, 1853) del litoral rocoso del municipio de Acapulco, Guerrero, México. *Universidad Autónoma de Guerrero, Acapulco, Guerrero, México*. 47 pp. (Inédito)
- Foale, S. (1993). An evaluation of the potential of gastropod imposex as a bioindicator of tributyltin pollution in Port Phillip Bay, Victoria. *Marine Pollution Bulletin*, 26(10), 546-552.
- Fretter, V. 1980. Observations on the gross anatomy of the female genital duct of British *Littorina* spp. *Journal of Molluscan Studies*. 46 (2), 148- 153.
- Fretter, V., & Graham, A. (1994). British prosobranch molluscs, their functional anatomy and

- ecology. The Ray Society. London, UK. 820 pp.
- Garrity, S. D., & Levings, S. C. (1981). A predator-prey interaction between two physically and biologically constrained tropical rocky shore gastropods: direct, indirect and community effects. *Ecological Monographs*, 51(3), 267-286.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Wilkins, M. R., Appel, R. D., & Bairoch, A. (2005). Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In *The proteomics protocols handbook* (pp. 571-607). Humana press.
- Gibbs, P. E., & Bryan, G. W. (1986). Reproductive failure in populations of the dog-whelk, *Nucella lapillus*, caused by imposex induced by tributyltin from antifouling paints. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 66(4), 767-777.
- Gibbs, P. E., Bryan, G. W., Pascoe, P. L., & Burt, G. R. (1987). The use of the dog-whelk, *Nucella lapillus*, as an indicator of tributyltin (TBT) contamination. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 67(3), 507-523.
- Gibson, C. P., & Wilson, S. P. (2003). Imposex still evident in eastern Australia 10 years after tributyltin restrictions. *Marine Environmental Research*, 55(2), 101-112.
- Giltrap, M., Macken, A., Davoren, M., Minchin, D., McGovern, E., Foley, B., & McHugh, B. (2009). Use of Caged *Nucella Lapillus* and *Crassostrea Gigas* to Monitor Tributyltin Induced Bioeffects in Irish Coastal Waters. *Environmental toxicology and chemistry*, 28(8), 1671-1678.
- Giraud-Billoud, M., Vega, I. A., Wuilloud, R. G., Clément, M. E., & Castro-Vazquez, A. (2013). Imposex and novel mechanisms of reproductive failure induced by tributyltin (TBT) in the freshwater snail *Pomacea canaliculata*. *Environmental toxicology and chemistry*, 32(10), 2365-2371.
- Giraud-Billoud, M., & Castro-Vazquez, A. (2019). Aging and retinoid X receptor agonists on masculinization of female *Pomacea canaliculata*, with a critical appraisal of imposex evaluation in the Ampullariidae. *Ecotoxicology and environmental safety*, 169, 573-582.
- Gooding, M. P., Wilson, V. S., Folmar, L. C., Marcovich, D. T., & LeBlanc, G. A. (2003). The biocide tributyltin reduces the accumulation of testosterone as fatty acid esters in the mud snail (*Ilyanassa obsoleta*). *Environmental health perspectives*, 111(4), 426-430.
- González-Flores, O. B. (1997). Contribución al estudio del ciclo gonádico del caracol *Purpura pansa* Gould 1853 (Gastropoda: Prosobranchia) en Mazatlán, Sinaloa. (*Biology Degree Thesis*). Universidad Nacional Autónoma de México. México, 87.
- Grimón, R. O. R., Osorio, M. F. A., de Freitas, D. M., & Castro, Í. B. (2016). Tributyltin impacts in Galapagos Islands and Ecuadorian shore: marine protected areas under threat. *Marine Policy*. 69. 24-31.
- Guzmán-García, X., Botello, A. V., Martínez-Tabche, L., & González-Márquez, H. (2009). Effects of heavy metals on the oyster (*Crassostrea virginica*) at Mandinga Lagoon, Veracruz, Mexico. *Revista de biología tropical*, 57(4), 955-962.
- HELCOM (2010) Hazardous substances in the Baltic Sea – an integrated thematic assessment of hazardous substances in the Baltic Sea Balt Sea Environ Proc. No. 120B.
- Ho, K. K., & Leung, K. M. (2016a). Imposex status associated with organotin contamination in

- Reishia clavigera after reciprocal transplantation between clean and polluted sites in Hong Kong. *Regional Studies in Marine Science*, 8, 480-486.
- Ho, K. K., Zhou, G. J., Xu, E. G., Wang, X., & Leung, K. M. (2016b). Long-term spatio-temporal trends of organotin contaminations in the marine environment of Hong Kong. *PloS one*, 11(5), e0155632.
- Hoch, M. (2001). Organotin compounds in the environment—an overview. *Applied geochemistry*, 16(7-8), 719-743.
- Holguín, Q. O. E. (1993). Distribución, abundancia y composición peso-talla de *Purpura pansa* (Mollusca Gastropoda) en Isla Socorro, Archipiélago Revillagigedo, Mexico. *Zoología Informa*, 25, 24-33.
- Hopkins, P. M., Durica, D., & Washington, T. (2008). RXR isoforms and endogenous retinoids in the fiddler crab, *Uca pugilator*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 151(4), 602-614.
- Horiguchi, T., Nishikawa, T., Ohta, Y., Shiraishi, H., & Morita, M. (2007). Retinoid X receptor gene expression and protein content in tissues of the rock shell *Thais clavigera*. *Aquatic toxicology*, 84(3), 379-388.
- Horiguchi, T., Nishikawa, T., Ohta, Y., Shiraishi, H., & Morita, M. (2010). Time course of expression of the retinoid X receptor gene and induction of imposex in the rock shell, *Thais clavigera*, exposed to triphenyltin chloride. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 396(2), 597-607.
- Horiguchi, T., Ohta, Y., Urushitani, H., Lee, J. H., Park, J. C., Cho, H. S., & Shiraishi, H. (2012). Vas deferens and penis development in the imposex-exhibiting female rock shell, *Thais clavigera*. *Marine environmental research*, 76, 71-79.
- Horiguchi T., Ohta Y., Nishikawa T., Shiraishi F., Shiraishi H., Morita M. (2008). Exposure to 9-retinoic acid induces penis and vas deferens development in the female rock shell, *Thais clavigera*. *Cell Biology and Toxicology* 24:553-562.
- INEGI. (15 de Mayo de 2015). Resultados de la encuesta nacional de ocupación y empleo, cifras durante el primer trimestre 2015. Obtenido de Boletín de prensa No. 198/15.
- International Maritime Organization, & International Maritime Organization. Marine Environment Protection Committee. (2005). *Anti-fouling Systems: International Convention on the Control of Harmful Anti-fouling Systems on Ships, 2001 (AFS 2001) and Guidelines for Survey and Certification of Anti-fouling Systems on Ships (resolution MEPC. 102 (48)), Guidelines for Brief Sampling of Anti-fouling Systems on Ships (resolution MEPC. 104 (49)), and Guidelines for Inspection of Anti-fouling Systems on Ships (resolution MEPC. 105 (49))*. IMO Publishing.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2015). *Catálogo de claves de entidades federativas, municipios y localidades*.
- Jarošová, B., Bláha, L., Giesy, J. P., & Hilscherová, K. (2014). What level of estrogenic activity determined by in vitro assays in municipal waste waters can be considered as safe?. *Environment international*, 64, 98-109.
- Jean-Claude, A., & Amiard-Triquet, C. (2015). *Ecotoxicological risk of endocrine disruptors*. In *Aquatic Ecotoxicology* (pp. 355-382). Academic Press.

- Jenner, M. G. (1979). Pseudohermaphroditism in *Ilyanassa obsoleta* (Mollusca: Neogastropoda). *Science*, 205(4413), 1407-1409.
- Johnson, A. C., Williams, R. J., & Matthiessen, P. (2006). The potential steroid hormone contribution of farm animals to freshwaters, the United Kingdom as a case study. *Science of the Total Environment*, 362(1-3), 166-178.
- Jones, M. R. L., & Ross, P. M. (2018). Recovery of the New Zealand muricid dogwhelk *Haustrum scobina* from TBT-induced imposex. *Marine pollution bulletin*, 126, 396-401.
- Kaur, S., Jobling, S., Jones, C. S., Noble, L. R., Routledge, E. J., & Lockyer, A. E. (2015). The nuclear receptors of *Biomphalaria glabrata* and *Lottia gigantea*: implications for developing new model organisms. *PloS one*, 10(4), e0121259.
- Keen, A. M. (1971). Sea shells of tropical West America.
- Ketata, I., Denier, X., Hamza-Chaffai, A., & Minier, C. (2008). Endocrine-related reproductive effects in molluscs. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 147(3), 261-270.
- Kirk, L. A., Tyler, C. R., Lye, C. M., & Sumpter, J. P. (2002). Changes in estrogenic and androgenic activities at different stages of treatment in wastewater treatment works. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 21(5), 972-979.
- Koch, V., & Wolff, M. (1996). The mangrove snail *Thais kiosquiformis* Duclos: A case of life history adaptation to an extreme environment. El caracol de manglar *Thais kiosquiformis* Duclos: un caso de ciclo vital adaptado a ambientes extremos. *Journal of Shellfish Research*, 15(2), 421-432.
- Kool, S. P. (1987). Significance of radular characters in reconstruction of thaidid phylogeny (Neogastropoda: Muricacea). *The Nautilus*, 101(3), 117-132.
- Kool, S. P. (1988). Aspects of the anatomy of *Plicopurpura patula* (Prosobranchia: Muricoidea: Thaidinae), new combination, with emphasis on the reproductive system. *Malacologia*, 29(2), 373-382.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular biology and evolution*, 35(6), 1547-1549.
- Lahbib, Y., Boumaiza, M., & El Menif, N. T. (2008). Imposex expression in *Hexaplex trunculus* from the North Tunis Lake transplanted to Bizerta channel (Tunisia). *Ecological Indicators*, 8(3), 239-245.
- Lam, N. H., Jeong, H. H., Kang, S. D., Kim, D. J., Ju, M. J., Horiguchi, T., & Cho, H. S. (2017). Organotins and new antifouling biocides in water and sediments from three Korean Special Management Sea Areas following ten years of tributyltin regulation: Contamination profiles and risk assessment. *Marine pollution bulletin*, 121(1-2), 302-312.
- Laranjeiro, F., Sánchez-Marín, P., Oliveira, I. B., Galante-Oliveira, S., & Barroso, C. (2018a). Environmental quality status of the Portuguese coast regarding TBT pollution—Recommendations for considering imposex monitoring within the scope of the Marine Strategy Framework Directive. *Ecological indicators*, 93, 966-974.
- Laranjeiro, F., Sánchez-Marín, P., Oliveira, I. B., Galante-Oliveira, S., & Barroso, C. (2018b).

- Fifteen years of imposex and tributyltin pollution monitoring along the Portuguese coast. *Environmental Pollution*, 232, 411-421.
- Laudet, V., & Gronemeyer, H. (2002). *The nuclear receptor factsbook* (No. 964). Gulf Professional Publishing.
- Lightner, D. V. (1992). Shrimp viruses: diagnosis, distribution and management. In *Proceedings of the special Session on Shrimp Farming*. World Aquaculture Society.
- Lima, D., Reis-Henriques, M. A., Silva, R., Santos, A. I., Castro, L. F. C., & Santos, M. M. (2011). Tributyltin-induced imposex in marine gastropods involves tissue-specific modulation of the retinoid X receptor. *Aquatic toxicology*, 101(1), 221-227.
- López-Chávez, F. J., Chassin-Noria, O., Ríos-Chávez, P., Rocha-Ramírez, V., Macip-Ríos, R., & Oyama, K. (2016). Phylogeography of the purple snail *Plicopurpura pansa* along the Mexican Pacific coast. *Ciencias Marinas*, 42(1), 1-14.
- Luján, A. NOROESTE. (05, 08, 2009). Se salen aguas negras de la Planta El Crestón [comunicado de prensa]. Recuperado de: <https://www.noroeste.com.mx/publicaciones/view/se-salen-aguas-negras-de-la-planta-el-creston-158437>.
- Mark, M., Ghyselinck, N. B., & Chambon, P. (2006). Function of retinoid nuclear receptors: lessons from genetic and pharmacological dissections of the retinoic acid signaling pathway during mouse embryogenesis. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 46, 451-480.
- Markov, G. V., Tavares, R., Dauphin-Villemant, C., Demeneix, B. A., Baker, M. E., & Laudet, V. (2009). Independent elaboration of steroid hormone signaling pathways in metazoans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(29), 11913-11918.
- Matthiessen, P., Reynoldson, T., Billingham, Z., Brassard, D. W., Cameron, P., Chandler, G. T., & Pottinger, T. G. (1999). Field assessment for endocrine disruption in invertebrates (pp. 199-270). SETAC Press.
- Mattos, Y., & Romero, M. S. (2016). Imposex en *Thaisella chocolata* (Duclos, 1832) (Gastropoda: Muricidae) de Bahía Caldera, Chile. *Latin american journal of aquatic research*, 44(4), 825-834.
- Mee, L. D., Espinosa, M., & Diaz, G. (1986). Paralytic shellfish poisoning with a *Gymnodinium catenatum* red tide on the Pacific coast of Mexico. *Marine environmental research*, 19(1), 77-92.
- Meirelles, C. A., Castro, Í. B., & Pinheiro, J. C. (2008). A first record of biphallia in imposed female of *Leucozonia nassa* (Caenogastropoda: Fascioliariidae). *Marine Biodiversity Records*, 1.(January), 1995–1997
- Michel Morfin, J. E. (2000). *Ecología y aprovechamiento del caracol del tinte *Plicopurpura pansa* en las Costas del Pacífico Mexicano* (Doctoral dissertation, Instituto Politécnico Nacional. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas). 134 pp.
- Michel-Morfin, J. E., Hernandez, M., Landa-Jaime, V., Arciniega, J., Kosonoy, D., & Flores, R. (2009). Estimation of the Abundance and Population Structure of the Purple Snail *Plicopurpura pansa* (Gould, 1853) Comparing Two Methods. *The Open Marine Biology Journal*, 3(1), 49–58.
- Mnif, W., Hassine, A. I. H., Bouaziz, A., Bartegi, A., Thomas, O., & Roig, B. (2011). Effect of

- endocrine disruptor pesticides: a review. *International journal of environmental research and public health*, 8(6), 2265-2303.
- Mohamat-Yusuff, F., Zulkifli, S. Z., Otake, T., Harino, H., & Ismail, A. (2014). Study on a new mechanism of sterilization in imposex affected females of tropical marine neogastropod, *Thais* sp. *Journal of environmental biology*, 35(5), 995.
- Morfin, J. E. M., Alvarado, R., & Quiñones, C. (2002). Fecundidad y morfometría de cápsulas y huevos del caracol del tinte *Plicopurpura pansa* en condiciones de laboratorio. *Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas*, 36(3).
- Muñoz Mancilla, E. (2003). *Ciclo gonádico del caracol Purpura pansa (Gould, 1853) (Gastropoda: Prosobranchia) de la Bahía de Cuastecomate, Región de Melaque, Jalisco, México* (Licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Ciencias.
- Naegel, Ludwig. C., & Aguilar-Cruz, C. A. (2006a). The hypobranchial gland from the purple snail *Plicopurpura pansa* (Gould, 1853) (Prosobranchia: Muricidae). *Journal of Shellfish Research*, 25(2), 391-395.
- Naegel, Ludwig. C., & Garcia-Dominguez, F. A. (2006b). Reproductive cycle of the purple snail *Plicopurpura pansa* (Gould 1853) from two locations at Baja California Sur, Mexico. *Journal of Shellfish Research*, 25(3), 925-934.
- Naegel, A., & Ludwig, C. (2004). Laboratory spawning of the purple snail *Plicopurpura pansa* (Gastropoda: Muricidae). *Revista de biología tropical*, 52(1), 57-65.
- Naegel, Ludwig. C., & Gómez del Prado-Rosas, M. (2004). Embriogénesis y desarrollo larvario intra-capsular de *Plicopurpura pansa* (Gould, 1853)(Prosobranchia, Muricidae) en condiciones de laboratorio. *Ciencias marinas*, 30(2), 297-310.
- Naegel, Ludwig. y C. J. Cooksey. (2002). Tyrian purple from marine muricids, especially from *Plicopurpura pansa* (Gould, 1853). *Journal of Shellfish Research*. 21:193- 200.
- Nias, D. J., McKillup, S. C., & Edyvane, K. S. (1993). Imposex in *Lepsiella vinosa* from southern Australia. *Marine Pollution Bulletin*, 26(7), 380-384.
- Nishikawa, J. I., Mamiya, S., Kanayama, T., Nishikawa, T., Shiraishi, F., & Horiguchi, T. (2004). Involvement of the retinoid X receptor in the development of imposex caused by organotins in gastropods. *Environmental science & technology*, 38(23), 6271-6276.
- Nishikawa, J. I. (2006). Imposex in marine gastropods may be caused by binding of organotins to retinoid X receptor. *Marine Biology*, 149(1), 117-124.
- Oberdörster, E., Rittschof, D., & McClellan-Green, P. (1998). Testosterone metabolism in imposex and normal *Ilyanassa obsoleta*: Comparison of field and TBTA Cl-induced imposex. *Marine pollution bulletin*, 36(2), 144-151.
- Oberdörster E., McClellan-Green P. (2000). The neuropeptide APGWamide induces imposex in the mud snail, *Ilyanassa obsoleta*. *Peptides* 21:1323-1330.
- Oberdörster E., Romano J., McClellan-Green P. (2005). The neuropeptide APGWamide as a penis morphogenic factor (PMF) in gastropod mollusks. *Integrative and Comparative Biology* 45:28-32.
- Ochoa, J. L. (2003). ENSO phenomenon and toxic red tides in Mexico. *Geofísica Internacional*,

42(3), 505-515.

- Oehlmann, J., Stroben, E., & Fioroni, P. (1992). The rough tingle *Ocenebra erinacea* (Neogastropoda: Muricidae): an exhibitor of imposex in comparison to *Nucella lapillus*. *Helgolaender Meeresuntersuchungen*, 46(3), 311.
- Oehlmann, J., Stroben, E., & Fioroni, P. (1991). The morphological expression of imposex in *Nucella lapillus* (Linnaeus)(Gastropoda: Muricidae). *Journal of Molluscan Studies*, 57(3), 375-390.
- Oehlmann, J., Stroben, E., & Fioroni, P. (1988). Zur Anatomie und Histologie des Fortpflanzungssystems von *Nucella lapillus* (L., 1758)(Prosobranchia, Stenoglossa). *Zoologischer Anzeiger*, 221(3-4), 101-116.
- Oehlmann, J., Fioroni, P., Stroben, E., & Markert, B. (1996). Tributyltin (TBT) effects on *Ocenebrina aciculata* (Gastropoda: Muricidae): imposex development, sterilization, sex change and population decline. *Science of the Total Environment*, 188(2-3), 205-223.
- O'halloran, K., Ahokas, J. T., & Wright, P. F. A. (1998). Response of fish immune cells to in vitro organotin exposures. *Aquatic toxicology*, 40(2-3), 141-156.
- Ortega, N. RIO DOCE. (04, 05,2014). Incumple El Crestón normas ambientales [Comunicado de prensa]. Recuperado de: <http://riodoce.mx/noticias/incumple-el-creston-normas-ambientales>.
- OSPAR Commission. (2000). OSPAR Background Document on Organic Tin Compounds. *OSPARCOM, London*.
- OSPAR, 2004. Provisional Assessment Criteria for TBT – Specific Biological Effects. *OSPAR Commission, London*.
- OSPAR, 2005. The ecological quality objective on imposex in dog whelks *Nucella lapillus*. *OSPAR*, London, pp 1–11
- Otegui, M. B., Zamprogno, G. C., França, M. A., Daros, B. N., Albino, J., & Costa, M. B. (2019). Imposex response in shell sizes of intertidal snails in multiple environments. *Journal of Sea Research*, 147, 10-18.
- Park, M. S., Kim, Y. D., Kim, B. M., Kim, Y. J., Kim, J. K., & Rhee, J. S. (2016). Effects of antifouling biocides on molecular and biochemical defense system in the gill of the pacific oyster *Crassostrea gigas*. *PloS one*, 11(12), e0168978.
- Pascoal, S., Carvalho, G., Vasieva, O., Hughes, R., Cossins, A., Fang, Y., ... & Creer, S. (2013). Transcriptomics and in vivo tests reveal novel mechanisms underlying endocrine disruption in an ecological sentinel, *Nucella lapillus*. *Molecular ecology*, 22(6), 1589-1608.
- Peranandam, R., Palanisamy, I., Lourdaraj, A. V., Natesan, M., Vimalananthan, A. P., Thangaiyan, S., ... & Muthukalingan, K. (2014). TBT effects on the development of intersex (Ovotestis) in female fresh water prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *BioMed research international*, 2014.
- Peralta, A. C., Miloslavich, P., & Bigatti, G. (2014). Imposex in *Voluta musica* (Caenogastropoda: Volutidae) from Northeastern Peninsula de Araya, Venezuela. *Revista de biología tropical*, 62(2), 523-532.
- Priya, T. J., Li, F., Zhang, J., Wang, B., Zhao, C., & Xiang, J. (2009). Molecular characterization and effect of RNA interference of retinoid X receptor (RXR) on E75 and chitinase gene

- expression in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 153(1), 121-129.
- Quintela, M., Barreiro, R., & Ruiz, J. M. (2000). The use of *Nucella lapillus* (L.) transplanted in cages to monitor tributyltin (TBT) pollution. *Science of the total environment*, 247(2-3), 227-237.
- Quiroz-Rocha, G. A. (1992). Contribución al estudio histológico de la gónada del caracol *Purpura pansa* Gould, 1853 (Gastropoda: Prosobranchia). (*Biology Degree Thesis*). *Universidad Nacional Autónoma de México. México*, 44.
- Rajasekharan, M., & Crowe, T. P. (2007). Intrinsic differences in dispersal between populations of gastropods separated by a few metres: evidence from reciprocal experimental transplantation. *Journal of experimental marine biology and ecology*, 341(2), 264-273.
- Ramírez, C. T., Flores-Garza, R., Flores-Rodríguez, P., García-Ibáñez, S., Morfín, J. E. M., Acevedo, J. L. R., & Valdés-González, A. (2017). Composition of Prosobranchia-Pulmonata (Mollusca: Gastropoda) in rocky intertidal zone in the Marine Priority Region 32, Guerrero, Mexico. *Revista de biología marina y oceanografía*, 52(1), 81-93.
- Ramírez-Rodríguez, M., & Naegel, L. C. a. (2003). Growth of the purple snail *Plicopurpura pansa* in Baja California Sur , Mexico. *Ciencias Marinas*, 29, 283–290.
- Rastinejad, F., Wagner, T., Zhao, Q., & Khorasanizadeh, S. (2000). Structure of the RXR–RAR DNA-binding complex on the retinoic acid response element DR1. *The EMBO journal*, 19(5), 1045-1054.
- Revathi, P., Vasanthi, L. A., & Munuswamy, N. (2011). Effect of cadmium on the ovarian development in the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (De Man). *Ecotoxicology and environmental safety*, 74(4), 623-629.
- Revathi, P., Iyapparaj, P., Vasanthi, L. A., Munuswamy, N., & Krishnan, M. (2013). Impact of TBT on the vitellogenesis and sex hormones in freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879). *Aquatic biosystems*, 9(1), 10.
- Rittschof, D., & McClellan-Green, P. (2005). Molluscs as multidisciplinary models in environment toxicology. *Marine pollution bulletin*, 50(4), 369-373.
- Robinson-Rechavi, M., Carpentier, A. S., Duffraisse, M., & Laudet, V. (2001). How many nuclear hormone receptors are there in the human genome?. *TRENDS in Genetics*, 17(10), 554-556.
- Robinson-Rechavi, M., Garcia, H. E., & Laudet, V. (2003). The nuclear receptor superfamily. *Journal of cell science*, 116(4), 585-586.
- Rodríguez, E. M., Greco, L. S. L., & Fingerman, M. (2000). Inhibition of ovarian growth by cadmium in the fiddler crab, *Uca pugilator* (Decapoda, Ocypodidae). *Ecotoxicology and environmental safety*, 46(2), 202-206.
- Rodríguez, J. G., Rouget, P., Franco, J., Garmendia, J. M., Muxika, I., Valencia, V., & Borja, Á. (2010). Evaluation of the use of transplanted *Nassarius reticulatus* (Linnaeus, 1758), in monitoring TBT pollution, within the European Water Framework Directive. *Ecological Indicators*, 10(4), 891-895.
- Rodríguez, R. (2004). Hidrología y condiciones ambientales que determinan la proliferación de dinoflagelados causantes de marea roja en la Bahía de Mazatlán, Sin., México. Tesis de

- Doctorado. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, 117 pp. Y anexos.
- Romero, F. R. (2010). Imposex en la Laguna de términos, Campeche, México. *Revista Científica UDO Agrícola*, 10(1), 141-149.
- Ronis, M. J. J., & Mason, A. Z. (1996). The metabolism of testosterone by the periwinkle (*Littorina littorea*) in vitro and in vivo: effects of tributyl tin. *Marine Environmental Research*, 42(1-4), 161-166.
- Ross, S. A. (2000). McCaffery PJ, Drager UC, De Luca LM. *Retinoids in embryonal development. Physiol Rev*, 80, 1021-1054.
- Rossato, M., Castro, I. B., & Pinho, G. L. L. (2014). Imposex in stramonita haemastoma: a preliminary comparison between waterborne and dietborne exposure.
- Rozen, S., & Skaletsky, H. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In *Bioinformatics methods and protocols* (pp. 365-386). Humana Press, Totowa, NJ.
- Ruiz, J. (2019) 50 years of imposex. *Marine Pollution Bulletin*. Volume 145. Page 270.
- Rumampuk, N. D., Rumengan, I. F., Rompas, R. M., Undap, S. L., Boneka, F. B., Jensen, K. R., & Lasut, M. T. (2018). Tributyltin (TBT) contamination and impacts on imposex in *Thalessa aculeata* (Mollusca: Neogastropoda: Muricidae) in Minahasa Peninsula coastal waters, North Sulawesi, Indonesia. *Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation-International Journal of the Bioflux Society (AAFL Bioflux)*, 11(1).
- Saekadin, P. M., Astruc, A., Desauziers, V., Pinel, R., & Astruc, M. (1991). Butyltin pollution in surface sediments of arcachon bay after ten years of restricted use of TBT based paints. *Environmental Technology*, 12(7), 537-543.
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*, 4(4), 406-425.
- Sant'Anna, B. S., Dos Santos, D. M., de Marchi, M. R. R., Zara, F. J., & Turra, A. (2012). Effects of tributyltin exposure in hermit crabs: *Clibanarius vittatus* as a model. *Environmental toxicology and chemistry*, 31(3), 632-638.
- Santos, M. M., Castro, L. F. C., Vieira, M. N., Micael, J., Morabito, R., Massanisso, P., & Reis-Henriques, M. A. (2005). New insights into the mechanism of imposex induction in the dogwhelk *Nucella lapillus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 141(1), 101-109.
- Santos, M. M., ten Hallers-Tjabbes, C. C., Vieira, N., Boon, J. P., & Porte, C. (2002). Cytochrome P450 differences in normal and imposex-affected female whelk *Buccinum undatum* from the open North Sea. *Marine environmental research*, 54(3-5), 661-665.
- Sarradin, P. M., Astruc, A., Desauziers, V., Pinel, R. y Astruc, M. 1991. Butyltin pollution in surface sediments of Arcachon Bay after ten years of restricted use of TBT-based paints. *Environmental Technology*. 12:537-543.
- Schäfer, S., & Köhler, A. (2009). Gonadal lesions of female sea urchin (*Psammechinus miliaris*) after exposure to the polycyclic aromatic hydrocarbon phenanthrene. *Marine environmental research*, 68(3), 128-136.

- Schulte-Oehlmann, U., Bettin, C., Fioroni, P., Oehlmann, J., & Stroben, E. (1995). *Marisa cornuarietis* (Gastropoda, Prosobranchia): a potential TBT bioindicator for freshwater environments. *Ecotoxicology*, 4(6), 372-384.
- Shim, W. J., Kahng, S. H., Hong, S. H., Kim, N. S., Kim, S. K., & Shim, J. H. (2000). Imposex in the rock shell, *Thais clavigera*, as evidence of organotin contamination in the marine environment of Korea. *Marine Environmental Research*, 49(5), 435-451.
- Sigrist, C. J., Cerutti, L., De Castro, E., Langendijk-Genevaux, P. S., Bulliard, V., Bairoch, A., & Hulo, N. (2009). PROSITE, a protein domain database for functional characterization and annotation. *Nucleic acids research*, 38(suppl_1), D161-D166.
- Smith, B. S. (1981). Tributyltin compounds induce male characteristics on female mud snails *Nassarius obsoletus*= *Ilyanassa obsoleta*. *Journal of Applied Toxicology*, 1(3), 141-144.
- Smith, B. S. (1971). Sexuality in the American mud snail, *Nassarius obsoletus* Say. *Journal of Molluscan Studies*, 39(5), 377-378.
- Smith, P. J., & McVeagh, M. (1991). Widespread organotin pollution in New Zealand coastal waters as indicated by imposex in dogwhelks. *Marine Pollution Bulletin*, 22(8), 409-413.
- Solé, M., Morcillo, Y., & Porte, C. (1998). Imposex in the commercial snail *Bolinus brandaris* in the northwestern Mediterranean. *Environmental Pollution*, 99(2), 241-246.
- Soliman, G. N. (1987). A scheme for classifying gastropod egg masses with special reference to those from the northwestern Red Sea. *Journal of Molluscan Studies*, 53(1), 1-12.
- Soto, A. M., Calabro, J. M., Prechtel, N. V., Yau, A. Y., Orlando, E. F., Daxenberger, A., ... & Sonnenschein, C. (2004). Androgenic and estrogenic activity in water bodies receiving cattle feedlot effluent in Eastern Nebraska, USA. *Environmental health perspectives*, 112(3), 346-352.
- Sousa, A., Matsudaira, C., Takahashi, S., Tanabe, S., & Barroso, C. (2007). Integrative assessment of organotin contamination in a southern European estuarine system (Ria de Aveiro, NW Portugal): tracking temporal trends in order to evaluate the effectiveness of the EU ban. *Marine Pollution Bulletin*, 54(10), 1645-1653.
- Spooner, N., Gibbs, P. E., Bryan, G. W., & Goad, L. J. (1991). The effect of tributyltin upon steroid titres in the female dogwhelk, *Nucella lapillus*, and the development of imposex. *Marine Environmental Research*, 32(1-4), 37-49.
- Sternberg, R. M., Gooding, M. P., Hotchkiss, A. K., & LeBlanc, G. A. (2010). Environmental-endocrine control of reproductive maturation in gastropods: implications for the mechanism of tributyltin-induced imposex in prosobranchs. *Ecotoxicology*, 19(1), 4.
- Stewart, C., & De Mora, S. J. (1990). A review of the degradation of tri (n-butyl) tin in the marine environment. *Environmental Technology*, 11(6), 565-570.
- Strand, J., Glahder, C. M., & Asmund, G. (2006). Imposex occurrence in marine whelks at a military facility in the high Arctic. *Environmental pollution*, 142(1), 98-102.
- Stroben, E. B. E. R. H. A. R. D., Brömmel, C. H. R. I. S. T. A., Oehlmann, J. O. R. G., & Fioroni, P. (1992a). The genital systems of *Trivia arctica* and *Trivia monacha* (Prosobranchia: Mesogastropoda) and tributyltin induced imposex. *Zool. Beitr. NF*, 34, 349-374.

- Stroben, E., Oehlmann, J., & Fioroni, P. (1992b). The morphological expression of imposex in *Hinia reticulata* (Gastropoda: Buccinidae): a potential indicator of tributulin pollution. *Marine Biology*, 113(4), 625-636.
- Stroben, E. (1994). *Imposex und weitere Effekte von chronischer TBT-Intoxikation bei einigen Mesogastropoden und Bucciniden (Gastropoda, Prosobranchia): Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften im Fachbereich Biologie der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster*. Cuvillier Verlag Göttingen.
- Stunnenberg, H. G. (1993). Mechanisms of transactivation by retinoic acid receptors. *Bioessays*, 15(5), 309-315.
- Svavarsson, J., Granmo, Å., Ekelund, R., & Szpunar, J. (2001). Occurrence and effects of organotins on adult common whelk (*Buccinum undatum*)(Mollusca, Gastropoda) in harbours and in a simulated dredging situation. *Marine pollution bulletin*, 42(5), 370-376.
- Titley-O'Neal, C. P., Munkittrick, K. R., & MacDonald, B. A. (2011). The effects of organotin on female gastropods. *Journal of Environmental Monitoring*, 13(9), 2360-2388.
- Torres-García M, Palacios- Avila E & corona-Muñiz M. (2016). Ciclo reproductivo del caracol *Plicopurpura pansa* (Gould, 1853) de la Bahía de Huatulco, Oaxaca, México. *Amici Molluscarum* 24(1-2): 7-15.
- Turok, M. (1988). *El caracol púrpura: una tradición milenaria en Oaxaca*. Secretaría de Educación Pública, Dirección General de Culturas Populares, Programa de Artesanías y Culturas Populares.
- Ulven, S. M., Gundersen, T. E., Sakhi, A. K., Glover, J. C., & Blomhoff, R. (2001). Quantitative axial profiles of retinoic acid in the embryonic mouse spinal cord: 9-cis retinoic acid only detected after all-trans-retinoic acid levels are super-elevated experimentally. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, 222(3), 341-353.
- Urushitani, H., Katsu, Y., Ohta, Y., Shiraishi, H., Iguchi, T., & Horiguchi, T. (2011). Cloning and characterization of retinoid X receptor (RXR) isoforms in the rock shell, *Thais clavigera*. *Aquatic toxicology*, 103(1-2), 101-111.
- Urushitani, H., Katsu, Y., Kagechika, H., Sousa, A. C., Barroso, C. M., Ohta, Y., ... & Horiguchi, T. (2018). Characterization and comparison of transcriptional activities of the retinoid X receptors by various organotin compounds in three prosobranch gastropods; *Thais clavigera*, *Nucella lapillus* and *Babylonia japonica*. *Aquatic toxicology*, 199, 103-115.
- Vázquez-Gil, C. A., Cervantes-Hernández, P., Serrano-Guzmán, S. J., Cid-Rodríguez, R. P., & Fuente-Carrasco, M. E. (2004). Análisis de la mortalidad en la población del caracol púrpura *Plicopurpura pansa* (Gould, 1853) en Bahías de Huatulco, Oaxaca. *Ciencia y Mar*, 8(24), 21-29.
- Voltzow, J. (1994). Gastropoda Prosobranchia. En: F. W. Harrison and A.J. Kohn (eds). *Microscopic anatomy of invertebrates*. Vol 5 Mollusca 1. Wiley- Liss. New York, New York. 390 pp.
- Wells, F. E., Keesing, J. K., & Brearley, A. (2017). Recovery of marine *Conus* (Mollusca:

- Caenogastropoda) from imposex at Rottnest Island, Western Australia, over a quarter of a century. *Marine pollution bulletin*, 123(1-2), 182-187.
- Werner, E. A., & DeLuca, H. F. (2001). Metabolism of a physiological amount of all-trans-retinol in the vitamin A-deficient rat. *Archives of biochemistry and biophysics*, 393(2), 262-270.
- Wong, A., Allen, C. R., Hart, N. M., Haak, D. M., Pope, K. L., Smeenk, N. A., & Uden, D. R. (2013). Enamel-based mark performance for marking Chinese mystery snail *Bellamya chinensis*. 4(3), 231–234.
- Wong, H. L., Garthwaite, D. G., Ramwell, C. T., & Brown, C. D. (2019). Assessment of occupational exposure to pesticide mixtures with endocrine-disrupting activity. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(2), 1642-1653.
- Zhang, J. N., Yang, L., Zhang, M., Liu, Y. S., Zhao, J. L., He, L. Y., ... & Ying, G. G. (2019). Persistence of androgens, progestogens, and glucocorticoids during commercial animal manure composting process. *Science of The Total Environment*, 665, 91-99.
- Zhao, Q., Chasse, S. A., Devarakonda, S., Sierk, M. L., Ahvazi, B., & Rastinejad, F. (2000). Structural basis of RXR-DNA interactions. *Journal of molecular biology*, 296(2), 509-520.
- Zhou, G. J., Li, X. Y., & Leung, K. M. Y. (2019). Retinoids and oestrogenic endocrine disrupting chemicals in saline sewage treatment plants: Removal efficiencies and ecological risks to marine organisms. *Environment international*, 127, 103-113.

11. ANEXOS

11.1. Datos Histológicos

Datos histológicos de muestras de tejido gonadal de organismos de *Plicopurpura pansa* colectados en el sitio “Cerro del Vigía” en Febrero de 2018.

Cerro del Vigía	Código muestreo de campo	Código interno histología
Macho	CVM-01	180202 A1
Macho	CVM-02	180202 A2
Macho	CVM-03	180202 A3
Macho	CVM-04	180202 A4
Macho	CVM-05	180202 A5
Hembra normal	CVHn-01	180202 A6
Hembra normal	CVHn-02	180202 A7
Hembra normal	CVHn-03	180202 A8
Hembra normal	CVHn-04	180202 A9
Hembra normal	CVHn-05	180202 A10
Hembra trasplantada	CVHt-01	180202 A11
Hembra trasplantada	CVHt-02	180202 A12
Hembra trasplantada	CVHt-03	180202 A13
Hembra trasplantada	CVHt-04	180202 A14
Hembra trasplantada	CVHt-05	180202 A15
Hembra trasplantada	CVHt-06	180202 A16
Hembra trasplantada	CVHt-07	180202 A17
Hembra trasplantada	CVHt-08	180202 A18
Hembra trasplantada	CVHt-09	180202 A19
Hembra trasplantada	CVHt-10	180202 A20
Hembra con imposex	CVHI-01	180202 A21
Hembra con imposex	CVHI-02	180202 A22
Hembra con imposex	CVHI-03	180202 D1
Hembra con imposex	CVHI-04	180202 D2
Hembra con imposex	CVHI-05	180202 D3
Hembra con imposex	CVHI-06	180202 D4
Hembra con imposex	CVHI-07	180202 D5

Código de letras: (CVM: Cerro del Vigía, Macho; CVHn: Cerro del Vigía, Hembra; CVHt: Cerro del Vigía, Hembra trasplantada; CVHI: Cerro del Vigía, Hembra con imposex).

Datos histológicos de muestras de tejido gonadal de organismos de *Plicopurpura pansa* colectados en el sitio “Las labradas” en Febrero de 2018.

Las labradas	Código muestreo de campo	Código interno histología
Macho	LM-01	180202 B1
Macho	LM-02	180202 B2
Macho	LM-03	180202 B3
Macho	LM-04	180202 B4
Macho	LM-05	180202 B5
Hembra normal	LHn-01	180202 B6
Hembra normal	LHn-02	180202 B7
Hembra normal	LHn-03	180202 B8
Hembra normal	LHn-04	180202 B9
Hembra normal	LHn-05	180202 B10
Hembra trasplantada	LHt-01	180202 B11
Hembra trasplantada	LHt-02	180202 B12
Hembra trasplantada	LHt-03	180202 B13
Hembra trasplantada	LHt-04	180202 B14
Hembra trasplantada	LHt-05	180202 B15
Hembra trasplantada	LHt-06	180202 B16
Hembra trasplantada	LHt-07	180202 B17
Hembra con imposex	LHI-01 (Hemipene)	180202 E1
Hembra con imposex	LHI-02 (Hemipene)	180202 E2
Hembra con imposex	LHI-03	180202 E3
Hembra con imposex	LHI-04	180202 E1

Código de letras: (LM: Las labradas, Macho; LHn: Las labradas; LHt: Las labradas, Hembra trasplantada; LHI: Las labradas, Hembra con Imposex).

Datos histológicos de muestras de tejido gonadal de organismos de *Plicopurpura pansa* colectados en el sitio “Mármol” en Febrero de 2018.

Mármol	Código muestreo de campo	Código interno histología
Machos	MNC	MNC
Hembras normales	MNC	MNC
Hembra trasplantada	MHt-01	180202 C1
Hembra trasplantada	MHt-02	180202 C2
Hembra trasplantada	MHt-03	180202 C3
Hembra trasplantada	MHt-04	180202 C4
Hembra trasplantada	MHt-05	180202 C5
Hembra con imposex	MHI-01	180202 C6

Código de letras: (MNC: Muestra No Colectada; MHt: Mármol, Hembra trasplantada).

11.2. Datos Morfológicos de Hembras de *Plicopurpura Pansa* Colectadas en Las Labradas y Marcadas Utilizadas Como Control de Trasplante en Octubre de 2017

PRIMERA COLECTA

n	Largo (mm)	Ancho (mm)	Alto (mm)	Peso (gr)	Código de color
1	28.20	19.11	13.03	3.60	Yellow
2	26.94	19.56	13.98	3.29	
3	22.18	18.75	13.45	3.65	
4	28.51	18.46	13.27	3.20	
5	26.05	17.39	12.39	2.70	
6	31.87	19.02	13.25	4.90	Red
7	31.58	19.49	13.71	3.90	
8	30.89	19.16	13.62	4.50	
9	31.30	20.24	12.45	4.30	
10	29.70	20.14	13.2	4.76	
11	30.79	20.49	14.24	4.40	Purple
12	29.47	20.67	13.84	4.20	
13	30.00	21.37	15.78	4.42	
14	32.73	21.8	15.12	4.91	
15	32.60	21.51	13.27	5.00	
16	32.74	19.48	15.73	4.50	Green
17	32.26	22.56	14.4	6.05	
18	35.16	24.83	15.88	7.05	
19	34.43	22.15	16.48	6.22	
20	34.24	23.44	15.35	7.22	
21	36.45	24.41	15.25	7.20	Yellow
22	34.11	23.86	15.8	6.10	
23	35.42	26.66	15.83	8.35	
24	38.26	25.83	17.4	9.55	
25	39.12	24.5	17.97	8.02	
26	39.19	25.39	18.49	8.82	Yellow
27	38.46	26.1	18.67	10.25	
28	39.54	25.62	17.87	10.40	
29	41.53	28.43	18.65	11.70	
30	43.29	26.39	20.33	12.65	
n	Largo (mm)	Ancho (mm)	Alto (mm)	Peso (gr)	Código de color
31	32.66	21.89	19.18	9.21	Yellow
32	30.52	19.24	11.14	5.80	
33	31.62	18.33	12.36	5.84	
34	31.56	20.6	19.64	6.84	
35	31.04	19.15	13.75	6.67	
36	35.42	19.16	14.1	7.12	

Datos morfológicos de hembras de *Plicopurpura pansa* colectadas en Las labradas, marcadas y trasplantadas en el sitio “Mármol” en octubre de 2017

n	Largo (mm)	Ancho (mm)	Alto (mm)	Peso (gr)	Código de color
41	27.38	15.07	10.04	3.5	Red
42	22.84	16.82	10.86	3.06	
43	24.30	16.72	10.9	2.92	
44	24.88	15.06	11.01	3.48	
45	24.21	15.95	10.64	3.42	
46	26.42	15.19	12.74	3.97	Purple
47	24.57	17.56	10.7	3.5	
48	24.79	15.51	12.47	3.33	
49	24.64	16.47	11.64	3.91	
50	25.41	16.38	11.93	3.6	
51	28.3	16.32	10.79	4.2	Green
52	28.13	17.67	10.49	4.27	
53	29.24	17.56	14.15	4.5	
54	25.32	17.75	10.68	3.38	
55	25.84	15.56	10.8	3.93	
56	29.4	18.67	12.77	4.84	Yellow
57	27.61	17.34	12.39	4.59	
58	28.46	16.23	11.47	4.5	
59	27.25	16.69	10.84	4.82	
60	28.63	16.47	11.93	4.58	
61	28.23	18.61	14.09	5.56	Yellow
62	26.36	18.12	14.84	4.73	
63	28.79	13.48	13.38	5.09	
64	28.18	18.1	13.23	5.22	
65	28.72	18.23	11.47	4.58	
66	35.59	23.91	14.77	9.49	Yellow
67	32.93	19.36	14.86	6.92	
68	30.63	20.25	13.15	6.39	
69	30.21	19.94	13.84	5.98	
70	29.09	18.18	11.09	4.95	

n	Largo (mm)	Ancho (mm)	Alto (mm)	Peso (gr)	Código de color
71	33.57	22.98	15.79	5.83	Green/Purple
72	32.7	21.54	14.3	6.05	
73	32.57	18.87	13.21	6.64	
74	32.05	19.16	13.64	6.87	
75	32.51	18.23	13.97	6.46	
76	31.86	20.62	14.11	7.36	Green/Red
77	32.1	29.07	13.65	7.58	
78	32.69	17.11	12.79	6.3	
79	32.68	21.1	13.2	7.82	
80	34.05	22.56	14.77	9.37	

Datos morfológicos de hembras de *Plicopurpura pansa* colectadas en Las labradas y marcadas trasplantadas en el sitio “Cerro del vigía” en octubre de 2017

n	Largo (mm)	Ancho (mm)	Alto (mm)	Peso (gr)	Código de color
81	21.73	17.06	12.71	3.29	Red
82	23.99	19.85	12.52	3.74	
83	23.59	18.65	12.57	3.18	
84	28.18	18.52	13.81	3.72	
85	30.26	18.54	14.9	3.96	
86	28.68	19.78	13.31	4.18	Yellow
87	32.19	21.5	14.2	5.33	
88	31.32	20.62	14.53	5.36	
89	29.9	19.75	13.23	4.78	
90	31.95	20.43	14.33	5.07	
91	28.82	19.17	13.81	3.8	Purple
92	25.6	18.34	12.7	2.84	
93	28.87	19.14	13.98	4	
94	28.48	16.41	12.62	2.73	
95	27.62	18.53	13.67	3.18	
96	29.76	19.8	12.8	4.14	Green
97	29.73	19.27	12.61	4.04	
98	30.98	21.12	14.16	4.95	
99	29.55	20.15	13.27	4.83	
100	30.85	19.84	13.28	4.22	
101	31.6	21.93	14.19	5.38	Yellow/Green
102	32.3	20.98	14.49	5.33	
103	32.11	20.71	13.79	4.57	
104	32.33	20.5	16.1	5.32	
105	34.74	20.68	14.51	6.2	
106	35.82	23.37	16.44	6.99	Yellow/Purple
107	38.7	26.28	18.99	9.52	
108	33.04	22.52	15.23	6	
109	28.15	20.1	13.34	4.92	
110	33.76	23.15	16.21	8.04	

n	Largo (mm)	Ancho (mm)	Alto (mm)	Peso (gr)	Código de color	
111	35.65	22.42	13.58	9.77	Green	Red
112	32.21	21.61	12.3	7.80		
113	33.27	22.68	12.4	7.69		
114	33.54	21.42	15.42	7.87		
115	32.34	17.53	12.64	7.56		
116	39.81	25.86	17.26	11.20	Red	Purple
117	35.12	23.1	15.16	7.12		
118	35.46	21.98	14.79	10.16		
119	32.47	21.19	13.23	8.61		
120	31.71	20.48	15.96	7.20		

11.3. Datos Morfológicos de Hembras de *Plicopurpura Pansa* Colectadas en Las Labradas y Marcadas Utilizadas Como Control de Trasplante en Diciembre de 2017

SEGUNDA COLECTA

n	Largo (mm)	Ancho (mm)	Alto (mm)	Peso (gr)	Código de color
1	13.97	23.09	13.06	7.13	Pink
2	30.23	19.99	11.53	4.43	
3	32.13	21.56	14.91	5.38	
4	32.04	21.75	12.45	6.09	
5	31.55	20.02	12.58	5.01	
6	30.47	20.25	13.26	4.99	
7	27.08	18.05	9.52	5.1	
8	26.42	20.26	13.6	3.31	
9	34.46	23.18	15.25	4.1	
10	27.41	18.39	12.74	4.52	
11	32.91	21.9	15.28	3.86	
12	35.04	22.24	16.78	6.56	
13	26.57	18.64	12.24	3.54	
14	30.22	19.96	13.26	3.95	
15	34.15	21.63	15.02	6.77	
16	35.13	23.52	15.29	7.38	
17	29.81	20.29	12.52	4.8	
18	32.19	22.12	13.83	6.31	
19	32.9	20.54	13.81	6.06	
20	27.54	19.33	13.02	3.91	
21	26.19	16.62	11.99	3.45	
22	35.85	24.05	13.52	8.43	
23	32.46	23.05	14.63	6.36	
24	43.6	29.15	18.93	14.26	
25	27.91	19.66	13.32	4.84	
26	29.14	19.26	11.82	4.16	
27	27.86	18.45	11.88	3.44	
28	30	19.06	12.44	4.32	
29	27.91	18.53	13.26	4.12	
30	26.89	18.01	10.43	3.68	

Datos morfológicos de hembras de *Plicopurpura pansa* colectadas en Las labradas, marcadas y trasplantadas en el sitio “Mármol” en diciembre de 2017

n	Largo (mm)	Ancho (mm)	Alto (mm)	Peso (gr)	Código de color
31	30.02	20.25	14.08	5.69	
32	24.66	17.35	11.58	4.31	
33	31.07	19.57	14.22	4.93	
34	36.09	24.61	15.41	9.8	
35	25.85	17.52	11.48	4.23	
36	29.09	20	12.15	4.35	
37	30.87	18.97	12.26	4.85	
38	28.15	18.91	12.39	4.03	
39	30.45	19.44	13.24	5.42	
40	31.46	22.94	13.9	6.77	
41	26.77	17.86	12.48	3.8	
42	32.09	21.53	14.26	6.5	
43	28.76	20.3	12.6	4.74	
44	25.66	16.98	11.38	3.39	
45	27.61	19.27	12.6	3.97	
46	27.71	17.93	2.05	4.15	
47	33.3	20.57	14.84	6.68	
48	33.28	21.19	13.98	6.63	
49	28.14	18.21	11.83	3.85	
50	32.36	18.52	13.32	5.3	
51	29.37	20.31	13.42	4.88	
52	27.75	20.59	13.54	5.56	
53	28.77	19.21	12.44	4.25	
54	23.71	16.74	12.24	2.9	
55	28.93	19.52	12.97	4.4	
56	43.92	27.05	18.05	14.86	
57	39.24	25.9	17.3	9.56	
58	30.22	19.89	14.8	4.45	
59	27.74	18.63	11.19	3.47	
60	32.13	24.43	13.77	4.91	

Datos morfológicos de hembras de *Plicopurpura pansa* colectadas en Las labradas y marcadas trasplantadas en el sitio “Cerro del vigía” en diciembre de 2017

n	Largo (mm)	Ancho (mm)	Alto (mm)	Peso (gr)	Código de color
61	29.18	18.35	14.27	4.41	
62	40.82	27.37	18.51	14.14	
63	30.47	18.51	12.51	4.41	
64	31.41	19.43	14.55	5.6	
65	31.96	22.35	12.79	6.24	
66	29.75	19.23	13.68	4.46	
67	39.82	24.97	16.75	5.7	
68	30.47	21.07	13.95	10.72	
69	32.91	22.17	13.64	3.48	
70	27.95	19.51	10.56	6.61	
71	25.64	20.5	11.02	4.83	
72	29.27	20.94	14.33	3.48	
73	23.14	15.59	11.64	2.45	
74	26.45	16.28	11.07	3.84	
75	28.36	18.34	12.01	2.45	
76	26.1	17.43	10.63	4.03	
77	27.76	17.64	11.8	3.34	
78	34.04	23.9	15.65	8.41	
79	32.87	21.69	14.26	6.27	
80	38.32	25.48	17.41	10.83	
81	37.76	24.29	15.2	8.74	
82	31.55	20.68	12.52	5.71	
83	32.79	20.26	14.61	5.97	
84	30.82	20.37	12.77	5.03	
85	31.84	19.67	12.55	5.22	
86	25.8	15.96	9.96	3.15	
87	35.92	23.76	11.97	8.32	
88	32.02	21.22	13.12	6.45	
89	33.93	21.39	12.9	6.68	
90	32.22	21.34	13.65	5.37	

11.4. Datos Morfológicos de Organismos De *Plicopurpura Pansa* Colectados en el Sitio “Las Labradas” Para Análisis Histológico Y de Expresión Génica De (RXR) en Febrero de 2018.

N	LARGO (mm)	ANCHO (mm)	ALTO (mm)	PESO (gr)	OBSERVACIONES
1	30.08	17.96	12.4	5.05	Hembras trasplantadas
2	27.15	18.33	12.67	3.71	Hembras trasplantadas
3	28.1	20.85	11.96	4.55	Hembras trasplantadas
4	28.26	18.31	12.86	3.53	Hembras trasplantadas
5	25.91	16.66	10.32	3.84	Hembras trasplantadas
6	27.11	17.26	8.82	3.16	Hembras trasplantadas
7	25.86	16.45	9.88	3.44	Hembras trasplantadas

N	LARGO (mm)	ANCHO (mm)	ALTO (mm)	PESO (gr)	OBSERVACION ES
1	31.51	20.53	6.82	8.46	Hembras normales
2	36.82	24.87	11.58	12.28	Hembras normales
3	29.16	19.78	12.63	6.39	Hembras normales
4	36.02	23.75	8.59	10.02	Hembras normales
5	33.33	21.23	10.57	6.97	Hembras normales

N	LARGO (mm)	ANCHO (mm)	ALTO (mm)	PESO (gr)	OBSERVACION ES
1	28.44	16.2	7.34	5.33	Machos
2	29.4	17.76	12.57	5.72	Machos
3	26.11	17.03	5.22	4.59	Machos
4	37.94	24.38	16.15	8.05	Machos
5	36.96	25.68	18.86	8.8	Machos

N	LARGO (mm)	ANCHO (mm)	ALTO (mm)	PESO (gr)	OBSERVACION ES
1	38.07	25.84	15.99	8.47	Imposex
2	25.67	16.4	4.99	4.56	Imposex

Datos morfológicos de organismos de *Plicopurpura pansa* colectados en el sitio “Mármol” para análisis histológico y de expresión génica de (RXR) en febrero de 2018

N	LARGO (MM)	ANCHO (MM)	ALTO (mm)	PESO (gr)	OBSERVACIONES
1	18.53	10.68	9.55	3.77	Hembras trasplantadas
2	26.42	12.61	5.29	3.75	Hembras trasplantadas
3	25.67	11.31	8.12	3.39	Hembras trasplantadas
4	25.31	15.54	10.02	3.55	Hembras trasplantadas
5	44.05	28.72	19.09	15.14	Hembras trasplantadas

Datos morfológicos de organismos de *Plicopurpura pansa* colectados en el sitio “Cerro del vigía” para análisis histológico y de expresión génica de (RXR) en febrero de 2018

N	LARGO (mm)	ANCHO (mm)	ALTO (mm)	PESO (gr)	OBSERVACIONES
1	31.49	19.59	13.43	4.98	Hembras trasplantadas
2	29.95	19.66	13.85	5.04	Hembras trasplantadas
3	22	16.23	10.15	2.15	Hembras trasplantadas
4	29.74	19.4	10.82	4.13	Hembras trasplantadas
5	29.43	19.39	12.53	4.28	Hembras trasplantadas
6	36.7	22.12	14.7	7.85	Hembras trasplantadas
7	26.39	18.32	11.73	3.25	Hembras trasplantadas
8	31.75	21.86	14.05	5.72	Hembras trasplantadas
9	31.6	21.75	14.06	5.77	Hembras trasplantadas
1	35.15	24.68	13.95	9.45	Hembras trasplantadas
0					

N	LARGO (mm)	ANCHO (mm)	ALTO (mm)	PESO (gr)	OBSERVACIONES
1	42.16	25.32	17.27	12.84	Hembras normales
2	33.23	22.9	14.06	6.27	Hembras normales
3	37.81	24.67	15.65	8.05	Hembras normales
4	36.27	26.65	15.94	8.87	Hembras normales
5	35.6	23.65	14.18	7.27	Hembras normales

N	LARGO (MM)	ANCHO (MM)	ALTO (MM)	PESO (GR)	OBSERVACIONES
1	32.88	20.49	13.48	5.31	Machos
2	38.24	18.36	12.39	3.79	Machos
3	33.77	23.43	14.65	7.19	Machos
4	28.81	20.19	13.72	5.55	Machos
5	32.89	20.74	14.36	6.07	Machos

N	LARGO (mm)	ANCHO (mm)	ALTO (mm)	PESO (gr)	OBSERVACIONES
1	38.88	20.15	13.98	4.9	Imposex
2	24.1	17.48	11.97	2.8	Imposex
3	29.39	19.21	13.53	4.4	Imposex
4	29.02	19.05	13.73	4.6	Imposex
5	37.04	24.54	16.09	9.3	Imposex
6	29.09	20	13.24	4.1	Imposex
7	34.01	24.56	13.64	7.5	Imposex
8	32.05	18.84	12.14	4.97	Imposex

11.5. Extracción de RNA Total

Protocolo:

- 1- Homogenizar tejido con 0.5 – 1 ml de Trizol.
- 2- Incubar 5 min a temperatura ambiente.
- 3- Añadir 100 -200 µl de cloroformo por 0.5 -1 ml de Trizol. (respectivamente)
- 4- Agitar vigorosamente e incubar 2-3 min a temperatura ambiente.
- 5- Centrifugar a 12,000 g 15 min a 4°C.

- 6- Transferir sobrenadante a un tubo limpio.
- 7- Añadir 250-500 μ l de isopropanol por 0.5 – 1 ml de Trizol (respectivamente)
- 8- Incubar a temperatura ambiente 15 min.
- 9- Centrifugar a 12,000 g 10 minutos a 4°C.
- 10- Descartar sobrenadante y lavar con 1 ml de etanol 70%.
- 11- Centrifugar a 12,000 g 5 min a 4°C.
- 12- Descartar sobrenadante y exceso de etanol, y resuspender en 50 μ l de agua DEPC.

11.6. Tratamiento con DNAsa I:

- 13- Preparar mezcla maestra, hacer el cálculo dependiendo del número de muestras:
 - a. Agua DEPC 4.5 μ l por muestra
 - b. 10X buffer para DNAsa I 6.5 μ l por muestra
 - c. RNAsin 0.5 μ l por muestra
 - d. DNAsa I (Promega) 3.5 μ l por muestra

Mezclar bien con la pipeta y agregar 15 μ l de mezcla maestra a cada muestra de 50 μ l de RNA (volumen final de 65 μ l)

- 14- Incubar 30 min a 37°C
- 15- Añadir 6.5 μ l de LiCl 4 M.
- 16- Añadir 65 μ l de fenol / cloroformo y vortex.
- 17- Centrifugar a máxima velocidad (~ 13,000 rpm) 10 min.
- 18- Transferir sobrenadante a un tubo limpio y añadir 2.5 volúmenes (~165 μ l) de etanol absoluto.
- 19- Incubar por lo menos 60 min a –20°C, puede permanecer toda la noche.
- 20- Centrifugar 20 min a máxima velocidad a 4°C.
- 21- Lavar con 0.5 ml de etanol 70% y centrifugar 10 min a 4°C a máxima velocidad.
- 22- Eliminar etanol y resuspender en 25-50 μ l de agua DEPC (dependiendo del pellet).
- 23- Almacenar a –20 °C o a –70 °C.

La síntesis de ADNc se llevó a cabo a 45°C con 5 µg de ARN total, transcriptasa reversa MMLV (Promega) y hexanucleótidos aleatorios (random primers).

11.7. Síntesis de cDNA

1. Colocar 5 µl de RNA total y 1 µl de oligo(dT) o “random primers” en un tubo de microcentrífuga e incubar a 70 °C 10 minutos. Centrifugar brevemente para coleccionar el líquido condensado y colocar en hielo inmediatamente.

Mezcla maestra (por muestra):	1X
• Agua DEPC	6.7 µl
• 5X buffer para M-MLVRT	4.0 µl
• dNTPs (10mM)	2.0 µl
• RNAsin	0.5 µl
• M-MLVRT	0.8 µl
	<hr/>
	14.0 µl por muestra de RNA
RNA + primers	6 µl
TOTAL	20 µl

2. Incubar a 45 °C una hora (cuando se usen random primers se recomienda incubar a temperatura ambiente 10 minutos y después a 45 °C una hora).
3. Incubar a 90-95 °C 5 minutos y poner de inmediato en hielo. Centrifugar rápido y almacenar a -20 °C.

11.8. PCR

La reacción de PCR se prepara mediante una mezcla maestra que se calcula dependiendo del número de muestras que se van a analizar.

Soluciones	1x	5x
Agua destilada	8.48	42.4
25mM MgCl ₂	0.75	3.75
2.5mM dNTPs	0.66	3.3
10x buffer	1.25	6.25
Primer F 250 µg/ml	0.13	0.65
Primer R 250 µg/ml	0.13	0.65
Taq polimerasa (5u/µl)	0.1	0.5

Es necesario incluir un control positivo y un control negativo. El control negativo puede ser la mezcla maestra sin ADN. Cada reacción (por muestra) es de 11.5 µl más 1 µl de ADN (total 12.5 µl por tubo).

El número de ciclos y la temperatura de alineación dependerán de las características de los oligos y del ADN. Por ejemplo, para amplificar 18S rRNA el programa es el siguiente:

- Desnaturalización a 94 °C 1 minuto
- Alineación a 57 °C 1 minuto
- Extensión a 72 °C 1 minuto
- Repetir 35 ciclos

Cuando la amplificación ha terminado el ADN es visualizado por electroforesis en gel de agarosa al 1 o 2 %. El producto de PCR es de ~ 450 pares de bases

11.9. Preparación de Gel de agarosa para Electroforesis

Gel agarosa 2%

1. Pesar 0.6 gr de agarosa en una balanza analítica debidamente calibrada.
2. Disolver la agarosa en 30 ml de buffer TAE 1X (Tris-Acetato- EDTA) en un matraz.
3. Calentar la mezcla de agarosa y TAE 1X en un horno de microondas por 30 segundos para homogeneizar perfectamente. (Repetir Este paso de ser necesario).
4. Dejar enfriar brevemente.
5. Agregar 0.5 μ l de red gel a la mezcla y homogeneizar.
6. Armar el cassette de electroforesis con el peine adecuado.
7. Vertir la mezcla dentro del cassette de electroforesis (Verificar que no se formen burbujas o grumos).
8. Esperar por lo menos 15 minutos a temperatura ambiente hasta que el gel esté solidificado.
9. Preparar la cámara de electroforesis (llenar con TAE 1X)
10. Colocar el cassette de electroforesis dentro de la cámara de electroforesis, verificando que el gel esté completamente cubierto por el buffer TAE 1X.
11. Cargar 6 μ l de muestra por pocillo.
12. Cargar 3 μ l de marcador molecular.
13. Correr el gel por 30 minutos a 90 V y 150 miliamperios.
14. Foto documentar el gel. (UVP Bioluminescence Imaging System).