

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

IMPOSEX EN EL CARACOL INVASOR *RAPANA VENOSA*

por

BESOZZI RABAGLIONI HUELMO, Ana Lucía

TESIS DE GRADO presentada como uno de
los requisitos para obtener el título de Doctor
en Ciencias Veterinarias
Orientación: Higiene, Inspección-control y
Tecnología de los alimentos de origen animal

MODALIDAD: Ensayo Experimental

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2013**

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:



Presidente de la mesa:

Dra. Graciela Fabiano



Segundo miembro:

Dra. Estela Delgado

Tercer miembro:

M.Sc. Gustavo Riestra

Cuarto miembro:

Dr. Alvar Carranza

Fecha:

19/12/2013

Autor:

Lucía Besozzi

AGRADECIMIENTOS

Muy especialmente a mi familia y amigos por su incondicional apoyo y por la confianza depositada a lo largo de la carrera.

A mi tutora Dra. Estela Delgado y co-tutor Dr. Alvar Carranza por la dedicación, motivación y confianza depositada en mí para la realización de este trabajo.

A la Dra. Maite Letamendía por su invaluable apoyo y enseñanza en la ejecución del trabajo experimental y por el tiempo dedicado.

A los docentes y funcionarios del Laboratorio de Pesca de Facultad de Veterinaria por el gran apoyo y tiempo dedicado y por permitirme el uso del mismo para poder llevar a cabo este trabajo.

A Iván Sosa, Debora Marquez, Nicole Marquez, Betina Cóppola y Beatriz Tellechea por su colaboración e incondicional apoyo.

TABLA DE CONTENIDO	Página
PAGINA DE APROBACIÓN.....	2
AGRADECIMIENTOS.....	3
TABLA DE CONTENIDO.....	4
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS.....	5
RESUMEN.....	6
SUMMARY.....	6
1. INTRODUCCIÓN.....	7
2. OBJETIVOS.....	9
2.1. Objetivo general.....	9
2.2. Objetivos Específicos.....	9
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
4. RESULTADOS.....	15
4.1. Relaciones Biométricas.....	20
4.2. Proporción Sexual.....	20
4.3. Caracteres sexuales primarios y secundarios.....	19
5. DISCUSIÓN.....	25
5.1. Relaciones Biométricas.....	25
5.2. Proporción Sexual.....	26
5.3. Caracteres sexuales primarios y secundarios.....	28
6. CONCLUSIONES.....	29
7. BIBLIOGRAFÍA.....	31

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Variables morfométricas discriminadas por sexo y por puerto de procedencia.	15
Tabla 2. Relación lineal largo - peso total por sexo y para cada puerto.	17
Tabla 3. Variables morfométricas del pene de machos e imposex en el puerto de Piriápolis.	23
Figura 1. Área de estudio en la costa atlántica de Maldonado. A. Puerto de Piriápolis, B. Puerto de Punta del Este.	11
Figura 2. Longitud total de concha.	12
Figura 3. Distribución de frecuencia de tallas por sexo y para cada puerto.	16
Figura 4. Puerto Punta del Este. Regresión lineal largo-peso total discriminado por sexo.	18
Figura 5. Puerto Piriápolis. Regresión lineal largo-peso total discriminado por sexo.	19
Figura 6. <i>Rapana venosa</i> , A. Hembra ejemplar entero, B. gónada femenina amarilla, C. corte histológico de gónada (aumento10X).	21
Figura 7. <i>Rapana venosa</i> A. Macho ejemplar entero, B. corte histológico de gónada, porción posterior (aumento 40X), C. corte longitudinal de pene de macho (aumento 4X).	22
Figura 8. <i>Rapana venosa</i> A. Imposex ejemplar entero, B. corte histológico de gónada, porción media (10X), C. corte histológico de gónada, porción media (40X). D. Imposex con gónada masculina (40X). E. corte longitudinal de pene de imposex (10X), F. corte longitudinal de pene de imposex (40X)	24

RESUMEN

Rapana venosa (Valenciennes, 1846), es un gasterópodo predador e invasor que ha colonizado gran parte de la costa atlántica uruguaya. Las hembras de gasterópodos pueden presentar caracteres sexuales masculinos (penes rudimentarios y vasos deferentes) que pueden ocasionar su esterilidad. Este fenómeno se denomina imposex y su aparición ha sido relacionada a la presencia de contaminantes en el agua (TBT). Se ha identificado la presencia de imposex en poblaciones de *Rapana venosa* de la costa atlántica uruguaya y de otras partes del mundo. A través de buceo autónomo se colectaron individuos del puerto de Piriápolis y además se analizaron muestras provenientes del puerto de Punta del Este. Con el fin de caracterizar y describir la presencia de individuos imposex entre ambos puertos se midieron, pesaron y sexaron 383 individuos y se realizaron análisis histológicos de las gónadas. Se registró por primera vez para el puerto de Piriápolis la presencia de imposex en el caracol *Rapana venosa*. El porcentaje de imposex fue mayor en el puerto de Piriápolis que en Punta del Este, pero estos últimos de mayor peso para un mismo largo total. *Rapana venosa* presentó menores porcentajes de rendimiento del músculo del pie al compararlo con otros caracoles marinos de importancia pesquera en Uruguay. Se realizó la primera estimación de proporción sexual considerando hembras funcionales (hembras e imposex) y machos de *Rapana venosa* para la costa atlántica, la cual fue sesgada hacia (hembras e imposex) en ambos puertos estudiados. Se realizó por primera vez la descripción macroscópica e histológica del pene de los individuos imposex de dicha especie.

SUMMARY

Rapana venosa (Valenciennes, 1846), is a predator and invasive gastropod that has colonized much of the Uruguayan estuarine coast. Gastropod females may present male sex characteristics (rudimentary penis and deferent vas) that can cause sterility. This phenomenon is called imposex and its appearance has been linked to the presence of contaminants in water (TBT). We have identified the presence of imposex in populations of *Rapana venosa* from the Uruguayan coast. Individuals were collected through scuba diving at the port of Piriápolis and further samples from

the port of Punta del Este were analyzed. In order to characterize and describe the presence of imposex, 383 individuals were measured, weighed and sexed. Gonadal histological analyzes were also performed gonads. We present the first record for imposex in *Rapana* at port of Piriápolis. The percentage of imposex was higher in Piriapolis port than in Punta del Este, but these showed highest weigh at lenght. *Rapana venosa* had lower percentages of foot muscle when compared to other marine snails of commercial importance in Uruguay. The first estimates of sex ratio were performed considering functional females (females and imposex), which was biased towards females and imposex in both ports studied. We also performed the first macroscopic and histological description of penis in imposex individuals of the species.

1. INTRODUCCIÓN

Las especies exóticas invasoras pueden causar graves alteraciones en la dinámica y el funcionamiento de los ecosistemas. El impacto negativo que generan las especies invasoras es enorme; por esta razón existen iniciativas a nivel mundial para prevenir y mitigar los efectos causados por su presencia (Delgado *et al.* 2011).

Rapana venosa (Valenciennes, 1846), es un gasterópodo depredador de gran tamaño de la familia Muricidae; es uno de los moluscos invasores que más se destaca. Esta especie es nativa del Mar de Japón, el Mar Amarillo, de China Oriental y el Golfo de Bohai. Ha sido introducido en varias partes de Eurasia (Mann *et al.* 2004; Savini, Occhipinti-Ambrogi 2006), EE.UU. (Harding, Mann 1999) y el Atlántico Sudoccidental (Orensanz *et al.* 2002). Desde la década de 1990, se comenzaron a encontrar registros de esta especie en el estuario del Río de la Plata (Scarabino *et al.* 1999; Pastorino *et al.* 2000); aunque recién a partir de 2004, se identificó la presencia de *R. venosa* en la bahía de Maldonado (Scarabino *et al.* 2006). Este hallazgo generó grandes preocupaciones a los pescadores artesanales de Punta del Este ya que su elevada abundancia unida a su hábito alimenticio podría conllevar la consecuente depredación de los bancos de mejillones de la zona (Carranza *et al.* 2010). Una alternativa prometedora para mitigar los efectos negativos de la invasión, es la apertura de una pesquería artesanal dirigida a *R. venosa* en la Bahía de Maldonado, innovando en procesos, productos y comercialización de manera de lograr impactos positivos a nivel económico, social y ecológico. La incorporación del

caracol *Rapana venosa* como nuevo recurso pesquero artesanal generaría beneficios socio-económicos para este sector, y concomitantemente disminuiría las alteraciones causadas en la dinámica y el funcionamiento de los ecosistemas por esta especie invasora.

Fue con este objetivo principal que durante 2011 se desarrolló un proyecto de investigación financiado por la ANII (*Desarrollo de una pesquería artesanal y cadena de comercialización de un gasterópodo invasor*), dirigido por el Dr. Alvar Carranza, lo que posibilitó el estudio conjunto de técnicos (Facultad de Ciencias), de la Dirección Nacional de Recursos Acuáticos (DINARA) y del Instituto de Investigaciones Pesqueras (Facultad de Veterinaria). Durante este proyecto se generó una base de datos primaria que permitió iniciar el conocimiento sobre la dinámica poblacional de esta especie en las costas de Maldonado así como evaluar ciertos aspectos sanitarios y reproductivos de este recurso. En particular se detectó la presencia de imposex en ejemplares de esta especie, extraídos del puerto de Punta del Este (Delgado et al. 2011).

El fenómeno de imposex se define como el desarrollo de caracteres sexuales masculinos tales como pene y/o vaso deferente en hembras de gasterópodos expuestas a compuestos orgánicos de estaño (Bigatti *et al.* 2013). Esta superposición de órganos genitales masculinos (pene y conducto deferente) en gasterópodos hembras, se produce generalmente a bajas concentraciones de compuestos orgánicos de estaño tales como tributilestaño (TBT), trifenilestaño (TPT) de pinturas anti-incrustantes (Horiguchi *et al.* 2001). La contaminación por estos compuestos se puede realizar tanto a través del agua como del sedimento, así como por el consumo de alimentos contaminados (bioacumulación) (Micu *et al.* 2009). El fenómeno de imposex se reportó por primera vez en 1969 en Plymouth, Inglaterra y desde ese entonces se ha registrado en más de 140 especies e incluso en una reciente revisión, se mencionan 220 especies de gasterópodos con individuos imposex (Bigatti *et al.* 2013). En por lo menos siete de esas especies se menciona el imposex como la principal causa de disminución de la abundancia poblacional debido a las fallas reproductivas (infertilidad) que causa la presencia de caracteres masculinos en el tracto genital de las hembras (Horiguchi *et al.* 2001).

El análisis de imposex en gasterópodos ha sido utilizado para monitorear y evaluar la contaminación por TBT en las costas de Sudamérica, en particular en la costa del océano Atlántico. Hasta el momento, han sido reportadas al menos 33 especies de

gasterópodos como indicadores de imposex en el área (Bigatti *et al.* 2013). Se registra imposex por primera vez en Brasil en 1997, en el murícido *Stramonita haemastoma*, y luego (2001) en Argentina en *Buccinanops monilifer* y *Adelomelon* (*Pachycymbiola*) *brasiliana*, seguidos más tarde de *Adelomelon beckii* y *Odontocymbiola magellanica* (Aycaguer 2001, Cledón *et al.* 2006, Arrighetti, Penchaszadeh 2010). En Uruguay los primeros estudios reportaban la ausencia de imposex en las hembras de gasterópodos, interpretándose este resultado como un indicador de población sana o una señal de que la población no habría sido expuesta el tiempo suficiente a TBT para desarrollar signos de imposex (Lanfranconi *et al.* 2009). Sin embargo recientes estudios han confirmado la presencia de imposex en *Rapana venosa* en las costas de Maldonado (Delgado *et al.* 2011). Anteriormente fue registrado también un único caso de imposex en *A. brasiliana*, colectado en un estudio realizado en la zona de operación de las flotas pesqueras costera y de altura Uruguayas (Aycaguer 2001). No se conoce la existencia de legislación alguna que regule el uso de TBT o compuestos similares, en Uruguay; e incluso no existe ningún estudio detallado de dosaje de TBT en sedimentos, agua o tejido de caracoles (Bigatti *et al.* 2013).

En este contexto, se continuó profundizando en la estrategia reproductiva y en otros aspectos no abordados anteriormente, relativos a la presencia de individuos imposex en el gasterópodo *Rapana venosa* en las costas de Maldonado. Se obtuvo información complementaria que permite apoyar la existencia de una pesquería artesanal de esta especie invasora.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Caracterizar y describir la presencia de individuos imposex en el gasterópodo invasor *Rapana venosa* en la costa de Maldonado, comparando dos puertos de importancia turística y pesquera de la zona: Puerto de Piriápolis, Puerto de Punta del Este.

2.2. Objetivos Específicos

- 1- Estimar las relaciones biométricas de *Rapana venosa* discriminadas por sexo (machos, hembras e individuos imposex) así como evaluar el rendimiento del músculo del pie discriminado por sexo y por puerto de procedencia.
- 2- Estimar la proporción sexual de la especie incluyendo a los individuos imposex en ambos puertos.
- 3- Caracterizar a los individuos imposex de *Rapana venosa* a través de la descripción de sus caracteres sexuales externos y su relación con los estadios gonadales internos por medio de un análisis histológico, tanto en el puerto de Punta del Este como en el de Piriápolis.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio y extracción de muestras

Un buzo mejillonero realizó la extracción de la especie objetivo, con los permisos previos de la DINARA y la Prefectura del Puerto de Piriápolis. A través de buceo autónomo se realizó la colecta manual de muestras biológicas en diciembre de 2012, en el puerto de Piriápolis, Maldonado (Figura 1A). Además se utilizaron muestras biológicas previamente colectadas en el proyecto anteriormente desarrollado, entre diciembre de 2010 y abril de 2011, provenientes del puerto de Punta del Este (Figura 1B). El área de estudio se limitó a las zonas rocosas y pilotes de ambos puertos. Las muestras fueron extraídas al azar, sin método de muestreo específico.

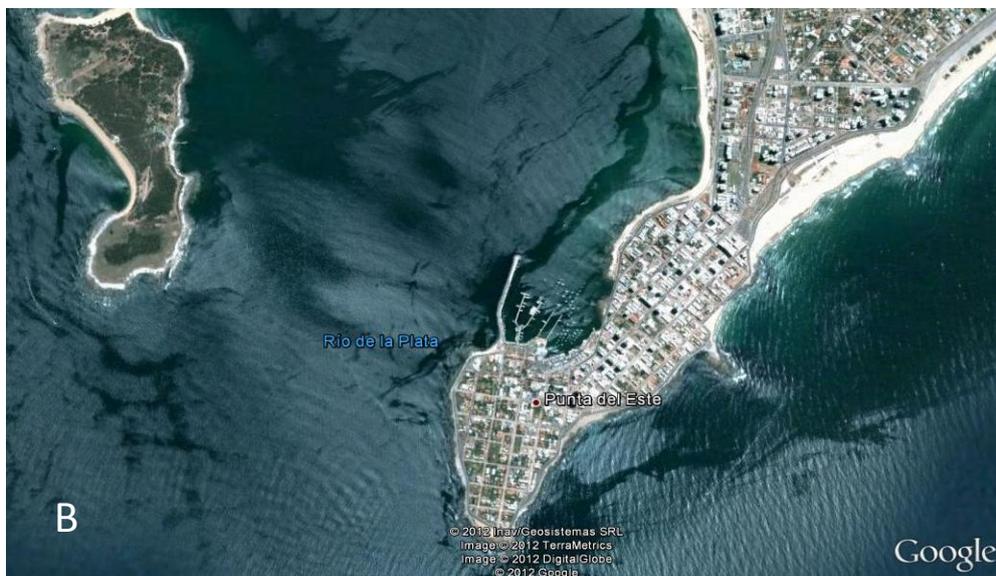


Figura 1. Área de estudio en la costa atlántica de Maldonado. A. Puerto de Piriópolis, B. Puerto de Punta del Este.

Registro de variables morfológicas

Para cada ejemplar se confeccionó una ficha donde se registraron las principales variables biométricas así como sus caracteres sexuales internos y externos.

La talla total de cada individuo se registró a través de un calibre (precisión 0,01mm) considerando la longitud total de concha - LT (Lanfranconi *et al.* 2009) (Figura 2).



Figura 2. Longitud total de concha.

Los ejemplares fueron pesados (peso total, peso del pie, peso desconchado, precisión de 0.01g).

La discriminación por sexo se realizó en base a caracteres morfológicos registrados en estudios previos (Micu *et al.* 2009, Bigatti, Penchaszadeh 2005, Covarrubias, Romero 2009, Lanfranconi *et al.* 2009) donde las hembras son los individuos sin pene y con gónadas de color amarillo, los machos con longitud de pene mayor a 15 mm y gónadas brillantes de color naranja-rojo y los imposex con longitudes de pene que van desde 1,9 a 25 mm y las gónadas que o bien eran totalmente amarillo o una mezcla de amarillo y naranja pálido (Mann *et al.* 2006). También se midió y registró la longitud del pene (precisión 0,01mm).

Rendimiento músculo del pie

El rendimiento del músculo del pie se estimó como la relación (o porcentaje) entre el peso total y el peso de la sección muscular del pie.

Proporción Sexual

Se estimó la relación entre Machos: (hembras + imposex) para ambos puertos, como también la proporción entre Hembras : Imposex.

Análisis histológico gonadal

Para el estudio histológico gonadal se extrajeron muestras de tejidos (0,5 cm³) de los fragmentos anterior, medio y posterior de las gónadas (Micu *et al.* 2009, Covarrubias, Romero 2009), las cuales se fijaron en AFA durante 48h para asegurar una correcta penetración del mismo y luego fueron almacenadas en alcohol 70° hasta su posterior procesamiento histológico. También se extrajeron muestras de pene tanto de machos como de imposex. Todas las muestras fueron deshidratadas en alcoholes de graduaciones crecientes y embebidas en parafina utilizando métodos histológicos estándar (Mann *et al.* 2006). Luego se seccionaron con micrótopo manual en láminas de 5 a 7 µ de espesor, las cuales fueron introducidas en agua destilada en Baño María (37°C) para provocar la total distensión de la parafina y se colocaron en portaobjetos limpios y provistos de Albúmina de Mayer. Se tiñeron con hematoxilina de Mayer y eosina. Los preparados histológicos así obtenidos se examinaron bajo microscopio óptico y se determinaron los estadios de desarrollo gonadal.

Protocolo ajustado para la obtención de los cortes histológicos

DESHIDRATACIÓN

Alcohol 80° 30´
Alcohol 95° 1h
Alcohol 100° I..... 1h
Alcohol 100° II..... 30´
Alcohol 100° : Cloroformo (1:1) 30´

DIAFANIZACIÓN

Cloroformo I 30´

IMPREGNACIÓN

Parafina I 1h (en estufa a 60 °C)
Parafina II 1h (en estufa a 60 °C)

CONFECCIÓN BLOQUE

CORTE 5 – 7 μm

DEPARAFINACIÓN

Xilol I..... 15´

Xilol II..... 6 baños rápidos

HIDRATACIÓN

Alcohol 100° I..... 6 baños rápidos

Alcohol 100° II..... 6 baños rápidos

Alcohol 95° 6 baños rápidos

Alcohol 70° 6 baños rápidos

Agua Destilada: 2´

TINCIÓN

Hematoxilina de Mayer 3´

Agua corriente circulante 5´ (hasta virado)

Eosina 1.5´

MONTAJE

Alcohol 95° I 6 baños rápidos

Alcohol 95° II 6 baños rápidos

Alcohol 100° I 6 baños rápidos

Alcohol 100° II 6 baños rápidos

Xilol I..... 6 baños rápidos

Xilol II..... 6 baños rápidos

Análisis estadístico de los datos

La relación largo total–peso total para cada sexo fue evaluada mediante un análisis de regresión lineal simple sobre las variables transformadas (log). Los resultados se presentaron discriminados por puerto y por sexo.

Se realizaron análisis de varianza (ANOVA) de una vía para detectar la existencia de diferencias significativas entre las medias de peso total, peso del pie, talla, rendimientos discriminados por sexo. Asimismo se realizaron ANOVAs de dos vías, para la comparación entre las variables biométricas entre los puertos de procedencia

(Zar 1999). También se realizaron análisis de covarianza (ANCOVA) para determinar la existencia de diferencias significativas en el peso medio de individuos capturados en los diferentes puertos, utilizando la talla como covariable (Zar 1999).

4. RESULTADOS

4.1 Relaciones Biométricas

Las principales variables biométricas (medias y desvíos estándares de las mismas), por sexo y para los dos puertos de procedencia se presentan en la Tabla 1. Los individuos del puerto de Punta del Este alcanzaron LT entre 59,4 a 101,8 mm (N= 88) en hembras, en imposex de 74,9 a 102,5 mm (N= 10) y en machos de 60,4 a 100,6 mm (N= 68). En el puerto de Piriápolis la longitud total osciló entre 61,3 a 88,5 mm (N= 97) en hembras, mientras que en imposex fue de 63,4 a 85,6 mm (N= 21) y en machos de 62,5 a 96,6 mm (N= 99) (Figura 3).

Tabla 1. Variables morfométricas discriminadas por sexo y por puerto de procedencia. Largo medio total (mm), peso medio total (g), peso medio del pie (g), rendimiento total de *Rapana venosa*.

Sexo	Largo Medio Total ± DE (mm)		Peso Medio Total ± DE (g)		Peso Medio del Pie ± DE (g)		Rendimiento total	
	Punta del Este	Piriapolis	Punta del Este	Piriapolis	Punta del Este	Piriapolis	Punta del Este	Piriapolis
Hembras	81,32 ± 8,30	74,01 ± 6,24	134,58 ± 34,76	95,50 ± 20,70	15,25 ± 4,43	12,13 ± 3,17	0,11 ± 0,02	0,11 ± 0,04
Imposex	86,30 ± 9,21	74,02 ± 6,49	144,26 ± 44,96	94,29 ± 24,66	18,10 ± 5,73	11,60 ± 4,05	0,13 ± 0,01	0,12 ± 0,02
Machos	84,23 ± 9,77	79,54 ± 6,18	143,76 ± 40,61	110,62 ± 25,20	18,40 ± 6,66	16,84 ± 5,07	0,12 ± 0,03	0,15 ± 0,02

La relación largo – peso total por sexo y para cada puerto se ajustó con una relación potencial ($y = a \cdot x^b$) en todos los casos. En el puerto de Punta del Este fue para hembras ($y = 0,004x^{2,4}$, $R^2 = 0,79$), para imposex ($y = 0,005x^{2,3}$, $R^2 = 0,66$) y para machos ($y = 0,0027x^{2,4}$, $R^2 = 0,81$). En el puerto de Piriápolis se estimó en ($y = 0,001x^{2,6}$, $R^2 = 0,852$) para hembras, en ($y = 0,0005x^{2,81}$, $R^2 = 0,89$) para imposex y en ($y = 0,001x^{2,6}$, $R^2 = 0,77$) para machos.

La regresión lineal largo-peso total presentó ajustes significativos ($p < 0,01$) por sexo y para cada puerto (Tabla 2, Figura 4 y 5).

Para un mismo largo total los individuos imposex de Punta del Este tuvieron mayor peso que los de Piriápolis (ANCOVA $F_{1,164} = 26,76$, $p < 0,01$).

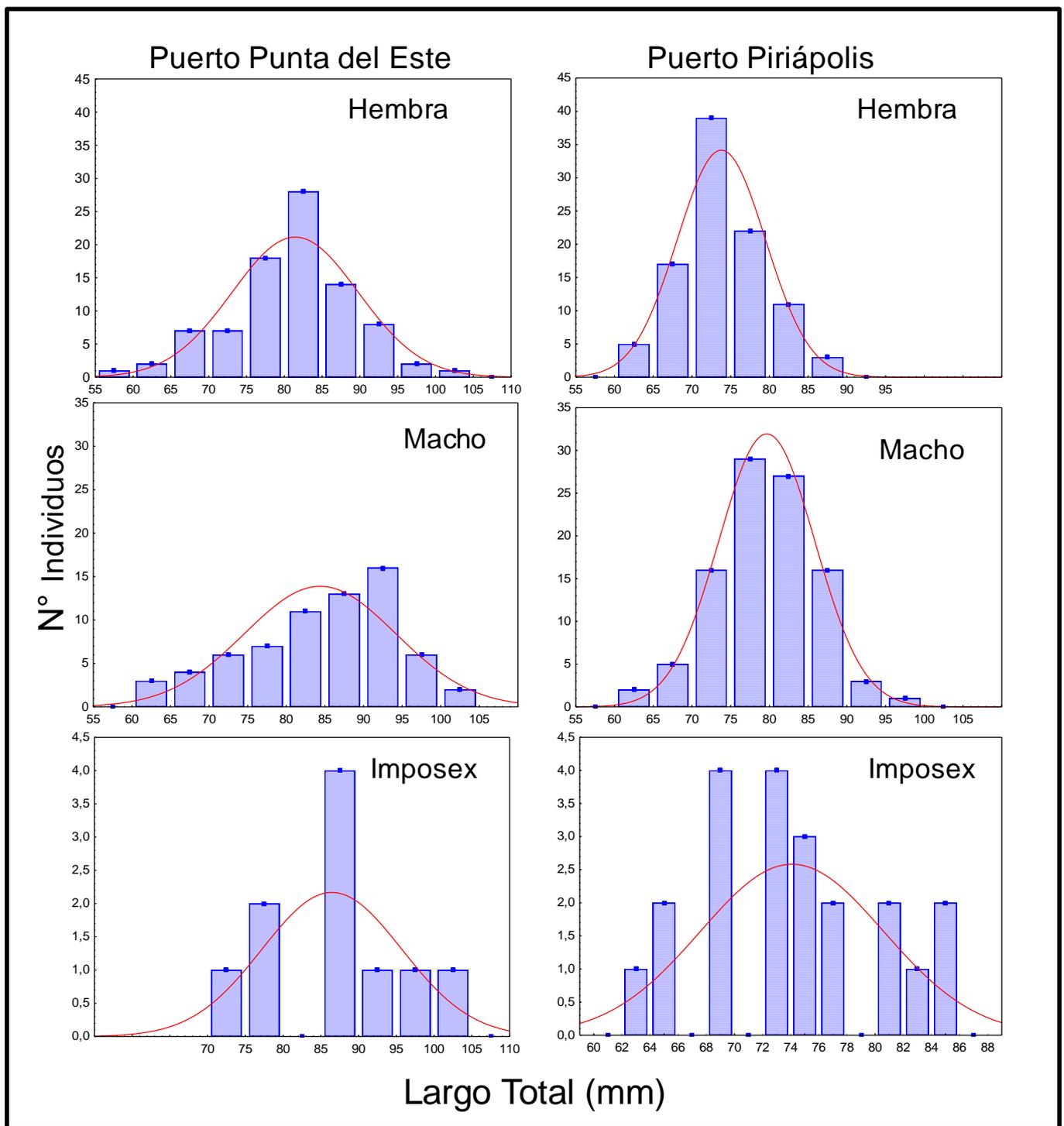


Figura 3. Distribución de frecuencia de tallas por sexo y para cada puerto.

Tabla 2. Relación lineal largo - peso total por sexo y para cada puerto.

	Punta del Este			
	Log a	b	r ²	P
Hembras	2.38	2.42	0.78	<< 0.01
Machos	2.45	2.56	0.81	<< 0.01
Imposex	2.31	2.33	0.65	< 0.01

	Piriápolis			
	Log a	b	r ²	P
Hembras	2.63	2.93	0.85	<< 0.01
Machos	2.63	2.97	0.77	<< 0.01
Imposex	2.81	3.29	0.89	<< 0.01

El rendimiento medio total de las hembras fue significativamente menor que en machos e imposex ($F_{2,156} = 7,13$; $p << 0,01$) en el puerto de Punta del Este. Mientras que en Piriápolis el rendimiento total de machos fue significativamente mayor que en hembras e imposex ($F_{2,200} = 36,75$; $p << 0,01$) (Tabla 1). El análisis de varianza de dos vías (ANOVA dos vías), para el rendimiento total entre los dos puertos mostró diferencias significativas ($F_{1,357} = 52,09$, $p << 0,01$), siendo los caracoles del puerto de Piriápolis los que presentaron un mayor rendimiento total. Asimismo los machos de los dos puertos alcanzaron rendimientos significativamente mayores que hembras e imposex ($F_{2,357} = 37,27$, $p << 0,01$).

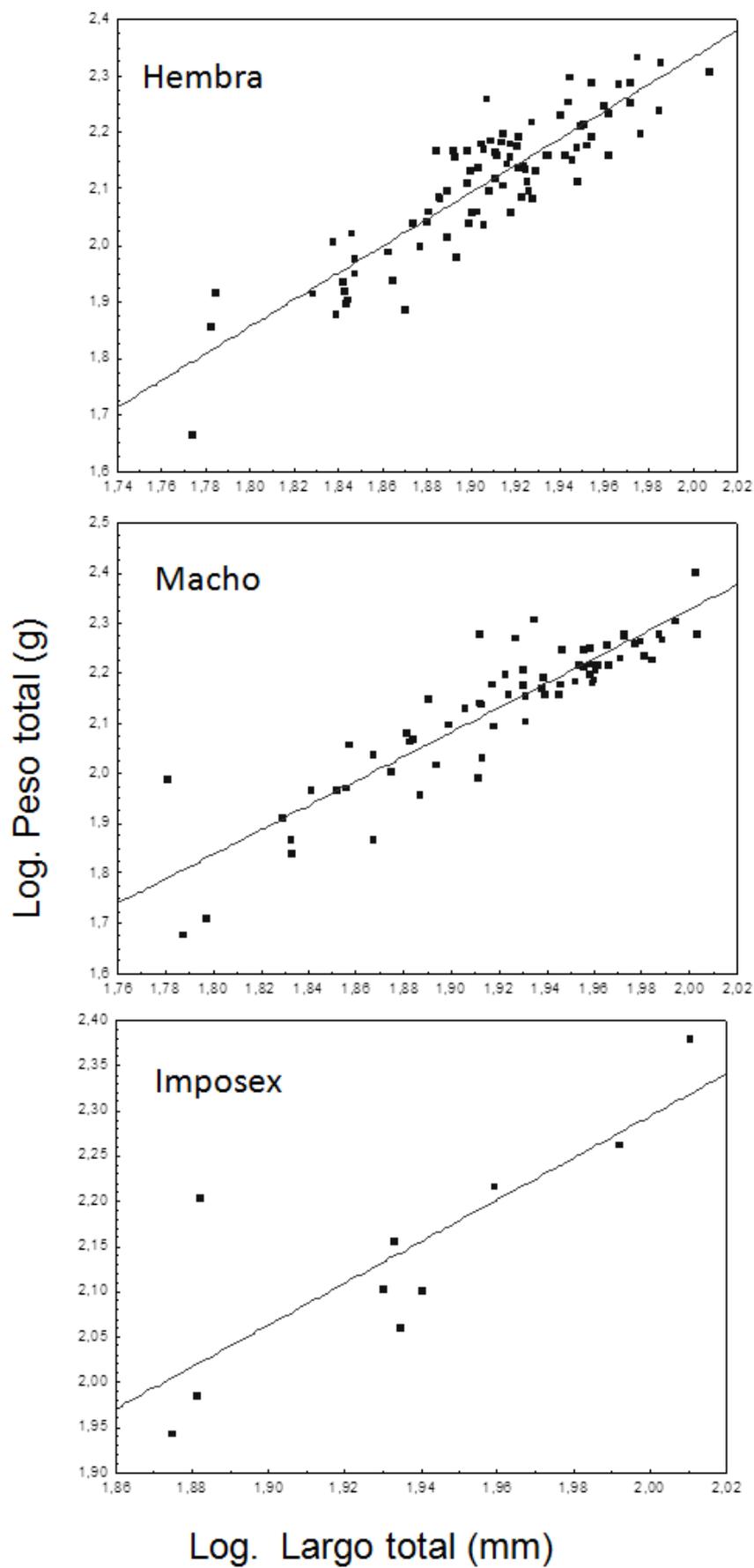


Figura 4. Puerto Punta del Este. Regresión lineal largo-peso total discriminado por sexo.

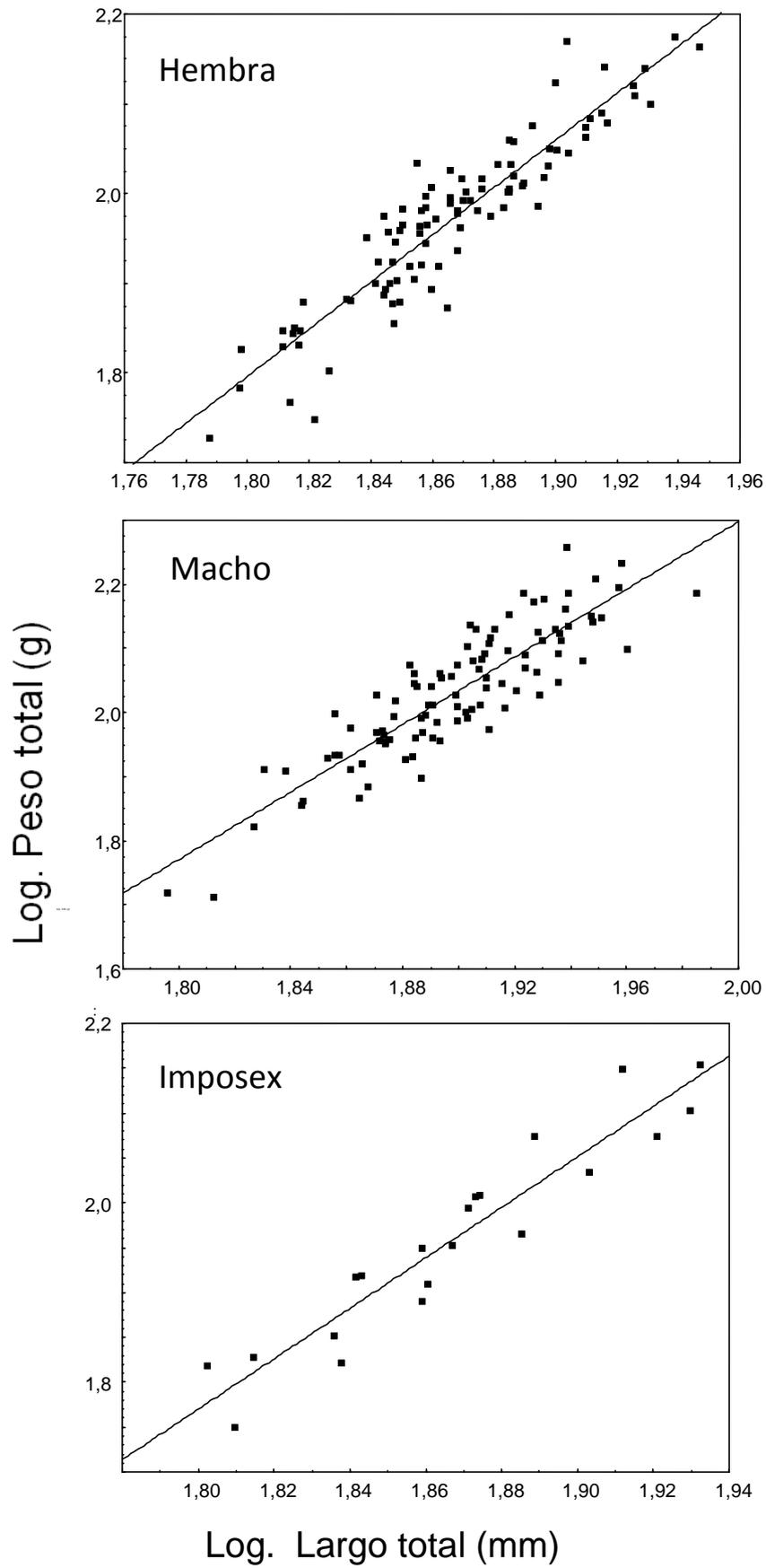


Figura 5. Puerto Piriápolis. Regresión lineal largo-peso total discriminado por sexo.

Para el puerto de Punta de Este el análisis de varianza (ANOVA) de una vía mostró que el largo total medio de los caracoles discriminados por sexo, no tuvo diferencias significativas ($F_{2,163} = 2,82$; $p > 0,01$); así como tampoco el peso total medio ($F_{2,163} = 1,23$; $p \gg 0,01$). Sin embargo en el puerto de Piriápolis tanto el largo total ($F_{2,214} = 21,13$; $p \ll 0,01$) como el peso total ($F_{2,214} = 11,75$; $p \ll 0,01$), mostraron diferencias significativas, siendo los machos los que presentaron peso y largo total con valores mayores que el resto de los individuos.

Hay diferencias significativas en el peso medio del pie en ambos puertos. En Punta del Este la diferencia estuvo dada por un tamaño significativamente menor en las hembras en relación a machos e imposex ($F_{2,157} = 6,31$; $p \ll 0,01$). En cambio en Piriápolis las diferencias significativas se debieron a que los machos son significativamente de mayor tamaño que hembras e imposex ($F_{2,200} = 32,52$; $p \ll 0,01$). Por tanto en Punta del Este los machos e imposex no se diferencian significativamente en el peso medio del pie mientras que en Piriápolis la similitud está dada entre hembras e imposex.

4.2 Proporción Sexual

La proporción sexual **Macho: (hembra + imposex)** fue 0.69:1 para Punta del Este y 0.84:1 para Piriápolis. Mientras que la proporción entre **Hembras: Imposex** fue 8.8:1 para Punta del Este y 4.6:1 para Piriápolis.

4.3 Caracteres sexuales primarios y secundarios

Hembras

Las hembras de *Rapana venosa* procedentes de ambos puertos, se caracterizaron por presentar gónadas de color amarillo y la ausencia de caracteres sexuales secundarios masculinos (pene). El ovario se observó ubicado en el extremo distal de la masa visceral (Fig. 6 A,B). Las hembras analizadas histológicamente mostraron ovarios maduros caracterizados mayoritariamente por la presencia de ovocitos vitelogénicos en diferente grado de desarrollo, así como ovocitos en estados iniciales de desarrollo. Los ovocitos maduros presentaron forma esférica y gran tamaño, con gránulos de vitelo eosinófilos, vesícula germinativa pequeña excéntrica

y nucléolo en su citoplasma (Fig. 6 C,D). Se observaron ovocitos vitelogénicos en todas las hembras analizadas histológicamente.

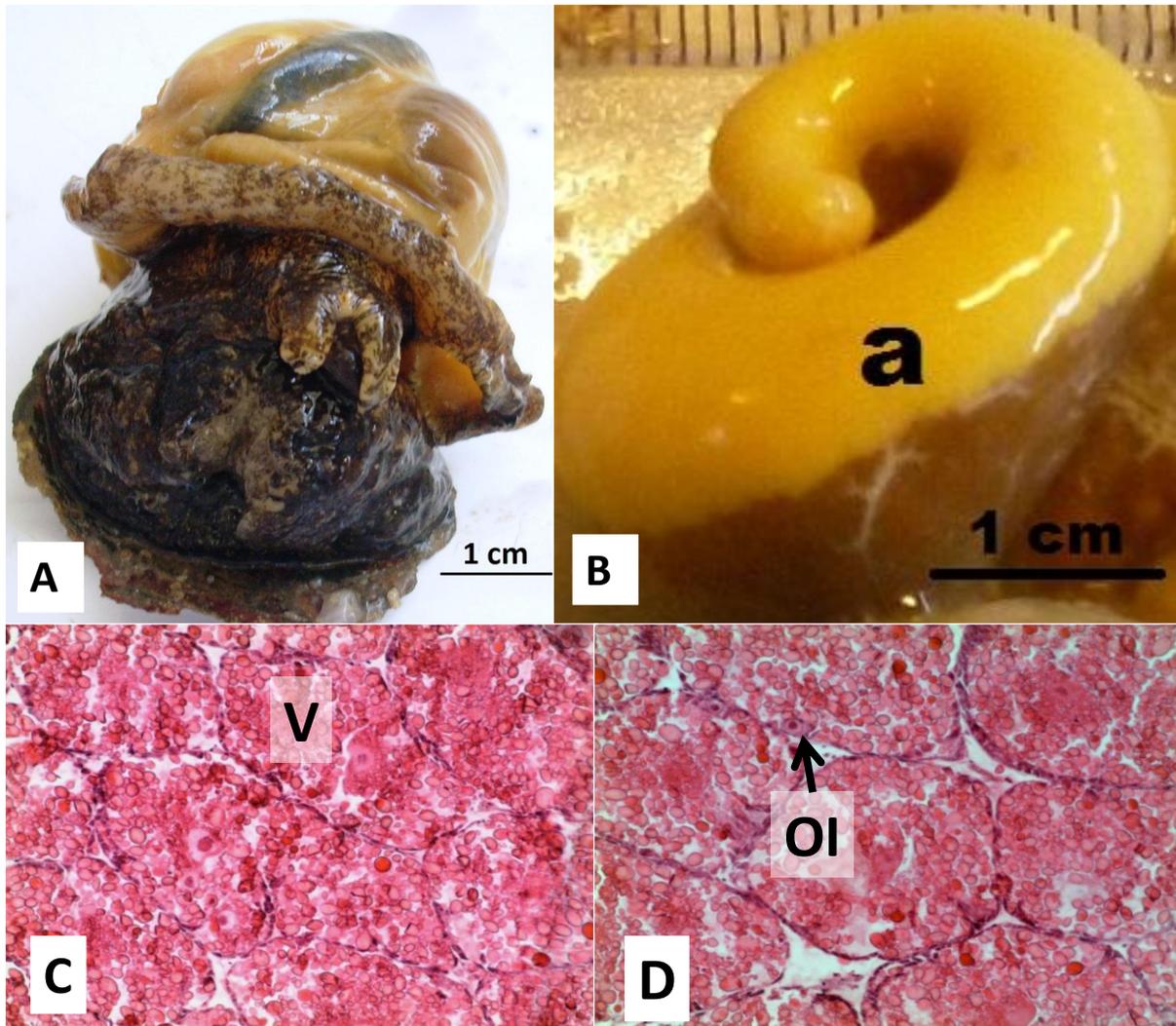


Figura 6. *Rapana venosa*, A. Hembra ejemplar entero, B. gónada femenina amarilla, C. corte histológico de gónada (aumento10X), D. corte histológico de gónada (10X). (a: ovario, V: Vitelo, OI: ovocito inicial).

Machos

Los machos de *Rapana venosa* presentaron un aparato reproductor constituido por un testículo conectado a una vesícula seminal y un vaso deferente, el cual desemboca en un pene conspicuo situado detrás del tentáculo derecho en la región cefálica. El testículo ubicado en el extremo distal de la masa visceral mostró coloración marrón oscura en los machos extraídos en ambos puertos (Fig. 7 A). A nivel histológico el testículo mostró túbulos delimitados por epitelio cilíndrico y tejido

conectivo, en cuyo lumen y pared se observaron gametos en diferentes estadios de la espermatogénesis (Fig. 7 B). Las espermátidas presentaron sus colas dirigidas hacia el lumen mientras que los espermatozoides filiformes se encontraron mayoritariamente en el lumen de los túbulos (Fig. 7 B).

El pene de *Rapana venosa* presentó forma alargada, lateralmente aplanados y su extremo distal de menor diámetro que el proximal (Fig. 7 A). La longitud de los penes varió entre 13,55 y 26,85 mm (Tabla 3). A nivel histológico el pene mostró estructura de órgano muscular delimitado por un epitelio cúbico, cuyas fibras musculares se encontraban dispuestas longitudinal, circular y radialmente. El vaso deferente presentó ubicación central, delimitado por un epitelio simple de células cilíndricas ciliadas (Fig. 7 C).

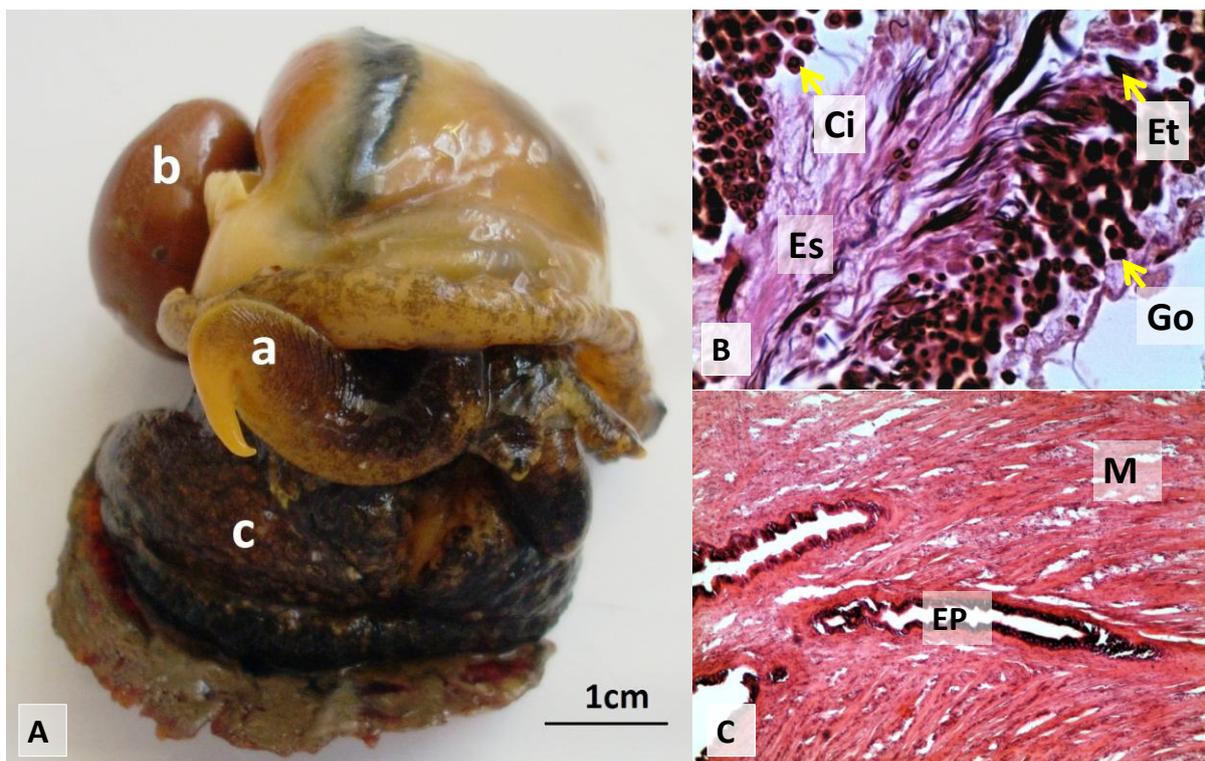


Figura 7. *Rapana venosa* A. Macho ejemplar entero, B. corte histológico de gónada, porción posterior (aumento 40X), C. corte longitudinal de pene de macho (aumento 4X) (a: Pene, b: gónada color marrón oscuro, c: pie, Ci: espermatozoides, Go: espermatozoides, Et: espermátidas, Es: espermatozoides, M: células musculares, EP: epitelio simple de células cilíndricas ciliadas).

Imposex

Los individuos imposex de *Rapana venosa*, se caracterizaron por la presencia concomitante de caracteres sexuales secundarios masculinos (pene) y gónadas femeninas (Fig. 8 A).

La longitud del pene en los individuos imposex varió entre 2,01 y 8,53 mm. Histológicamente, el pene presentó la misma estructura que en los machos (Fig. 8 E,F).

La gónada femenina de coloración amarillenta o marrón claro se observó ubicada en el extremo distal de la masa visceral. El análisis histológico, mostró que los individuos imposex presentaron folículos ováricos en las porciones anterior, media y posterior de la gónada (Figs. 8 B,C). Las hembras imposex estudiadas (N= 20) presentaron sus ovarios maduros, observándose mayoritariamente ovocitos vitelogénicos a nivel histológico (Fig. 8 B). El ejemplar que presentó el pene de mayor longitud (8,53 mm) mostró además una gónada de color marrón claro lo que permitió clasificarlo como un individuo imposex; sin embargo el análisis histológico gonadal mostró estructura testicular (Fig. 8 D).

El ANOVA de una vía mostró que la longitud media del pene difirió significativamente entre machos e imposex (Tabla 3).

Tabla 3. Variables morfométricas del pene de machos e imposex en el puerto de Piriápolis. Largo medio (mm), Ancho medio (mm), Punta media (mm) de *Rapana venosa*.

	Largo	Ancho	Punta	Anova
Machos	19,73 ± 2,51	9,24 ± 1,63	10,04 ± 1,3	F _{1,108} = 486,41; p<<0,00
Imposex	4,37 ± 1,75	1,62 ± 0,98	2,51 ± 0,78	F _{1,108} = 486,41; p<<0,01

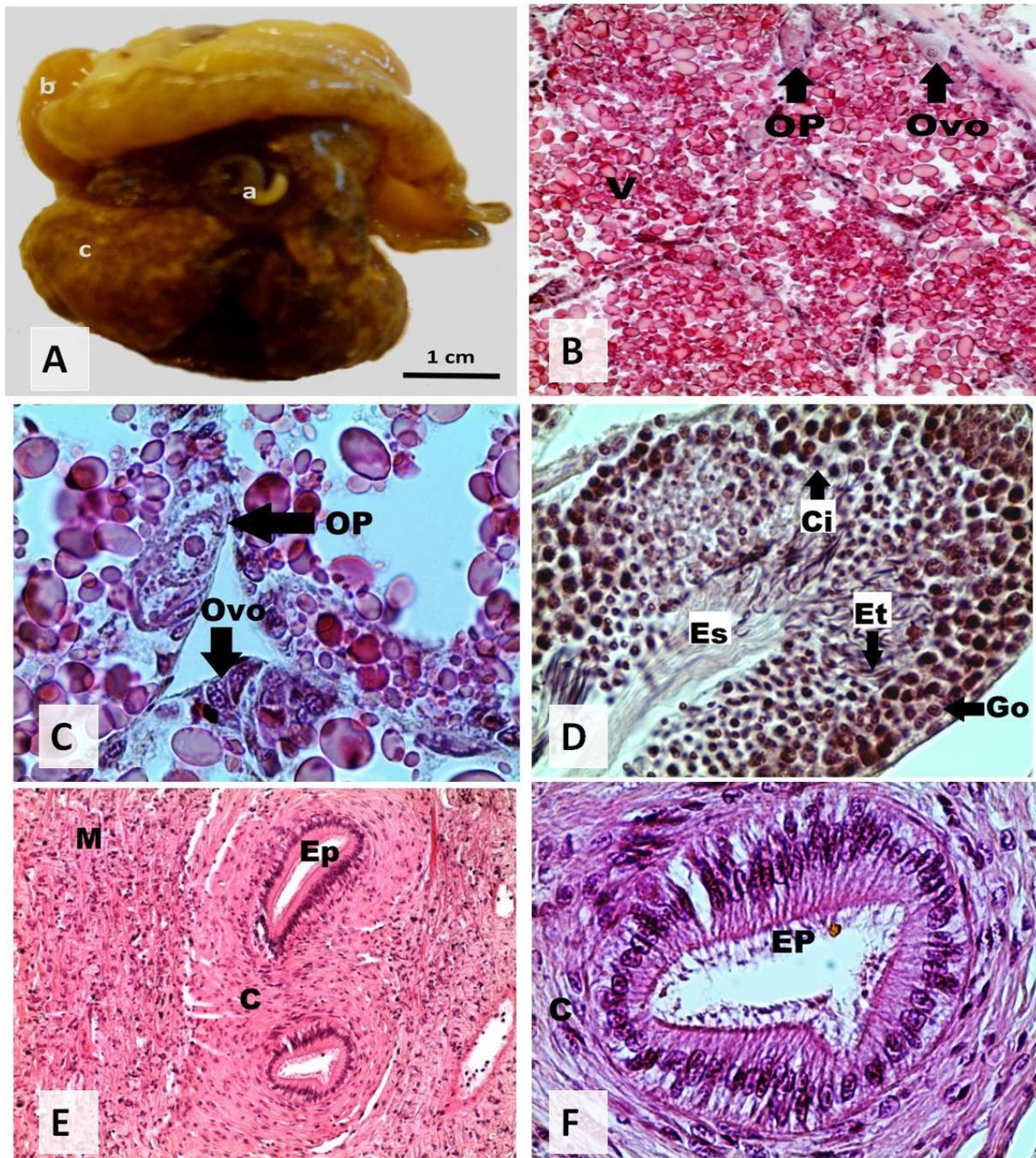


Figura 8. *Rapana venosa* A. Imposex ejemplar entero, B. corte histológico de gónada, porción media (aumento 10X), C. corte histológico de gónada, porción media (40X). D. imposex con gónada masculina (40X). E. corte longitudinal de pene de imposex (10X), F. corte longitudinal de pene de imposex 40X. (a: Pene imposex, b: Gónada marrón claro, c: Pie, V: Vitelo, OP: Ovocito previtelogénico, Ovo: Ovogonia, M: células musculares, EP: epitelio simple de células cilíndricas ciliadas, C: Tejido conectivo, Ci: espermatoцитos, Go: espermatogonias, Et: espermátidas, Es: espermatozoides).

5. DISCUSIÓN

5.1. Relaciones Biométricas

Los individuos imposex de *Rapana venosa* extraídos del puerto de Punta del Este tuvieron mayor peso que los de Piriápolis, para un mismo largo total. Estas diferencias podrían explicarse debido al grado de contaminación y/o diferencias en la disponibilidad de alimento entre los distintos puertos (Bigatti *et al.* 2013, Mann *et al.* 2006). Aunque no existen trabajos específicos que permitan comparar las condiciones entre ambos puertos, el grado de contaminación e hipoxia podría ser mayor para el puerto de Piriápolis. A pesar que no se lo considera como un puerto de gran tráfico marítimo (actividad de pesca artesanal y recreativa), se encuentra ubicado en una bahía semi-cerrada que probablemente dificulta la dispersión de contaminantes (Bigatti *et al.* 2013). La mayor concentración de los contaminantes podría redundar en un menor crecimiento individual aunque acompañado de un mayor porcentaje de individuos imposex en el puerto de Piriápolis (ver sección 5.1 y 6.2). En este caso sería mayor la energía destinada a generar individuos imposex (estructuras reproductivas energéticamente costosas) y menor la destinada al crecimiento individual. Sin embargo los machos de *Rapana venosa* colectados en el puerto de Piriápolis presentaron tamaños corporales (peso y largo) mayores que hembras e imposex, pero no se observó diferencias significativas en talla y peso entre los distintos sexos para el puerto de Punta del Este. De acuerdo a éstos resultados el mayor tamaño de los machos podría coincidir con el momento de cópula, lo cual fue observado durante el muestreo (Fabiano com.per.). Estos resultados son parcialmente similares con los obtenidos por (Mann *et al.* 2006) para la Bahía de Chesapeake, donde no se registró un marcado dimorfismo sexual a nivel poblacional, sin embargo pudo registrarse un menor peso húmedo en las hembras en relación a los otros dos sexos; a pesar que dicha bahía no presenta limitantes en la disponibilidad de alimento y existe una invasión continúa de dicha especie. En comparación con otra especie *Tonna Galea* en Uruguay, se registró que las hembras presentaron longitud y peso superiores a los machos. Estas diferencias podrían explicarse debido a que las hembras presentaron avanzado grado de desarrollo gonadal, que correspondió a ovipostura activa (Fabiano *et al.* 2003).

Es de destacar que a pesar de la posible variación en las condiciones de contaminación y de disponibilidad de alimento entre ambos puertos, también existió una diferencia en el muestreo realizado para la extracción de los individuos a ser analizados. En Punta del Este se realizó la recolección mensual de muestras de diciembre 2010 a abril 2011, mientras que en Piriápolis la muestra se tomó únicamente en el mes de diciembre de 2012. Esto coincide con lo ya registrado por (Mann *et al.* 2006) donde las diferencias de tamaños individuales de *Rapana venosa* fueron explicadas por variaciones en los métodos de recolección de muestras, los intervalos de muestreo y cantidad de caracoles examinados.

Rendimiento del músculo del pie

Al comparar el rendimiento del músculo del pie con otros caracoles marinos de importancia pesquera en Uruguay, se observa que *Rapana venosa* presentó porcentajes menores (Fabiano *et al.* 2000, Riestra, Fabiano 2000). Considerando la pesquería del caracol fino *Zidona dufresnei* (Mollusca: Gastropoda) en el Uruguay, donde compararon rendimientos con otros recursos pesqueros no tradicionales, moluscos bentónicos marinos como *Adelomelon beckii* y *Tonna galea* los que presentaron rendimientos del 30 % y 19% respectivamente, siendo el rendimiento de *Zidona dufresnei* (48%). Otro recurso pesquero importante como *Adelomelon (Pachycymbiola) brasiliiana* presenta rendimientos de 20% (Fabiano com.per). Estos valores son superiores en relación a los resultados obtenidos en *Rapana venosa* y al ser un recurso pesquero no tradicional en Uruguay al igual que otros moluscos, dificulta aún más incentivar la pesquería en la zona. No obstante la incorporación del caracol *Rapana venosa* como nuevo recurso pesquero artesanal generaría beneficios socio-económicos para este sector, y concomitantemente disminuiría las alteraciones causadas en la dinámica y el funcionamiento de los ecosistemas por ser una especie invasora.

5.2 Proporción Sexual

La proporción sexual (macho: (hembra + imposex) en *Rapana venosa* muestra un claro sesgo hacia la predominancia de hembras funcionales (hembras + imposex), siendo mayor el número de machos en Piriápolis (0.84:1) que en Punta

del Este (0.69:1). Estos resultados constituyen la primera estimación de proporción sexual de *Rapana venosa* para la costa atlántica considerando los individuos imposex.

Esta estimación se contrapone a la realizada por Mann (2006) para la Bahía de Chesapeake (EUA), quien obtuvo un mayor número de machos en relación al total de hembras funcionales en 4 de las localidades estudiadas. Así mismo, datos de proporción de sexos en *Rapana venosa* en el litoral de Agigea (Rumania), también indicaron una dominancia numérica de los machos (M: (F+I) (1.09:1) y un predominio de hembras en comparación con imposex (F: I = 3.26:1) (Micu *et al.* 2009). Para nuestras costas, la estimación realizada por (Lafranconi y col. 2009), aunque fue solamente de machos en relación a hembras (debido a que en su análisis no detectaron individuos imposex), también se obtuvo un sesgo numérico hacia las hembras de la población en concordancia con lo obtenido en el presente estudio. Esta preponderancia de hembras observada en ambas poblaciones de nuestra costa podría atribuirse a la coincidencia del muestreo con la época reproductiva de éstos y otros invertebrados en nuestras latitudes (desde fines de primavera hasta inicio de otoño). Además muchos gasterópodos murícidos como ser *Bolinus brandaris* presentan un comportamiento reproductivo en el que las hembras forman agregaciones para depositar huevos colectivos (Elhasni *et al.* 2013); este también podría ser el caso de *Rapana venosa*.

El análisis de la proporción entre hembras e imposex (H:I) de *Rapana venosa* mostró un sesgo hacia las hembras en ambos puertos pero en mayor proporción en Punta del Este. Este resultado es coincidente con el reportado para la misma especie (Micu *et al.* 2009) e incluso para otro murícido *Bolinus brandaris* (Elhasni *et al.* 2013). Sin embargo (Mann *et al.* 2006) describe una preponderancia de individuos imposex sobre hembras de *Rapana venosa*, (por lo menos en una proporción de 2:1) en 4 diferentes regiones de la Bahía de Chesapeake. El mayor porcentaje de individuos imposex registrado en el puerto de Piriápolis (9.7%) en relación a Punta del Este (6.0%) también podría explicarse por la condiciones de bahía semi-cerrada de dicho puerto (Bigatti *et al.* 2013). Dado que el desarrollo de imposex en gasterópodos se relaciona directamente con la exposición acumulativa del TBT (Mann *et al.* 2006), podría considerarse que dado un mayor concentración

de contaminantes en dicho puerto también sería mayor el tiempo de exposición a dichos compuestos y en consecuencia redundaría en un mayor número de individuos imposex.

5.3 Caracteres sexuales primarios y secundarios

Se registró por primera vez para el puerto de Piriápolis la presencia de imposex en el caracol *Rapana venosa*. También se realizó por primera vez la descripción macroscópica e histológica del pene de los individuos imposex de dicha especie.

El análisis histológico gonadal tanto de hembras como de individuos imposex de *Rapana venosa*, mostró solo elementos sexuales femeninos en las tres secciones gonadales estudiadas. Este hallazgo se contrapone con lo reportado por Micu y colaboradores (2009) en la misma especie, quienes observaron además células sexuales masculinas en la porción anterior de la gónada de hembras y de individuos imposex. Asimismo el análisis histológico gonadal de machos de Punta del Este y Piriápolis mostró elementos sexuales masculinos y en particular espermatozoides maduros en las tres secciones de la gónada (anterior, media y posterior) tal como fue observado por Micu *et al.* (2009) en la misma especie.

No existe información previa relativa a la estructura y morfología del pene de *Rapana venosa*. Por tanto se discuten los resultados obtenidos en relación a la morfología peniana reportada para otros gasterópodos marinos. La forma alargada y lateralmente aplanada de los penes de *Rapana venosa* fue muy similar a la encontrada en *Sinum cymba* (Gastropoda: Naticidae) cuyo pene situado detrás del tentáculo derecho muestra también forma de tubo lateralmente aplanado (Covarrubias y Romero 2009). En contraposición, Castillo y Brown (2008) describe en machos de *Echinolittorina peruviana* (Mollusca: Caenogastropoda), un pene de forma cónica, alargado y puntiagudo localizado debajo del tentáculo derecho. Sin embargo a nivel histológico los penes de las tres especies presentaron estructura de órgano muscular delimitado por un epitelio cúbico y fibras musculares dispuestas longitudinal, circular y radialmente (Castillo, Brown 2008, Covarrubias, Romero 2009).

Las diferencias significativas en el tamaño medio de los penes de imposex y machos reportados en este trabajo fueron también estimadas para la población de *Rapana venosa* de la bahía de Chesapeake (Mann *et al.* 2006). En ambas poblaciones los machos presentaron penes significativamente más largos que los individuos imposex. En este estudio se colectó un ejemplar con gónada de coloración atípica (marrón claro), que no presentaba la típica gónada amarilla de las hembras ni la coloración marrón oscura de los machos. A su vez se le detectó la presencia de un pene cuyo tamaño fue mayor al tamaño promedio registrado en imposex, pero mucho menor a los tamaños registrados para machos. El examen histológico gonadal mostró células sexuales masculinas y en particular espermatozoides maduros. En este caso se pueden plantear varias hipótesis para interpretar las características de este ejemplar:

1. podría tratarse de un macho joven, es decir un macho en crecimiento cuyo pene no haya completado el desarrollo total, aunque la relación entre largo del pene y tamaño individual no es la misma estimada para el resto de los machos. Esta hipótesis se sugiere en base a que el examen histológico gonadal sólo mostró células sexuales masculinas.
2. podría tratarse de una hembra imposex que ha revertido gonadalmente a macho. Esta hipótesis está sustentada en que el individuo presenta talla y peso corporal mayores a la media de los individuos imposex, así como una coloración gonadal similar a éstos, pero sin embargo no tiene el pene del tamaño de un macho.

Ninguna de estas hipótesis pueden ser corroboradas con los resultados obtenidos en este trabajo.

6. CONCLUSIONES

1. Los individuos imposex de *Rapana venosa* extraídos del puerto de Punta del Este tuvieron mayor peso que los de Piriápolis, para un mismo largo total.
2. Los machos de *Rapana venosa* colectados en el puerto de Piriápolis presentaron tamaños corporales (peso y largo) mayores que hembras e

imposex, pero no se observó dimorfismo sexual en talla y peso entre los distintos sexos para el puerto de Punta del Este.

3. Al comparar el rendimiento del músculo del pie con otros caracoles marinos de importancia pesquera en Uruguay, se observa que *Rapana venosa* presentó porcentajes menores.
4. Se reporta la primera estimación de proporción sexual considerando hembras funcionales (hembras e imposex) y machos de *Rapana venosa* para la costa atlántica.
5. La proporción sexual de *Rapana venosa* está sesgada hacia (hembras e imposex) en ambos puertos estudiados.
6. Entre hembras e imposex (H:I) la proporción de *Rapana venosa* mostró un sesgo hacia las hembras en ambos puertos pero en mayor proporción en Punta del Este.
7. El porcentaje de imposex de *Rapana venosa* es mayor en el puerto de Piriápolis que en el puerto de Punta del Este.
8. Se encontró más cantidad de machos en Piriápolis que en Punta del Este.
9. Se registró por primera vez para el puerto de Piriápolis la presencia de imposex en el caracol *Rapana venosa*.
10. También se realizó por primera vez la descripción macroscópica e histológica del pene de los individuos imposex de dicha especie.
11. Los individuos imposex, se caracterizaron por la presencia concomitante de caracteres sexuales secundarios masculinos (pene) y gónadas femeninas en los dos puertos.
12. En la histología gonadal de las hembras e imposex, se observaron elementos sexuales femeninos en las tres secciones analizadas.
13. Los caracoles del puerto de Piriápolis son los que presentaron un mayor rendimiento total.
14. Los machos de los dos puertos alcanzaron rendimientos significativamente mayores que hembras e imposex, por lo que sería más conveniente su extracción.
15. El fenómeno de imposex encontrado podría sugerir la presencia de TBT en los dos puertos.

7. BIBLIOGRAFÍA

- 1) Arrighetti F, Penchaszadeh P.E (2010). Gametogenesis, seasonal reproduction and imposex of *Adelomelon beckii* (Neogastropoda: Volutidae) in Mar del Plata, Argentina. *Aquatic Biology* 9: 63–75.
- 2) Aycaguer, C (2001). Un caso de imposex y otros posibles indicadores de tributilestaño en aguas uruguayas. en prensa.
- 3) Bigatti G, Penchaszadeh P (2005). Imposex in *Odontocymbiola magellanica* (Caenogastropoda: Volutidae) in Patagonia. *Comunicaciones de la Sociedad Malacológica del Uruguay* 9 (88): 371 – 375.
- 4) Bigatti G, Averbuj A, Castro I, Primost M, Carranza A, Commendatore M, Fillmann G, Delgado E, Scarabino F, Del Brío F, Franco M, Letamendía M, Martínez G, Saucó S, Penchaszadeh P.E (2013). Situación de contaminación en las costas del sur de Brasil, Uruguay y Argentina luego de la prohibición mundial de TBT en Problemática de los ambientes costeros, Montevideo, Ed. Cesar Goso, 26 p.
- 5) Carranza A, de Mello C, Ligrone A, González S, Píriz P, Scarabino F (2010). Observations on the invading gastropod *Rapana venosa* in Punta del Este Maldonado Bay, Uruguay. *Biological Invasions* 12: 995-998.
- 6) Castillo V. M, Brown D. I. (2008) Microscopic anatomy of the male reproductive system in *Echinolittorina peruviana* (Mollusca: Caenogastropoda). *International Journal of Morphology* 26(2): 423-432.
- 7) Cledón M, Theobald N, Gerwinski W, Penchaszadeh P.E. (2006). Imposex and organotin compounds in marine gastropods and sediments from the Mar del Plata coast, Argentina. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 86(04): pp 751-755.
- 8) Covarrubias A, Romero MS (2009) Anatomía del sistema reproductor femenino y masculino de *Sinum cymba* (Menke, 1828) (Gastropoda: Naticidae), *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 44(3): 673-683.
- 9) Delgado E, Carranza A, Saucó S, Letamendia M (2011). Imposex en *Rapana venosa* provenientes de la bahía de Maldonado, Uruguay, VIII Congreso Latinoamericano de Malacología, Puerto Madryn, 135 p.
- 10) Elhasni K, Vasconcelos P, Ghorbel M, Jarboul O (2013). Reproductive cycle of *Bolinus brandaris* (Gastropoda: Muricidae) in the Gulf of Gabès (southern

Tunisia), *Mediterranean Marine Science*, 14/1, 2013, 24-35.

- 11) Fabiano G, Riestra G, Santana O, Delfino E, Foti R, Capítulo III (2000). Consideraciones sobre la pesquería del caracol fino *Zidona dufresnei* (Mollusca: Gastropoda) en el Uruguay. Período 1996-1998. En: Recursos pesqueros no tradicionales: moluscos bentónicos marinos, Montevideo, Publicaciones del Plan de Investigación Pesquera INAPE-PNUD/URU/92/003, pp 114-143.
- 12) Fabiano G, Santana O, Riestra G (2003). Aspectos de la reproducción de *Tonna galea* (mollusca: gastrópoda) en aguas atlánticas del Uruguay. En prensa.
- 13) Harding J, Mann R (1999). Observations on the biology of the Veined Rapa Whelk, *Rapana venosa* (Valenciennes, 1846) in the Chesapeake Bay. *Journal of Shellfish Research* 18: 9-17.
- 14) Horiguchi T, Cho H-S, Shiraishi H, Kojima M, Kaya M, Morita M & Shimizu M (2001). Contamination by organotin (tributyltin and triphenyltin) compounds from antifouling paints and endocrine disruption in marine gastropods; Riken Review No. 35: Focused on New Trends in Bio-Trace Elements Research 9-11.
- 15) Lanfranconi A, Hutton M, Brugnoli E, Muniz P (2009). New record of the alien mollusc *Rapana venosa* (Valenciennes, 1846) in the Uruguayan coastal zone of Río de la Plata. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, 4(2): 216-221.
- 16) Mann R, Occhipinti A, Harding J, (2004). Alien Species Alert: *Rapana venosa* (veined welk). ICES Cooperative Research Report No. 264, 14p.
- 17) Mann R, Harding J, Westcott E (2006). Occurrence of imposex and seasonal patterns of gametogenesis in the invading veined rapa whelk *Rapana venosa* from Chesapeake Bay, USA. *Marine Ecology Progress Series* Vol. 310: 129–138.
- 18) Micu S, Comanescu G, Kelemen B (2009). The imposex status in *Rapana venosa* population from Agigea littoral. *Analele Științifice a le Universității “Al. I. Cuza” Iași, s. Biologie animală, Tom LV.*
- 19) Orensanz JML, Schwindt E, Pastorino G, Bortolus A, Casas G, Darrigran G, Elías R, López Gappa JJ, Obenat S, Pascual M, Penchaszadeh P, Piriz ML, Scarabino F, Spivak ED, Vallarino EA (2002). No longer the pristine confines of the world ocean: a survey of exotic marine species in the southwestern Atlantic. *Biological Invasions* 4: 115-143.

- 20) Pastorino G, Penchaszadeh PE, Schejter L, Bremec C (2000). *Rapana venosa* (Valenciennes, 1846) (Mollusca: Muricidae): A new gastropod in south atlantic waters. *Journal of Shellfish Research* 19: 897-899.
- 21) Riestra G, Fabiano G (2000). Moluscos gasterópodos de interés socio-económico para el Uruguay. En: Recursos Pesqueros No Tradicionales: Moluscos Bentónicos Marinos. Ed. M. Rey. Proyecto INAPE-PNUD URU/92/003. ISBN 9974-563-13-5. 75-81.
- 22) Savini D, Occhipinti-Ambrogi A (2006). Consumption rates y prey preference of the invasive gastropod *Rapana venosa* in the Northern Adriatic Sea. *Helgoland Marine Research* 60(2): 153-159.
- 23) Scarabino F, Menafrá R, Etchegaray P (1999). Presencia de *Rapana venosa* (Valenciennes, 1846) (Gastropoda: Muricidae) en el Río de la Plata. *Boletín de la Sociedad Zoológica del Uruguay (Actas de las V Jornadas de Zoología del Uruguay)* 11 (Segunda Epoca):40. Montevideo.
- 24) Scarabino F, Zaffaroni JC, Clavijo C, Carranza A, Nin M (2006). Bivalvos marinos y estuarinos de la costa uruguaya: faunística, distribución, taxonomía y conservación. En: Menafrá R, Rodríguez-Gallego L, Scarabino F, Conde D (eds) Bases para la conservación y el manejo de la costa uruguaya, Montevideo, Vida Silvestre Uruguay pp 157-169.
- 25) Zar JH (1999). *Biostatistical Analysis*. 4a. ed, New Jersey, Prentice Hall, 662 p.