Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Análisis de los niveles de metales pesados (Pb, Cu, Cr, Zn, Ni y Cd) y aspectos reproductivos del delfín franciscana (Pontoporia blainvillei)

Panebianco, María Victoria

2011

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Panebianco, María Victoria. (2011). Análisis de los niveles de metales pesados (Pb, Cu, Cr, Zn, Ni y Cd) y aspectos reproductivos del delfín franciscana (Pontoporia blainvillei). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Panebianco, María Victoria. "Análisis de los niveles de metales pesados (Pb, Cu, Cr, Zn, Ni y Cd) y aspectos reproductivos del delfín franciscana (Pontoporia blainvillei)". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2011.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Análisis de los niveles de metales pesados (Pb, Cu, Cr, Zn, Ni y Cd) y aspectos reproductivos del delfín franciscana (*Pontoporia blainvillei*)

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Ciencias Biológicas

María Victoria Panebianco

Directores de Tesis: Dr. Humberto Luis Cappozzo
Dr. Jorge Eduardo Marcovecchio
Consejero de Estudios: Dra. Graciela Esnal

Lugar de trabajo: Laboratorio de Ecología, Comportamiento y Mamíferos marinos-Museo Argentino de Ciencias Naturales "Bernardino Rivadavia"

Buenos Aires, 2011

Análisis de los niveles de metales pesados (Pb, Cu, Cr, Zn, Ni y Cd) y aspectos reproductivos del delfín franciscana (*Pontoporia blainvillei*)

El delfín franciscana, *Pontoporia blainvillei* es un pequeño cetáceo endémico de las costas del Océano Atlántico Sudoccidental de hábitos marino-costeros. La especie fue considerada "Vulnerable" por la IUCN. El objetivo de la presente tesis fue obtener nueva información científica acerca de la presencia y acumulación de metales pesados y estudiar aspectos reproductivos en el delfín franciscana que habita en el sur de la provincia de Buenos Aires. Se determinaron concentraciones de metales pesados (Cd, Pb, Zn, Cu, Cr y Ni) en el tejido hepático (n= 40), renal (n= 39), epitelial (n= 33) y muscular (n= 36) y se estableció la influencia de parámetros ecológicos y biológicos sobre la asimilación de estos elementos. La concentración de metales pesados fue determinada por espectrofotometría de absorción atómica y espectrometría de plasma inductivamente acoplado. El estado general de los individuos fue moderadamente bueno. No se encontraron diferencias entre los tejidos hepático y renal en cuanto a los metales detectados (Zn, Cu y Cd). El Cd presentó mayor concentración en el riñón, mientras que el Cu y el Zn en el hígado. El sexo no afectó las concentraciones de Zn, Cu y Cd en el hígado, mientras que influyó sobre el Cu y el Zn en el riñón. El Zn y el Cu no se correlacionaron significativamente con la talla, peso y edad. Mientras que el Cd sí lo hizo, de forma positiva con la edad, talla y peso. El estado de madurez sexual de los ejemplares influyó únicamente sobre la acumulación del Cd en el hígado. Mientras que en el riñón influyó sobre el Cu y el Zn. El estado de condición podría afectar los niveles de Zn. En la piel el Zn resultó mayoritario seguido por el Ni. El Zn, en piel, fue afectado significativamente por el sexo, la edad y el estado de madurez de los ejemplares, mientras que el Ni no lo fue. No se encontraron diferencias significativas entre las localidades analizadas para las concentraciones de los metales pesados. Estas

concentraciones resultaron las más bajas a lo largo de toda la distribución geográfica de la especie. El peso combinado y medio de los testículos y el índice de madurez sexual resultaron buenos indicadores del estado de madurez. La edad, talla y peso medios de madurez fueron: 2,92-3,54 años, 126,19-126,26 cm y 23,47-23,75 kg respectivamente. *Pontoporia blainvillei* podría tener un sistema de apareamiento monogámico

Palabras Claves: Metales traza, edad, madurez sexual, condición corporal, Buenos Aires, Argentina.

Heavy metals levels (Pb, Cu, Cr, Zn, Ni y Cd) and reproductive aspects of franciscana dolphin (*Pontoporia blainvillei*)

The franciscana dolphin, *Pontoporia blainvillei* is a small cetacean endemic to the southwestern Atlantic Ocean shores of coastal and marine habits. The species was considered "Vulnerable" by IUCN. The objective of this thesis was to obtain new scientific information about the presence and accumulation of heavy metals and study of reproductive traits in the franciscana dolphin that lives in southern Buenos Aires province. The levels of heavy metals (Cd, Pb, Zn, Cu, Cr and Ni) in liver (n= 40), kidney (n= 39), epithelial (n= 33) and muscle (n= 36) tissues were determinate, and the influence of ecological and biological parameters on the assimilation of these elements was established. Histological standardized methods were used to determine age of the animals. It was, also, estimated different body condition indexes. The levels of heavy metals were determined by atomic absorption and by inductively coupled plasma spectrometry. The overall status of the individuals was moderately good. There were no differences between liver and kidney tissues in terms of metal detected (Zn, Cu and Cd). In addition, Cd was the only metal found in highest concentration in the kidney, whereas Cu and Zn were more frequent in the liver. Sex did not affect the levels of Zn, Cu and Cd in the liver, while influenced Cu and Zn in the kidney. Zn and Cu were not significantly correlated with the size, weight and age. In contrast Cd was positively influenced by age, length and weight of the specimens in both liver and kidney. The condition state of the dolphins could affect Zn levels. On skin Zn was found in highest concentration followed by Ni. Zn, on skin, was significantly affected by sex, age and maturity of the specimens, while the Ni did not. The area of origin did not strongly influence the levels of metals in the studied organs. The concentration values found in the tissues were the lowest throughout the entire distribution of the

species. The combined weight and the testicular index of maturity were reliable indicators of sexual maturity, whereas testis length and median testicular diameters of the dolphins were not. Age, length and weight at attainment of sexual maturity were 2.92-3.54 years, 126.19-126.26 cm and 23.75-23.47 kg. *Pontoporia blainvillei* could have a monogamous mating system.

Key words: trace metals, age, sexual maturity, body condition, Buenos Aires, Argentina.

AGRADECIMIENTOS

La realización de esta Tesis no hubiera sido posible sin la gran ayuda y el apoyo de muchas personas. En primer lugar quiero agradecer a mis padres, quienes con esfuerzo diario lograron que pudiera recibir mi educación brindándome su apoyo constante. A mis directores, Dr. Luis Cappozzo, quien me enseñó a trabar y mejorar cada día y Dr. Jorge Marcovecchio y su grupo de trabajo, del Laboratorio de Química Marina del Instituto Argentino de Oceanografía (CONICET), especialmente a Sandra, Nedda, Javier, Matías, Fabián y Lili por permitirme desarrollar mis actividades en el laboratorio. A mi amor, Guillermo por compartir conmigo todos sus días; por estar en los malos y buenos momentos, por su apoyo, su amor, su ayuda y sus consejos. A mi hermana por escucharme y brindarme sus útiles y desinteresados consejos. A mi prima Mariela por guiarme durante toda mi carrera. A mis suegros por escucharme cada vez que lo necesité. A mis amigos y colegas del Laboratorio de Ecología, Comportamiento y Mamíferos Marinos del MACN: Fer, Naty, Amalia, Nacho, Iris, Barbi, Dani, Maggy, Bubu y Mariano por los momentos compartidos, por su apoyo, aliento y paciencia constantes. A todos los pescadores artesanales de Quequén, Claromecó, Monte Hermoso y Bahía Blanca que con su apoyo hacia nuestra investigación colaboraron en la obtención de los ejemplares estudiados, sin ellos, este trabajo no hubiera sido posible. Quiero agradecer muy especialmente a Lalo y Nidia Flores y toda la familia, Oscar Zicchieri y toda su familia, Raúl y Andrea Pinza, Enrique y Virginia Russo, Enrique Mulder y familia, Jorge y Daniel Raverta, Carlos y María Sologubik, Gustavo y Cristina Ozcariz, al Tano Duilio, Antonio Dato e hijo, Leo Galván, Pato Khulman, Mario Epherra, Pablo y Pepe Screpante, Pablo Montero, Pablo Bertazzo, Juancito, Miguel Rama, Juan Martínez. A Roque Bruno, Damián Ricci y los Frigoríficos Iglesias, Maceiro y La Bacotera, por la logística en el campo. Así como también a los guardaparques A. Areco y M. Sotelo, y a la coordinadora de gestión M.V. Massola de la reserva de usos múltiples Bahía Blanca, Bahía Falsa y Bahía Verde por su continua colaboración durante las campañas de muestreo. A los doctores: Pablo Penchazsadeh, Martín Broguer, Andrés Averbuj, Viviana Barreda, Pedro Gutierrez, la Silvia Césari, Cristian Ituarte, Paula Faillace, Rudy Bernabeu, Julián Faivovich y Mirta Arriaga por abrirme las puertas de sus laboratorios y brindarme su ayuda desinteresada para realizar diversas etapas de este estudio. A las doctoras Lilia Lauria y Luisa Fiorito, por su paciencia y por compartir su experiencia guiándome en la correcta realización de las diferentes técnicas de histología. Al Dr. Edgardo Romero por permitirme trabajar en el Museo Argentino de Ciencias Naturales como personal autorizado para realizar esta tesis. A los Técnicos Profesionales del CONICET de la Estación Hidrobiológica de Puerto Quequén, Sr. José Luis Nogueira y Sra. Karina Arias por su colaboración en los puestos de muestro.

ꕥ

Dedicada

... a mi abuela Nélida "Coca" Murillo

ÍNDICE

CAPÍTULO 1: Introducción general

1-1 Biología y ecología del delfín franciscana *Pontoporia blainvillei* *1*

1-2 Objetivos generales *4*

1-3 Objetivos particulares *4*

1-4 Organización de la tesis *5*

1-5 Créditos *6*

CAPÍTULO 2: Antecedentes y marco teórico de referencia

2-1 Los metales pesados *7*

2-2 Aspectos reproductivos *12*

CAPÍTULO 3: Metodología general

3-1 Área de estudio *13*

3-2 Obtención de animales y recolección de muestras *16*

3-3 Parámetros biológicos *17*

3-4 Determinación de la edad *17*

3-5 Índices de condición corporal y órgano-somáticos *19*

CAPÍTULO 4: Metales pesados en tejido hepático y renal

4-1 Introducción *21*

4-2 Materiales y métodos

4-2-1 Toma de muestras *24*

4-2-2 Procesamiento de las muestras y material de laboratorio *24*

4-2-3 Metodología analítica *25*

4-2-4 Equipamiento *26*

4-2-5 Límite de detección instrumental, del método y pautas de control generales en la determinación de metales pesados *27*

4-2-6 Calibración y cálculos *28*

4-2-7 Análisis estadístico de los datos *30*

4-3 Resultados *33*

4-4 Discusión *59*

CAPÍTULO 5: Metales pesados en tejido epitelial y muscular

5-1 Introducción *72*

5-2 Materiales y Métodos *75*

5-3 Resultados *77*

5-4 Discusión *97*

CAPÍTULO 6: Aspectos reproductivos del delfín franciscana

6-1 Introducción *102*

6-2 Materiales y métodos

6-2-1 Método histológico *105*

6-2-2 Método morfométrico gonadal *106*

6-2-3 Método morfométrico corporal *108*

6-2-4 Método multivariado descriptivo: Análisis de cluster *108*

6-2-5 Talla y edad medias de madurez sexual *109*

6-3 Resultados *112*

6-4 Discusión *136*

CAPÍTULO 7: Conclusiones y consideraciones finales *147*

BIBLIOGRAFÍA *150*

APÉNDICE 1: Protocolo para la obtención de cortes histológicos de dientes de *Pontoporia blainvillie* *173*

APÉNDICE 2: Protocolo para la obtención de cortes histológicos de gónadas de *Pontoporia blainvillie* *175*

APÉNDICE 3: Tabla de abreviaturas *178*

CAPÍTULO 1

Introducción general

1-1 Biología y ecología del delfín franciscana *Pontoporia blainvillei*

El delfín franciscana, *Pontoporia blainvillei,* es uno de los delfines más pequeños (Figura 1-1) y es una especie que habita en aguas marino-costeras y ocasionalmente en estuarios (Praderi, 1989). Es endémico de América del Sur y, si bien se lo considerada miembro del grupo de los delfines de río, al cual pertenecen además el delfín del Río Amazonas o *Boto*, el delfín chino del Río Yangtzé o *Baiji*, el delfín del Río Ganges o *Susu* y el delfín del Río Indo, *Platanista minor*, actualmente *P. blainvillei*, no incursiona en el estuario del Río de La Plata como lo hacía en el pasado (Monzón y Corcuera, 1991). Se lo encuentra principalmente en las regiones costeras de la provincia de Buenos Aires, Río Negro y Chubut (Crespo *et al.*, 1998). Su distribución se reduce a las aguas de la costa atlántica de Brasil, Uruguay y Argentina desde Itaúnas (18°25'S- 30º42'O), Espíritu Santo, en Brasil (Siciliano *et al.*, 1994), hasta el Golfo Nuevo (42°35'S- 64º48'O), Chubut, Argentina (Crespo *et al.*, 1998).

P. blainvillei, habita principalmente dentro de las primeras 5 millas náuticas de la costa, pudiendo extenderse hasta las 30 millas náuticas (Crespo *et al.*, 2010). Este delfín presenta hábitos alimenticios especializados y se alimenta principalmente de calamaretes y juveniles de peces sciánidos (Pérez, *et al.*, 1996; 2000; Rodríguez *et al.*, 2002; Paso Viola *et al.*, 2009).

Por otro lado, desde hace más de dos décadas, esta especie de delfín es capturada de forma accidental en las redes de pesca artesanal (Corcuera, 1994). Para Argentina recientemente, se estimó la abundancia poblacional en alrededor de 15.000 ejemplares (Crespo *et al.*, 2010) y una mortalidad anual para la costa atlántica de la provincia de Buenos Aires de entre 500

y 600 individuos (Cappozzo *et al.*, 2007). En consecuencia, cada año se remueve entre un 2,5% - 3,6 % (Bordino y Albareda, 2004) de la poblacional por causa de la mortalidad incidental producto de la pesca artesanal, es decir más del 2% del total de la población, límite sostenible para una población de delfines, de acuerdo a lo recomendado por la Comisión Ballenera Internacional (IWC de sus siglas en inglés, *International Whaling Commission*).

En este sentido, la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza considera a esta especie en estado de conservación "Vulnerable" a lo largo de toda su distribución, por enfrentarse a un alto riesgo de extinción en la naturaleza (IUCN, 2010).

Figura 1-1: Aspecto externo de un ejemplar adulto capturado accidentalmente en redes de pesca artesanal.

Como consecuencia de los problemas de conservación a los que este pequeño cetáceo enfrenta en todo su rango de distribución, Secchi y colaboradores (2003) propusieron dividir el área en cuatro unidades de manejo poblacional (*Franciscana Management Areas*, FMAs, Figura 1-2) fundamentadas en información genética, morfológica, poblacional y de comportamiento:

FMA I: recientemente subdividida en a y b, e incluye las aguas costeras de los estados de Espírito Santo y Río de Janeiro (datos no publicados).

FMA II: que incluye desde São Paulo hasta Santa Catalina, Brasil.

FMA III: comprende las aguas costeras de Río Grande do Sul, Brasil y Uruguay.

FMA IV: incluye a las aguas costeras de Argentina.

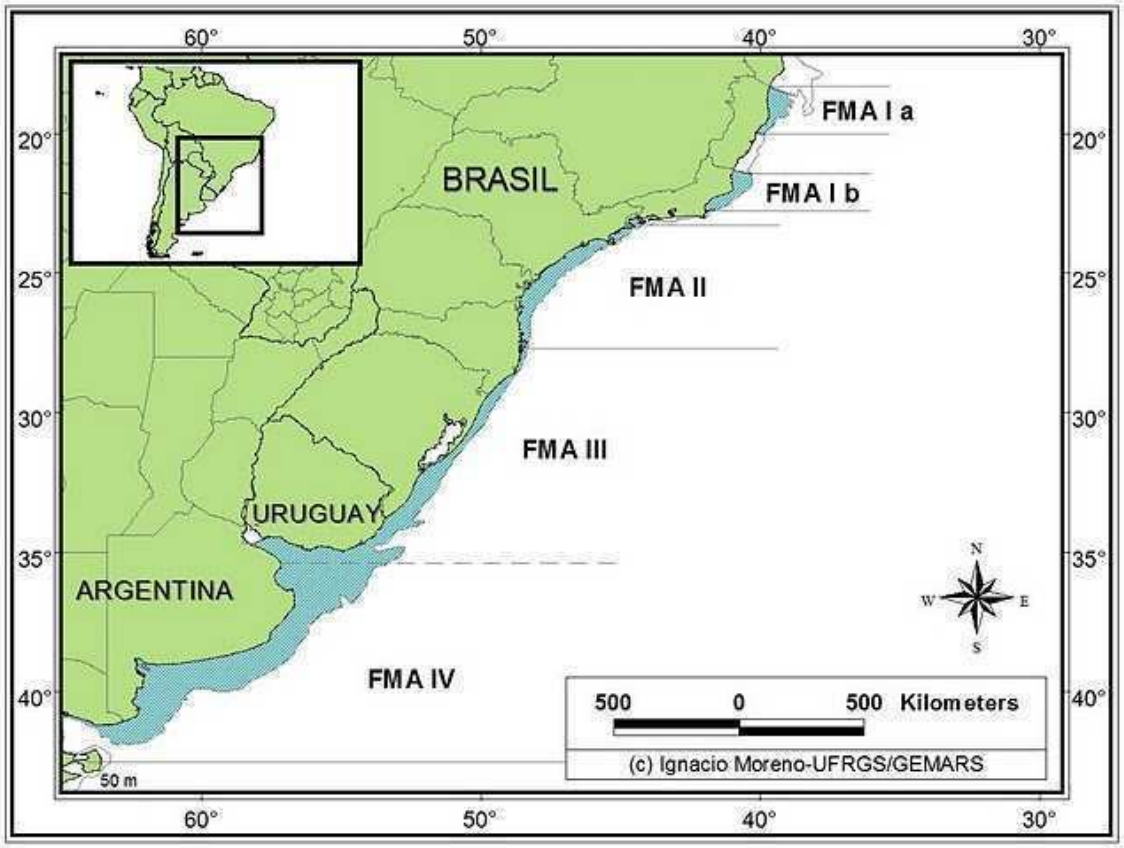


Figura 1-2: Distribución y Áreas de Manejo del delfín Franciscana (FMAs). Fuente: Ignacio Moreno (VII workshop para coordenação de pesquisa e conservação de *Pontoporia blainvillei* (Gervais & D'Orbigny, 1844).

Existe mucha información sobre biología, ecología, mortalidad, condición corporal, aspectos genéticos, morfométricos y reproductivos, al igual que sobre la presencia y efectos de contaminantes, tanto metálicos como organoclorados. Sin embargo, aún existen importantes vacíos de información en ciertas regiones de la distribución de esta especie. Estos vacíos fueron ratificados en el reciente taller de trabajo de franciscana llamado "VII workshop para coordenação de pesquisa e conservação de *Pontoporia blainvillei* (Gervais & D'Orbigny, 1844)" celebrado en Octubre de 2010. Entre las principales regiones de las cuales es escaza la información se encuentran Argentina y Uruguay. La falta de información resulta de la discontinuidad de los estudios sobre la especie. La presente Tesis abarca varios años de estudio en el extremo sur de la distribución de esta especie de delfín y trata sobre la presencia de metales pesados en diversos tejidos que resultan de importancia por tratarse

de barreras metabólicas y de protección de los factores externos. Se analizó, además, cómo las concentraciones de estos metales pueden ser influenciados por factores biológicos y ecológicos. La información presentada no solo es novedosa sino que resulta de importancia para la conservación de esta especie en el extremo de la FMA IV (Cappozo *et al.*, 2010; Denuncio *et al.*, 2010; Negri *et al.*, 2010; Panebianco *et al.*, 2010; Paso-Viola *et al.*, 2010; Pollizzi *et al.*, 2010).

1-2 Objetivos generales

1. Determinar la concentración de los metales pesados (Pb, Cd, Cr, Zn, Ni y Cu) en hígado, riñón, músculo y piel de delfines franciscanas (*Pontoporia blainvillei*) provenientes de del Sur de la provincia de Buenos Aires.

2. Estudiar aspectos reproductivos de machos y hembras de franciscana del sur de la provincia de Buenos Aires.

1-3 Objetivos particulares

1. Determinar los siguientes parámetros biológicos: edad, sexo, estado de madurez sexual, peso y talla en delfines capturados accidentalmente y varados.

2. Relacionar los parámetros biológicos en estudio con la concentración de los metales pesados determinados en los diferentes órganos estudiados.

3. Determinar los índices de condición corporal y órgano-somáticos y analizar su relación con los niveles de metales pesados en los tejidos analizados.

4. Determinar el estado de madurez sexual a través del uso de diferentes parámetros morfométricos gonadales y corporales y de técnicas histológicas: compararlos y determinar al más apropiado para la especie en el área de estudio.

5. Estimar la edad y la talla a la cual se alcanza la madurez sexual en delfines machos y hembras.

6. Estimar, a partir del estudio de los aspectos reproductivos, el tipo de sistema de apareamiento que posee esta especie endémica.

1-4 Organización de la tesis

Esta Tesis fue organizada en 7 Capítulos. En el Capítulo 1 se brinda una descripción de los aspectos generales de la ecología y biología de la especie bajo estudio, así como también los objetivos generales y particulares. El Capítulo 2 busca introducir al conocimiento de los antecedentes e información previa sobre los objetivos generales propuestos. Los detalles sobre el área de estudio y sobre la metodología empleada en la toma de muestras y en la determinación de la edad y el estado de condición corporal se detallan en el Capítulo 3. Este Capítulo contiene además detalles sobre el área de estudio. El Capítulo 4 se refiere a la determinación de la presencia y concentración de los metales pesados en hígado y riñón, mientras que el Capítulo 5 se presenta los resultados y discusión sobre la estimación de los metales en piel y músculo. El Capítulo 6 engloba la introducción, metodología analítica, resultados y discusión sobre la estimación de los aspectos reproductivos del delfín franciscana. Finalmente, el Capítulo 7 enumera las principales conclusiones y consideraciones finales.

1-5 Créditos

Resultados parciales de la presente Tesis de doctorado fueron enviados a diferentes revistas científicas para su publicación, según el siguiente detalle:

- **Panebianco M.V.**, Negri M.F., Cappozzo H.L. Reproductive aspects of male franciscana dolphins (*Pontoporia blainvillei*) off Argentina. Enviado a: Journal of Mammalogy N° de Ref: 11-MAMM-A-196.
- Negri M.F., Denuncio P., **Panebianco M.V.**, Cappozzo H.L. Bycatch of franciscana dolphins *Pontoporia blainvillei* and artisanal fisheries dynami c in the southernmost distribution of the species. Enviado a: Brazilian Journal of Oceanography N° 246. Aceptado con cambios.
- **Panebianco M.V.**, Negri M.F., Marcovecchio J.E., Cappozzo H.L. Metales pesados en el riñón del delfín franciscana, *Pontoporia blainvillei* (Cetacea: Pontoporiidae) y su relación con parámetros biológicos. Enviado a: Latin American Journal of Aquatic Research. N° de Ref: Ms 508. Aceptado.
- Negri M.F., **Panebianco M.V.**, Denuncio P., Rodriguez D., Cappozzo, H.L. Biological parameters of franciscana dolphins, *Pontoporia blainvillei*, bycaught in artisanal fisheries off Argentina. Enviado a: Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom. N° de Ref: JMBA 03-11-OA-0037.
- **Panebianco M.V.,** Botte S.E., Negri M.F., Marcovecchio J.E., Cappozzo H.L. Heavy Metals in liver of the franciscana dolphin (*Pontoporia blainvillei*) from the Southern coast of Buenos Aires Province, Argentina. Enviado a: Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology. Ref. Nº:JBSE132_2009. Aceptado. Aparecerá en el Vol 6 N° 1, año 2012

CAPÍTULO 2

Antecedentes y marco teórico de referencia

2-1 Los metales pesados

Desde 1940 grandes cantidades de metales tóxicos y no naturales vertidos en el ambiente marino han producido accidentes generando fatalidades. Algunos ejemplos son: la intoxicación por metil-mercurio en las bahías de Minimata y Niigata en Japón y en Irak (Bakir *et al.*, 1973) y según Nriagu (1990) la entrada de metales pesados a la atmósfera se ha triplicado y aún cuadruplicado en el período entre 1900 y 1990.

Las fuentes de procedencia de metales pesados pueden ser antropogénicas y/o naturales. En algunas áreas, el componente natural puede ser tanto o más importante que el antropogénico (Marcovecchio, 1996). La distribución de estas sustancias en el medio permanece relativamente constante debido a la existencia de procesos biológicos naturales, tanto de síntesis como de degradación. Los metales pesados son componentes naturales de los océanos y son requeridos por la biota en cantidades pequeñas. Las dificultades surgen cuando aparecen en concentraciones excesivas en los estuarios o en océanos y debido a que algunos de estos metales presentan una elevada toxicidad aún en bajas concentraciones pudiendo dañar o finalizar con la vida vegetal o animal (Dawes, 1991; Shimshock, 1992).

Los principales orígenes de éstos contaminantes incluyen las actividades agropecuarias, portuarias y petroleras, aguas residuales domésticas e industriales; así como también los que llegan a través del aire y el escurrimiento natural desde ríos y arroyos hasta el mar. En la mayoría de los casos las sustancias tóxicas que ingresan en los sistemas naturales permanecen en los sustratos por largo tiempo (Botté, 2005).

Actualmente, el rol de los metales pesados como contaminantes ha sido ampliamente reconocido ya que constituyen un grave problema debido a los efectos negativos sobre los ecosistemas (Giordano *et al.*, 1992). Cuando ingresan a las aguas salobres el peligro lo constituye su combinación con compuestos orgánicos presentes en los sedimentos o con los iones del agua, y posteriormente su ingreso, a través de organismos filtradores, a los sucesivos eslabones de las redes alimentarias en donde pueden ocurrir procesos de bioconcentración, bioacumulación y biomagnificación (Ponce-Velez y Botello, 1991). La bioacumulación hace posible identificar áreas prioritarias de riesgo mediante el estudio sostenido en el tiempo de los niveles de contaminantes en mamíferos marinos residentes (Holden, 1978).

Los metales pesados se dividen en esenciales: cinc (Zn), cobre (Cu), cromo (Cr), níquel (Ni), selenio (Se) y aluminio (Al) y no esenciales: tales como cadmio (Cd), mercurio (Hg) y plomo (Pb) (Das *et al.*, 2003). Los metales esenciales son necesarios para un crecimiento normal y pueden encontrarse unidos a proteínas o metaloproteínas (hemoglobinas y hemocianinas) o libres. El Zn y el Cu han sido identificados como componentes esenciales en reacciones enzimáticas, no obstante, ambos pueden ser de alta toxicidad si están presentes en exceso (Das *et al.*, 2003). Por otro lado, los metales no esenciales no cumplen ninguna función en el organismo de los ejemplares que los contienen (Das *et al.*, 2003).

Los delfines se ubican en los niveles tróficos más altos de la cadena alimenticia del océano, como depredador de alto nivel trófico, pueden acumular los contaminantes metales pesados que se encuentran en las zonas costeras en las que estas especies habitan (Fujise *et al.*, 1988; Aguilar y Borrell, 1995). Mediante dicho proceso ocurre la concentración química del contaminante en un organismo con la edad debido a la ingesta, por diferentes rutas de acceso a las que se encuentra expuesto el individuo en el ambiente, incluyendo la absorción por medio de la dieta (Aizpún *et al.*, 2003). Las presas que consumen los organismos, la estructura trófica del ecosistema y la longitud de la cadena alimenticia de la que forman

parte, son factores determinantes en la concentración de los metales pesados en el organismo (Cabana *et al.*, 1994). Uno de los métodos más difundidos para determinar la presencia de metales pesados en la biota de ambientes acuáticos es la utilización de los *"organismos indicadores"* o *"centinelas"* que mejor representan al ambiente elegido. Los mamíferos marinos han sido considerados como *centinelas* de los mares del mundo (Reif, 2011). Las especies más adecuadas para realizar un monitoreo sobre los niveles de contaminación según la Agencia de Protección Ambiental o EPA (de sus siglas en inglés, *Environmental Protection Agency*, 1994) son aquellas que:

1) son endémicas de la región de estudio,

2) se alimentan en el último nivel de la trama trófica,

3) pueden potencialmente acumular altas concentraciones de contaminantes y

4) su necropsia es viable.

El delfín franciscana resulta un modelo adecuado para ser considerado como especie centinela porque es endémica de Sudamérica, ocupa los últimos niveles en las redes tróficas del océano (Rodríguez *et al.*, 2002; Paso-Viola *et al.*, 2010), puede acumular contaminantes metales pesados (Marcovecchio *et al.*, 1990; 1994) y su necropsia es viable (Corcuera *et al.*, 1994; Cappozzo *et al.*, 2007) a partir de la recuperación de los ejemplares que mueren en forma accidental (Negri, 2010). Las ventajas de realizar estudios de contaminantes en esta especie se ven potenciadas por el hecho que la población estudiada ocupa el extremo sur de su distribución formando parte de la FMA IV (Secchi *et al.*, 2003). Es prioritario su estudio, considerando además que en resultados de estudios genéticos recientes realizados por nuestro laboratorio (Negri, 2010) fue encontrado que los ejemplares que habitan el área de estudio están genéticamente diferenciados del resto de los stocks de esta especie en toda su distribución.

Los primeros trabajos donde se informó de la presencia de contaminantes metales pesados, en el delfín franciscana son de hace más de 25 años atrás (Marcovecchio *et al.*, 1990; 1994).

Más tarde, Gerpe y colaboradores (2002) estudiaron la presencia de metales pesados en hígado y riñón de 18 ejemplares de delfín franciscana provenientes del norte de la provincia de Buenos Aires; en el mismo año apareció el primer trabajo científico para el norte de las costas de Río de Janeiro (Lailson-Brito *et al.*, 2002). En Brasil los trabajos sobre el estudio de los metales pesados se sucedieron año tras año (Kunito *et al.*, 2004; Dorneles *et al.*, 2007; Seixas *et al.*, 2007; 2008; 2009; Carvalho *et al.*, 2008). En cambio, en Argentina desde el año 2002 no se han publicado en revistas de interés científico actualizaciones sobre este tema (Panebianco *et al.* a; b, en prensa y la presente Tesis).

2-2 Aspectos Reproductivos

Un paso importante para la implementación de estrategias de conservación viables lo constituye la comprensión de la dinámica de la población bajo estudio. Particularmente, la estimación de la edad, la talla y la edad de madurez sexual de los ejemplares estudiados, pues estos datos ofrecen información acerca de las fluctuaciones y tendencias poblacionales de la especie, además de ser útiles para los estudios biológicos comparativos con otras áreas u otras especies de delfines afines.

La madurez sexual, definida como la capacidad de fertilizar y ser fertilizado, a partir de la producción de gametas maduras, puede ocurrir a edades más tempranas en aquellas poblaciones que poseen bajas densidades de individuos por unidad de área (DeMaster, 1984; Boness *et al.*, 2002). De esta manera, como la edad de madurez sexual (EMS) es un parámetro denso-dependiente, podría ser utilizado como un indicador de los cambios de la población de una especie que se encuentra sometida a una mortalidad no natural. Algunos de estos casos han sido informados en la literatura científica sobre poblaciones donde la EMS disminuía como una respuesta a la disminución en la densidad de individuos (Lockyer, 1984; Hernandez *et al.,* 1995).

La primera información presente en la bibliografía sobre la biología de la franciscana data de la segunda mitad del siglo XIX, como resultado de investigaciones conducidas por científicos europeos producto de las incursiones de exploración realizadas en América de Sur (Burmeister, 1867; Lahille, 1899).

Desde estas primeras observaciones biológicas no se realizaron posteriores investigaciones hasta la década del 70' cuando investigadores americanos, japoneses y europeos publicaron trabajos sobre aspectos de la biología de la especie (Van Erp, 1969; Brownell y Ness, 1970; Kamiya y Yamasaki, 1974; Brownell, 1975; Kagei *et al.*, 1976). No obstante, cabe destacar que todos estos estudios fueron realizados exclusivamente a partir de ejemplares procedentes de Punta del Diablo, en la costa uruguaya.

En relación con la biología reproductiva, autores como Harrison y Brownell (1971) y Harrison y colaboradores (1972) publicaron observaciones preliminares; más tarde Kasuya y Brownell (1979) y Harrison y col. (1981) realizaron estudios más detallados con un número mayor de ejemplares (n= 200 aproximadamente). Los trabajos más recientes sobre la biología reproductiva en delfines procedentes de Brasil fueron realizados por Rosas (2000), Danilewicz (2003), Danilewicz y col. (2004) y Botta (2005). Estos estudios presentan la estimación de la edad, la talla y el peso de madurez sexual, también realizan una caracterización morfométrica e histológica de las gónadas según el estado de madurez sexual. Danilewicz *et al.* (2004) a partir del estudio de las características gonadales, ausencia de caracteres secundarios y de cicatrices producto de confrontaciones, sugirió un posible sistema de apareamiento. Recientemente Bertozzi (2009) presentó estudios sobre la reproducción de esta especie a partir del análisis de ejemplares procedentes de la costa del estado de São Paulo, de cual se tenía exigua información. En 1990 se publicaron estudios realizados a partir de ejemplares de delfines de la costa Argentina. Corcuera y Monzón (1990) informaron observaciones sobre la biología reproductiva basados en un número pequeño de delfines. Más tarde, Corcuera (1996) presentó estimaciones de la edad en la que

se alcanzan la madurez sexual los machos y las hembras de esta región. De lo aquí expuesto se hace evidente la escasa información que existe acerca de la caracterización de los aspectos reproductivos del delfín franciscana, *Pontoporia blainvillei,* en la zona más austral de su distribución.

CAPÍTULO 3

Metodología general

3-1 Área de estudio

En la presente Tesis se estudiaron delfines franciscanas procedentes de la costa del sur de la provincia de Buenos Aires (38°37'S, 58°50'O - 38°44'S, 62°14'O). En este litoral marítimo se ubican grandes centros urbanos con un importante desarrollo industrial y comercial, como así también pequeñas ciudades y pueblos. Desembocan en ella numerosos ríos y arroyos, algunos de los cuales están directamente afectados por centros urbanos costeros. Los delfines estudiados se obtuvieron de las redes de pesca en la que mueren ahogados en forma accidental en las localidades de Necochea (N), Claromecó (C), Monte Hermoso (MH), y Bahía Blanca (BB) (Figura 3-1).

Las localidades de Necochea y Monte Hermoso están ubicadas en zonas agrícolas, de turismo y pesca, mientras que Bahía Blanca es una zona petroquímica y uno de los ambientes costeros más impactados por la contaminación de todo el litoral marítimo de nuestro país. Ésta última localidad presenta un sistema semicerrado, el Estuario de Bahía Blanca, que incluye a un importante centro industrial (refinerías y reservorios petroquímicos, fábricas de pesticidas y grandes puertos). En el veril norte del Estuario existen varios puertos (Ingeniero White, Galván, Belgrano) industrias y ciudades (Bahía Blanca, Punta Alta, Gral. Cerri) cuyos flujos y desechos descargan en él (Marcovecchio *et al.*, 2008).

Actualmente la ciudad de Necochea cuenta con alrededor de 92.000 habitantes (Censo, 2010). Entre las principales actividades que mantienen la economía de la ciudad, además del turismo estival, se encuentra la agricultura y la producción de combustible biodiesel y

químicos para la agricultura. La misma se encuentra separada de la cuidad de Quequén por el Río Quequén Grande que desemboca en el puerto marino de aguas más profundas de Argentina "Puerto Quequén" (Varella y Teruggi, 2002). Las principales actividades de este puerto están relacionadas con la industria y la agricultura por la exportación a través de grandes buques cerealeros y otros productos de la actividad agrícola (Lopez Gappa *et al.*, 1990).

Claromecó se localiza al sur-este de la provincia de Buenos Aires. Es el principal distrito turístico de la cuidad de Tres Arroyos y posee alrededor de 2000 habitantes. Esta región se destaca por su riqueza ictícola, siendo la pesca deportiva y artesanal una importante actividad. Adicionalmente, la región cercana a la localidad es apta para actividades tales como la agricultura y la ganadería (Carbone y Piccolo, 2002).

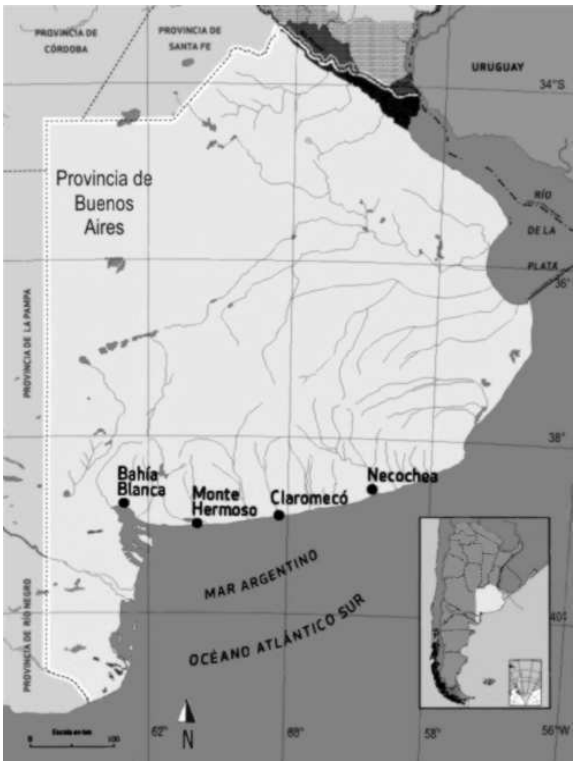


Figura 3-1: Área de muestreo localizada en el sur bonaerense. El muestreo comprendió 4 localidades de la provincia de Buenos Aires: Necochea, Monte Hermoso, Claromecó y Bahía Blanca.

Monte Hermoso es una ciudad de alrededor de 6500 habitantes (Censo, 2010) y se caracteriza por el desarrollo de las actividades turísticas y pesqueras, con un buen desarrollo agrícola-ganadero en la zona aledaña. Al igual que Necochea, Monte Hermoso y Claromecó se benefician por el gran flujo de turistas durante los meses estivales.

En las cuatro localidades existe una flota pesquera artesanal que cuenta con alrededor de 125 embarcaciones habilitadas (Disp. 50/09, MAA) y frecuentemente operan desde pequeños campamentos apostados a lo largo de la costa de la provincia de Buenos Aires o desde los puertos de Bahía Blanca o Quequén (Cappozzo *et al.*, 2007; Negri, 2010). Estudios previos han demostrado que estas pequeñas embarcaciones, pertenecientes a la flota artesanal, tienen gran influencia sobre la mortalidad de este delfín por quedar enmallados incidentalmente en sus redes (Corcuera *et al.*, 1994).

Teniendo en consideración estas actividades desarrolladas en las localidades estudiadas, se puede inferir que la principal fuente de ingreso de contaminantes estaría relacionada con el uso de fertilizantes y plaguicidas, pinturas anti-incrustantes usadas para el mantenimiento de los cascos de los barcos, además de aerosoles y efluentes urbanos e industriales, que son vertidos directamente en la zona costera marina o que llegan a los cuerpos de agua más cercanos y son trasportados por ellos hacia el mar, como destino final de los residuos de origen humano y que contaminan los océanos.

Existen diferentes grupos de plaguicidas, los fosforados pueden contener Zn, Cd y Pb; también son usados con frecuencia fungicidas a base de Cu y Zn como el sulfato de cobre, el superfosfato y el cloruro potásico (Andrade, 2005; Camello *et al.*, 1997). Además, algunos metales pesados (Zn y Cu), son adicionados en alimentos del ganado con el fin de evitar enfermedades, pueden estar presentes en el estiércol de los animales de cría que los han ingerido (Andrade, 2005).

En lo que respecta a las pinturas utilizadas para el mantenimiento de botes de pesca, estudios científicos muestran como resultado de los análisis cuantitativos realizados sobre

estas pinturas que existen en promedio de 300 y 100 mg g^{-1} de Cu y Zn respectivamente. Además de detectarse la presencia de otros metales como Ag, Cd, Cr, Ni, Pb y Sn, aunque en menor concentración que los anteriores (Singh y Turner, 2009).

Varios trabajos han informado la presencia de niveles detectables de Cu, Zn, Pb y Cd en sedimentos y aguas en zonas adyacentes a la ciudad y en el estuario de Bahía Blanca. Además se ha encontrado que tanto el Cd, como el Pb y el Cr se encontrarían biodisponibles para la biota y que su origen sería natural (Botté *et al.,* 2007; Grecco *et al.*, 2006; Marcovecchio y Ferrer, 2005). No obstante, información semejante sobre la presencia de metales en las restantes localidades bajo estudio (Monte Hermoso, Claromecó y Necochea) no ha sido publicada hasta la fecha.

3-2 Obtención de animales y recolección de muestras

Los delfines *P. blainvillei* estudiados fueron obtenidos de la captura accidental en redes de pesca artesanal por las flotas pesqueras costeras en cada una de las cuatro localidades que comprenden el área de estudio. Algunos ejemplares procedieron de varamientos a la largo de las playas del área de estudio. En el presente estudio se incluyeron muestras tomadas entre los años 1998 y 2001 (Tabla 3-1), que estaban en buen estado de conservación y que fueron obtenidas por colaboradores del equipo del Dr. Luis Cappozzo, director del LECyMM en donde se desarrolló el presente trabajo bajo su dirección. Las restantes muestras fueron colectadas entre noviembre de 2003 y Marzo de 2010. Los ejemplares frescos se mantuvieron en cámara frigorífica (- 20 °C) hasta el momento de realizar la necropsia.

3-3 Determinación de parámetros biológicos

Los ejemplares muestreados fueron medidos según métodos estandarizados (Norris, 1961, Figura 3-2). Se determinó el sexo, la presencia de leche en las glándulas mamarias y las marcas o cicatrices, producidas por congéneres o por las redes, sobre la superficie del cuerpo.

Tabla 3-1: Detalle de los ejemplares analizados en cada área de muestreo, durante los años 1998-2010.

Localidad	Coordenadas	Animales Muestreados
Necochea (N)	38° 37' S 58° 50' O	16
Claromecó (C)	38º 52' S 60º 05' O	31
Monte Hermoso (MH)	38° 59' S 61° 15' O	9
Bahía Blanca (BB)	38° 44' S 62° 14' O	3
Total		59

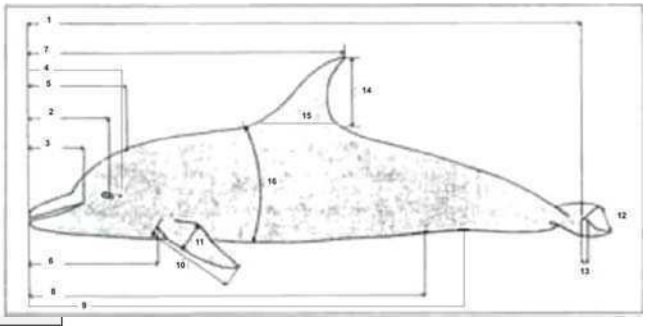
3-4 Determinación de la edad

Para determinar de la edad se extrajeron dientes de la parte media de la mandíbula inferior izquierda y se fijaron en solución de formaldehído al 10%. La edad se determinó a través del conteo de los grupos de capas de crecimiento (GLGs, de sus siglas en inglés *growth-layers groups*), según el protocolo de Pinedo y Hohn (2000) con modificaciones *ad hoc* (para más detalle de la metodología remítase al apéndice 1). Únicamente las láminas centrales y con mejor contraste fueron utilizadas para la lectura de los grupos de capas de crecimiento tanto en la dentina como en el cemento (Figura 3-3). Se consideró que un GLG corresponde a un año de edad (Pinedo y Hohn, 2000). No fue posible practicar la metodología detallada en este apartado sobre 7 de los ejemplares muestreados, ya que no se

contó con los dientes necesarios para hacerlo. Para la determinación de la edad final de los individuos se realizaron 3 lecturas diferentes e independientes de los GLGs en dentina y cemento. Las lecturas fueron realizadas por la Dra. Daniza Molina (de la Universidad Federal do Río grande do Sul, UFRGS), la Dra. María Fernanda Negri (LECyMM-MACN/CONICET) y la autora de esta tesis. Además, se comparó nuestra estimación con la realizada por la Dra. Silvina Botta de la Universidad de Río Grande, Brasil (FURG).

REGISTRO DE MEDIDAS EXTERNAS (cm)

	DIRECTA (punto a punto)	PARALELA al eje del cuerpo
Largo total, punta ant. de mandibula superior hasta escotadura caudal		
Proyección de la frente delante del hocico (delfines piloto)		
Hocico al ápice del melón (largo hocico)		
Hocico al centro de espiráculo/s		
Largo del espiráculo (// eje del cuerpo)		
Ancho del espiráculo (⊥ eje del cuerpo)		
Hocico a comisura de la boca	I: D:	I: D:
Hocico a centro del ojo	I: D:	I: D:
Hocico al oído	I: D:	I: D:
Hocico a inserción ant. de aleta pectoral	I: D:	I: D:
Centro del ojo a comisura de la boca	I: D:	
Centro del ojo al oído	I: D:	
Ojo a borde del espiráculo, sobre curva	I: D:	
Largo de apertura del ojo	I: D:	
Diámetro de apertura del oído	I: D:	
Número de dientes visibles	IS: DS:	
	II: DI:	
Largo de línea de dientes visibles	IS: DS:	
	II: DI:	
Diámetro de diente más grande (// línea md.)		
L. aleta pectoral, inserción ant a la punta	I: D:	
L. aleta pectoral, axila a la punta	I: D:	
Ancho máximo de aleta pectoral	I: D:	
Hocico a inseción ant. de la aleta pectoral		
Hocico a punta superior de la aleta dorsal		
Hocico a punta posterior de la aleta dorsal		
Largo de la base de la aleta dorsal		
Altura de la aleta dorsa ⊥ a la base		
Escot. caudal a punta post. de la aleta dorsal		
Esc. caudal a punta sup de la aleta dorsal		
Largo de la hendidura genital		
Largo perineo (hend. genital a ano)		
Número de hendiduras mamarias		
Largo de hendiduras mamarias	I: D:	
Hocico al centro del ombligo		
Hocico al centro de hendidura genital		
Hocico al centro del ano		
Escotadura caudal al centro del ano		
Esc. caudal al c. de hendidura genital		
Esc. caudal al centro del ombligo		
Ancho aleta caudal, punta a punta		
Ancho aleta caudal, inserción ant. (por la línea del cuerpo) a escotadura		
Profundidad de la escoladura caudal		
Ancho del rostro, al ápice del melón		
Diámetro de la cabeza entre los ojos		
Circunferencia en la axila		
Circunferencia máxima		
Circunferencia en el ano		
Circunf. en el pto. medio de ano y esc. caudal		
Altura, en el mismo lugar		
Grosor, en el mismo lugar		



Referencias: l: largo, a: ancho, h: alto, c: centro, ant: anterior, post: posterior, //: paralelo, ⊥: perpendicular, I: izquierda del animal, D: derecha del animal, IS: izquierda superior, II: Izquierda inferior, DS: derecha superor, DI: derecha inferior, sup: superior, inf: inferior.

Figura 3-2: Detalle de la planilla de medidas utilizada desde el año 1996 y del perfil del delfín franciscana con las medidas tomadas.

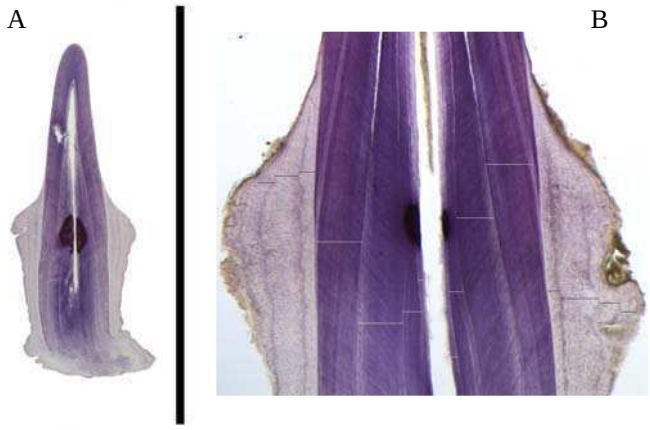


Figura 3-3: Cortes histológicos de dientes de delfines franciscana del sur de la provincia de Buenos Aires. A: macho de 120 cm y 7 años de edad, A= 10X. B: hembra de 164,2 cm y 5 años de edad, se indican las GLGs de dentina y cemento. A= 40X. GLGs marcadas. Escala 1cm.

3-5 Índices de condición corporal y órgano-somáticos

El índice graso es el resultado de la contribución en porcentaje del peso total de la grasa con respecto al peso total de cada ejemplar, se calculó el porcentaje del peso de la grasa (%PG) como el peso de la grasa * 100. Cuando no fue posible obtener el peso total de la grasa de los ejemplares, este fue estimado a través de la siguiente regresión (Negri, 2010):

$$Log_{GT} = (Log_{CA} - 0{,}796) / 0{,}270.$$

Donde, GT es el peso de la grasa total y CA es la circunferencia axilar.

Para la determinación del índice relativo de condición corporal o Kn (Le Cren, 1951) se aplicó la siguiente ecuación: Kn = Po/Pe

Donde: Po = Peso corporal medido (kg)

Pe = Peso corporal estimado (kg)

La variable Pe se obtuvo de la curva largo estándar vs. peso corporal elaborada a partir de las medidas de los delfines obtenidos (Figura 3-4).

Los índices órgano-somáticos se calcularon a partir del peso de cada órgano y del peso total del animal. Para el hígado, se emplea el índice hepato-somático (IH) y para el riñón el índice renal-somático (IR), que en este último caso considera el peso de ambos riñones.

Índice hepato-somático = peso hígado (g) / peso franciscana (kg)

Índice renal-somático = promedio del peso de ambos riñones (g) / peso franciscana (kg).

Se utilizó los valores en porcentaje de cada uno de éstos índices órganos somáticos.

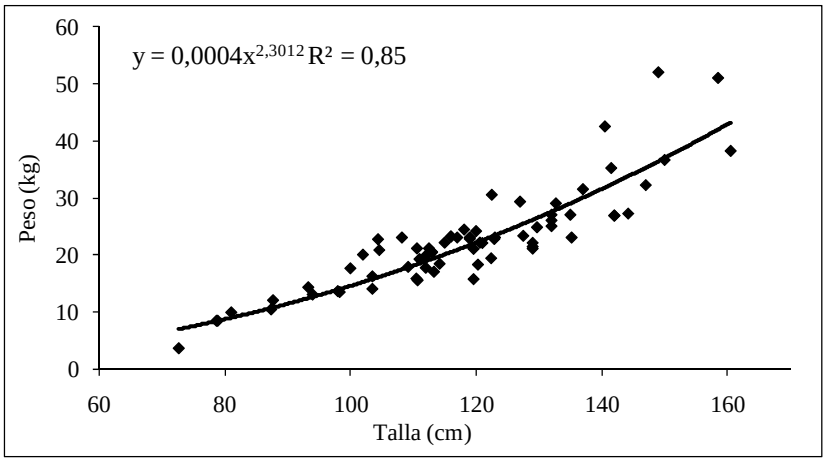


Figura 3-4: Relación entre el peso corporal y la talla de todos los delfines (cuatro sitios de muestreo) obtenidos durante el periodo 1998 a 2010.

CAPÍTULO 4

Metales pesados en tejido hepático y renal

4-1 Introducción

La exposición de un organismo a un determinado contaminante es principalmente estudiada a través de la concentración del contaminante en sus órganos y tejidos (Caurant *et al.*, 1994; Woshner *et al.*, 2001; Kunito *et al.*, 2004; Seixas *et al.*, 2007). Esta aproximación resulta más sencilla que medir directamente la entrada de los contaminantes a través del alimento u otras fuentes de exposición. Esta metodología, que mide las concentraciones de los contaminantes en los tejidos, ha sido aplicada extensamente para evaluar poblaciones expuestas de cetáceos (Aguilar *et al.*, 1999).

Los cetáceos son altamente sensibles a los cambios ambientales y desde hace tiempo han sido considerados como buenos centinelas de la presencia de contaminantes en el ambiente a través del estudio de los niveles presentes en sus tejidos (Capelli *et al.*, 2000; 2008; Seixas *et al.*, 2009). Las concentraciones de los contaminantes, como los metales pesados, medidas sobre un gran número de ejemplares de una misma población presentan gran variabilidad, en especial aquellos metales no esenciales, como el cadmio, el plomo y el mercurio (Aguilar *et al.*, 1999). Esta gran variación revela la existencia de numerosos factores fisiológicos y ecológicos influyen sobre los niveles de contaminantes en los organismos que comparten un mismo ecosistema. Entre los factores se deben consideran la dieta, la edad (no es lo mismo ejemplares jóvenes que adultos), el sexo del individuo (las hembras pueden transferir a las crías a través del período de preñez y de la lactancia) y la distribución geográfica. También deben considerarse los distintos tejidos y órganos blanco, ya que

existen diferencias en las tasas metabólicas y responden de diferente forma frente a los distintos metales pesados (Aguilar *et al.*, 1999; Das *et al.*, 2002; 2004).

Los metales no esenciales, como el Hg y el Cd no cumplen una función vital en los mamíferos y pueden causar inmunosupresión en varias especies, mientras que el Zn, Fe, Cu y Se son componentes claves en asociación con metaloenzimas y con otros metales (Hg:Se), formando parte de procesos de protección y detoxificación en los delfines (Zelikoff y Tomasm 1998; Kunito *et al.*, 2004; Seixas *et al.*, 2007; 2008). La relación causa-efecto de los niveles de contaminantes en los mamíferos marinos y los efectos observables en los ejemplares han sido demostrados en muy pocos estudios (Reijnders y Aguilar, 2002).

De acuerdo al modelo propuesto por Julshamm y colaboradores (1987), se describe la distribución de los metales pesados en tejidos de los cetáceos. Los niveles de Cd en el riñón, son más elevados que los niveles en el hígado y éstos su vez son más elevados que en los tejidos musculares. La alta concentración de cadmio en el riñón se debe a la presencia en este órgano de las metalotioneinas, proteínas entrampadoras de metales (Wagemann y Muir, 1984). Las concentraciones de Cu, Hg y Pb en hígado tienden a ser más elevadas que en los riñones. La razón de éste modelo de concentración de metales según órgano o tejido se debe a que en algunos metales pesados, particularmente Hg, Cd, As y Cu, tienen baja o nula afinidad con los lípidos por lo que no se depositan en las reservas de grasa, pero sí en los órganos metabólicos, como en el hígado y en el riñón haciendo más probable que niveles excesivos causen deficiencias en el animal (inmuno-deficiencia, cambios de las tasas metabólicas, etc.). El Cr y el Zn, por otro lado, pueden ser encontrados en cantidades similares tanto en tejidos ricos como pobres en lípidos (Odell y Asper, 1976).

En estudios previos realizados en franciscana no se encontraron diferencias en la concentración de metales pesados entre los sexos, sin embargo los ejemplares adultos contenían mayor concentración que los juveniles. A dicho fenómeno o proceso se lo llama

bioacumulación (Marcovecchio *et al.*, 1990; Danilewicz *et al.*, 2002; Gerpe *et al.*, 2002; Lailson-Brito *et al.*, 2002; Seixas *et al.*, 2007).

En estudios realizados con hembras y sus crías lactantes, se encontró una reducción de la carga de metales esenciales como consecuencia de la transferencia madre-cría a través de la leche y de la placenta. De esta manera se observa que la preñez, el parto y la lactancia son mecanismos que involucran cambios en los niveles de algunos metales pesados en el organismo (Honda *et al.*, 1987; Gerpe *et al.*, 2002).

A partir de la década del 70' con el descubrimiento de que algunas especies de cetáceos presentaban elevados niveles de contaminantes en sus tejidos, principalmente metales pesados y organoclorados, surgió la preocupación sobre los efectos de éstos contaminantes en la supervivencia de los organismos particularmente de aquellas especies en las que dichos efectos nocivos se potencian con otras amenazas como la captura accidental en las redes de pesca y la destrucción del hábitat (Aguilar *et al.*, 1999). Con el objetivo de responder a la preocupación creciente sobre el estado de conservación del delfín franciscana se estudió la presencia y las concentraciones de metales pesados esenciales y no esenciales en hígado y riñón así como también, la relación entre estas concentraciones con varios parámetros biológicos y ecológicos, tales como el sexo, el estado de madurez sexual, la edad, la talla y área de procedencia de los ejemplares.

4-2 Materiales y Métodos

4-2-1 Toma de muestras

Para la determinación de la concentración de metales pesados las muestras de 5 cm^3 de hígado (n= 40) y riñón (n= 39), obtenidas durante la necropsia, se conservaron en bolsas de plástico adecuadamente rotuladas a una temperatura de -20º C hasta su tratamiento en el laboratorio y luego fueron fraccionadas en sub-muestras.

4-2-2 Procesamiento de las muestras y material de laboratorio

El método utilizado para la destrucción de la materia orgánica de las sub-muestras analizadas fue una mineralización del tejido en medio ácido (Marcovecchio y Ferrer, 2005). Los procedimientos de preparación, digestión y determinación en las sub-muestras de los metales pesados fueron realizados en el laboratorio de Química Marina, perteneciente al área de Oceanografía Química del Instituto Argentino de Oceanografía (IADO).

El material utilizado fue acondicionado para la aplicación de la metodología de determinación de metales pesados en matriz sólida. Ésta incluyó el lavado con solución detergente no-iónica, profundo enjuague con agua corriente seguido por, al menos tres, enjuagues en agua destilada, calidad de laboratorio, inmersión en solución acuosa de ácido nítrico 0,7% v/v durante 24-72 horas a temperatura ambiente y un enjuague final en agua destilada (basado en APHA, 1998). Se trabajó con indumentaria apropiada y en un ambiente sin corrientes de aire para evitar los contaminantes procedentes del mismo.

En todos los casos se usaron reactivos ultrapuros (marca Merk, Baker o similares) para evitar y/o minimizar cualquier tipo de contaminación e interferencias en las determinaciones. Todas las soluciones fueron preparadas con agua destilada calidad de laboratorio.

Todos los análisis se realizaron con duplicados de las muestras para evaluar la precisión y exactitud de los resultados obtenidos. Se emplearon blancos de reactivos para evaluar la calidad analítica de los compuestos utilizados.

4-2-3 Metodología analítica

Cada submuestra de 0,6 g fue pesada en balanza analítica dentro de tubos de ensayos de 50 ml de capacidad; una vez pesados y bajo campana de extracción, se añadió a cada tubo: (*i*) 3 ml de ácido nítrico concentrado (HNO_3 65 %), y (*ii*) 1 ml de ácido perclórico concentrado ($HClO_4$ 72%). Esta metodología se basa en la destrucción del grueso de la materia orgánica de las muestras por "*mineralización húmeda*" con la mencionada mezcla de ácidos.

Los tubos con las muestras se colocaron en un baño de glicerina pura dentro de un cristalizador con una plancha de teflón perforada sobre el mismo, donde se ubicaron los tubos para facilitar su manipulación y evitar golpes entre ellos. Se colocó todo el instrumental sobre una plancha de calor controlando la temperatura hasta que se alcanzó un máximo de 110 ± 10º C.

Durante las primeras horas de digestión bajo campana se agitaron los tubos cada 30 minutos. El proceso concluye al observarse un cambio en la coloración del extracto final de 1 ml (viraje de color amarillo oscuro a amarillo claro o incoloro). Debido a que el tiempo de mineralización es variable, puede ocurrir una reducción excesiva del extracto, en este caso se adicionó 1 ml más de ácido nítrico al 0,7%.

Se utilizó como control tubos de 50 ml de capacidad con el mismo volumen de la mezcla de ácidos y manipulados según lo descrito en el párrafo anterior.

Una vez concluida la digestión se retiraron los tubos del baño y se dejaron enfriar bajo campana. El extracto de cada muestra se trasvasó con pipeta Pasteur a tubos graduados con tapa esmerilada de 10 ml de capacidad. La pared de cada tubo de ensayo se enjuagó con ácido nítrico diluido (solución 0,7 % v/v, preparado con agua destilada) mediante una pizeta, repitiéndose la operación varias veces. Se trabajó con tandas de 24 – 30 tubos (12 – 15 muestras por duplicado), con dos o tres blancos de reactivo respectivamente. Los blancos fueron tratados de igual forma que las muestras.

Con el fin de determinar el Límite de Detección del Método (LDM) se agregaron 12 tubos con blancos de reactivos a los cuales se los sometió a la misma rutina que las muestras de tejido durante las digestiones ácidas.

4-2-4 Equipamiento

Las muestras de tejido renal y hepático se analizaron con un Espectrofotómetro de Absorción Atómica (EAA), *Perkin Elmer Modelo 2380*, con llama aire/acetileno. Las lecturas fueron hechas con lámparas de cátodo hueco y para cada metal se siguió con las condiciones de lectura dadas por el manual del equipo.

Figura 4-1: Espectrofotómetro de absorción atómica modelo *Perkin-Elmer 2380*.

4-2-5 Límite de detección instrumental, del método y pautas de control generales en la determinación de metales pesados

Los límites de detección del instrumento (LDI) y del método (LDM) se definen de la siguiente manera:

LDM (Límite de detección del método): Es la mínima concentración de un elemento que al ser procesado, a través del método completo, puede ser detectado por encima el ruido de fondo con un nivel de confianza del 99%. Los resultados por debajo de éste límite fueron informados como "*no detectables*" (nd) (Tabla 4-1).

El LDM se calculó multiplicando la desviación estándar (DS) de entre 10 y 12 réplicas (n) por el valor obtenido de la tabla de "*t*-Student" para n-1 grados de libertad y un alfa de 0,01.

$$LDM = t_{(n-1,1-\alpha)} * DS$$

LDI (límite de detección del instrumento)**:** se define como la mínima concentración que produce una absorbancia equivalente al doble de la magnitud de la fluctuación de fondo (APHA, 1998) y que puede ser distinguido de un ensayo en blanco (Tabla 4-1).

Tabla 4-1: Límite de detección del método (LDM, μg g^{-1}) y del instrumento (LDI, μg ml^{-1}) de cada metal analizado por Espectrofotometría de Absorción Atómica (AEE).

Metales	LDM	LDI
Cu	2,17	0,020
Zn	1,83	0,015
Ni	2,21	0,050
Cr	1,02	0,003
Cd	0,41	0,001
Pb	2,15	0,070

Las soluciones estándares de trabajo muy diluidas fueron preparadas antes de cada lectura y se evitó almacenarlas por períodos superiores a los cinco días. Las mismas fueron hechas a partir de soluciones stock de 100 μg ml^{-1}.

La calidad analítica de la concentración de cada metal fue controlada por comparación con el Material de Referencia Certificado (harina de tejido de mejillón, NIES Nº6) provistos por el Instituto Nacional de Estudios Ambientales (NIES), Tsukuba (Japón). Luego se calculó el **porcentaje de recuperación** (%RE, Tabla 4-2) expresado en μg g^{-1} de cada metal según la siguiente ecuación:

$$\%RE = \left(V_o / V_s \right) * 100$$

Donde: V_o: es el valor de concentración obtenido para cada metal pesado en μg g^{-1}.

V_s: es el valor de concentración certificado para cada metal pesado en μg g^{-1}

Tabla 4-2: Porcentaje de Recuperación (%RE) de cada metal analizado por Espectrofotometría de Absorción Atómica (AEE).

Metales	%RE
Cd	92,4 - 98,7
Cu	93,1 - 97,9
Pb	95,3 - 99,8
Zn	96,5 - 102,3
Ni	--
Cr	95,3 - 99,8

4-2-6 Calibración y cálculos

Para calcular las concentraciones de cada uno de los metales a partir de las absorbancias obtenidas por EAA se realizó una curva de calibración, la cual se obtuvo graficando los valores de absorbancia obtenidos de cada extracto en función de sus concentraciones o cantidades absolutas en las soluciones patrón de trabajo o en las soluciones con estándares internos (Figura 4-2), según la metodología analítica previamente comentada.

Cada curva fue construida con un mínimo de cuatro patrones y un máximo de siete y se ajustó la recta de regresión como mejor estimador, obteniéndose la ecuación correspondiente:

$$Y = a * x + b$$

Donde: *Y* es la absorbancia, expresada en unidades de absorbancia.

x es la concentración de interés, expresada en $\mu g\ g^{-1}$.

a= pendiente de la recta de regresión (tg a); *b*= ordenada al origen

Cada punto sobre la curva son los puntos obtenidos de los patrones de trabajo o de las soluciones con estándares internos de concentraciones conocidas.

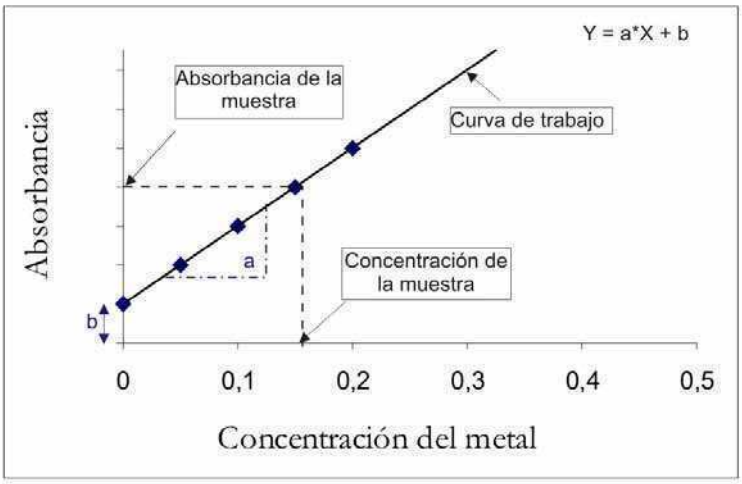


Figura 4-2: Curva de calibración a partir de la cual se obtuvieron los valores de concentración de las muestras de tejido analizadas. Esquema tomado de Botté (2005).

Con las lecturas de Absorbancia (*Y*) en EAA de cada uno de los extractos, se calculó luego la concentración de cada metal (*C*), siendo posteriormente corregidas para que el resultado final en la matriz de la muestra original quedara expresado en μg g^{-1}.

La ecuación aplicada para obtener el valor de *C* fue la siguiente:

$$X = \frac{C(Abs - b)}{a}$$

Las soluciones de las muestras de material biológico se aspiraron en la llama en idénticas condiciones que los patrones (soluciones de trabajo) y la concentración total de cada elemento en las muestras originales expresada en μg de metal por gramo de muestra:

$$\text{Concentración de metal en } \mu g/g = \left[\frac{(C * V)}{W}\right]$$

C= concentración del metal en la solución de la muestra digerida en μg; *V*= volumen final de la solución digerida, 10 ml; *W*= tamaño de la muestra expresada en gramos.

Cuando las concentraciones de cada extracto no entraron en el rango de los patrones de *W* se hicieron las diluciones adecuadas y el resultado final se multiplicó por el factor de dilución (*DF*) así:

DF= Vol. Solución muestra diluida (ml)/Vol. Alícuota de la dilución (ml)

Los valores de concentración menores a los límites de detección del método (LDM) fueron reemplazados por la mitad del valor de dicho límite con fines estadísticos. Mientras que aquellos metales con más del 40% de sus valores de concentración por debajo del LDM no fueron incluidos en los análisis estadísticos. Los coeficientes de variación entre las réplicas estuvieron entre rangos aceptables para el método utilizado (25 – 35%).

4-2-7 Análisis estadístico de los datos

Los análisis estadísticos se realizaron usando los programas Statistica 7.0 (Statsoft, Inc.), InfoStat/E y XLSTAT, que es una aplicación para el Microsoft Excel (2007).

Se aplicó la función logaritmo a los valores de concentración de los metales pesados. Se realizó un análisis de componentes principales (ACP) con el objetivo de explorar los datos y detectar valores *outliers* o anómalos. Se evaluó la normalidad de la distribución de los datos y la homocedasticidad de varianza a través de las pruebas de Shapiro-Wilk y de Levene, respectivamente. Cuando los supuestos no se cumplieron se realizaron pruebas tradicionales no paramétricas. A su vez, se realizaron análisis multivariados.

Se analizó la existencia de diferencias significativas de las concentraciones de los metales pesados entre el sexo y el estado de madurez sexual por la prueba de Mann-Whitney. La misma prueba se utilizó, además, para comparar los índices (Kn, IR, IH y %PG) según el sexo y estado de madurez sexual.

Los defines encontrados se dividieron en tres grupos de edad. El primer grupo correspondió al período desde el nacimiento hasta el destete (0 – 1 año), el segundo grupo comprendió a los animales mayores a un año hasta los 4 años y el tercero a los mayores de 4 años. La concentración de los metales por grupo de edad se comparó por la prueba ANOVA de Kruskal-Wallis o ANOVA de un factor, según corresponda.

Se estudió la relación de las concentraciones de los metales en función de la edad, la talla, el peso, los índices de condición y órgano-somáticos a través de la prueba de rangos de Spearman y regresión lineal, según corresponda.

Se realizó un Análisis de Función Discriminantes (AFD) con el objetivo de determinar qué variables contribuyen a discriminar entre dos o más grupos que se observan en la práctica. Se comparó la concentración de los metales pesados (variables) entre las cuatros localidades del área de estudio. De dicho análisis se obtiene un indicador llamado distancia de

Mahalanobis, que es una medida de la distancia entre dos puntos (o centroides de cada grupo) en el espacio, definido por dos o más variables correlacionadas. Se busca maximizar esta distancia. Para determinar la significancia de la variables que se introducen, se emplea el estadístico Lambda de Wilks que se obtiene de la razón entre el determinante de la matriz de variancias y covariancias dentro de grupos y el determinante de la matriz de variancias y covariancias total; este se aproxima con una F.

El efecto en conjunto de los parámetros biológicos y de los índices de condición corporal sobre las concentraciones de los metales en ambos tejidos fue evaluado mediante el análisis de modelos lineales generalizados o "*generalized lineal models*" (GLZ). A través de esta prueba pueden ser analizados los efectos lineales y no lineales para cualquier cantidad y tipo de variables predictoras en una variable dependiente discreta o continua.

El análisis permite obtener un modelo que explica la variación, teniendo en cuenta más de una variable a la vez, permitiendo de esta manera obtener información adicional que no es posible obtener con los análisis no paramétricos tradicionales. En la mayoría de los casos habrá un número variable de modelos posibles que puedan ajustarse a un conjunto determinado de datos. Se determinó cuál de todos estos modelos resulta adecuado y cuál es el que explica la mayor proporción de la varianza sujeto a la restricción de que todos los parámetros del modelo deberán ser estadísticamente significativos. Esto es lo que se conoce como el *modelo adecuado mínimo*. El criterio de información de Akaike (AIC) es un índice que evalúa tanto el ajuste del modelo a los datos como la complejidad del modelo. Cuanto más bajo es el valor de AIC mejor es el ajuste. Para la elección del mejor modelo se usó el siguiente criterio: la diferencia entre el valor de AIC (ΔAIC) del primer modelo obtenido debe ser ≤ 2 respecto de los valores subsiguientes de AIC (obtenidos de los otros modelos). Todos los modelos dentro de este rango (0-2) son buenos para explicar la varianza de los datos. Si esta diferencia está entre 2 y 4, la varianza explicada es pobre y si es mayor a 4 el modelo falla en explicar la varianza.

La correlación canónica es un procedimiento adicional para evaluar la relación entre las variables. En concreto, este análisis permitió investigar la relación entre dos conjuntos de variables o matrices de datos. La correlación canónica es un caso especial del modelo lineal general, una aplicación completa y flexible. Aquí se estudió la interrelación entre dos grupos de variables medidas (concentración de metales pesados mayoritarios, Zn, Cu y Cd en los órganos analizados, hígado y riñón) sobre los ejemplares analizados (o casos).

La última consideración importante a tener en cuenta es la utilización de los parámetros medias y desvío estándar para describir los resultados. Debido a que las variables respuestas no siguen distribuciones normales, correspondía comparar y estudiar los valores de las medianas y sus percentiles 25% y 75%, en vez de las medias y desvíos. En la presente tesis, sin embargo se analizó las medias y desvío estándar con el propósito de poder comparar los resultados obtenidos aquí con los informados en estudios previos.

4-3 Resultados

Tejido Hepático

Concentración de metales pesados y análisis exploratorio de los datos

La Tabla 4-3 resume los valores de parámetros biológicos correspondientes a los ejemplares analizados, según el sexo y el estado de madurez sexual.

Tabla 4-3: Parámetros biológicos de los delfines franciscana estudiados en este apartado. I: inmaduros, M: maduros.

	Edad (años)			Talla (cm)			Peso (kg)		
	Media	DE	n	Media	DE	n	Media	DE	n
Hembras	3,00	2,25	16	123,85	21,91	16	26,20	10,98	16
I	2,17	1,70	12	115,80	18,69	12	21,64	6,62	12
M	5,50	1,91	4	148,00	9,12	4	39,89	10,43	4
Machos	2,65	2,98	23	112,36	17,10	24	18,78	6,59	24
I	1,47	1,23	17	106,21	14,78	18	16,59	5,09	18
M	6,00	4,00	6	130,83	7,51	6	25,36	6,53	6

Fueron seis los metales pesados analizados (Cd, Cu, Zn, Pb, Cr y Ni), de los cuales solo tres (Cd, Cu y Zn) presentaron menos del 40% de sus concentración no detectables por el método analítico utilizado.

El Zn resultó ser el metal pesado en mayor concentración, seguido por el Cu y finalmente el Cd (Tabla 4-4). El 100% de los valores de concentración de Cr resultaron no detectables, mientras que el Ni presentó un 92,5% y el Pb un 70% de sus valores de concentración no detectables.

Tabla 4-4: Concentraciones (µg g^{-1} peso fresco) de Cd, Cu y Zn en el tejido hepático del delfín franciscana. I: inmaduros, M: maduros.

	Cd				Cu				Zn			
	Media	Mediana	DE	n	Media	Mediana	DE	n	Media	Mediana	DE	n
Hembras	2,18	1,27	2,74	16	6,14	4,21	7,03	16	36,40	34,08	15,18	16
I	1,11	0,69	1,00	12	6,39	3,77	8,18	12	34,30	29,89	16,94	12
M	5,38	3,65	3,95	4	5,41	5,11	0,98	4	42,69	39,01	5,39	4
Machos	1,88	0,85	2,23	24	7,3	5,32	5,39	24	33,53	28,30	15,39	24
I	0,95	0,60	0,96	18	6,37	4,69	4,92	18	32,67	28,30	11,79	18
M	4,69	4,92	2,67	6	10,11	10,23	6,24	6	36,11	36,48	24,60	6
Total	2,00	0,88	2,42	40	6,84	4,91	6,04	40	34,68	30,25	15,17	40

Se realizó un análisis de componentes principales (ACP) y el resultado fue la ausencia de valores fuera de lo esperado (valor *outlier)*. Los primeros tres factores resultantes de las combinación lineal de las variables originales explicaron el 77% de la varianza de los datos (Tabla 4-5). De este análisis surgió que el Factor 1 representó a las variables relacionadas con el crecimiento de los ejemplares (edad, talla, peso, índice hepático y Cd), mientras que el factor 2 estaría relacionado con el estado de condición general de los ejemplares estudiados (porcentaje del peso de la grasa y Kn). El Factor 3 explicó la variación de los datos de Cu y Zn (Tabla 4-6, Figura 4-3).

Cuando se analizaron los factores resultantes de la combinación lineal de las variables originales en función de las variables categóricas (sexo, madurez, grupo de edad y localidad), se observó que únicamente el estado madurez y la edad parecen tener un efecto sobre los factores (Figura 4-4).

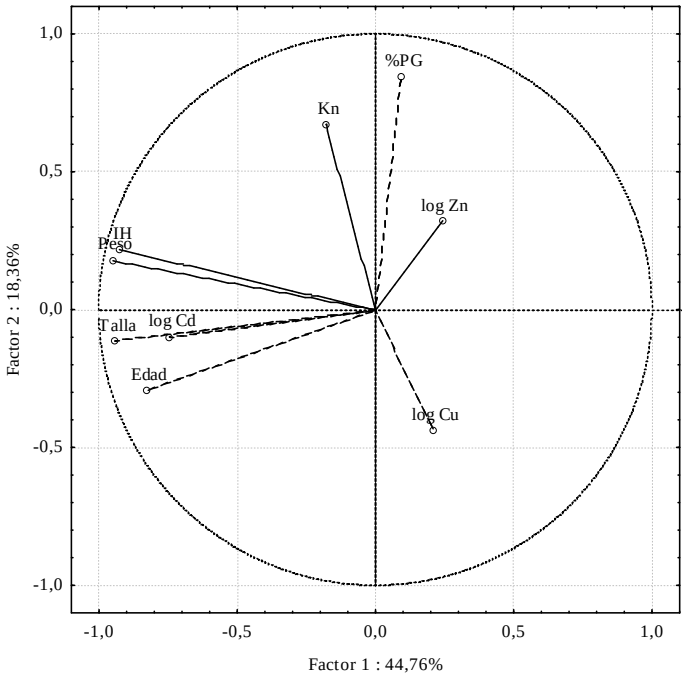


Figura 4-3: Gráfico de los autovectores de las variables originales en función de los factores de componentes principales en hígado. Índices de condición analizados: IH: índice hepático, Kn: índice relativo de condición corporal. %PG: índice graso. Parámetros biológicos: peso, talla y edad.

Tabla 4-5: Autovalores de la matriz de correlación y la estadística asociada. Var.: varianza.

Factor	Autovalor	% var. total	% de var. acumulada
1	4,03	44,76	44,76
2	1,65	18,36	63,12
3	1,25	13,90	77,02
4	0,93	10,32	87,34
5	0,60	6,67	94,01
6	0,26	2,90	96,91
7	0,20	2,21	99,12
8	0,06	0,64	99,76
9	0,02	0,24	100,00

Tabla 4-6: Autovectores de la matriz de correlación obtenida del ACP. IH: índice hepático, Kn: índice relativo de condición corporal. %PG: índice graso.

Variables	Factor 1	Factor 2	Factor 3
Edad	-0,41	-0,23	0,23
Largo	-0,47	-0,09	-0,06
Peso	-0,47	0,14	0,14
IH	-0,46	0,17	0,08
%PG	0,05	0,66	-0,14
Kn	-0,09	0,52	0,38
log Cd	-0,37	-0,08	-0,21
log Cu	0,10	-0,34	0,68
log Zn	0,12	0,25	0,50

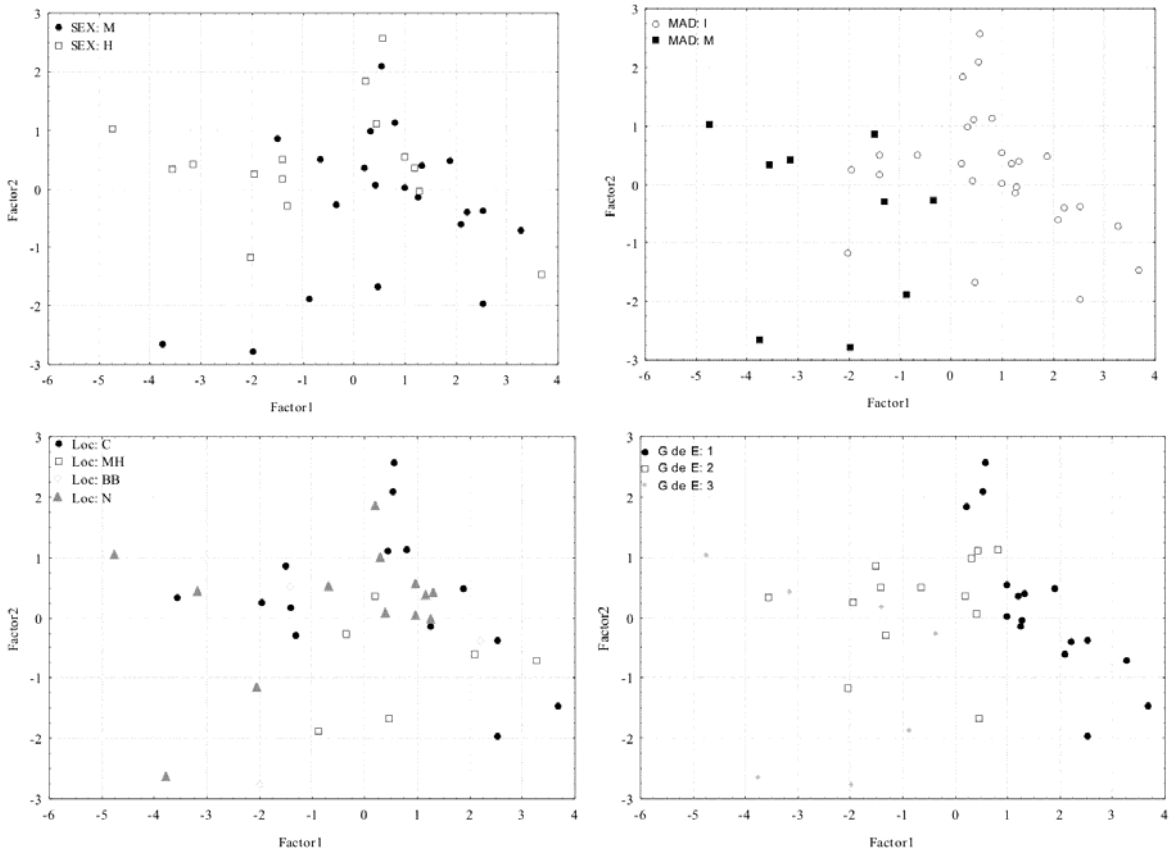


Figura 4-4: Gráficos de los Factores 1 y 2 en función de las variables categóricas (sexo, estado de madurez sexual (Mad), localidad (Loc) y grupo de edad (G de E). M: maduros, I: inmaduros, N: Necochea, C: Claromecó, MH: Monte Hermoso; BB: Bahía Blanca.

Efecto de los parámetros biológicos edad y madurez sexual, sobre las concentraciones de los metales pesados

Las tendencias obtenidas por el ACP fueron verificadas mediante la aplicación de los análisis estadísticos correspondientes.

Las concentraciones de los metales no se diferenciaron según el sexo de los ejemplares (Mann-Whitney: Cd p= 0,59; Cu p= 0,49, Zn p= 0,39). Mientras que sí se encontraron diferencias significativas según el estado de madurez, confirmando la tendencia encontrada en el análisis exploratorio. Las concentraciones de Cd fueron mayores en los ejemplares sexualmente maduros (4,97 ± 3,05 $\mu g\ g^{-1}$) respecto de los inmaduros (Mann-Whitney: p< 0,001). El 26,67% de los inmaduros presentaron valores no detectables de Cd, mientras que los maduros no presentaron valores de concentración no detectables. El Cu y el Zn no presentaron concentraciones estadísticamente diferentes entre los grupos de madurez (Mann-Whitney: Cu p= 0,38; Zn p= 0,16). Se obtuvieron resultados similares mediante el método GLZ, el sexo no resultó un modelo que explicara, por sí sólo, la mayor proporción de la variación de los datos para los tres metales (GLZ: Cd AIC= 59,80, p= 0,87 posición quinta en el ranking, Cu AIC=26,09, p=0,71 puesto 54 en el ranking, Zn AIC= -20,52, p= 0,84 puesto 3 en el ranking). Tanto para el Cd como para el Zn, no se encontró un modelo significativo que tuviera en cuenta el sexo, estado de madurez, talla, peso y edad que explique la variación de los datos. No obstante, para el Cu se encontraron varios modelos que tuvieron éxito en explicar la mayor proporción de la variación de los datos, el modelo con el menor número de AIC= 20,15 (p= 0,02), los subsiguientes modelos presentaron una diferencia de menos de 2 unidades entre su valor akaike y valores de p significativos. Las variables involucradas en estos modelos fueron la edad y la interacción madurez/sexo (primer modelo) seguido por la edad (GLZ: AIC= 20,17, p= 0,02), la talla (AIC= 21,68, p= 0,03) y el sexo (GLZ: AIC= 22,05, p= 0,04).

El Cd fue el único metal pesado que presentó diferencias significativas entre los grupos de edad evaluados, siendo la concentración hasta el primer año de edad menor que la encontrada en los años subsiguientes de vida (Kruskal-Wallis: grupo de edad 1 vs 2/ 2 vs 3 $p < 0,001$, Tabla 4-7).

Tabla 4-7: Concentraciones (μg g^{-1} peso fresco) de Cd, Cu y Zn en tejido hepático del delfín franciscana según el grupo de edad al que corresponden. Letras diferentes indican diferencias significativas.

		Grupo de Edad		
		>0; ≤1	≥2; ≤4	≥5, 13
Cd	Media	0,65[a]	2,59[b]	3,48[b]
	Mediana	0,51	1,57	2,66
	DE	0,62	2,45	3,22
	Rango	0,20 - 2,25	0,20 - 8,76	0,44 - 9,95
	n	15	15	9
Cu	Media	8,31	4,06	9,65
	Mediana	5,21	3,76	7,93
	DE	7,71	1,76	6,08
	Rango	1,08 - 31,58	1,51 - 8,22	3,77 - 21,41
	n	15	15	9
Zn	Media	36,20	32,69	35,37
	Mediana	29,05	31,46	25,37
	DE	15,44	11,18	21,78
	Rango	22,15 - 69,75	17,50 - 57,04	14,19 - 75,26
	n	15	15	9

El estudio de correlación de Spearman reveló que una vez más sólo el Cd presentó una relación estadísticamente positiva con la edad, la talla y el peso de los ejemplares, mientras que los restantes metales no mostraron este tipo de relación (Tabla 4-8). Éste hecho fue previamente demostrado por el análisis exploratorio inicial y reafirmado por el análisis lineal generalizado.

Tabla 4-8: Resultados de la prueba de Rangos de Spearman (R_{sp}). Los valores de concentración de los metales pesados fueron transformados a logaritmo. Se resaltan en negrita los valores significativos. R_{sp}: coeficiente de correlación de la prueba.

	n	R_{Sp}	p
Edad - Cd	39	0,582	**0,000**
Edad - Cu	39	0,053	0,751
Edad - Zn	39	-0,115	0,485
Talla - Cd	40	0,623	**0,000**
Talla - Cu	40	-0,120	0,462
Talla - Zn	40	-0,122	0,453
Peso - Cd	40	0,548	**0,000**
Peso - Cu	40	-0,173	0,285
Peso - Zn	40	-0,176	0,278
Cd - Cu	40	-0,027	0,869
Cd - Zn	40	-0,168	0,299
Cu - Zn	40	0,199	0,218

Condición Corporal

Es importante resaltar que los todos los ejemplares analizados presentaron una buena condición corporal, resultado que se desprende de la estimación del parámetro Kn de condición (Kn medio= 0,98 ± 0,18, es decir que no se separa del esperado obtenido de la curva de regresión que aparece en la Figura 3-4). El valor de Kn más bajo encontrado fue de 0,57 y perteneció a un neonato encontrado varado en la playa, el valor más alto fue de 1,38 y fue exhibido una hembra madura, preñada de la localidad de Necochea.

Los índices de condición corporal analizados aquí (%IH, %PG y Kn) no se relacionaron con el sexo ni el estado de madurez sexual de los ejemplares (Mann-Whitney: sexo p≥ 0,24, madurez p≥ 0,17; GLZ: %IH AIC (Sexo/Madurez)= 77,53, p= 0,15; %PG AIC (Sexo/Madurez)= 277,39, p= 0,82; Kn AIC (Sexo/Madurez)= -18,34, p= 0,84 (Tabla 4-9). Sin embargo, la variación en los datos del peso de hígado estuvo representado por un

modelo que incluyó a la madurez y al sexo de los ejemplares (GLZ: AIC= 531,51, p< 0,001).

De igual forma, los índices no se diferenciaron estadíticamente según el grupo de edad ni la localidad de procedencia (Kruskal-Wallis: grupo de edad: p≥ 0,22, localidad: p≥ 0,11, Tabla 4-10); tampoco se relacionaron estadísticamente con los parámetros biológicos (talla, peso y edad, Spearman: R_{Sp}= -0,21 – 0,20 p> 0,19) ni con las concentraciones de los metales, según la prueba no paramétrica de rangos de Spearman (R_{Sp}= -0,30 – 0,30 p> 0,06). No obstante, se observó una correlación significativamente negativa, aunque débil, entre el %IH y el Cu (Spearman: R_{Sp}= -0,34 p= 0,03). Esta relación se verificó además por el método de GLZ, siendo el Cu la única variable que explicó significativamente la variación de los datos de %IH (GLZ: AIC= 77,04, p= 0,04, puesto 1 en el ranking). Adicionalmente, mediante la prueba de GLZ se encontró que el %PG estaría afectado significativamente por la interacción de las concentraciones de Cu, Zn, y por el Cd simultáneamente (GLZ: Cu/Zn AIC= 528,29, p< 0,001, primer puesto en el ranking), previamente observado en el análisis exploratorio.

Tabla 4-9: Índices de condición corporal analizados en función del sexo y el estado de madurez sexual. %IH/%PG: porcentaje del peso del hígado (o de la grasa total) en función del peso total de cada ejemplar. PH: valor del peso absoluto del riñón. Kn: índice relativo de condición corporal (Le Crem, 1951). No se encontraron diferencias significativas entre sexos y grupos de madurez.

	% IH			% PG			Kn		
	Media	DE	n	Media	DE	n	Media	DE	n
Hembras	2,51	0,57	16	28,28	9,31	15	1,04	0,20	16
I	2,50	0,65	12	28,65	10,01	11	1,03	0,17	12
M	2,53	0,23	4	27,25	8,29	4	1,08	0,30	4
Machos	2,21	0,67	24	24,90	8,47	24	0,93	0,17	24
I	2,14	0,75	18	26,32	7,20	18	0,95	0,18	18
M	2,41	0,34	6	20,64	11,16	6	0,89	0,12	6
Total	2,33	0,64	40	26,20	8,84	39	0,98	0,19	40

Tabla 4-10: Índices de condición corporal analizados en función de la localidad de procedencia de los delfines. Referencias: C: Claromecó, MH: Monte Hermoso, BB: Bahía Blanca, N: Necochea. %IH/%PG: porcentaje del peso del hígado (o de la grasa total) en función del peso total de cada ejemplar. PH: valor del peso absoluto del riñón. Kn: índice relativo de condición corporal (Le Crem, 1951). No se encontraron diferencias significativas entre las diferentes localidades analizadas.

Localidades	% IH			% PG			Kn		
	Media	DE	n	Media	DE	n	Media	DE	n
C	2,44	0,61	15	27,89	10,10	15	0,95	0,17	15
MH	2,17	0,65	6	24,87	2,69	6	0,89	0,14	6
BB	2,46	0,37	4	21,75	11,33	4	0,82	0,17	4
N	2,25	0,75	15	26,23	8,71	14	1,08	0,18	15

No fue posible analizar el efecto del varamiento sobre los índices de condición analizados debido a que únicamente dos individuos analizados se encontraron varados en la playa. Sin embargo, ambos presentaron marcas de red y estaban fresco al momento de ser procesados.

Análisis según el área de procedencia de los ejemplares

La Tabla 4-11 muestra los valores medios y la estadística asociada de las concentraciones de los metales pesados en las cuatro localidades muestreadas.

El análisis de discriminantes indicó que no se cumplió el supuesto de homocedasticidad de la varianza de la matriz de varianza-covarianza ($p<0,001$) y por lo tanto esta prueba se consideró como una tendencia. Dicha tendencia, de las variables en función de las localidades, aparece en la Figura 4-5 y fue similar a la observada en el ACP. Se analizaron las diferencias entre las localidades muestreadas (con excepción de la localidad de BB por el bajo tamaño muestral) según el estado de madurez sexual y el grupo de edad al cual pertenecían los ejemplares por métodos no paramétricos.

A partir de la prueba de ANOVA no paramétrico de Kruskal-Wallis se verificó la tendencia descripta por el grafico del análisis de función discriminante (Figura 4-5) donde es claramente observable la ausencia de diferencias entre las localidades para las variables involucradas según el estado de madurez sexual.

Por el contrario el análisis de las diferencias en la concentración de Cd hallado en los tejidos según las localidades, indicó que en los ejemplares de más de 1 año y hasta 4 años de edad, las concentraciones de Necochea y de Claromecó fueron significativamente distintas entre sí (C: 1,37 ± 0,36 y N: 0,90 ± 0,33 $\mu g\ g^{-1}$ respectivamente, Mann-Whitney: p= 0,03).

La concentración media de Cd en Claromecó resultó mayor que la de Necochea. Mientras que para los demás grupos de edad no se observaron diferencias entre las localidades para el Cd y el Zn. No obstante, el Cu presentó diferencias significativas entre las localidades de Claromecó y Monte Hermoso para los ejemplares de más 4 años de edad (Kruskal-Wallis: p= 0,03), resultando la concentración de Monte Hermoso mayor que la de Claromecó (2,18 ± 0,19 y 1,43 ± 0,34 $\mu g\ g^{-1}$, respectivamente).

La Tabla 4-12 resume los valores de concentración de Zn, Cd y Cu obtenidos de la revisión bibliográfica realizada para esta tesis. De ésta revisión bibliografía surgió que en hígado, únicamente el Cd fue significativamente diferente entre las cuatro regiones puestas a prueba (Río de Janeiro, Río Grande do Sul, Norte de Buenos Aires y Sur de Buenos Aires, Student: p≤ 0,002). Lo mismo ocurrió con el Zn y Cu, que fueron los que se encontraron en mayor concentración en el Norte de Buenos Aires (NBA, Marcovecchio *et al.*, 1990), seguidos por los niveles observados en São Paulo-Paraná (SP-PA) y Río de Janeiro (RJ), resultando las concentraciones de Sur de Buenos Aires las más bajas de toda la costa sudamericana (Tabla 4-12). Se verificaron diferencias significativas entre los niveles de Zn del sur de Buenos Aires (SBA) con respecto a los de NBA y a los de SP (Student: $p_{SBA/NBA} \leq 0{,}0001$, $p_{SBA/SP} = 0{,}03$; Kunito *et al.*, 2004). No obstante, los niveles en SBA fueron similares a los de RJ

(Student: $p_{SBA/RJ}$= 0,70; Lailson–Brito *et al.,* 2002; Seixas *et al.*, 2007; Carvalho *et al.*, 2008; Seixas *et al.*, 2009) y los menores informados hasta la fecha.

Tabla 4-11: Concentraciones (µg g^{-1} peso fresco) de Cd, Cu y Zn según el área de procedencia de los delfines. N: Necochea, C: Claromecó, MH: Monte Hermoso, BB: Bahía Blanca. No se encontraron diferencias significativas entre las diferentes localidades analizadas.

		Localidades			
		BB	C	MH	N
Cd	Media	4,09	1,58	2,34	1,73
	Mediana	2,68	0,84	1,65	0,77
	DE	3,13	1,90	2,63	2,56
	Rango	2,25 - 8,76	0,20 - 7,37	0,20 - 7,05	0,20 - 9,95
	n	4	15	6	15
Cu	Media	6,83	6,29	12,76	5,01
	Mediana	6,47	3,87	13,07	5,09
	DE	3,74	7,64	6,74	2,27
	Rango	2,99 - 11,39	1,08 - 31,58	4,17 - 21,41	1,08 - 9,41
	n	4	15	6	15
Zn	Media	28,39	37,04	38,42	32,49
	Mediana	20,3	28,9	28,05	31,7
	DE	19,35	15,93	25,33	7,05
	Rango	15,92 - 57,04	20,12 - 69,75	14,19 - 75,26	20,13 - 44,09
	n	4	15	6	15

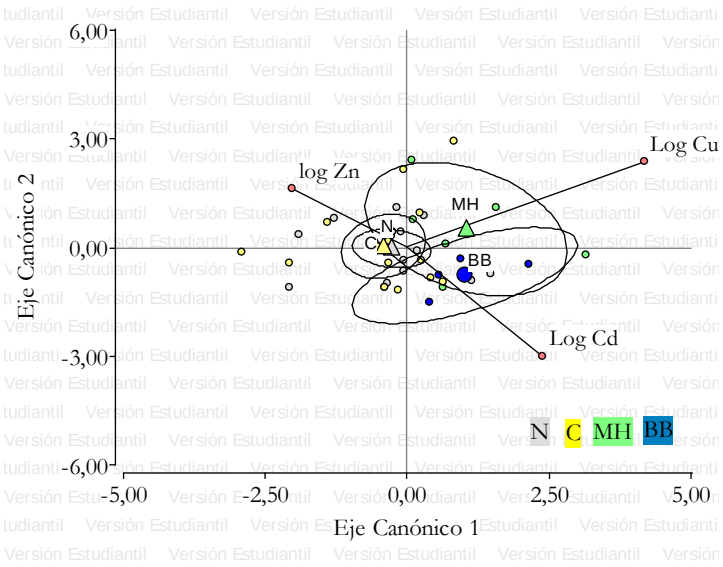


Figura 4-5: Gráfico biplot que resulta del análisis de funciones discriminantes. Los triángulos grandes respresentan los centroides de cada grupo. Referencias: Colores: Gris: Necochea, Verde: Monte Hermoso, Amarillo: Claromecó y Azul: Bahía Blanca. Las variables (Cd, Cu y Zn) están representadas por los vectores y la correlación con cada función discriminantes está representada por el ángulo, y la direccción indica su incremento.

Tabla 4-12: Concentraciones de metales pesados (µg g^{-1} de peso húmedo) en tejido hepático de delfín franciscana a lo largo de la costa sudamericana. Letras diferentes indican diferencias significativas $p \leq 0,05$.

País	Zona	Metales	n	Concentración en µg g^{-1} de peso húmedo			Referencia
				Rango	Media	DE	
Brasil	Río de Janeiro	Zn	17	11,00 – 61,00	36,35[b]	14,01	Lailson–Brito *et al.,* 2002
		Cu	17	4 - 21,00	8,20	4.45	
		Cd	14	nd - 0,63	0,43	0,43	
		Cd	13	0,04 - 1,23	0,46[b]	0,38	Seixas *et al.*, 2007*
		Zn	7	21,70 – 46,6	37,5	--	Carvalho *et al.*, 2008
		Cd	7	0,05–0,17	0,11	--	
		Cu	18	0,95 - 57,20	7,77	12,51	Seixas *et al.*, 2009*
		Cd	18	nd - 0,92	0,17	0,29	
	São Pablo - Paraná	Zn	23	33,64 - 47,27	46,06	24,85	Kunito *et al.*, 2004*
		Cu	23	5,30 - 26,67	13,48	27,00	
	Río Grande do Sul	Cd	44	0,04 - 4,14	0,58[b]	0,36	Dorneles *et al.*, 2007
Argentina	Norte de Buenos Aires	Zn	2	--	83,40[b]	40,00	Marcovecchio *et al.*, 1990
		Cu	2	--	16,00	3,30	
		Cd	2	--	3,30[b]	1,40	
		Zn	18	29,70	--	--	Gerpe *et al.*, 2002
		Cu	18	19,00	--	--	
		Cd	18	2,27	--	--	
	Sur de Buenos Aires	Zn	40	14,19 - 75,26	34,67[a]	15,17	Presente estudio
		Cu	40	nd - 31,58	6,84[a]	6,04	
		Cd	40	nd - 9,95	2,00[a]	2,42	

* Las concentraciones en base de peso seco fueron transformadas en base de peso fresco asumiendo un contenido de humedad de 70% según Yang *et al.* (2003).

Tejido Renal

Concentración de metales pesados y análisis exploratorio de los datos

La Tabla 4-13 resume los valores de los parámetros biológicos del grupo de ejemplares según el sexo y el estado de madurez sexual.

Tabla 4-13: Parámetros biológicos de los delfines franciscana estudiados en este apartado. I: inmaduros, M: maduros. DE: desvío estándar, n: tamaño muestral.

	Edad (años)			Talla (cm)			Peso (kg)		
	Media	DE	n	Media	DE	n	Media	DE	n
Hembras	2,73	2,15	15	122,74	22,21	15	25,12	10,43	15
I	1,91	1,51	11	114,54	19,06	11	21,35	6,86	11
M	5,00	2,16	4	145,30	12,90	4	35,46	12,50	4
Machos	2,83	2,93	23	111,74	16,30	24	18,27	6,26	24
I	1,83	1,62	18	107,12	14,69	19	16,51	4,85	19
M	6,40	3,97	5	129,30	8,42	5	24,99	6,95	5

Al igual que en el tejido hepático, el Zn fue el metal mayoritario en el tejido renal seguido por el Cd, el Cu y el Pb, quien presentó un 69,23% de sus valores de concentración por debajo del límite de detección del método. El Ni presentó un 92% de valores no detectable y sólo tres ejemplares presentaron concentraciones detectables de Cr.

Del análisis de componentes principales se obtuvieron resultados similares a los observados para el hígado. Los primeros tres factores resultantes de las combinación lineal de las variables originales explicaron aproximadamente un 74% de la varianza de los datos (Tabla 4-14). El Factor 1 es un factor de crecimiento, mientras que el Factor 2 resultó un contraste entre la condición de los ejemplares y la concentración de Zn y el Factor 3 explicó la variación de los datos de Cu (Tabla 4-15, Figura 4-6).

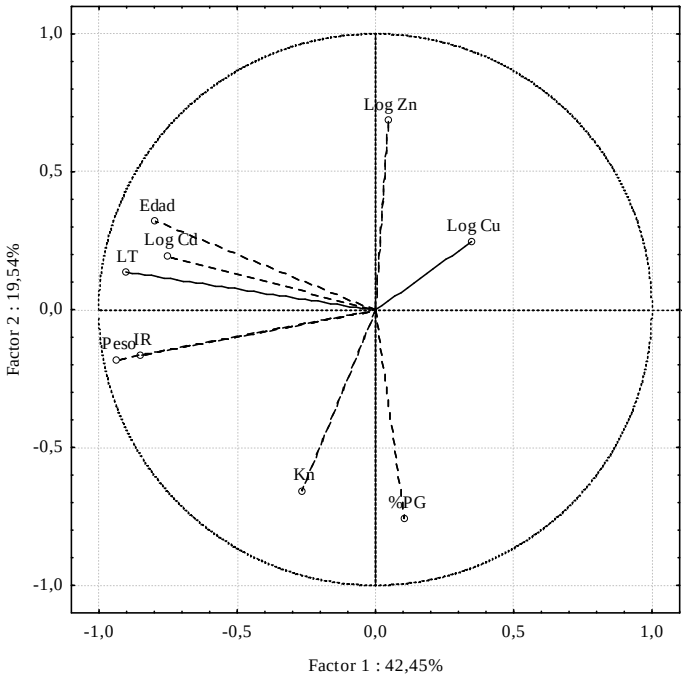


Figura 4-6: Gráfico de los autovectores de las variables originales en función de los factores de componentes principales en riñón. Índices de condición analizados: IR: índice renal, Kn: índice relativo de condición corporal. %PG: índice graso. Parámetros biológicos: peso, talla y edad.

Tabla 4-14: Autovalores de la matriz de correlación y la estadística asociada. Var.: Varianza

Factor	Autovalor	% de var. total	% var. acumulada
1	3,82	42,45	42,45
2	1,76	19,54	61,98
3	1,07	11,89	73,87
4	0,77	8,58	82,45
5	0,70	7,78	90,23
6	0,37	4,12	94,34
7	0,28	3,09	97,43
8	0,22	2,41	99,84
9	0,01	0,16	100,00

Tabla 4-15: Autovectores de la matriz de correlación. %IR/%PG: porcentaje del peso del riñón (o de la grasa total) en función del peso total de cada ejemplar. Kn: índice relativo de condición corporal (Le Crem, 1951).

Variables	Factor 1	Factor 2	Factor 3
Edad	-0,41	0,24	0,19
Talla	-0,46	0,10	0,24
Peso	-0,48	-0,14	0,09
Kn	-0,14	-0,50	-0,30
IR	-0,44	-0,12	-0,05
%PG	0,05	-0,57	0,15
Log Cu	0,18	0,19	0,73
Log Cd	-0,38	0,15	-0,12
Log Zn	0,02	0,52	-0,48

Al igual de lo observado para el hígado, parece haber un efecto del estado de madurez sexual y de la edad sobre las nuevas variables (Figura 4-7). Para verificar esta tendencia se aplicaron diferentes pruebas estadísticas.

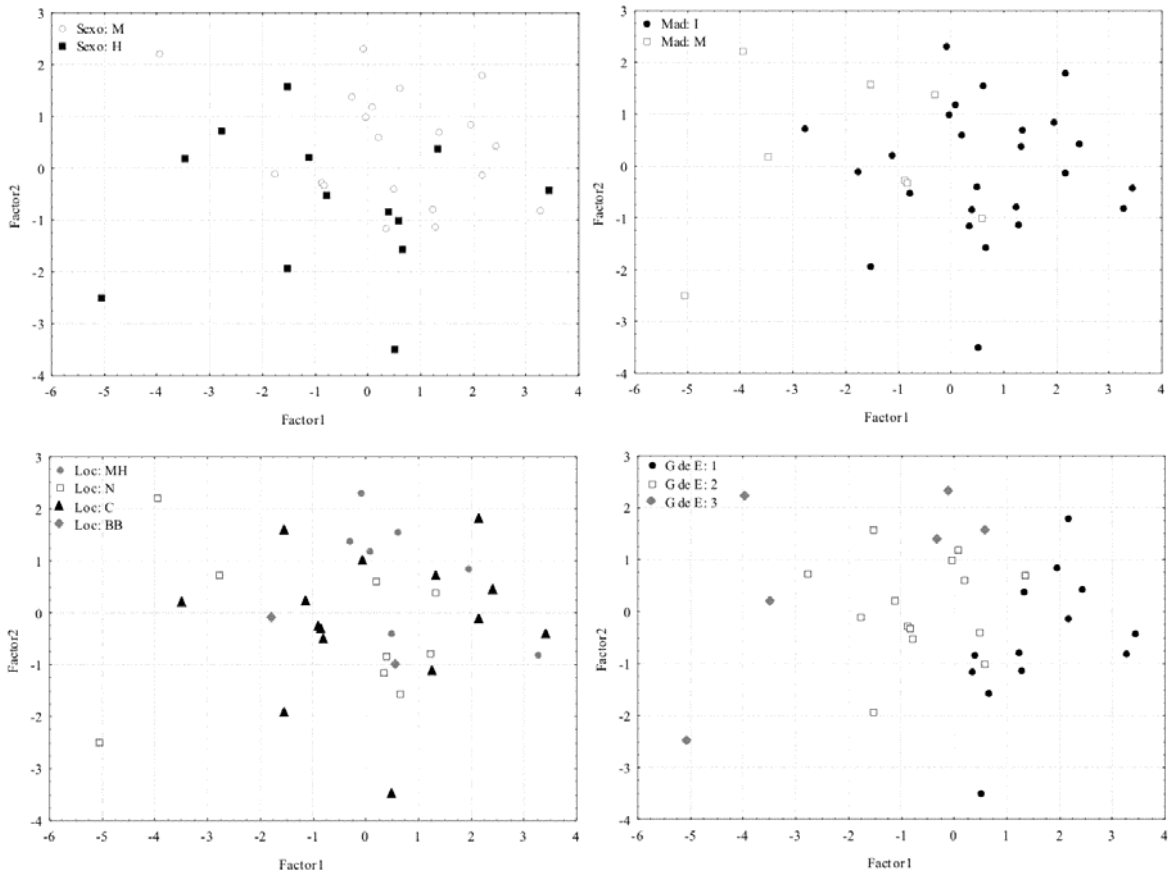


Figura 4-7: Gráficos de los Factores 1 y 2 en función de las variables categóricas (sexo, estado de madurez (Mad), localidad (Loc) y grupo de edad (G de E). M: maduros, I: inmaduros, N: Necochea, C: Claromecó, MH: Monte Hermoso; BB: Bahía Blanca.

Efecto de los parámetros biológicos edad y madurez sexual, sobre las concentraciones de los metales pesados

En el riñón se verificó un efecto significatvo del sexo para el Cu y Zn (Mann-Whitney: Cu p= 0,04, Zn p= 0,03; GLZ: Cu AIC= 9,36, p= 0,02, puesto uno en el ranking, Zn AIC= -77,06, p= 0,03, puesto uno en el ranking). Por su parte el Cd no presentó diferencias significativas entre sexos, por ambos métodos. Los niveles de Cd fueron mayores en ejemplares maduros respecto de los inmaduros (Mann-Whitney: p= 0,001, Tabla 4-16). El efecto de la madurez sobre el Cd fue también corroborado por el método de GLZ (AIC= 91,53, p= 0,01, puesto uno del ranking).

Por otro lado, tanto el Cu como el Zn presentaron mayores concentraciones en los ejemplares machos inmaduros que en las hembras en el mismo estado de madurez (Mann-Whitney: HI vs MI p_{Cu}= 0,04, p_{Zn}= 0,03). Además no hubo diferencias entre los ejemplares sexualmente maduros machos y hembras. El efecto de la madurez sólo pudo ser verificado por el método GLZ para el Cu, pero con una significancia marginal (GLZ: AIC= 10,94 p= 0,05, puesto dos del ranking).

En relación a los grupos de edad, nuevamente el Cd se diferenció entre el grupo 1 con respecto a los grupos 2 y 3, mientras que estos últimos no se diferenciaron entre sí (Kruskal-Wallis: grupo de edad 1vs 2 p=0,002; grupo de edad 1 vs 3 p< 0,001. Tabla 4-17). No hubo diferencias significativas entre los grupos de edad para el Cu y Zn.

Tabla 4-16: Concentraciones (µg g^{-1} peso fresco) de Cu, Cd y Zn en el tejido renal del delfín franciscana. I: inmaduros, M: maduros. Letras diferentes indican diferencias significativas p≤0,05.

		Hembras			Machos			Total
		I	M	H totales	I	M	M Totales	
Cu	Media	2,74[a]	4,13	3,17	6,37[b]	5,78	6,25	5,07
	Mediana	2,4	3,1	2,89	3,69	5,34	3,73	3,37
	DE	0,91	2,64	1,66	5,41	3,85	5,06	4,34
	n	9	4	13	17	4	21	34
Cd	Media	2,06	13,18	5,02	4,08	12,85	5,91	5,57
	Mediana	2,99	14,88	2,99	1,64	12,21	2,61	2,99
	DE	1,49	10,04	7,01	6,85	7,03	7,65	7,33
	n	11	4	15	19	5	24	39
Zn	Media	20,37[a]	21,01	20,54	24,58[b]	22,26	24,09	22,73
	Mediana	20,45	20,60	20,46	24,32	21,06	23,66	21,06
	DE	2,08	5,46	3,09	5,62	2,95	5,21	4,80
	n	11	4	15	19	5	24	39

Tabla 4-17: Concentraciones (µg g^{-1} peso fresco) de Cu, Cd y Zn en tejido renal del delfín franciscana según los grupos de edad. Letras diferentes indican diferencias significativas p≤0,05.

		Grupo de Edad		
		>0; ≤1	≥2; ≤4	≥5, 13
Cu	Media	4,77	3,90	8,68
	Mediana	3,69	2,58	21,16
	DE	2,93	3,26	7,50
	Rango	2,40 - 13,38	1,62 - 10,60	2,30 - 20,57
	n	13	14	6
Cd	Media	3,84[a]	6,69[b]	7,73[b]
	Mediana	1,49	3,46	3,30
	DE	6,17	8,65	7,10
	Rango	0,20 - 22,74	0,20 - 29,85	0,20 - 19,16
	n	16	15	7
Zn	Media	22,90	22,02	23,82
	Mediana	21,16	21,05	24,42
	DE	5,08	5,12	4,17
	Rango	16,84 - 34,92	12,17 - 29,88	19,24 - 31,31
	n	16	15	7

En cuanto a las relaciones entre los metales y los parámetros biológicos (talla, peso y edad) se encontró que en riñón únicamente el Cd fue el que se relacionó estadísticamente con ellos tres (Spearman: Edad R_{Sp}= 0,70, p< 0,001, Talla R_{Sp}= 0,64, p< 0,001, Peso R_{Sp}= 0,55,

p< 0,001). Los resultados obtenidos por el método no paramétrico de correlación de Spearman fueron corroborados por el método GLZ, con la salvedad de que el modelo que mejor explicó la variación de los datos de Cd en riñón fue el compuesto por la interacción de dos variables, la edad y la talla (GLZ: AIC= 80,73, p< 0,001, primer puesto del ranking). No obstante, en el segundo puesto del ranking obtenido aparece un efecto significativo de la interacción de tres variables, edad, talla y peso (GLZ: AIC= 82,63, p< 0,001). Se verificó una correlación marginalmente negativa entre los niveles de Cu y Cd (Spearman: R_{Sp}= -0,33, p= 0,05) por el método no paramétrico. Esta relación no fue encontrada mediante el método GLZ.

Condición Corporal

Al igual que lo descripto para el hígado, los índices de condición en riñón no se relacionaron con el sexo, el estado de madurez sexual de los ejemplares ni el grupo de edad al cual pertenecían los ejemplares según las pruebas no paramétricas (Mann-Whitney y Kruskal-Wallis; Tabla 4-18). No obstante, mediante la prueba GLZ el índice de condición Kn estuvo afectado por el sexo de los ejemplares (AIC= -26,10, p= 0,04, primer puesto en el ranking). Mientras que el peso del riñón se relacionó con la interacción del sexo y el estado de madurez sexual (GLZ: AIC= 391,38, p= 0,002, primer puesto en el ranking). Adicionalmente, tampoco se hallaron relaciones significativas entre los índices de condición evaluados y los parámetros biológicos por la prueba de rangos de Spearman (talla, peso y edad, R_{Sp}= -0,22 - 0,32, p> 0,05). Sin embargo, al aplicar la prueba GLZ a las variables tanto el Kn como el peso del riñón (PR) resultaron influenciados por la interacción de los tres parámetros biológicos analizados (GLZ: Kn= AIC (Edad/Peso/LT)= -75,24, p< 0,001, primer puesto del ranking y AIC (Edad/Peso/LT)= 359,69, p< 0,001, segundo

puesto del ranking). El %PG fue afectado por la interacción de la edad y el peso (GLZ: AIC (edad/peso)= 261,25, p= 0,03, primer puesto del ranking). El %IR no estuvo relacionado con los parámetros biológicos en coincidencia con la prueba no paramétrica.

Tabla 4-18: Índices de condición corporal analizados en función del sexo y el estado de madurez sexual. %IR/%PG: porcentaje del peso del rinón (o de la grasa total) en función del peso total de cada ejemplar. Kn: índice relativo de condición corporal (Le Crem, 1951).

	% IR			% PG			Kn		
	Media	DE	n	Media	DE	n	Media	DE	n
Hembras	0,41	0,15	15	28,38	9,65	14	0,99	0,19	15
I	0,44	0,17	11	28,88	10,52	10	0,99	0,16	11
M	0,35	0,03	4	27,13	8,30	4	1,00	0,27	4
Machos	0,39	0,12	24	25,23	7,55	24	0,88	0,16	24
I	0,38	0,13	19	26,11	7,15	19	0,88	0,16	19
M	0,44	0,10	5	21,89	8,96	5	0,90	0,15	5
Total	0,40	0,13	39	26,39	8,40	38	0,93	0,18	39

Mediante la prueba no paramétrica se observó una relación significativa entre el índice %PG y el Zn, aunque débil (Tabla 4-19). Lo mismo fue verificado por la prueba GLZ (GLZ: AIC= 241,49, p= 0,02, primer puesto del ranking) coincidiendo con el análisis exploratorio inicial. Además se encontró una relación negativa significativa entre el peso del riñón y la concentración de Cd y de Cu, en menor medida (Tabla 4-19), mientras que el Zn no se relacionó con el peso del riñón. Mediante la prueba GLZ, se verificó el efecto conjunto de los tres metales sobre del peso del riñón (GLZ: AIC (Log Cu/Log Cd/Log Zn)= 337,09, p< 0,001, primer puesto en el ranking), mientras que el Zn por sí sólo no se relacionó con la variable en cuestión (GLZ: AIC= 352,89, p= 0,55, puesto 14 en el ranking) en concordancia con lo observado por la prueba no paramétrica de Spearman.

El índice Kn fue el único índice de condición analizado que presentó valores significativamente diferentes en las localidades de Monte Hermoso y Necochea (Kruskal-Wallis: p= 0,02), presentando los ejemplares de Monte Hermoso los valores medios más bajos y los de Necochea los más altos (Tabla 4-20).

Tabla 4-19: Pruebas de rangos de Spearman: índices de condición en función del logaritmo de las concentraciones de Cd, Cu y Zn. R_{sp}: coeficiente de correlación de la prueba. %IR/%PG: porcentaje del peso del rinón (o de la grasa total) en función del peso total de cada ejemplar. PR: valor del peso absoluto del riñón. Kn: índice relativo de condición corporal (Le Crem, 1951). Se resaltan en negrita los valores significativos.

	n	R_{Sp}	p
%IR - Cd	39	0,04	0,80
%IR - Cu	34	-0,23	0,19
%IR - Zn	39	0,04	0,81
PR - Cd	39	0,53	**0,00**
PR - Cu	34	-0,38	**0,01**
PR - Zn	39	-0,12	0,48
%PG - Cd	38	-0,02	0,93
%PG - Cu	34	-0,17	0,33
%PG - Zn	38	-0,31	**0,05**
Kn - Cd	39	-0,04	0,83
Kn - Cu	34	-0,13	0,48
Kn - Zn	39	-0,17	0,31

Tabla 4-20: Índices de condición corporal analizados en función de la localidad de procedencia de los delfines. %IR/%PG: porcentaje del peso del rinón (o de la grasa total) en función del peso total de cada ejemplar. Kn: índice relativo de condición corporal (Le Crem, 1951). MH: Monte Hermoso, N: Necochea, C: Claromecó, BB: Bahía Blanca. Letras diferentes indican diferencias significativas $p \leq 0,05$.

Localidades	% IR			% PG			Kn		
	Media	DE	n	Media	DE	n	Media	DE	n
MH	0,41	0,09	8	24,36	2,70	8	$0,82^{b}$	0,10	8
N	0,40	0,08	12	24,93	9,88	11	$1,02^{a}$	0,23	12
C	0,38	0,16	17	27,87	9,47	17	$0,92^{a}$	0,15	17
BB	0,52	0,31	2	30,05	5,19	2	$0,89^{a}$	0,01	2

Finalmente se evaluó el efecto del varamiento sobre las medidas de los índices de condición. Se recuperaron cuatro ejemplares varados durante el muestreo. Se encontró diferencias significativas entre los ejemplares varados y enmallados (n= 35) para los tres índices de condición, Kn, %IR y %PG (Mann-Whitney: Kn p= 0,001, %IR= 0,03, %PG= 0,03). Sin embargo, los niveles de Zn no fueron afectados por la variable (Mann-Whitney: varamiento vs enmalle, p= 0,74).

Análisis según el área de procedencia de los ejemplares

En coincidencia con lo encontrado en el tejido hepático no se encontraron diferencias significativas entre las localidades analizadas para el Cd, Cu y Zn ya que las distancias de Mahalanobis (al cuadrado) fueron bajas (Tabla 4-21 y 4-22), y sus respectivos p fueron mayores de 0,05 en todos los casos. A diferencia de lo descripto para el hígado se cumplieron los supuestos de homogeneidad de varianza de la matriz de varianza-covarianza (F= -42,53, gl= 20, p> 0,99, n= 32). Sin embargo, todos los estadísticos puestos a prueba (Wilk, Pillai, Lawley-Hotelling y Roy; p≥0,06) concuerdan en no rechazar la hipótesis nula de que no existen diferencias significativas entre las localidades (Tabla 4-21, Figura 4-8).

Tabla 4-21: Concentraciones (µg g^{-1} peso fresco) de Cd, Cu y Zn según el área de procedencia de los delfines. N: Necochea, C: Claromecó, MH: Monte Hermoso. No se encontraron diferencias significativas entre las localidades analizadas.

		Localidades			
		N	C	MH	BB
Cu	Media	3,23	4,71	8,31	4,94
	Mediana	3,31	3,05	6,95	4,94
	DE	0,67	3,65	6,99	4,39
	Rango	1,64 - 3,76	1,62 - 13,38	2,08 - 20,57	1,84 - 8,04
	n	9	16	7	2
Cd	Media	5,44	4,78	5,07	15,03
	Mediana	2,20	2,87	3,28	15,03
	DE	7,82	5,79	5,34	20,97
	Rango	0,20 - 23,22	0,20 - 22,74	0,20 - 13,91	0,20 - 29,85
	n	12	17	8	2
Zn	Media	22,63	22,31	24,19	21,05
	Mediana	21,76	20,74	24,42	21,05
	DE	3,34	5,62	4,51	8,89
	Rango	17,90 - 29,33	12,17 - 34,92	19,24 - 31,31	14,76 - 27,33
	n	12	17	8	2

Tabla 4-22: Distancias de Mahaladonis al cuadrado entre las localidades analizadas. N: Necochea, C: Claromecó, MH: Monte Hermoso.

	MH	N	C
MH	0,00	2,21	1,66
N	2,21	0,00	0,10
C	1,66	0,10	0,00

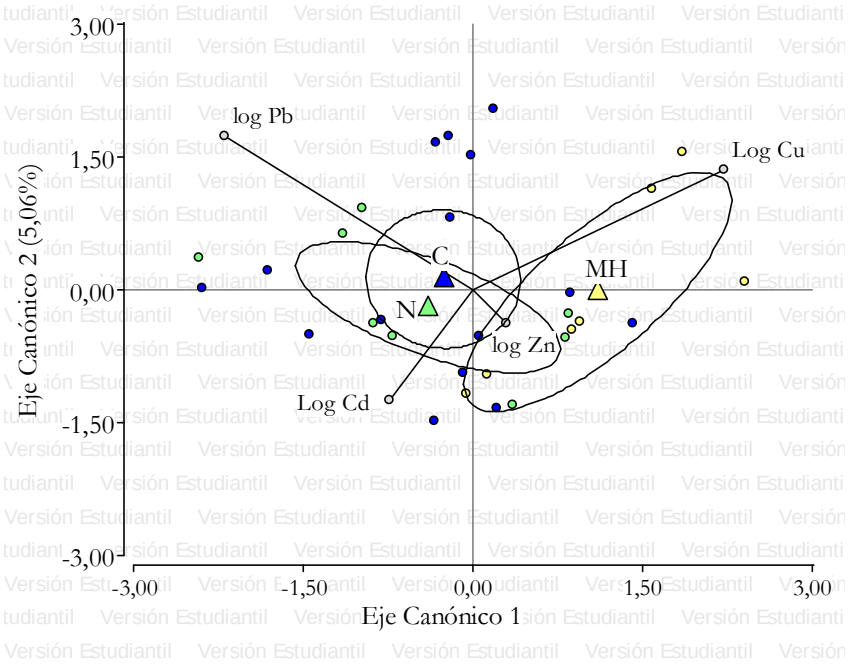


Figura 4-8: Gráfico biplot que resulta del análisis de funciones discriminantes. Los triángulos grandes respresentan los centroides de cada grupo. El eje canónico 1 (94,94%) y 2 (5,06%) explican el 100% de la varianza acumulada. No se detectaron grupos estadísticamente diferentes. Referencias: Colores: Verde: localidad de Necochea, Amarillo: Monte Hermoso, Azul: Claromecó, el area de Bahía Blanca no fue incluida. Las variables (Cd, Cu , Pb y Zn) están representadas por los vectores y la correlación con cada función discriminantes es representada por el ángulo, y la direccción indica su incremento.

En la Tabla 4-23 se resumen los niveles de Cd, Zn y Cu informados para toda el área de distribución de *P. blainvillei* a los largo del tiempo, desde 1990 hasta la actualidad. En riñón las concentraciones de Zn, Cu y Cd encontradas en el NBA por Marcovecchio y col. (1990) fueron estadísticamente mayores a las informadas para RJ y las del SBA (Student: Zn: $p_{NBA/RJ,\ NBA/SBA} < 0{,}001$, Cu: $p_{NBA/RJ} = 0{,}006$; $p_{NBA/SBA} = 0{,}01$; Cd: $p_{NBA/RJ,\ NBA/SBA} < 0{,}001$; Lailson-Brito *et al.*, 2002). Mientras que únicamente el Cd resultó

estadísticamente mayor en el SBA respecto a RJ (Student: $p_{SBA/RJ} < 0,001$, Tabla 4-23). El Zn y el Cu resultaron similares en ambas regiones del Océano Atlántico Sudoccidental.

Tabla 4-23: Concentraciones medias de metales pesados (µg g^{-1} de peso húmedo) en tejido renal de delfín franciscana a lo largo de la costa sudamericana. Letras diferentes indican diferencias significativas $p \leq 0,05$.

País	Área	Metal analizado	n	Concentración en µg g^{-1} de peso húmedo			Referencia
				Rango	Media	DE	
Brasil	Río de Janeiro	Cd	15	nd - 1,20	0,30[b]	0,32	Lailson-Brito *et al.*, 2002
		Zn	15	11,00 - 49,00	22,66	9,51	
		Cu	15	15,90 - 1,60	4,72	3,80	
		Cd	18	--	0,79	--	Seixas *et al.*, 2007 *
	Río Grande do sul	Cd	13	--	1,28	--	Seixas *et al.*, 2007 *
Uruguay	Zona oceánica	Cd	15	0,03 - 5,74	nd	nd	Foglia, 2008
Argentina	Norte de Bs. As.	Cd	2	--	9,90	3,90	Marcovecchio *et al.*, 1990
		Zn	2	--	79,40[b]	21,40	
		Cu	2	--	14,00	4,90	
	Norte de Bs. As.	Cd	18	0,24 - 6,70	--	--	Gerpe *et al.*, 2002
		Zn	18	2,11 - 15,48	--	--	
	Sur de Bs. As.	Cd	39	nd - 29,85	5,55[a]	7,34	Presente estudio
		Zn	39	12,17 - 34,91	22,73[a]	4,80	
		Cu	34	1,62 - 20,57	5,07	4,34	

* Las concentraciones en base de peso seco fueron transformadas en base de peso fresco asumiendo un contenido de humedad de 77% según Yang *et al.* (2003).

Diferencias y asociación entre tejidos

En el siguiente apartado fueron analizados los coeficientes de variación de los metales detectados y las diferencias de las concentraciones en función de cada órgano analizado (Tabla 4-24). Se observó que los valores de variación fueron muy elevados, principalmente

para el Cd en riñón. Adicionalmente se encontró diferencias significativas para cada metal según el tejido analizado. El Cd fue encontrado en mayor concentración en riñón respecto al hígado (Mann-Whitney: p= 0,01). Mientras que el Zn y Cu presentaron mayores niveles en hígado (Mann-Whitney: H vs R, Cu p= 0,04, Zn p< 0,001). No se evidenció relación alguna entre los tejidos para los metales analizados por el análisis estadístico no paramétrico, presentando coeficientes de correlación de Spearman bajos y valores de p no significativos (Spearman: R_{Sp}= -0,23 - 0,29, p> 0,09).

Tabla 4-24: Valores de coeficiente de variación para cada metal detectado según el tejido analizado. DE: desvío estándar, CV: coeficiente de variación. Letras diferentes indican diferencias significativas p≤0,05.

	Riñón			Hígado		
	Media	DE	%CV	Media	DE	%CV
Cd	5,57[a]	7,33	131,57	2,57[b]	2,42	93,92
Cu	5,07[c]	4,34	85,60	6,68[d]	6,04	90,46
Zn	22,73[c]	4,80	21,11	33,02[d]	15,17	45,95

Del análisis de correlación canónica fue posible evaluar la asociación de los metales en los órganos analizados. Para éste análisis no se tuvieron en cuenta los datos faltantes o *missing data* y se utilizaron los valores de logaritmo de las concentraciones.

El Factor 1 obtenido del análisis de correlación logró explicar un 91% de la variabilidad de los datos (Tabla 4-25). Únicamente este Factor presentó un valor de p de la prueba del lambda de Wilk significativo (λ= 0,37, F= 3,42, p=0,002). El valor de R de correlación canónica para el F1 fue 0,78. Las Tablas 4-26 y 4-27 muestran la matriz de correlación canónica y los valores de correlación entre los datos de concentración de cada metal y las variables canónicas.

Tabla 4-25: Valores propios y porcentaje de variabilidad explicado por cada factor canónico (F1 y F2).

	F1	F2
Valor propio	0,61	0,06
Variabilidad (%)	91,10	8,63
% acumulado	91,10	99,73

Del análisis de correlación canónica se desprendería la existencia de una asociación entre los tejidos analizados para el Cd, ya que como se observa en la Figura 4-9 ambas variables presentan una tendencia y ángulo similar con el F1. Asimismo el Cd, en ambos tejidos, presentó los valores más altos de correlación con la variable canónica F1, única variable que explica significativamente la variabilidad de los datos. Fue evidente también, la independencia entre estas dos variables (log Cd H/R) con el Zn en riñón y el Cu en hígado, evidenciada por un ángulo de 90° entre ellas. Tanto el Cu en riñón como el Zn en hígado fueron las variables con menor coeficiente de correlación la variable canónica 1.

Tabla 4-26: Matriz de correlación canónica. R: riñón, H: hígado.

Variables	Log Cd H	Log Cu H	log Zn H	Log Cu R	Log Cd R	log Zn R
Log Cd H	**1**	-0,08	-0,13	0,19	0,53	-0,20
Log Cu H	-0,08	**1**	0,24	0,03	-0,22	0,31
log Zn H	-0,13	0,24	**1**	-0,03	-0,11	0,19
Log Cu R	0,19	0,03	-0,03	**1**	-0,26	-0,04
Log Cd R	0,53	-0,22	-0,11	-0,26	**1**	0,21
log Zn R	-0,20	0,31	0,19	-0,04	0,21	**1**

Tabla 4-27: Correlaciones entre las variables de entrada (logaritmo de las concentraciones de Cd, Cu y Zn) y las variables canónicas (F1 y F2). R: riñón, H: hígado.

	F1	F2
Log Cd H	-0,91	-0,42
Log Cu H	0,49	-0,83
log Zn H	0,29	-0,40
Log Cu R	-0,20	-0,48
Log Cd R	-0,72	-0,29
log Zn R	0,40	-0,82

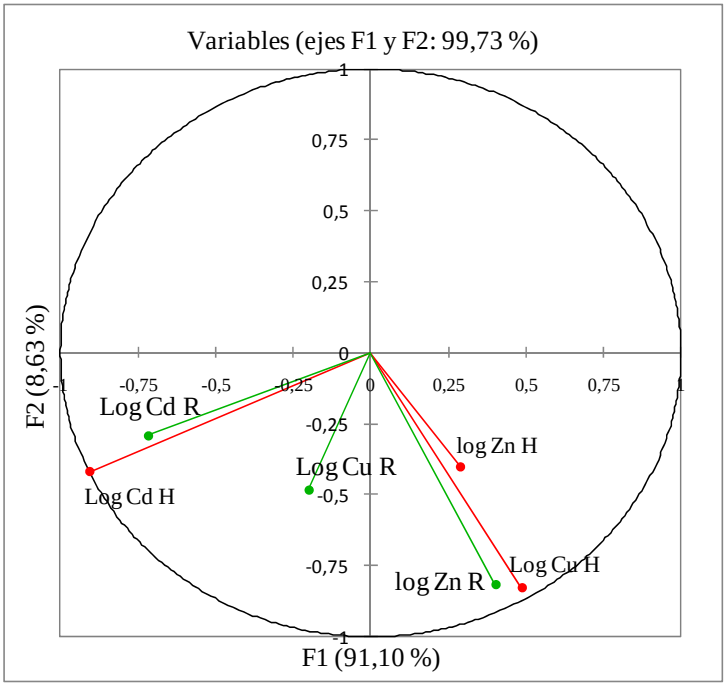


Figura 4-9: Gráfico de correlación canónica de las concentraciones de los metales pesados analizados en hígado (H) y riñón (R).

4-4 Discusión

La estimación de la edad y el estado de madurez sexual, así como también el sexo y los índices de condición aquí evaluados fueron obtenidos según métodos estandarizados con el fin de obtener información comparable con los datos aportados por la bibliografía existente. Asimismo, como fue previamente señalado por Shaughnessy en 1993, los residuos de los contaminantes ambientales son acumulados y metabolizados diferencialmente dependiendo del sexo, edad y del estado de madurez en que los organismos se encuentren, así como también dependen de factores como la condición de salud y dieta de los ejemplares (Aguilar y Borrell, 1990). De aquí se desprende la importancia de obtener información sobre la historia de vida de cada ejemplar analizado.

El valor de los resultados obtenidos se vincula con la escasa información sobre la presencia de contaminantes ambientales en el sur de la costa bonaerense, donde habita una de las poblaciones de franciscanas más austral de la distribución de la especie que sufre el impacto de la captura accidental y de la modificación del ambiente por mano del hombre. Los trabajos previos relacionados con el tema bajo estudio se limitan a aquellos que abarcan las poblaciones de Brasil (Estados de Río de Janeiro, São Paulo, Paraná y Río Grande do Sul) y el Norte de Buenos Aires (San Clemente del Tuyu y Cabo San Antonio).

Concentración de metales pesados

No se encontraron diferencias entre los tejidos hepático y renal en cuanto a los metales detectados por el método analítico utilizado. En ambos tejidos fueron tres los metales analíticamente detectados, Cd, Cu y Zn. Adicionalmente, el Cd fue el único metal encontrado en mayor concentración en el riñón, mientras que el Cu y el Zn fueron mayoritarios en el hígado. Este resultado coincide con lo publicado en la bibliografía científica, principalmente sobre ejemplares capturados accidentalmente, donde fue informada la acumulación preferencial del Cd en el tejido renal de los mamíferos marinos y puntualmente de *P. blainvillei* (Marcovecchio *et al.*, 1990; Thomson, 1990; Law, 1996; Gerpe *et al.*, 2002; Lailson-Brito *et al.*, 2002; Kunito *et al.*, 2004; Dorneles *et al.*, 2007; Seixas *et al.*, 2007; 2009). El hecho de que el Cd se acumula preferencialmente en el riñón estaría ligado a las funciones de filtración y eliminación de este órgano, así como también, a la fuerte unión que presenta el metal con las metalotioneínas presentes en el riñón (Monaci *et al.*, 1998; Das *et al.*, 2000). Estas proteínas cumplen la función de detoxificación de elementos no esenciales (tales como el Cd y el Hg) en los órganos de moluscos y mamíferos marinos (Das *et al.*, 2002; 2006).

Es importante destacar el gran porcentaje de variación de los valores de Cd (%CV= 131,57 y 93% en el riñón y el hígado respectivamente), que es un metal no esencial, con respecto a los metales esenciales estudiados aquí, el Cu y el Zn. Este hecho fue observado previamente por otros autores, quienes señalaron grandes variaciones en los niveles de los metales no esenciales en los diferentes tejidos de mamíferos marinos, debido a que reflejan principalmente los niveles de exposición ambiental y la preferencia alimenticia de los individuos (Capelli *et al.*, 2008). Por otro lado las concentraciones de los metales esenciales

son reguladas por procesos fisiológicos que mantienen la homeostasis del organismo (Capelli *et al.*, 2008; Seixas, 2008).

En relación al Pb, metal no esencial, se encontró que el 70% de sus valores de concentración fueron no detectables en ambos tejidos, lo que sugiere que ninguno de los órganos bajo estudio serían órganos blanco del Pb en la especie analizada. La información existente acerca de la presencia y niveles de Pb es muy escasa siendo el único trabajo el publicado por Kunito y colaboradores (2004), quienes estudiaron su acumulación hepática. Más tarde, en 2008 una tesis doctoral (Seixas, 2008) estudió la presencia del metal tanto en hígado como en riñón. Ambos trabajos informaron niveles de Pb menores a los aquí informados. No obstante este hecho y de acuerdo a la literatura, el Pb no es considerado nocivo para las especies que habitan en ambientes marinos, en comparación con los efectos del Cd y el Hg. Adicionalmente, se considera a la dieta la fuente principal de Pb en éstos organismos (Kennish, 1997, en Seixas, 2008).

En relación al tejido blanco del Pb, diferentes estudios han demostrado que los dientes y el tejido óseo de los mamíferos y las aves marinas son los principales tejidos de acumulación del mismo (Eisler, 1988; en Seixas, 2008; Nam *et al.*, 2005). También fue observado que en lobo marino de California *Zalophus californianus* las concentraciones de Pb en hueso fueron hasta 52 veces mayores a las informadas para músculo y grasa (Kennish, 1997, en Seixas, 2008). Este patrón de acumulación de Pb (Pb^{2+}) estaría relacionado con la interferencia de metal con el metabolismo del calcio (Ca^{+2}) en los tejidos de los mamíferos marinos (Nam *et al.*, 2005). La baja detección de este metal en los órganos analizados concuerda con el hecho de que los niveles de Pb tienden a disminuir a medida que se asciende en la trama trófica reflejando la bio-deplesión de éste (Syderman y Jarman, 1998).

En referencia al Ni, es importante resaltar que su presencia y niveles han sido muy poco estudiados hasta la fecha en mamíferos marinos. Este metal es esencial y tóxico para los humanos y otros mamíferos (Anke *et al.*, 1995). Al igual que lo encontrado por Das y colaboradores (2003) en diferentes mamíferos marinos las concentraciones de Ni encontradas en franciscana fueron bajas, es más sólo estuvo en forma detectable en el hígado de cuatro ejemplares, tres de los cuales fueron capturados en Claromecó y sólo uno en Necochea. Asimismo, únicamente dos ejemplares presentaron valores detectables en riñón, también procedentes de la localidad de Claromecó. El Ni actúa antagonísticamente con el Ca^{+2} y el Mg^{+2}, particularmente (Costa *et al.*, 2003). Sin embargo, no resulta claro aún el efecto de la toxicidad del Ni sobre los mamíferos marinos (Law, 1996). Una investigación realizada sobre la población finlandesa de la foca de anillos *Pusa hispida saimensis* reveló una clara conexión entre las crías nacidas muertas y la concentración de Ni en el aire (Hyvärinen y Sipilä, 1984). Estos autores encontraron la existencia de un gran aporte de este metal al medioambiente en esa zona particular por parte de la actividad industrial. Se sugiere que las concentraciones aquí encontradas podrían estar relacionadas con un aporte puntual de éste metal al medio.

Los niveles de Cr, Ni y Pb presentes en tejido renal y hepático, no fueron detectables con el método analítico utilizado y además no fue posible encontrar información previa para esta especie, con excepción del trabajo de Kunito y col. (2004) para delfines de Brasil. Por lo tanto, estos son los primeros resultados informados para la población de franciscanas que habita en las costas del sur de Buenos Aires. Finalmente, se concluye que estos últimos metales se acumularían en el riñón y en hígado del delfín franciscana en concentraciones que se encuentran por debajo del límite de detección del método.

Efecto de los parámetros biológicos edad y madurez sexual, sobre las concentraciones de los metales pesados

El sexo de los ejemplares no se relacionó con los tres metales hallados en el tejido hepático, mientras que sí lo hizo sobre las concentraciones de Cu y Zn en el riñón, las cuales fueron mayores en machos respecto a las hembras. Estas diferencias podrían relacionarse con la preñez y la lactancia en las hembras. Según Watanabe y colaboradores (1998), estas son rutas de excreción que resultan en una menor concentración de metales en las hembras respecto de los machos. Asimismo, las funciones de filtrado y excreción del riñón probablemente influyen sobre dicha diferencia. Sin embargo, este resultado no coincide con el patrón encontrado en estudios previos, tanto en la especie bajo estudio como en otros mamíferos marinos donde no se observó la influencia del sexo en el patrón de acumulación de los metales pesados en ambos órganos (O´Shea *et al.*, 1999; Lailson-Brito *et al.*, 2002; Gerpe *et al.*, 2002; Kunito *et al.*, 2004; Seixas *et al.*, 2007; Seixas, 2008).

Ninguno de los metales esenciales analizados en esta tesis (Zn y Cu) presentó correlación significativa con la talla, peso y edad de los ejemplares en ambos órganos (hígado y riñón), aunque presentaron una tendencia negativa. En coincidencia con los resultados obtenidos en la presente tesis, Seixas (2008) no encontró una influencia significativa de la talla/edad sobre el Cu en tejido hepático para los delfines de Brasil. Sin embargo, Kunito y col. (2004) y Gerpe y col. (2002) sí observaron una relación significativa con ambas variables, aunque para el caso de los delfines de Brasil (Kunito *et al.*, 2004) esta fue negativa, mientras que para los delfines de Argentina, la relación fue positiva (Gerpe *et al.*, 2002). En la bibliografía existen trabajos donde se informa la presencia o ausencia de la relación en cuestión; por ejemplo, Kunito y col. (2004) encontraron una relación significativa y negativa, entre el Cu

y Zn y la edad para los delfines listados *Stenella coeruleoalba*, mientras que los mismos autores en 2002, no encontraron dicha relación en la ballena minke *Balaenoptera acuturostrata*. Los autores proponen que dicha inconsistencia podría deberse tanto a diferencias en el metabolismo, como a los hábitos alimenticios de cada especie. Como se mencionó anteriormente, es conocida la influencia de la dieta sobre la acumulación de los metales en los tejidos de los mamíferos marinos. En estudios previos sobre la especie bajo estudio se encontró que los neonatos se alimentaban mayormente de crustáceos, que son ricos en Cu, mientras que los peces óseos y calamaretes (ricos en Hg, Se y Cd) fueron los principales ítem presa consumidos por los juveniles y los adultos (Di Beneditto y Siciliano, 2007; Paso-Viola *et al.*, 2010).

De acuerdo con Woshner y colaboradores (2001), la caída del Cu con la edad en los tejidos de los mamíferos marinos puede deberse a la pérdida del mismo con el tiempo debido a, por ejemplo, la dilución de los niveles con el aumento de la masa muscular con la edad, o también, por una disminución de los niveles requeridos de Cu para realizar las actividades metabólicas. Según otros investigadores (Kakuschke *et al.*, 2008b) la alta concentración de los metales en los neonatos podría deberse a la transferencia de los mismos a través de la placenta y la leche materna durante la lactancia.

El único metal no esencial que se pudo analizar estadísticamente en esta tesis, el Cd, presentó en patrón de comportamiento muy diferente. Éste fue influenciado de forma positiva por la edad, talla y peso de los ejemplares tanto en hígado como en riñón. Resultados similares fueron informados para los delfines que habitan en las aguas costeras de Brasil (Lailson-Brito *et al.*, 2002; Kunito *et al.*, 2004; Seixas, 2008), Uruguay (Foglia, 2008) y Argentina (Gerpe *et al.*, 2002). No sólo se encontró esta relación entre los niveles de Cd y la talla/edad en franciscana, sino que también fue observada en diferentes especies de mamíferos marinos tanto en hígado como en riñón (Caurant *et al.*, 1994; Monaci *et al.*,

1998; O'Shea, 1999; Monteiro-Neto *et al.*, 2003). A medida que los delfines se desarrollan y sustituyen el alimento materno por presas sólidas se observa un cambio significativo en la concentración de Cd en el hígado y el riñón. Esto se vio reflejado en la diferencia en los niveles de Cd entre el grupo de edad 1 y los otros dos grupos. El primero de los grupos incluyó seis individuos neonatos, de los cuales cuatro contenían sólo leche en sus estómagos (Paso-Viola *et al.*, 2009) y no se encontraron valores detectables de Cd en ambos órganos. Finalmente, es posible concluir, que únicamente el Cd se acumula en ambos tejidos en los defines franciscana procedentes de Buenos Aires, mientras que existe una tendencia al decremento de Cu en ambos tejidos.

El estado de madurez sexual de los ejemplares influyó, únicamente, sobre la acumulación del Cd en el hígado, mientras que no ocurrió lo mismo en riñón. En riñón se observó la influencia tanto del sexo como del estado de madurez sexual sobre las concentraciones de Cu y Zn. Dentro del grupo de los inmaduros, los delfines neonatos fueron los que presentaron mayor concentración de los metales, este hecho refuerza la hipótesis ya confirmada en otras especies de mamíferos marinos y anteriormente discutida, sobre un mayor requerimiento de estos metales esenciales por individuos neonatos y su asimilación por los individuos durante la gestación (Law *et al.,* 1992; Wood y Van-Vleet, 1996).

La ausencia de diferencias significativas entre los grupos de madurez sexual para los metales esenciales en hígado, en discrepancia con lo informado en estudios previos, podría deberse a que la gran variación intraespecífica de las concentraciones (Aguilar *et al.,* 1999) enmascara las posibles diferencias presentes en este trabajo.

Efecto de la condición corporal

La concentración total de los metales pesados por sí sola es insuficiente para poder estimar tanto el estado de salud de los animales o el efecto de un determinado tóxico. Sin embargo, es importante y necesaria ya que puede proveer un punto de partida para determinar si las cargas de los metales en los ejemplares son "normales" o "anormales" (Wagemann y Muir, 1984). Para establecer la toxicidad de estos metales en mamíferos marinos se requiere de información adicional, como por ejemplo las influencias antagonistas y sinérgicas producidas por otros metales así como también la especiación de los metales en los tejidos.

Posibles efectos de niveles subletales de los metales pesados a nivel de las funciones neurológicas e inmunológicas y sobre el comportamiento de los mamíferos marinos han sido muy poco estudiados, y la implicancia sobre la salud de los animales es actualmente poco conocida (Kauschje y Prange, 2007). Uno de los mecanismos propuestos por el cual los metales pueden alterar el estado de salud es a través de la modulación de la homeostasis. Los metales pueden cambiar la respuesta por medios directos e indirectos, los cuales incluyen cambios en la proliferación celular, fagocitosis, expresión proteínica y otros mecanismos celulares. Algunos efectos resultantes incluyen inmunosupresión, procesos inflamatorios crónicos y agudos que conducen a la hipersensibilidad y enfermedades autoinmunes. En las múltiples influencias de los metales sobre el sistema inmune subyace la importancia del estudio de los metales pesados como potenciales factores de *stress* fisiológico de los mamíferos marinos (Kauschje y Prange, 2007).

Es posible encontrar algunos ejemplos de los efectos de los metales pesados sobre los mamíferos marinos. Entre ellos son destacables el estudio realizado por Shlosberg y col. (1997) en el que describieron un daño progresivo del hígado y la posterior muerte de un

delfín nariz de botella *Tursiops truncatus* como resultado de la intoxicación por plomo. Más tarde, Bennett y colaboradores (2001) estudiaron marsopas de puerto *Phocoena phocoena* que habían muerto debido a un trauma físico y a enfermedades infecciosas encontrando que aquellos ejemplares que murieron a causa de la enfermedad presentaron valores medios de Hg, Se, Zn y proporción de Hg:Se significativamente mayores a los de las marsopas que murieron a causa de trauma. Pillet y col. (2000) encontraron un efecto sexo dependiente de Zn sobre la actividad fagocítica en la beluga *Balaenoptera melas*. En otro estudio realizado sobre neonatos de foca de puerto *Phoca vitulina*, Kakuschke y col. (2008a) observaron que la proliferación de linfocitos era especialmente inhibida por Be, Pb, Cd y Hg, que la susceptibilidad a los efectos del tóxico disminuía con el aumento de la edad de los neonatos.

En un nuevo estudio, Das y col. (2004) demostraron que el peso del hígado puede ser influenciado por el estado de condición de los ejemplares, manteniéndose sin cambio en aquellos individuos con bueno o moderadamente buen estado de condición general. El peso relativo del hígado (peso de hígado/peso del ejemplar) o índice hepático aumenta significativamente con el deterioro de la condición corporal como resultado de la pérdida de biomasa del ejemplar. Esta pérdida podría deberse a que durante el proceso de inanición, los lípidos de la grasa y las proteínas musculares son preferentemente metabolizadas (Markussen, 1995). También observaron que aquellos ejemplares que fueron capturados accidentalmente presentaron mejor estado nutricional que los delfines varados. En el trabajo las medidas de referencia de un buen estado nutricional de los organismos fueron la presencia de una capa de grasa o *blubber* más gruesa, menor índice hepático y mayor índice graso. El mismo patrón fue observado por Negri (2010) para el delfín franciscana, quien encontró que los ejemplares varados presentaron menor valor del índice graso respecto a los ejemplares capturados accidentalmente y en la presente investigación.

Aquí se evidenció el efecto del varamiento sobre los índices de condición, encontrándose que los valores de Kn y %PG fueron significativamente menores en ejemplares varados respecto de los enmallados, mientras que el %IR fue mayor en los primeros. Sin embargo, no se observó un efecto sobre los niveles de Zn, probablemente debido al bajo número de animales varados estudiados.

Nuevamente Das y col. (2004), observaron una relación entre la concentración hepática y renal de Zn con la condición corporal de los ejemplares, encontrando un incremento significativo de Zn con el deterioro de la condición. Mientras que el Cu, Cd y Hg, no mostraron variación según los diferentes estados de condición corporal.

Un patrón similar fue observado en el presente trabajo, donde se encontró un efecto significativo, aunque débil, entre la concentración de Zn y el índice graso, lo que estaría demostrando que los niveles de Zn informados podrían tener un incipiente efecto sobre el estado de condición de los ejemplares. Sin embargo, el estado general de los individuos fue bueno o moderadamente bueno, ya que no se observó un cambio significativo en la masa del hígado y riñón (%IR y %IH), evidenciado por la ausencia de relación con la talla y edad de los ejemplares en ambos tejidos, por los dos métodos estadísticos aquí empleados.

Por otro lado, los machos maduros presentaron un estado de condición corporal levemente menor que las hembras, hecho que fue reflejado en el mayor valor de los índices hepático y renal y menor valor de índice graso, no obstante tal diferencia no fue significativa. Este hecho podría estar ligado a que los ejemplares fueron muestreados en su mayoría durante la época reproductiva de la especie y podrían haber estado invirtiendo sus energías en la reproducción, reflejando la capacidad de los ejemplares en buen estado de salud para movilizar la grasa del *blubber* y utilizarla como fuente de energía (Das *et al.*, 2004).

Tal tendencia no fue corroborada para las hembras posiblemente debido al bajo número de hembras maduras muestreado.

Finalmente, se sugiere que los niveles de Zn en ambos tejidos podrían ser utilizados, en relación con los índices hepáticos, renales y de condición como un indicador del estado de condición. Las concentraciones de Zn aquí informadas podrían considerarse como "*normales*" para la especie bajo estudio; no obstante habría que poner especial atención a los cambios de éstas en el futuro, ya que como se expuesto anteriormente hay evidencia de un efecto sobre la condición de los ejemplares y el peso de los órganos analizados. Es importante continuar investigando la influencia de este metal, ya que a pesar de ser esencial, sus niveles altos pueden influenciar críticamente el sistema inmune de los mamíferos (Rink y Gabriel, 2001; Salgueiro *et al.*, 2000).

Análisis según el área de procedencia de los ejemplares

Las concentraciones de Zn, Cu y Cd encontradas en el norte de Buenos Aires por Marcovecchio y colaboradores (1990) fueron estadísticamente mayores a las informadas para Río de Janeiro y las del sur de Buenos Aires. Mientras que únicamente el Cd resultó estadísticamente mayor entre el sur de Buenos Aires y el Norte de Brasil, Río de Janeiro, siendo el Zn y en Cu similares en ambas regiones del atlántico sudoccidental (Kunito *et al.*, 2004; Lailson–Brito *et al.*, 2002; Seixas *et al.*, 2007; Carvalho *et al.*, 2008; Seixas *et al.*, 2009).

A partir de los análisis no paramétricos y del análisis de discriminantes se verificó la escasa diferencia entre las localidades (Necochea, Claromecó y Monte Hermoso) para las

concentraciones de Cd, Cu y Zn en ambos tejidos. Fue posible reconocer (Figura 4-6) que Necochea y Claromecó serían más semejantes entre sí y diferentes en relación a los niveles de los metales de Monte Hermoso. Al analizar las diferencias entre las localidades para el Cd en hígado, se observó que los ejemplares de más de 1 año y hasta 4 años de edad, las concentraciones entre las localidades de Necochea y Claromecó fueron significativamente diferentes, siendo la concentración media de Cd en Claromecó mayor que la de Necochea. Esta diferencia estría muy probablemente relacionada con el ingreso de Cd a través de la dieta principalmente del calamarete, que es un importante ítem presa de la especie en el área de estudio (Rodríguez *et al.*, 2002; Paso Viola *et al.*, 2010). Además que el Cd y el Zn no se diferenciaron estadísticamente entre los grupos de edad 2 y 3 según las localidades. Sin embargo, el Cu presentó diferencias significativas entre Claromecó y Monte Hermoso para los ejemplares de más 4 años de edad, siendo la concentración de Monte Hermoso mayor a la de Claromecó. Según lo descripto en la discusión sobre la condición corporal, esta diferencia podría estar relacionada con el estado de condición de los ejemplares y la dieta de los mismos.

A partir de los resultados expuestos se desprende que los delfines del sur de la provincia de Buenos Aires presentaron bajos niveles de metales pesados en sus tejidos en comparación con las restantes localidades estudiadas, siendo los niveles aquí informados semejantes de los encontrados en las franciscanas de Río de Janeiro, Brasil. Es destacable que en este estudio realizado en la costa sur bonaerense los niveles encontrados resultaron menores a los determinados en el norte de la provincia. Esto podría ser consecuencia de un mayor impacto sobre la zona debido a la cercanía a centros urbanos (la Ciudad de Mar del Plata y Bahía Samborombón), a la desembocadura del Río de La Plata, así como también a las características geográficas asociadas a las bahías. Si bien los especímenes estudiados presentaron bajos niveles de metales pesados en relación a las poblaciones de otras áreas

geográficas, este trabajo en conjunto con investigaciones precedentes indica un estado crónico de contaminación. Entre los efectos que estos elementos pueden producir a largo plazo, en uno de los principales órganos de detoxificación, se pueden enumerar la alteración de la tasa en que los elementos tóxicos son metabolizados y excretados (Aguilar *et al.*, 1999). Por esta razón se propone comenzar estudios de histopatología sobre aquellos tejidos más afectados a fin de evaluar posibles efectos subletales sobre los tejidos.

Según nuestros resultados, el riñón sería el órgano acumulador de Cd, mientras que el hígado acumula preferentemente Zn y Cu. También se sugiere que los metales podrían tener diferentes roles en ambos tejidos, resultado evidenciado a partir del análisis de correlación canónica, expresado en la independencia del Cd con el Zn y Cu, es decir entre el metal no esencial versus los esenciales.

CAPÍTULO 5

Metales pesados en tejido epitelial y muscular

5-1 Introducción

En las últimas décadas un gran número de trabajos científicos han abordado el estudio de los contaminantes, como por ejemplo, los metales traza en los mamíferos marinos y en especial en diversas especies de delfines costeros. En esencia se ha informado la presencia de diversos metales traza en el hígado y en el riñón (Gerpe *et al.*, 2002, Das *et al.*, 2002). Sin embargo, los estudios realizados sobre piel y músculo no han sido muy frecuentes en cetáceos hasta la fecha (Fossi y Marsili, 1997; Bryan *et al.*, 2007; Kunito *et al.*, 2002; Stavros *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2002). Adicionalmente, en algunos de estos trabajos las muestras fueron obtenidas de animales varados en las playas (Wagemann *et al.*, 1996; Watanabe *et al.*, 1996; Frodello y Marchand, 2001; Carvalho *et al.*, 2002; Kunito *et al.*, 2002; Fossi *et al.*, 2004) y las concentraciones de metales traza obtenidas pueden no ser representativas de los valores que exhibe la población. La degradación a la que se ven sometidas estas muestras mientras el animal está en varado en la playa, dificulta la evaluación del impacto adverso del metal sobre la salud del ejemplar (Das *et al.*, 2003).

En recientes estudios realizados sobre muestras de piel de *Stenella coeruleoalba* y *Balaenoptera acutorostrata*, se ha propuesto que la presencia de metales pesados podría ser utilizada para el monitoreo de la acumulación de estos contaminantes en los órganos internos (Monaci *et al.*, 1998; Kunito *et al.*, 2002). Aún más, se sugirió que la biopsia de piel podría ser implementada con una herramienta no letal para el estudio de riesgo ecotoxicológico en mamíferos marinos (Fossi y Marsili, 1997; Farro *et al.*, 2008; Querouil *et al.*, 2010).

Asimismo, la información sobre los niveles de metales en músculo es aún más escasa que la existente en piel (Marcovecchio *et al.,* 1994; Carvalho *et al.*, 2002; Carvalho *et al.*, 2008). En particular, la información disponible sobre los niveles y presencia de metales pesados en tejido esquelético muscular en *P. blainvillei*; hasta la actualidad se encuentran disponibles en la bibliografía únicamente dos trabajos. El primero de ellos fue publicado en 1994 por Marcovecchio y colaboradores, basándose en el estudió de la presencia de Zn, Cu, Cd y Hg en delfines recuperados de las costas de Mar del Plata. El segundo trabajo, más reciente, data del año 2008 y fue publicado por Carvalho y col. quienes analizaron la distribución de Zn, Cd y Hg en tejido muscular y hepático de defines procedentes de Río de Janeiro.

El objetivo de este Capítulo fue determinar la presencia y concentración de metales traza (Cd, Cu, Pb, Zn, Cr y Ni) en piel y músculo del delfín franciscana de las costas del sur de la provincia de Buenos Aires y evaluar la influencia de los parámetros biológicos (talla, peso, edad, madurez sexual), ecológicos (área de procedencia) y la condición corporal sobre su asimilación.

5-2 Materiales y Métodos

Se analizaron muestras de tejido muscular (n=36) y epitelial (n=33). Adicionalmente, de cada una de las muestras de piel se extrajo la capa córnea superficial con bisturí de acero inoxidable. Los procedimientos para la toma de las muestras y la metodología analítica utilizados fueron los mismos descriptos en detalle en el Capítulo 4. El método para la estimación de los límites de detección del equipo utilizado, el porcentaje de recuperación de los metales analizados (Tabla 5-1) y la forma en que se trataron los datos desde el punto de vista estadístico, también coinciden con los descriptos en el Capítulo 4.

El equipo utilizado para la medición de los metales pesados (Pb, Cd, Cu, Cr, Ni y Zn) en las muestras de piel y músculo fue un espectrofotómetro de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES) modelo *Perkin-Elmer Optima 2100 DV* (Figura 5-1). Las condiciones de lecturas de cada metal fueron elegidas según el manual del equipo.

El procedimiento de calibración de las curvas es realizado automáticamente por el ICP-OES a partir de la entrada de los valores de peso de cada muestra analizada y de las concentraciones de los estándares internos.

Figura 5-1: Espectrofotómetro de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES) modelo *Perkin-Elmer optima 2100 DV*.

Tabla 5-1: Límite de detección del método (µg g^{-1}), del instrumento (µg ml^{-1}) y porcentaje de recuperación de cada metal analizado por Espectrofotometría de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES).

Metales	LDM	LDI	%RE
Cu	1,63	0,0001	100,06
Zn	0,26	0,0000	93,56
Ni	0,21	0,0001	73,12
Cr	1,03	0,0001	80,95
Cd	1,90	0,0009	113,17
Pb	5,34	0,0006	97,80

5-3 Resultados

Tejido Epitelial

Concentración de metales pesados y análisis exploratorio de los datos

En la Tabla 5-2 se resumen los valores medios de los parámetros biológicos (sexo y el estado de madurez sexual) de los ejemplares analizados en este estudio.

Tabla 5-2: Parámetros biológicos de los delfines franciscana estudiados en este apartado.
I: inmaduros, M: maduros.

	Talla (cm)			Peso (kg)			Edad (años)		
	Media	DE	n	Media	DE	n	Media	DE	n
Hembras	121,21	22,21	14	24,97	10,81	14	2,71	2,23	14
I	113,22	17,21	11	21,14	6,69	11	2,00	1,67	11
M	150,50	9,34	3	39,02	12,59	3	5,33	2,31	3
Machos	115,17	15,75	19	19,41	6,44	19	3,33	3,11	18
I	105,99	13,78	11	16,64	5,36	11	1,60	1,35	10
M	127,79	7,26	8	23,23	6,07	8	5,50	3,38	8

El Zn presentó menos del 40% de sus valores de concentración no detectable por el método analítico utilizado, mientras que el Ni presentó un 48% de sus valores no detectables. Debido a la gran diferencia entre este porcentaje de concentraciones no detectable de Ni con el observado en hígado y riñón (más de 90%) se decidió incluir a este metal en los análisis estadísticos. El 100% de los valores de concentración de Cd y Cr y el 99% de los de Pb resultaron no detectables, de mientras que el Cu presentó un 91% de sus valores de concentración no detectables. La Tabla 5-5 resume los niveles de Zn y Ni en la piel del delfín franciscana.

Tabla 5-3: Concentraciones (μg g^{-1} peso fresco) de Zn y Ni en piel del delfín franciscana. I: inmaduros, M: maduros.

	Zn				Ni			
	Media	Mediana	DE	n	Media	Mediana	DE	n
Hembras	115,29	112,63	48,07	14	0,31	0,11	0,48	10
I	115,03	112,15	53,42	11	0,17	0,11	0,09	8
M	116,23	117,6	27,33	3	0,88	0,88	1,09	2
Machos	85,11	77,63	35,43	19	0,75	0,22	1,05	11
I	84,37	77,63	38,45	11	0,55	0,16	0,80	4
M	86,13	78,75	33,35	8	0,86	0,25	1,21	7
Total	97,91	88,24	43,29	33,00	0,54	0,16	0,84	21,00

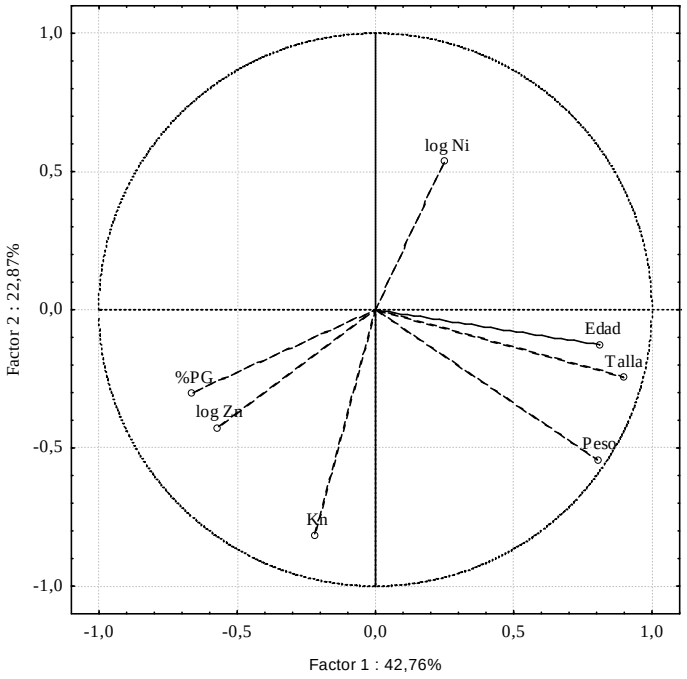


Figura 5-2: Gráfico de los autovectores de las variables originales en función de los factores de componentes principales en piel. Índices de condición analizados: Kn: índice relativo de condición corporal; %PG: índice graso. Parámetros biológicos: peso, talla y edad.

Tabla 5-4: Autovalores de la matriz de correlación y la estadística asociada. Var.: Varianza de los datos.

	Autovalor	% de var. total	% de var. acumulada
1	2,99	42,76	42,76
2	1,60	22,87	65,63
3	0,94	13,50	79,13
4	0,64	9,19	88,31
5	0,52	7,37	95,68
6	0,30	4,21	99,89
7	0,01	0,11	100,00

Del análisis de componentes principales (ACP) se obtuvo que los primeros 2 Factores resultantes de las combinación lineal de las variables originales explicaron un 65,63% de la varianza de los datos (Tabla 5-4). El Factor 1 representó a las variables relacionadas con el crecimiento de los ejemplares (edad, talla, peso), mientras que el Factor 2 estaría relacionado con la condición corporal (porcentaje del peso de la grasa) (Tabla 5-5, Figura 5-2).

Tabla 5-5: Autovectores de la matriz de correlación. %PG: porcentaje del peso de la grasa total en función del peso total de cada ejemplar. Kn: índice relativo de condición corporal (Le Crem, 1951).

	Factor 1	Factor 2	Factor 3
Edad	0,47	-0,10	-0,01
Talla	0,52	-0,19	0,14
Peso	0,46	-0,43	0,07
%PG	-0,39	-0,24	0,56
Kn	-0,13	-0,64	0,27
Log Zn	-0,33	-0,34	-0,12
Log Ni	0,14	0,42	0,76

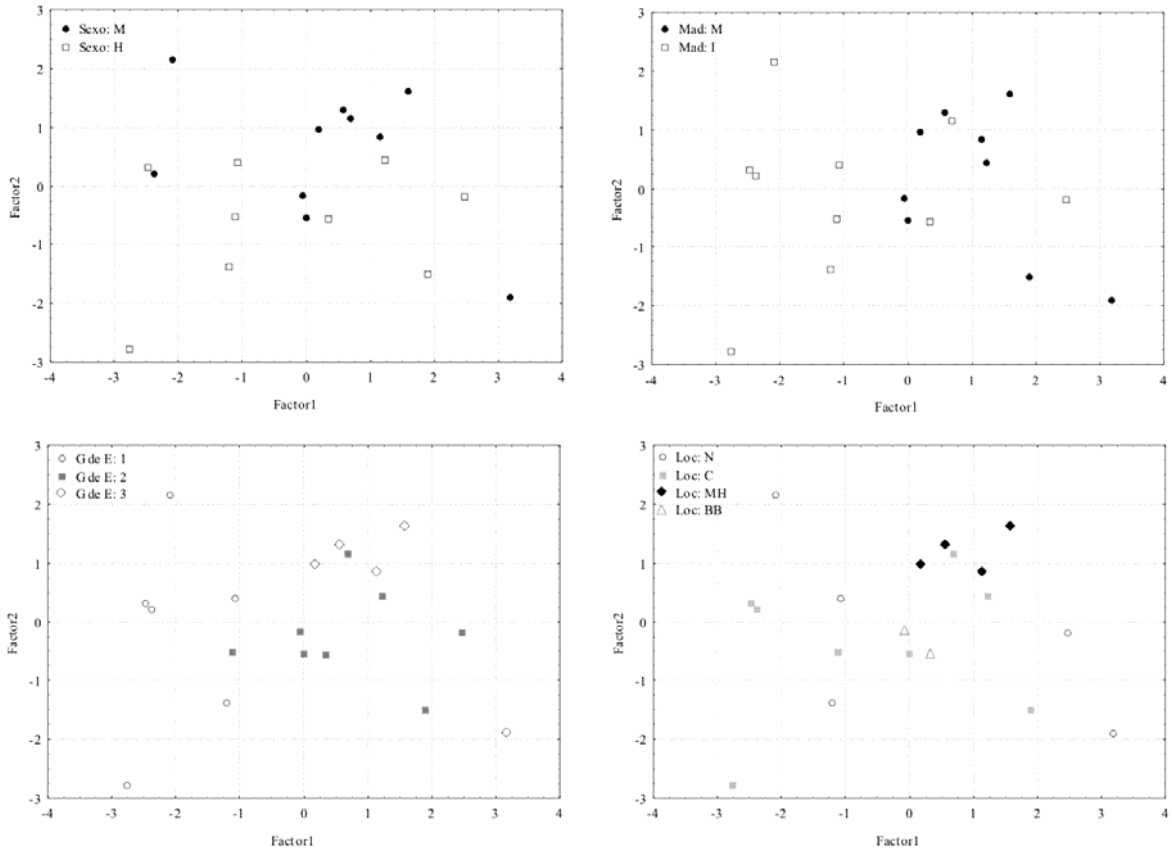


Figura 5-3: Gráficos de los Factores 1 y 2 en función de las variables categóricas (sexo, estado de madurez sexual (Mad), localidad (Loc) y grupo de edad (G de E). M: maduros, I: inmaduros, N: Necochea, C: Claromecó, MH: Monte Hermoso; BB: Bahía Blanca.

En la Figura 5-3 puede apreciarse que únicamente el estado madurez sexual y el área de estudio parecerían tener un efecto sobre los factores obtenidos del ACP, mientras que el sexo y los grupos de edad no muestran ningún patrón específico. Estas tendencias fueron verificadas mediante el uso de pruebas estadísticas complementarias cuyos resultados se detallan a continuación.

Efecto de los parámetros biológicos edad y madurez sexual, sobre las concentraciones de los metales pesados

Se verificó que las concentraciones de Ni en piel no resultaron influenciadas por sexo y el estado de madurez sexual de los ejemplares (Mann-Whitney: Sexo p= 0,26; Madurez p= 0,13; GLZ: p> 0,05). Por el contrario, el Zn fue afectado significativamente por el sexo de los ejemplares (GLZ: AIC= -13,15, p= 0,04). Sin embargo, este hecho no fue verificado por el análisis ANOVA de dos factores, al no encontrarse diferencias significativas entre los factores analizados (ANOVA: Madurez F= 0,16, p= 0,69; Sexo F= 3,41 p= 0,07; Sexo*Madurez F= 0,01, p= 0,92).

Al estudiar el efecto de la edad sobre las concentraciones de Ni y Zn, una vez más, se encontró que únicamente las concentraciones de Zn estuvieron relacionadas con esta variable, hecho que fue verificado por el GLZ y por análisis estadístico paramétrico convencional (ANOVA de un factor, prueba *post-hoc* de Tukey ANOVA F= 3,99 p= 0,03, Tabla 5-6). El Zn resultó estadísticamente mayor en el primero de los tres grupos de edad analizados (>0 - ≤1), mientras que los grupos 2 y 3 no se diferenciaron entre sí. Esta tendencia pudo ser confirmada por los análisis de regresión y correlación entre la edad de los ejemplares y el logaritmo de Zn. No obstante, la relación con la talla presentó una tendencia negativa no significativa (Figura 5-4).

Se observó un efecto no significativo de la edad (y de los grupos de edad), la talla y el peso sobre el Ni mediante los tres análisis aplicados (Kruskal-Wallis: p> 0,16; GLZ: p> 0,05; Spearman: Edad: R_{sp}= 0,34, p= 0,15, Talla: R_{sp}= 0,24, p= 0,31, Peso: R_{sp}= 0,05, p= 0,85).

Tabla 5-6: Concentraciones (µg g^{-1} peso fresco) de Zn y Ni en la piel del delfín franciscana según el grupo de edad al que corresponden. Letras diferentes indican diferencias significativas.

Grupo de edad	Zn				Ni			
	Media	Mediana	DE	n	Media	Mediana	DE	n
>0; ≤1	118,39[a]	111,58	42,64	14	0,18	0,14	0,09	8
≥2; ≤4	86,70[b]	76,39	43,29	12	0,52	0,11	0,73	8
≥5, 13	76,18[b]	76,61	28,93	7	1,14	0,29	1,37	5
Total	97,91	88,24	43,29	33	0,54	0,16	0,84	21

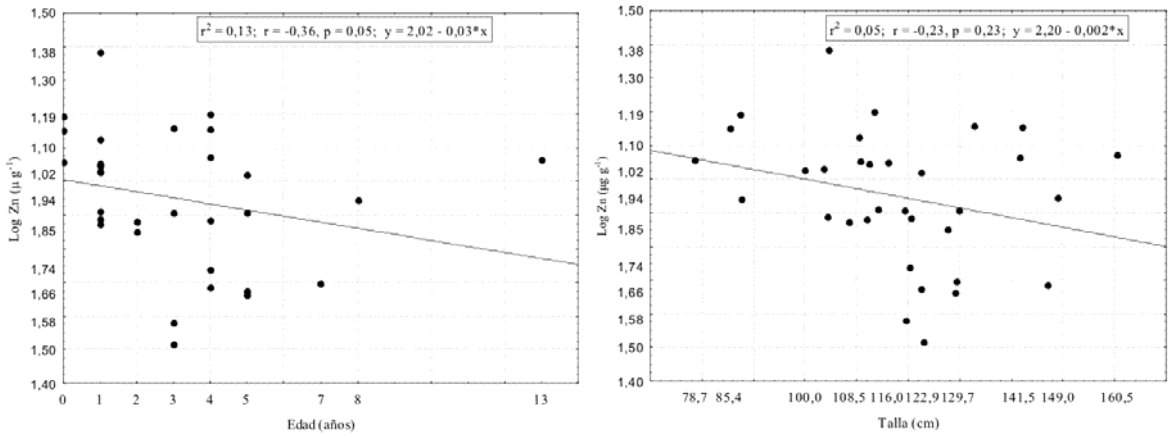


Figura 5-4: Relación entre la edad y talla de los ejemplares con el logaritmo de la concentración de Zn (µg g^{-1} peso fresco).

Condición Corporal

Ninguno de los índices de condición, Kn y %PG, presentaron relaciones significativas con el sexo o el estado de madurez sexual de los ejemplares. Este resultado fue verificado por los análisis estadísticos paramétricos (ANOVA: Kn vs madurez F= 3,93 p= 0,06; Kn vs sexo F= 1,43 p= 0,24), no paramétricos (Mann-Whitney: %PG vs madurez p= 0,43; %PG vs sexo p= 0,22) y por el análisis GLZ (GLZ: p> 0,05). No obstante, los machos sexualmente maduros presentaron una condición corporal más pobre con respecto a las hembras y a los machos inmaduros, lo cual se reflejó en sus menores valores de %PG y Kn (Tabla 5-7). Por otro lado, el índice Kn fue afectado por la interacción de la talla y el peso

(GLZ: Kn AIC=-48,83, p< 0,001) hecho que fue demostrado mediante al análisis de regresión múltiple (r_{mult}= 0,91, r^2_{mult}= 0,81, F (2, 27)= 66,38, p≤ 0,001). El %PG no se relacionó significativamente con los parámetros biológicos evaluados (Spearman: Edad: R_{sp}= -0,23, p= 0,21, Talla: R_{sp}= -0,14, p= 0,25, Peso: R_{sp}= 0,11, p= 0, 54) ni con los logaritmo de las concentraciones de Zn y Ni (Spearman: Log Zn: R_{sp}= 0,14, p= 0,43, Log Ni: R_{sp}= -0,04, p= 0,86).

Mediante el análisis exploratorio de componentes principales fue posible observar una asociación débil entre el índice %PG y la concentración de Zn, y un contraste entre el índice Kn y la concentración de Ni. Sin embargo, estas asociaciones no fueron corroboradas estadísticamente por el análisis GLZ (GLZ: p> 0,05). No obstante, la relación negativa entre el Kn y el Ni fue verificada mediante la prueba no paramétrica de correlación (Spearman: Log Ni vs Kn: R_{sp}= -0,50, p= 0,03).

Tabla 5-7: Índices de condición corporal analizados en función del sexo y el estado de madurez sexual. %PG: porcentaje del peso de la grasa total en función del peso total de cada ejemplar. Kn: índice relativo de condición corporal (Le Crem, 1951). No se encontraron diferencias significativas entre sexos y grupos de madurez.

	%PG			Kn		
	Media	DE	n	Media	DE	n
Hembras	28,55	10,02	13	1,04	0,19	14
I	28,91	10,51	10	1,05	0,16	11
M	27,38	10,15	3	1,01	0,32	3
Machos	24,85	8,36	19	0,91	0,18	19
I	25,35	9,03	11	0,94	0,21	11
M	24,16	7,91	8	0,87	0,12	8
Total	26,36	9,11	32	0,97	0,19	33

Análisis según el área de procedencia de los ejemplares

La homogeneidad de varianza de la matriz de varianza-covarianza resultó significativa (F= -42,53, gl= 20, p> 0,99, n= 32). Las diferencias de las concentraciones de Ni y Zn en función de las tres localidades y resultaron no significativas (λ_{Wilk}= 0,64, F (4, 30)= 1,88, p< 0,14). Por lo que no fue posible rechazar la hipótesis nula de que no existen diferencias significativas entre las localidades (Tabla 5-8, Figura 5-5). En coincidencia con lo encontrado en el tejido hepático y renal, no se hallaron diferencias significativas entre las localidades analizadas para el Ni y Zn ya que las distancias cuadradas de Mahalanobis resultaron bajas y no significativas en todos los casos (p>0,05) (Tabla 5-9).

Tabla 5-8: Concentraciones (µg g^{-1} peso fresco) de Zn y Ni según el área de procedencia de los delfines. N: Necochea, C: Claromecó, MH: Monte Hermoso, BB: Bahía Blanca. No se encontraron diferencias significativas entre las localidades analizadas.

Localidades	Zn				Ni			
	Media	Mediana	DE	n	Media	Mediana	DE	n
N	102,69	109,28	26,02	12	0,18	0,11	0,11	6
C	107,90	100,6	57,28	14	0,48	0,11	0,69	9
MH	67,31	54,78	24,95	5	1,39	1,07	1,43	4
BB	75,88	75,88	6,86	2	0,18	0,18	0,10	2
Total	97,91	88,24	43,29	33	0,54	0,16	0,84	21

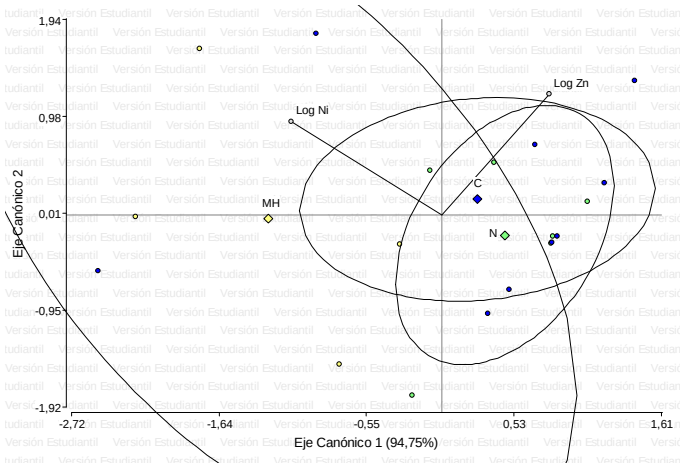


Figura 5-5: Análisis de funciones discriminantes. Los rombos respresentan los centroides de cada grupo. Referencias: Verde: Necochea, Amarillo: Monte Hermoso y Azul: Claromecó. Las variables (Ni y Zn) estan representadas por los vectores, la correlación con cada función discriminantes es representada por el ángulo y la direccción indica su incremento.

Sin embargo, es posible observar tanto en la Figura 5-5 como en la Tabla 5-10 que la localidad de MH se diferencia levemente de las localidades de N y C en relación a ambos metales, siendo la concentración de de Ni mayor en MH y la de Zn menor, respecto a las otras localidades.

Tabla 5-9: Distancias de Mahaladonis al cuadrado entre las localidades analizadas.

	N	C	MH
N	0,000	0,169	3,033
C	0,169	0,000	2,381
MH	3,033	2,381	0,000

Tabla 5-10: Prueba de Hotelling con nivel de significancia corregido por la prueba de Bonferroni α=0,05.

Localidad	Log Zn	Log Ni	n		
C	2,05	0,36	1	A	B
N	2,02	0,19	7	A	
MH	1,82	0,89	11		B

Nota: letras distintas indican diferencias significativas $p \leq 0,05$.

Tejido Muscular

Concentración de metales pesados y análisis exploratorio de los datos

La Tabla 5-11 resume los valores de los parámetros biológicos de los ejemplares analizados en este apartado según el sexo y el estado de madurez sexual.

Los metales detectados en el tejido muscular, al igual que sus concentraciones, presentaron el mismo patrón y las mismas tendencias que los encontrados en la piel. Una vez más, el Zn fue el metal pesado mayoritario, presentando todo sus valores de concentración por encima del LDM. Por su parte, el Ni presentó un 48,6% de sus valores no detectables por el método analítico utilizado y fue el segundo metal mayoritario (Tabla 5-12). El Cd, Cr y Pb no presentaron valores detectables, mientras que el Cu presentó el 77% de sus valores de concentración por debajo de LDM. En función de estos resultados sólo fueron analizados estadísticamente el Zn y el Ni en el tejido muscular.

Tabla 5-11: Parámetros biológicos de los delfines franciscana estudiados en este apartado.
I: inmaduros, M: maduros.

	Talla (cm)			Peso (kg)			Edad (años)		
	Media	DE	n	Media	DE	n	Media	DE	n
Hembras	125,19	23,10	15	25,70	10,57	14	2,87	2,23	15
I	116,03	19,58	11	22,06	6,77	11	2,00	1,67	11
M	150,38	7,63	4	39,02	12,59	3	5,25	1,89	4
Machos	111,96	16,35	21	18,34	6,51	21	2,71	2,99	21
I	104,79	13,04	15	16,04	4,88	15	1,47	1,19	15
M	129,88	7,23	6	24,07	6,90	6	5,83	3,92	6

Tabla 5-12: Concentraciones (µg g^{-1} peso fresco) de Zn y Ni en el tejido muscular esquelético del delfín franciscana. I: inmaduros, M: maduros.

	Zn				Ni			
	Media	Mediana	DE	n	Media	Mediana	DE	n
Hembras	11,60	11,10	3,25	14	0,69	0,40	0,92	15
I	11,98	11,63	3,32	10	0,79	0,50	1,03	11
M	10,64	9,47	3,33	4	0,44	0,25	0,49	4
Machos	12,50	10,85	4,23	20	0,53	0,29	0,61	20
I	12,37	10,85	3,91	14	0,53	0,11	0,60	14
M	12,80	11,03	5,32	6	0,53	0,29	0,68	6
Total	12,13	10,85	3,83	34	0,60	0,40	0,75	35

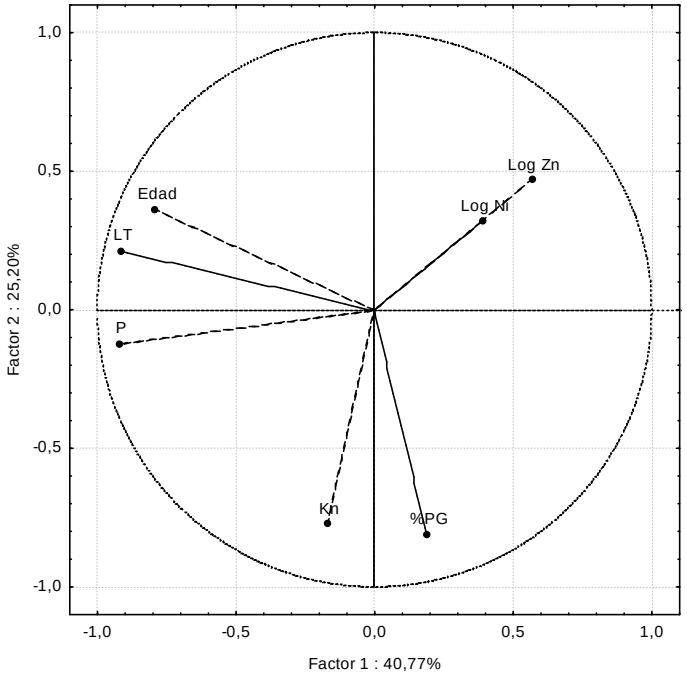


Figura 5-6: Gráfico de los autovectores de las variables originales en función de los factores de componentes principales en músculo. Índices de condición analizados: Kn: índice relativo de condición corporal. %PG: índice graso. Parámetros biológicos: peso (P), talla (LT) y edad.

Del análisis de componentes principales (ACP, Figura 5-6) se obtuvo que los primeros tres Factores resultantes de las combinación lineal de las variables originales explicaron más del 80% de la varianza de los datos (Tabla 5-13). El Factor 1 representó a las variables relacionadas con el crecimiento de los ejemplares (edad, talla y peso), mientras que el

Factor 2 estaría relacionado con la condición de los ejemplares (porcentaje del peso de la grasa y Kn), y el Factor 3 explicaría la variación de los datos de Ni (Tabla 5-14, Figura 5-6).

Tabla 5-13: Autovalores de la matriz de correlación y la estadística asociada. Var.: Varianza de los datos.

	Autovalor	% de var. total	% de var. acumulada
1	2,85	40,77	40,77
2	1,76	25,20	65,98
3	1,21	17,25	83,23
4	0,58	8,23	91,46
5	0,35	5,01	96,47
6	0,22	3,15	99,62
7	0,03	0,38	100,00

Tabla 5-14: Autovectores de la matriz de correlación. %PG: porcentaje del peso de la grasa total en función del peso total de cada ejemplar. Kn: índice relativo de condición corporal (Le Crem, 1951).

	Factor 1	Factor 2	Factor 3
Edad	-0,47	0,27	0,26
Talla	-0,54	0,16	0,06
Peso	-0,55	-0,09	0,26
%PG	0,11	-0,61	0,27
Kn	-0,10	-0,58	0,36
Log Zn	0,34	0,35	0,44
Log Ni	0,23	0,24	0,68

Del análisis de los Factores en función de las variables categóricas (sexo, estado de madurez, grupo de edad y localidades, Figura 5-7) surgió que ninguna de las variables categóricas analizadas, el sexo, el estado de madurez sexual, la localidad y los grupos de edad, seguirían un patrón específico. Estas tendencias fueron verificadas, además, mediante pruebas estadísticas complementarias.

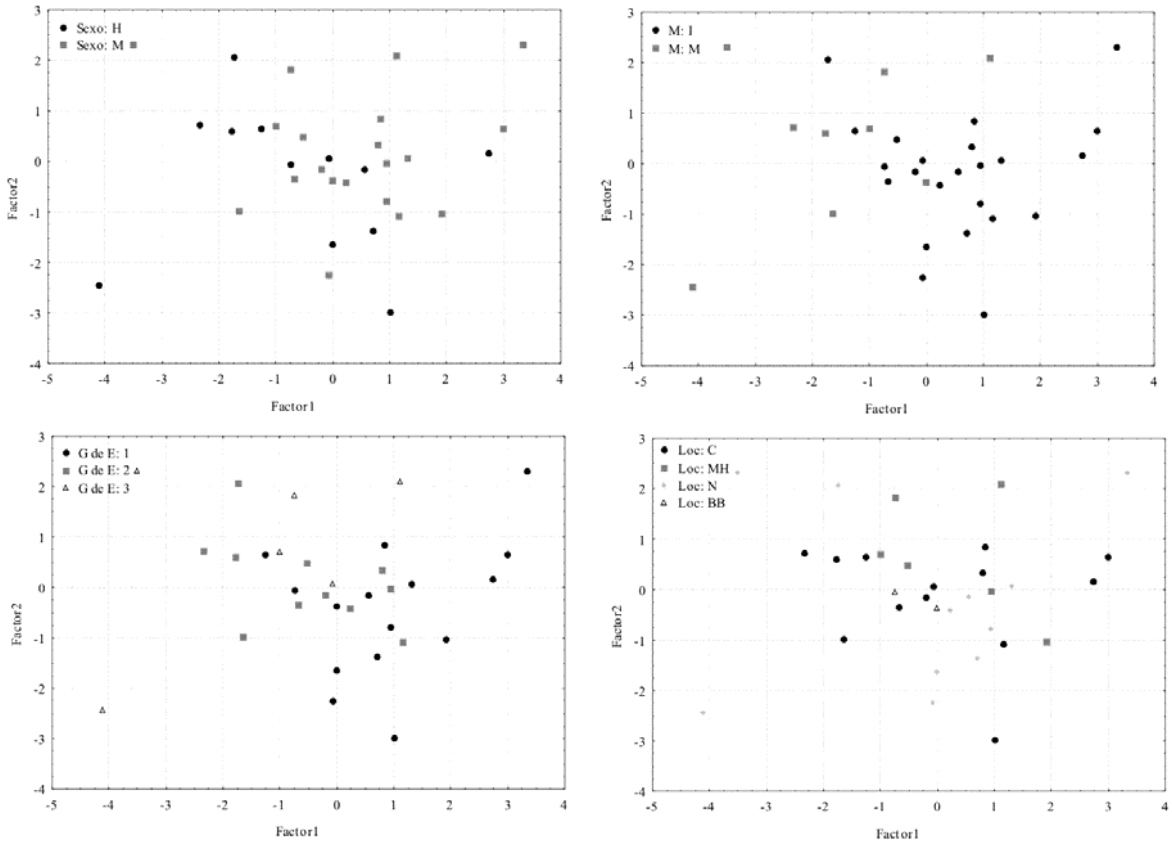


Figura 5-7: Gráficos de los Factores 1 y 2 en función de las variables categóricas (sexo, estado de madurez (Mad), localidad (Loc) y grupo de edad (G de E). M: maduros, I: inmaduros, N: Necochea, C: Claromecó, MH: Monte Hermoso; BB: Bahía Blanca.

Efecto de los parámetros biológicos edad y madurez sexual, sobre las concentraciones de los metales pesados

Se comprobó la ausencia de diferencias significativas entre el sexo y el estado de madurez sexual de los ejemplares para las concentraciones de Ni y Zn en músculo (Mann-Whitney: Sexo p_{Zn}= 0,52, p_{Ni}= 0,78, Madurez p_{Zn}= 0,54, p_{Ni}= 0,53). El mismo resultado fue encontrado también mediante el análisis GLZ en el cual ningún modelo explicó significativamente la variabilidad en la concentración de ambos metales (GLZ: $p > 0,05$).

Al estudiar el efecto de la edad sobre las concentraciones de Ni y Zn, a diferencia de lo observado en la piel, en el tejido muscular no se encontró diferencias significativas entre los

grupos de edad (Kruskal-Wallis: p> 0,05). No obstante, es posible observar una disminución de los niveles de ambos metales en el grupo de edad 2 (≥2 - ≤4) (Tabla 5-15). De igual forma no se verificó la existencia de una relación significativa entre los parámetros biológicos (talla, peso y edad) y el logaritmo de las concentraciones de Ni (Spearman: Talla R_{Sp}= - 0,14, p= 0,44, Peso R_{Sp}= - 0,20, p= 0,26, Edad R_{Sp}= - 0,07, p= 0,68; GLZ: p> 0,05). Por otro lado, el Zn presentó una relación significativamente negativa y débil con la talla y el peso de los ejemplares (Spearman: Talla R_{Sp}= - 0,39, p= 0,02, Peso R_{Sp}= - 0,49, p= 0,003 verificada también por el método GLZ (GLZ: Peso AIC= -45,41 p= 0,01, $\Delta AIC_{ranking1-7}$= 0,78; Talla: AIC= -44,77 p= 0,02, $\Delta AIC_{ranking1-7}$= 1,40). Asimismo, estas relaciones coinciden con lo previamente observado en el análisis de componentes principales (Figura 5-7).

Tabla 5-15: Valores medios (μg g^{-1} peso fresco), desvíos estándar (DE) y n de Zn y Ni encontrados en tejido muscular del delfín franciscana según el grupo de edad. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos de edad analizados.

	Zn				Ni			
	Media	Mediana	DE	n	Media	Mediana	DE	n
>0; ≤1	12,28	11,63	3,65	16	0,61	0,5	0,66	17
≥2; ≤4	10,42	9,69	2,38	11	0,31	0,11	0,24	11
≥5, 13	14,47	15,12	5,12	7	1,03	0,47	1,24	7
Total	12,13	10,85	3,83	34	0,60	0,4	0,75	35

Condición Corporal

Los índices de condición (%PG y Kn) no resultaron afectados por el sexo o el estado de madurez sexual de los ejemplares (Tabla 5-16), resultado verificado por los análisis estadísticos no paramétricos (Mann-Whitney: %PG vs madurez p= 0,14, %PG vs sexo p= 0,55; Kn vs madurez p= 0,18, Kn vs sexo p= 0,14) y por el GLZ (p> 0,05). No obstante,

los machos sexualmente maduros, un vez más, presentaron una menor condición corporal que las hembras y los machos inmaduros, lo cual se ve reflejado en sus bajos valores de %PG y Kn (Tabla 5-16). Por otro lado, el índice Kn fue afectado por la interacción de la talla y el peso en el análisis de GLZ (GLZ: Kn AIC=-50,22 $p< 0,001$) aunque no mediante el análisis de correlación (Spearman: R_{Sp}= -0,23 – 0,20, $p> 0,18$). Similar a lo observado en la piel, el %PG no se relacionó significativamente con los parámetros biológicos evaluados (Spearman: R_{Sp}= -0,28 – -0,04, $p> 0,11$). Mediante el análisis exploratorio de componentes principales fue posible observar la independencia entre el índice %PG y la concentración de Zn y Ni evidenciado por un ángulo de 90° entre las variables (Figura 5-6), este resultado fue confirmado mediante el análisis de correlación de Spearman (Spearman: R_{Sp}= -0,13 – -0,03, $p> 0,48$) y el GLZ ($p> 0,05$). Adicionalmente del análisis de componentes principales se comprobó la asociación entre el Zn y el Ni, además confirmada por la prueba no paramétrica de Spearman (R_{Sp}= 0,46, n= 34, p= 0,007).

Tabla 5-16: Índices de condición corporal analizados en función del sexo y el estado de madurez sexual. %PG: porcentaje del peso de la grasa total en función del peso total de cada ejemplar. Kn: índice relativo de condición corporal (Le Crem, 1951). No se encontraron diferencias significativas entre los sexos y grupos de madurez sexual.

	%PG			Kn		
	Media	DE	n	Media	DE	n
Hembras	27,84	9,83	13	1,03	0,20	14
I	27,98	10,28	10	1,04	0,17	11
M	27,38	10,15	3	1,01	0,32	3
Machos	25,90	6,92	21	0,92	0,17	21
I	27,09	5,84	15	0,94	0,18	15
M	22,92	9,01	6	0,86	0,14	6
Total	26,64	8,06	34	0,96	0,19	35

Análisis según el área de procedencia de los ejemplares

De la misma forma que para la piel, la matriz de varianza-covarianza (F= -25,78, gl= 6, p> 0,99, n= 32) y las concentraciones de Ni y Zn en función de las tres localidades resultaron no significativas (Lambda de Wilk: F (6, 58)= 1,58, p< 0,17, ver Tabla 5-17, Figura 5-8). En coincidencia con lo encontrado en el tejido hepático, renal y piel, no se encontraron diferencias significativas entre las localidades analizadas para el Ni y Zn ya que las distancias de Mahalanobis (al cuadrado) fueron bajas (Tablas 5-18 y 5-19) y sus respectivos p fueron no significativos.

Tabla 5-17: Concentraciones (µg g^{-1} peso fresco) de Zn y Ni según el área de procedencia de los delfines. N: Necochea, C: Claromecó, MH: Monte Hermoso, BB: Bahía Blanca. No se encontraron diferencias significativas entre las localidades analizadas.

	Zn				Ni			
	Media	Mediana	DE	n	Media	Mediana	DE	n
N	11,67	10,81	3,19	12	0,39	0,11	0,51	13
C	11,79	10,62	4,25	13	0,84	0,56	0,99	13
MH	14,14	14,21	4,33	7	0,57	0,11	0,69	7
BB	10,04	10,04	1,79	2	0,51	0,51	0,02	2
Total	12,13	10,85	3,83	34	0,60	0,4	0,75	35

Tabla 5-18: Distancias de Mahaladonis al cuadrado entre las localidades analizadas.

	C	MH	N
C	0,00	1,46	0,47
MH	1,46	0,00	0,52
N	0,47	0,52	0,00

Tabla 5-19: Prueba de Hotelling con nivel de significancia corregido por la prueba de Bonferroni α=0,05.

Localidad	Zn	Ni	n	
N	11,67	0,41	13	A
MH	14,14	0,57	6	A
C	11,79	0,84	13	A

Nota: letras distintas indican diferencias significativas p≤ 0,05

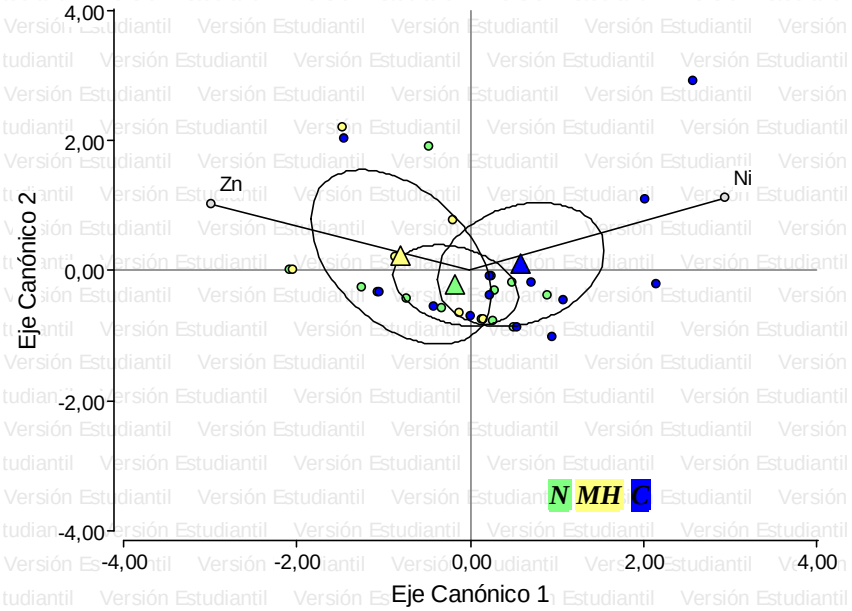


Figura 5-8: Gráfico del análisis de funciones discriminantes. Los rombos grandes respresentan los centroides de cada grupo. Referencias: Colores Verde: Necochea, Amarillo: Monte Hermoso y Azul: Claromecó. Las variables (Ni y Zn) estan representadas por los vectores y la correlación con cada función discriminantes es representada por el ángulo, y la direccción indica su incremento.

Diferencias y asociación entre el tejido epitelial y muscular

La Tabla 5-20 muestra los valores de variación de las concentraciones de cada metal en los ejemplares analizados. Se puede observar que los valores de variación fueron muy elevados, principalmente para el Ni, tanto en piel como en músculo.

Los niveles de cada metal presentaron diferencias significativas según el tejido analizado, siendo el Zn mayor en piel y el Ni en músculo (Mann-Whitney: M vs P Zn, $p< 0,001$; Ni $p= 0,04$). Seguidamente, se verificó únicamente una relación significativamente positiva entre los dos metales en músculo (Spearman: $R_{Sp}= 0,46$, $n= 34$, $p= 0,007$).

Tabla 5-20: Valores de coeficiente de variación (CV) para cada metal detectado según el tejido analizado. DE: desvíos estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas p≤0,05.

	Piel				Músculo			
	Media	DE	n	%CV	Media	DE	n	%CV
Zn	97,91[a]	43,29	33	44,21	12,13[b]	3,83	34	31,61
Ni	0,54[c]	0,84	21	155,62	0,60[d]	0,75	35	124,54

A partir del análisis de correlación canónica fue posible evaluar la asociación entre los metales en los órganos analizados. Para éste análisis se siguió el mismo procedimiento que en el Capítulo cuatro.

El Factor canónico 1 obtenido del análisis de correlación logró explicar por sí sólo un 99% de la variabilidad de los datos (Figura 5-9). El valor de R de correlación canónica para el F1 fue 0,38. Sin embargo, éste factor no presentó un valor de p de la prueba del lambda de Wilk significativo (λ= 0,85, F= 0,67, p=0,62), es decir que no fue posible explicar significativamente la variación de los datos. Por lo tanto éstos resultados deben considerarse como tendencias.

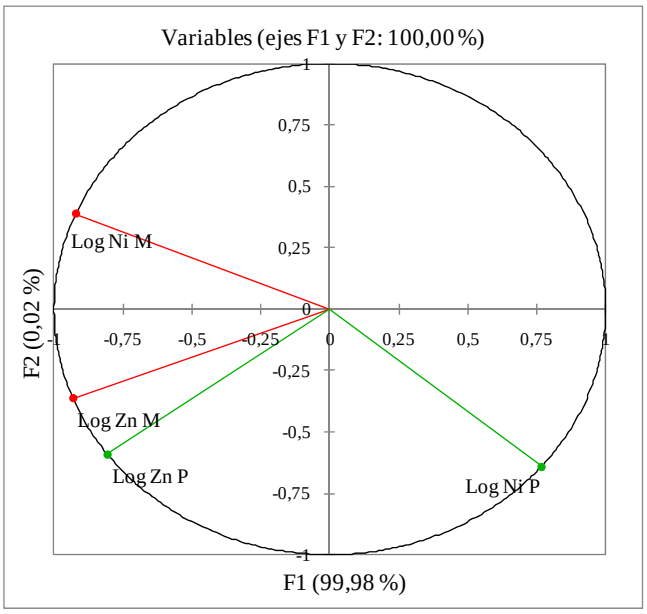


Figura 5-9: Gráfico de correlación canónica de las concentraciones de los metales pesados analizados en hígado y riñón.

Los niveles encontrados de Zn en músculo de delfines franciscanas del sur de la provincia de Buenos Aires resultaron significativamente menores a los encontrados en delfines procedentes del norte de la provincia de Buenos Aires (Marcovecchio *et al.,* 1994) quienes informaron una concentración media de Zn de 49,3 ± 4,80 $\mu g\ g^{-1}$ (*t* de Student t= 19,98 p< 0,001), siendo éstos los únicos datos comparables hasta la fecha.

5-4 Discusión

Los resultados de concentraciones de Ni en la piel, aquí presentados, son los primeros informados para el delfín franciscana del sur de la provincia de Buenos Aires.

La piel en los cetáceos cumple un papel muy importante como la primera barrera en contra de los agentes externos, siendo uno de los órganos más importantes del grupo y de los mamíferos en general (Yang *et al.*, 2002). La piel de los cetáceos no presenta pelos ni glándulas sudoríparas o sebáceas (Tinker, 1988; Pfeiffer y Rowntree, 1996). A diferencia de los pinnípedos tampoco cuentan con las vías de excreción (pelos o glándulas) de algunos metales pesados (por ej. Hg); por esta razón era esperable que la acumulación de los metales pesados en la piel de los cetáceos presente diferentes particularidades (Watanabe *et al.*, 1996; Monaci *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 2002).

En estudios previos se demostró que las concentraciones de contaminantes en la piel y en la sangre se relacionan con la carga de estos contaminantes en el cuerpo (Fossi *et al.*, 1992; Monaci *et al.*, 1998; Kunito *et al.*, 2002), proveyendo la estimación de las concentraciones de metales pesados en piel una herramienta no letal para futuros estudios sobre el monitoreo de especies en peligro de extinción.

Concentración de metales pesados

El Zn resultó el metal hallado en mayor concentración seguido por el Ni, mientras que los restantes metales bajo estudio (Pb, Cd, Cr y Cu) resultaron no detectables por el método analítico utilizado. Este resultado coincide con el informado por Yang y col. (2002) para la marsopa de Dall *Phocoenoides dalli* y por Stravos y colaboradores (2007) en delfín nariz de

botella *Tursiops truncatus*, donde se sugirió además, que la piel era el órgano acumulador de Zn. En coincidencia con los resultados de Yang y col. (2002) los niveles del Zn en piel fueron muy superiores a los encontrados en hígado, riñón y músculo en ambos trabajos. La concentración de Zn en la piel hallada, en este trabajo, fue ocho veces superior a la encontrada en músculo, cuatro veces superior a la encontrada en riñón y casi tres veces superior a la encontrada en el hígado. La mayor concentración de Zn en piel en relación con las concentraciones en el hígado o el riñón fue también informada en el delfín mular del Mediterráneo *Tursiops truncatus* (Roditi-Elasar *et al.*, 2003) y en el delfín listado *Stenella coeruleoalba* (Honda y Tatsukawa, 1983; Roditi-Elasar *et al.*, 2003). Brian y colaboradores (2007) informaron la presencia de bajas concentraciones de Cr, Cd y Cu, en el delfín nariz de botella *Tursiops truncatus*, semejantes a las detectadas en las muestras de piel analizadas en este trabajo.

En relación a los metales en músculo, sus concentraciones estuvieron dentro de los mismos órdenes de magnitud que aquellos informados por Carvalho y col. (2002) en el delfín nariz de botella *Tursiops truncatus* y en el delfín común *Delphinus delphis*. Sin embargo, la concentración de Zn encontrada por Carvalho *et al.* (2008) en el tejido muscular de franciscanas procedentes de Río de Janeiro fueron mayores a las informadas en este estudio. Resultando la máxima concentración de las franciscanas que habitan la costa del norte de Brasil 34,80 $\mu g\ g^{-1}$ (Media 27,00 $\mu g\ g^{-1}$), mientras que la estimada para las franciscanas de sur de la provincia de Buenos Aires fue de 21,67 $\mu g\ g^{-1}$ (Media 12,13 $\mu g\ g^{-1}$). La misma tendencia fue mostrada por los niveles encontrados en el norte de la provincia de Buenos Aires (Marcovecchio *et al.*, 1994). En función de estos resultados, la concentración de Zn en músculo parece presentar la misma tendencia a la ya confirmada para las concentraciones de los metales analizados en relación a las áreas geográficas. Es decir, los niveles de Zn en músculo de las franciscanas del sur de la provincia de Buenos Aires

fueron menores en relación a los niveles encontrados a lo largo de la distribución geográfica de la especie.

En este estudio, las concentraciones de Cd, Cr y Pb detectadas en la piel fueron, en general, inferiores a las informadas en otros tejidos como el hígado y el riñón. Por lo cual resultaría poco probable que estos elementos tengan efectos toxicológicos significativos sobre la población de delfines estudiada.

Efecto de los parámetros biológicos edad y madurez sexual, sobre las concentraciones de los metales pesados

Las variables relacionadas con la historia de vida de cada ejemplar (sexo, estado de madurez, edad, estado de condición corporal, etc.) influyeron diferencialmente en los niveles de Zn en cada tejido analizado (hígado, riñón, piel y músculo). Un ejemplo de esto fue la influencia del sexo y el estado de madurez sexual sobre la concentración de Zn en piel y músculo. Yang y colaboradores (2002) encontraron un resultado similar; los autores informaron diferencias significativas según el sexo de los ejemplares sobre los niveles de Zn en piel, encontrándose mayores concentraciones en hembras que en machos; de la misma forma que los resultados aquí presentados. Este mismo patrón fue observado en muchas otras especies, como por ejemplo: marsopa de puerto *Phocoena phocoena* y de Dall *Phocoenoides dalli* (Paludan-Müller *et al.*, 1993; Yang *et al.*, 2002), beluga *Delphinopterus leucas* (Wagemann *et al.*, 1996) y ballena minke *Balaenoptera acuturostrata* (Kunito *et al.*, 2002), pudiendo ser considerado este patrón como un fenómeno general en los cetáceos. Los altos niveles de Zn encontrados en estos animales responden al rol que cumple en funciones de protección. El Zn desempeñaría una función crítica en la recuperación de heridas en la piel. Una gran cantidad de Zn es usado por metaloenzimas, la proliferación de

las células cutáneas, y el depósito de colágeno en las incisiones (Gönül *et al.*, 1998; Nezu *et al.*, 1999). Otra posible función del Zn sería la protección de las células de la piel contra el daño solar foto-oxidativo producido por los rayos ultravioletas que podrían ocasionar inflamación de la piel y progresión de tumores (El-Ghorr y Norval, 1999; Leccia *et al.*, 1999 en Yang *et al.*, 2002). La concentración cutánea de Zn en los cetáceos puede ser mucho mayor que la de los pinnípedos. Esto puede deberse a que la piel de focas, leones marinos o morsas está protegida por pelaje y en consecuencia un mecanismo de protección basado en el Zn no resultaría tan adaptativo ni necesario (Yang *et al.*, 2002).

En relación a los resultados obtenidos de Ni, se pudo observar la ausencia de la influencia del sexo, la madurez sexual y la edad. Sus niveles resultaron, además, similares a los encontrados en el delfín común *Delphinus delphis* por Carvalho y col. (2002) y muy cercanos al límite de detección del método. Muy pocos trabajos han estudiado la influencia de parámetros biológicos y ecológicos sobre los niveles de Ni, por lo tanto no fue posible analizar comparativamente los resultados obtenidos de Ni en función de éstos parámetros.

Efecto de la condición corporal

Los resultados obtenidos permitieron comprobar que el %PG resultaría un buen estimador del estado de condición de los ejemplares, ya que como se explicó en el Capítulo 4, este no fue afectado por el sexo y la madurez, ni por la talla, el peso y la edad de los ejemplares; por lo tanto resultó ser independiente del crecimiento de los individuos. Mientras que el Kn presentó un comportamiento diferente al observado para el índice graso; ya que se relacionó significativamente con parámetros biológicos. El índice relativo de condición corporal o Kn fue utilizado previamente para estimar el estado de condición de ejemplares procedentes del norte de la provincia de Buenos Aires por Rodríguez y col. (2002). Sin

embargo, en base a los resultados aquí obtenidos no se sugiere utilizar dicho parámetro como índice que condición ya que presentó relaciones significativas con los parámetros biológicos de los ejemplares aquí analizados, tales como la edad, el peso y la talla, dicha tendencia refleja una asociación con el crecimiento de los mismos. Adicionalmente al no observarse un cambio significativo del %PG (menor %PG a mayor edad o talla) es posible sugerir que los ejemplares se encontraban en un estado bueno de condición (o estable). Sin embargo, y en coincidencia a lo informado en el Capítulo anterior, se encontró una asociación débil, no significativa, entre la concentración de Zn y el %PG en piel. La continuidad necesaria de este estudio a través del tiempo, conlleva el objetivo de seguir monitoreando los niveles de Zn y el estado de condición de los ejemplares de *P. blainvillei* que habitan las costas bonaerenses para evaluar la evolución de los niveles de este metal y un posible deterioro en la condición de los ejemplares de esta especie actualmente vulnerable.

En la piel se observó una correlación negativa entre la concentración de Ni y el índice Kn (de crecimiento). Esta relación no ha sido informada en ningún estudio previo y aún más, no existe un consenso actual de si se trata o no de un metal esencial en los mamíferos (Anke *et al.*, 1995). A partir de esta investigación se pudo sugerir que al menos en la franciscana, el Ni se comportaría como un metal no esencial, ya que no fue influenciado por los cambios que sufren los ejemplares a lo largo de su vida, es decir, ni los parámetros biológicos analizados ni la condición corporal afectó los niveles de este metal. Adicionalmente, presentó un gran valor de CV en ambos tejidos (> 155%). Estos hechos caracterizan el comportamiento de los metales no esenciales, aportando de esta manera información para su caracterización final como metal no esencial en el delfín franciscana. Otro resultado que refuerza esta hipótesis es la independencia entre el Ni y el Zn tanto en músculo como en piel, verificada por el análisis de correlación canónica. Mientras que, tal

como se esperaba, el Zn presentó una asociación en ambos tejidos, reflejando su carácter esencial, ya analizado previamente.

Hyvärinen y Sipilä (1984) observaron un efecto de la concentración de Ni aportado por la actividad industrial de su zona de estudio sobre la mortandad de las crías de la foca de anillos *Pusa hispida saimensis*. Este hecho, unido a la relación negativa entre los niveles de Ni y el Kn y al resultado de que mayores niveles de Ni fueron encontrados en Monte Hermoso hacen preciso seguir investigando y reforzando los análisis sobre los ejemplares que habitan en las cercanías de esta localidad.

Los metales presentes en músculo no se vieron influenciados significativamente por el estado de condición de los ejemplares. Por lo tanto es posible concluir que el estudio de los niveles de metales en músculo no provee de una herramienta útil para la evaluación de los posibles efectos de los contaminantes sobre el delfín franciscana del sur de la provincia de Buenos Aires.

Análisis según el área de procedencia de los ejemplares

El área de procedencia no presentó relación con la concentración de Zn y Ni en piel ni en el músculo de los ejemplares. Sin embargo, tal como fue destacado en la sección previa, el Ni en piel podría ser utilizado como una herramienta para analizar el efecto de parámetros ecológicos, ya que no fue influenciado por las variables de la historia de vida de los ejemplares, como el sexo, la edad, talla, estado de madures, etc. Para tal efecto resulta necesario encontrar nuevas herramientas analíticas que provean un límite de detección menor para hacer el estudio de éste metal, ya que el mismo es un metal micro-traza y debido a ello resulta difícil obtener valores detectables con los métodos analíticos que actualmente se usan.

Finalmente, se recomienda no utilizar el tejido muscular para el monitoreo de contaminantes en futuros estudios sobre la especie y en cambio se destaca la utilización de la piel como una posible herramienta no letal para el estudio de la condición de los ejemplares y de la presencia de Zn y Ni. Sin embargo, para lograr un aplicación eficiente de esta herramienta, resulta necesario seguir trabajando con los ejemplares capturados accidentalmente de manera de obtener los valores desde de los cuales se pueda proporcionar un punto de referencia a partir del cual una dada carga de metal pueda ser considerada como "normal" o "anormal" en los tejidos de los animales analizados (Wagemann y Muir, 1984).

CAPÍTULO 6

Aspectos reproductivos del delfín franciscana

6-1 Introducción

Aspectos reproductivos de esta especie como la variación ontogénica, la edad de primera madurez, el ciclo reproductivo, y las descripciones histológicas de sus gónadas, fueron estudiados en forma parcial para las FMAs III y IV por diversos autores (Harrison *et al.*, 1969; Harrison y Brownell, 1971; Harrison *et al.*, 1972; 1981; Kasuya y Brownell, 1979; Brownell Jr., 1989; Pinedo, 1991; Corcuera, 1996; Danilewicz 2003; Danilewicz *et al.*, 2004; Botta, 2005; Bertozzi, 2009).

Pontoporia blainvillei presenta dimorfismo sexual sesgado hacia las hembras, siendo mayores en tamaño que los machos en estado adulto. El dimorfismo se manifiesta en el peso y en la talla (Kasuya y Brownell, 1979; Pinedo, 1991; Ramos, 2000). De acuerdo a los criterios propuestos por Kasuya y Brownell (1979) la longitud a partir de la cual los ejemplares macho son considerados sexualmente maduros es de 131,4 cm y mientras que la talla de madurez sexual en las hembras es de 141 cm. La edad de madurez sexual ocurre entre los 2 y 3 años de edad en ambos sexos. Para las franciscanas que habitan en el extremo sur de la distribución Corcuera (1996) estimó que la edad de madurez sexual fue de 3,3 años para los machos y 4,5 para las hembras. Los delfines franciscana de Río Grande do Sul, en Brasil presentaron una edad de primera madurez sexual de entre 3,0 y 3,6 años, con 128,2 cm y 26,4 kg para los machos y entre 3,5 y 3,7 años para las hembras con 138,9 y 32,8 kg (Danilewicz *et al.*,2003; Danilewicz, 2004). En 2009, Bertozzi, encontró para las franciscanas de São Pablo, en Brasil, que la edad y longitud de madurez sexual, fue menor,

tanto para los ejemplares macho (1,3 - 1,5 años y 103 – 107 cm) como para los ejemplares hembra (1,2 – 1,8 años y 115 – 119 cm).

El período de gestación para los delfines franciscana de Uruguay se estimó entre 10,8 y 11,1 meses, o 10,5 meses en promedio, de acuerdo a Kasuya y Brownell (1979) y Harrison y col. (1981). Éste período fue similar al hallado por Danilewicz (2003) para franciscanas de Río Grande do Sul (11,2 meses).

El período de lactancia se estimó en 9 meses y las crías comienzan a cazar alimento sólido a partir de los tres meses de edad (Kasuya y Brownell, 1979).

Sólo en pocas ocasiones se registraron hembras lactantes preñadas según Brownell (1989) y en relación a la periodicidad, el ciclo reproductivo de una hembra fue descripto como bianual tanto para las costas uruguayas (Kasuya y Brownell, 1979) como para el litoral de Sao Pablo y Paraná (Rosas y Monteiro-Filho, 2002). Sin embargo, Danilewicz (2003) estimó un intervalo de nacimientos de 1,5 años para las franciscanas de Río Grande do Sul, lo que significaría que la mitad de las hembras maduras se están reproduciendo anualmente, y la otra mitad lo hace bianualmente. Más tarde Bertozzi (2009) informó que el intervalo de nacimientos para las franciscanas de São Paulo fue de 1,8 años.

La longevidad del delfín franciscana se estimó en aproximadamente 20 años, sin embargo pocos individuos alcanzan esta edad (Pinedo y Hohn, 2000). El ejemplar macho de mayor edad encontrado recientemente tenía 17 años de edad y fue capturado accidentalmente en redes de pesca costera en aguas del estado de Río Grande do Sul (Botta, 2005). La hembra de mayor edad tenía 21 años y fue encontrada por Pinedo (1991).

En la actualidad persisten vacíos o escasez de información biológica de esta especie en la costa de Argentina (FMA IV), esta falta de información biológica se hace extensiva a diversos aspectos de la historia de vida de esta especie, en particular en el norte de la provincia de Buenos Aires y más aún hacia el extremo sur de la distribución. Dado la escasez y antigüedad de la información existente sobre la biología reproductiva de la

especie en el extremo sur de la distribución, sumada a la evidente variación de las variables biológicas entre las diferentes unidades de manejo de franciscana o entre las FMAs, y el hecho de que recientemente (2008) la especie ha sido catalogada como "Vulnerable" (IUCN, 2008) en todo su rango de distribución, se planteó como objetivo estudiar aspectos reproductivos y los respectivos parámetros biológicos involucrados en el proceso reproductivo del delfín franciscana del sur de la provincia de Buenos Aires.

6-2 Materiales y Métodos

6-2-1 Método histológico

Los testículos fueron separados del epidídimo y conservados en tubos herméticos con solución de formaldehído al 10%. De la parte media de cada pieza testicular se obtuvieron con bisturí submuestras de 3 mm de espesor. El tejido fue embebido en *Paraplast*© (Biopack) y los tacos obtenidos se cortaron en láminas de 4 – 7 μm de espesor con micrótomo digital y teñidos con hematoxilina - eosina. El estado de madurez sexual de los machos fue determinado mediante la observación de las secciones testiculares bajo microscopio óptico a distintos aumentos, según el criterio descripto por Hohn *et al.* (1985) y Danilewicz *et al.* (2004): presencia de espermatogonias, espermatocitos, espermátidas, espermatozoides y la forma de los túbulos seminíferos. Según este criterio los individuos se clasificaron en:

Inmaduros: Sus túbulos seminíferos contienen principalmente espermatogonias. Los túbulos seminíferos se presentan embebidos en abundante tejido intersticial, se encuentran densamente empaquetados y presentan una sección transversal circular (no están elongados).

Maduros: Los túbulos seminíferos presentan espermatogonias, espermatocitos, espermátidas y espermatozoides. Los túbulos seminíferos se observan bien elongados, con gran lúmen tubular y poco tejido intersticial rodeándolos.

Por otro lado, durante la necropsia, los ovarios fueron separados del tracto reproductor, y conservados en formaldehído al 10%. Para la estimación del estado de madurez de las hembras luego de la observación macroscópica realizada bajo lupa, los ovarios fueron cortados a mano con bisturí en secciones de 1 a 3 mm de espesor y se los observó bajo

lupa según el protocolo descripto por Danilewicz (2003). El criterio para determinar el estado de madurez utilizado fue la presencia de al menos un cuerpo lúteo o blanco en alguno de los ovarios. Cuando fue necesario se realizó un examen microscópico. Para tal fin los ovarios fueron embebidos en parafina o *Paraplast*© y cortados en láminas de entre 4-10 μm de espesor. Los cortes se colorearon con hematoxilina – eosina y se observaron bajo lupa y microscopio óptico a diferentes aumentos. El análisis histológico de las gónadas se realizó sobre 25 testículos y 14 ovarios.

El estado de madurez sexual de aquellos ejemplares de los cuales no se obtuvieron cortes histológicos apropiados o no se obtuvieron las gónadas, fue estimado por los métodos morfométricos que se detallan en la sección próxima.

6-2-2 Método morfométrico gonadal

Tanto los ovarios como los testículos, una vez extraídos durante la disección, fueron medidos con un calibre digital (± 0,01 mm) y pesados con balanza digital (± 0,01 gr). Los testículos fueron pesados sin el epidídimo. Las gónadas obtenidas fueron medidas en tres dimensiones (largo, ancho y espesor) y se determinaron los siguientes parámetros morfométricos (Danilewicz *et al.,* 2004; Danilewicz 2003) sobre cada ejemplar:

Largo y peso combinado de testículos y ovarios (LCT/O y PCT/O), largo y peso medio de testículos y ovarios (LTM y PTM), índice de madurez sexual testicular (IM), peso relativo de testículos y ovarios (PRT/O) y diámetro medio testicular (DMT). Los parámetros mencionados se calcularon según las siguientes ecuaciones:

Largo combinado de testículos y ovarios (LCT/O) →

$$LCT/O(cm) = LTD/LOD(cm) + LTI/LOI(cm)$$

Peso combinado de testículos y ovarios (PCT/O) →

$$PCT/O(gr) = PTD/POD(gr) + PTI/POI(gr)$$

Largo testicular medio (LTM) → $LTM(cm) = \frac{LTD(cm) + LTI(cm)}{2}$

Peso testicular medio (PTM) → $PTM(gr) = \frac{PTD(gr) + PTI(gr)}{2}$

Índice de madurez (IM) → $IM = \frac{PCT/O(gr)}{LCT/O(cm)}$

Peso Relativo de testículo y ovario (PRT/O) →

$$PRT/O\% = \frac{PCT/O(gr)}{P(gr)} * 100$$

Diámetro medio testicular (DMT) →

$$DMT\,(cm) = \frac{\left(aTD\,(cm) + eTD\,(cm)\right) + \left(aTI\,(cm) + eTI\,(cm)\right)}{2}$$

Donde:

P: peso corporal total (gr)

PTD/POD: peso de testículo/ovario derecho (gr)

PTI/POI: peso de testículo/ovario derecho (gr)

LTD/LOD: largo de testículo/ovario (cm)

LTI/LOI: largo de testículo/ovario izquierdo (cm)

aTD/I: ancho de testículo derecho /izquierdo (cm)

eTD/I: espesor de testículo derecho / izquierdo (cm)

Fue posible analizar las medidas morfométricas gonadales de 38 machos y 24 hembras. Con los resultados de los diferentes parámetros calculados se determinó cuál o cuáles de ellos resultarán los más confiables para la estimación del estado de madurez sexual de los ejemplares. Estos parámetros brindaran la posibilidad de realizar una estimación del estado

de madurez sobre carcasas encontradas que no se encuentren completas o en buenas condiciones de conservación.

6-2-3 Método morfométrico corporal

Actualmente este es el método más utilizado para la estimación de la madurez sexual en Argentina. Permite estimar el estado de madurez de los ejemplares al momento de la muerte partir de la talla medida sobre los cuerpos de los ejemplares muertos en redes de pesca de forma accidental o varados en las playas. La Tabla 6-1 muestra los valores de la talla, peso y edad obtenidos por Kasuya y Brownell (1979), y cuyos valores se utilizan para estimar el estado de madurez. Para este análisis morfométrico corporal se utilizaron 44 ejemplares machos y 29 hembras.

Tabla 5-1: valores promedio, desvío estándar (DE) y rangos y de la edad y talla obtenidos por Kasuya y Brownell (1979) sobre franciscanas capturadas accidentalmente en las costas uruguayas.

	Edad		Talla (cm)				Peso (kg)			
	Rango	Media	Rango	Media	DE	n	Rango	Media	DE	n
Machos	0 ≤ < 1	0,3	84,0-102,0	92,7	8,0	5,0	10,9 -17,2	14,2	2,7	4,0
	1 ≤ < 2	1,2	90,5-134,0	115,7	9,7	48,0	11,8-24,5	18,6	4,4	21,0
	2 ≤ < 3	2,2	110,0-152,0	128,8	10,6	21,0	16,3-35,7	24,0	6,4	10,0
	3 ≤ < 4	3,3	118,0-129,0	123,5		2,0	17,2			1,0
	4 ≤ < 16	6,2	122,0-147,0	133,3	8,6	21,0	19,9-32,2	28,2	5,7	4,0
Hembras	0 ≤ < 1	0,5	85,0-105,0	98,4	6,0	8,0	11,8-14,9	13,1	1,6	3,0
	1 ≤ < 2	1,3	100,0-143,0	122,6	10,6	54,0	14,5-30,8	22,9	4,7	26,0
	2 ≤ < 3	2,2	120,0-169,0	141,2	14,4	25,0	17,7-34,9	26,3	6,8	9,0
	3 ≤ < 4	3,2	145,0-160,0	152,2	5,5	6,0	34,4	34,4		1,0
	4 ≤ < 13	6,4	137,0-171,0	152,8	9,2	28,0	29,90-52,10	40,3	8,6	5,0

6-2-4 Método multivariado descriptivo: Análisis de cluster

A partir del actual auge de los análisis multivariados descriptivos y debido a la valiosa información que éstos brindan se decidió abordar la estimación de la madurez sexual analizando de forma conjunta los parámetros morfométricos corporales (talla y peso) y la edad. Se realizó un análisis de Cluster jerárquico sobre 40 machos y 28 hembras con el objetivo de encontrar la estructura natural de agrupamiento.

El criterio de agrupamiento utilizado fue jerárquico y la distancia de (di) similitud fue la distancia euclídea. Se analizaron varios métodos de ligamiento con el fin de encontrar el más apropiado para los datos aquí analizados. La elección del método se basó en el valor de correlación cofenética, siendo elegido aquel método que presentó el valor más alto de correlación. Se realizaron dos cluster por separado, uno para cada sexo. Los grupos definidos por el análisis para cada sexo se compararon con la información obtenida del análisis histológico y morfométrico corporal. El análisis de conglomerado se realizó con el programa estadístico InfoStat/E (Di Rienzo *et al.*, 2010).

6-2-5 Estimación de la edad, talla y peso medios de madurez sexual

Para determinar la edad, talla y peso en la cual los ejemplares alcanzan la madurez sexual se utilizaron dos métodos diferentes: el método de la regresión logística y el método de DeMaster (1978) modificado por Ferrero y Walker (1995).

El método logístico se realizó aplicando 100 iteraciones, por el método no lineal-Quasi Newton, minimizando la suma de cuadrados de los residuos (Cox y Snell, 1989 en Ferrero y Walker, 1995). La relación entre los parámetros quedó expresada según la siguiente ecuación:

$$Y = \frac{1}{\left(1 + e^{(-xb+a)}\right)}$$

Donde x es la edad, talla o peso del animal, Y es la proporción de maduros e inmaduros, b es el coeficiente de regresión; y a es la ordenada al origen.

Por el método de DeMaster (1978) con modificaciones, la edad de madurez (EMS) se expresa según la siguiente ecuación:

$$EMS = \sum_{a=j}^{k} a\left(f_a - f_{a-1}\right)$$

Donde, f_a es la fracción de animales sexualmente maduros de la clase de edad a, j es la edad del animal sexualmente maduro más joven de la muestra; y k es animal sexualmente inmaduro más longevo de la muestra.

La varianza de EMS queda expresada por la siguiente ecuación:

$$VAR(EMS) = \sum_{a=j}^{k} \left[a\left(1 - f_a\right) / N_a - 1\right]$$

Donde, N_a es el número total de animales de edad a.

La talla (TMS) y el peso (PMS) de madurez sexual fueron calculados usando la ecuación de DeMaster (1978) modificada por Ferrero y Walker (1995). La ecuación utilizada para el cálculo fue la siguiente:

$$TMS / PMS = \sum_{C_{\min}}^{C_{\max}} C\left(f_t - f_{t-1}\right)$$

Donde, C_{max} representa la clase de talla/peso de los ejemplares sexualmente inmaduros de mayor tamaño o más pesados, C_{min} es la clase de talla/peso de los ejemplares maduros de menor talla o peso, C es el menor valor de la clase talla/peso t, y f_t es la fracción de animales sexualmente maduros de la clase de talla/peso t. Los ejemplares fueron agrupados en intervalos de 5 cm y 5 kg.

El cálculo de la varianza también sufre un cambio y quedó expresada por la siguiente ecuación:

$$VAR(TMS/PMS) = w^2 \sum_{a=j}^{k} \left[f\left(1 - f_t\right) / N_t - 1 \right]$$

Donde, N_t es el número total de animales de clase de talla/peso t, y w^2 es el intervalo de clases, en este caso fue 5.

Todos los análisis estadísticos aquí utilizados (Prueba de normalidad Shapiro-Wilk, prueba de homocedasticidad de Levene, pruebas de comparación: Kruskal-Wallis y Mann-Whitney, prueba de Wilcoxon, prueba de rangos de Spearman) se realizaron con el programa estadístico Statistica 7.0 (Statsoft, Inc.). Se consideró como nivel de significancia estadística $p \leq 0{,}05$ para todas las pruebas realizadas.

6-3 Resultados

Método histológico macroscópico y microscópico

Para la determinación del estado de madurez de los individuos analizados se utilizó el método histológico macroscópico y el microscópico, ambos complementarios y determinantes para el objetivo buscado. De manera, la estimación del estado de madurez obtenida por el método histológico fue comparada con aquellas obtenidas por los restantes métodos evaluados en esta Tesis.

Los ovarios de los animales inmaduros presentaron una forma ovoide y alargada con una superficie externamente lisa y sin relieves (Figura 6-1). En cambio, los ovarios maduros presentaron cuerpos lúteos y blancos sobre su superficie (Figura 6-2). Los ovarios inmaduros presentaron en su interior folículos primarios unilaminales y multilaminales, secundarios en crecimiento y folículos de de Graff o atrésicos (Figuras 6-3 y 6-4).

En cuanto a los machos, la determinación del estado de madurez sexual no pudo realizarse mediante la observación directa externa de las gónadas ya que éstas no se diferencian macroscópicamente (Figuras 6-5) haciendo necesario realizar cortes histológicos. Los machos inmaduros presentaron túbulos seminíferos, en general, de forma circular en su sección transversal, densamente empaquetados en tejido intersticial (Figura 6-6 A). En los túbulos seminíferos con un lúmen tubular pequeño o en aquellos que estaban completamente cerrados predominaron las espermatogonias sobre las paredes internas, característica propia de los mamíferos (Figuras 6-6 C). Los machos maduros, se observaron túbulos más elongados y menos empaquetados (Figura 6-7 B); con espermátidas en diferentes estadios de maduración en su interior (Figuras 6-7 B y E-F).

El macho inmaduro de mayor tamaño presentó una talla de 135,2 cm, un peso de 23,0 kg y 3,0 años de edad, por su parte el macho maduro más pequeño en tamaño ostentó una talla de 119,3 cm, 16,5 kg y 5 años de edad. Los machos cuyos valores de talla, peso y edad fueron mayores a 121,8 cm, 18,5 kg y 3,2 años, respectivamente, resultaron sexualmente maduros por este método (límite inferior del IC 95%).

Figura 6-1: Aspecto externo de los ovarios de una hembra inmadura. Escala 1 cm.

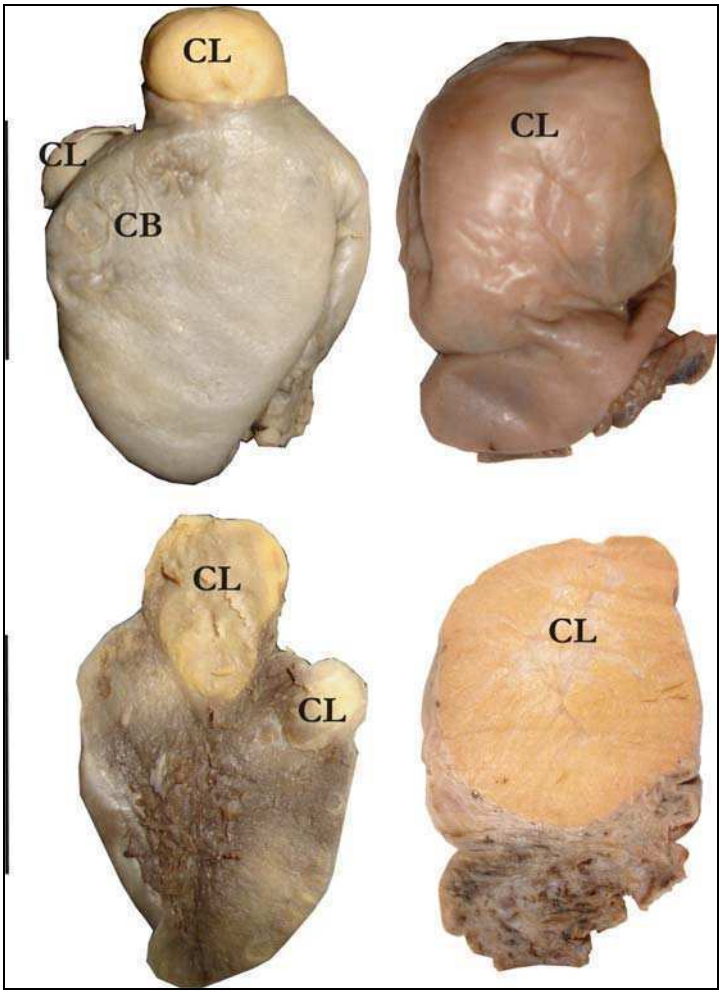


Figura 6-2: Aspecto macroscópico externo e interno de ovarios maduros de ejemplares de delfín franciscana. Las marcas sobre la superficie representan, cuerpos lúteos (CL) y blancos (CB). Escala 2 cm.

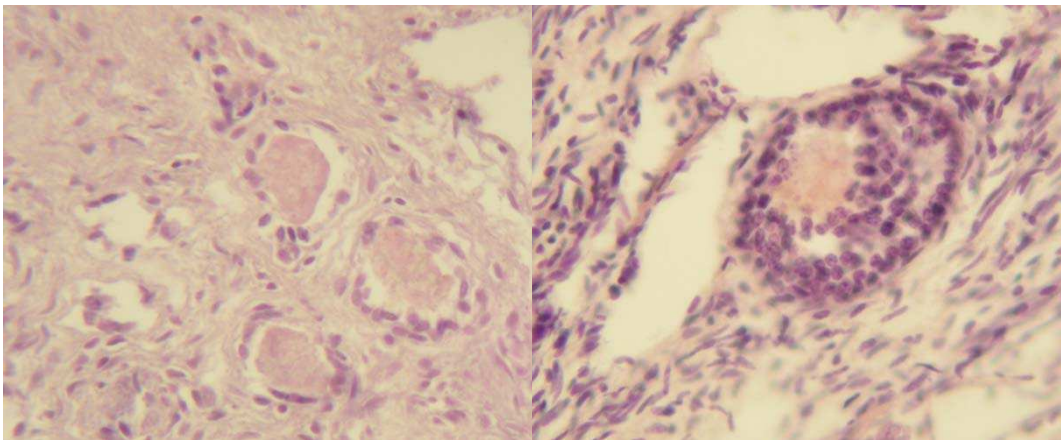


Figura 6-3: Folículos primarios: unilaminar (izquierda) y multilaminar (derecha). Aumento 200X. Cortes histológicos de 6 micrones teñido con hematoxilina-eosina.

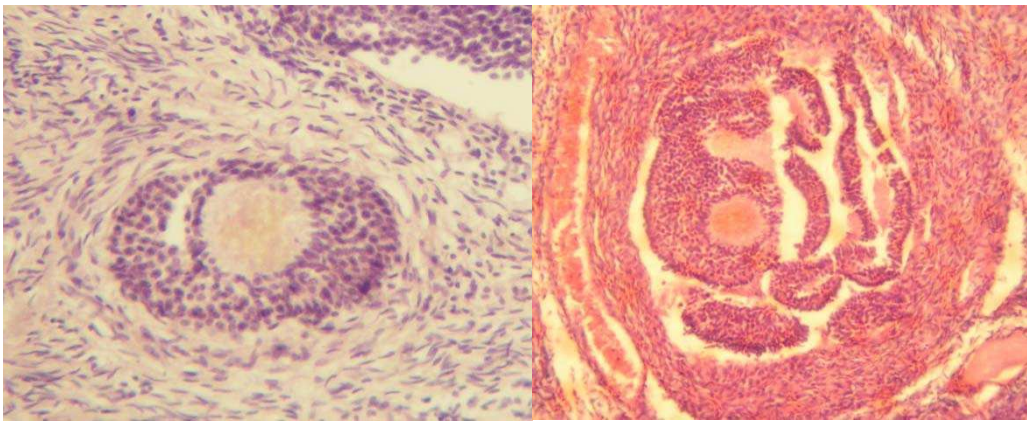


Figura 6-4: Folículo secundario (izquierda) y folículo atrésico (derecha) a un aumento de 100X. Cortes histológicos de 6 micrones teñido con hematoxilina-eosina.

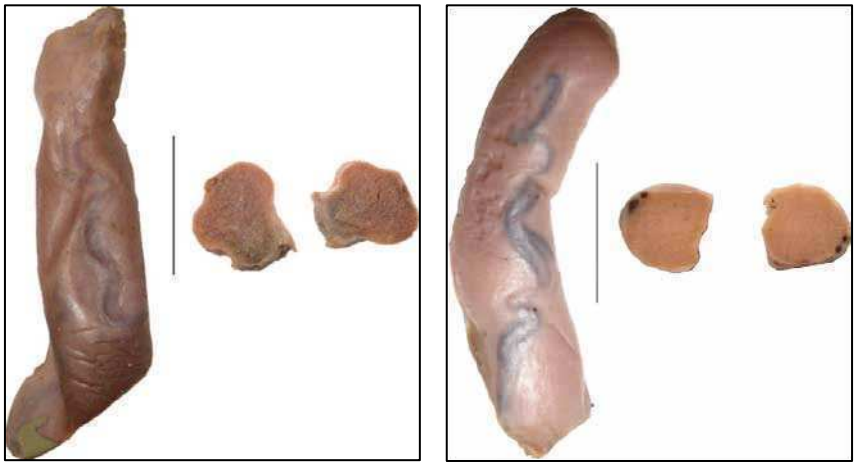


Figura 6-5: Aspecto externo e interno de un testículo inmaduro (derecha) y maduro (izquierda) de ejemplares de delfín franciscana. Escala 1 cm.

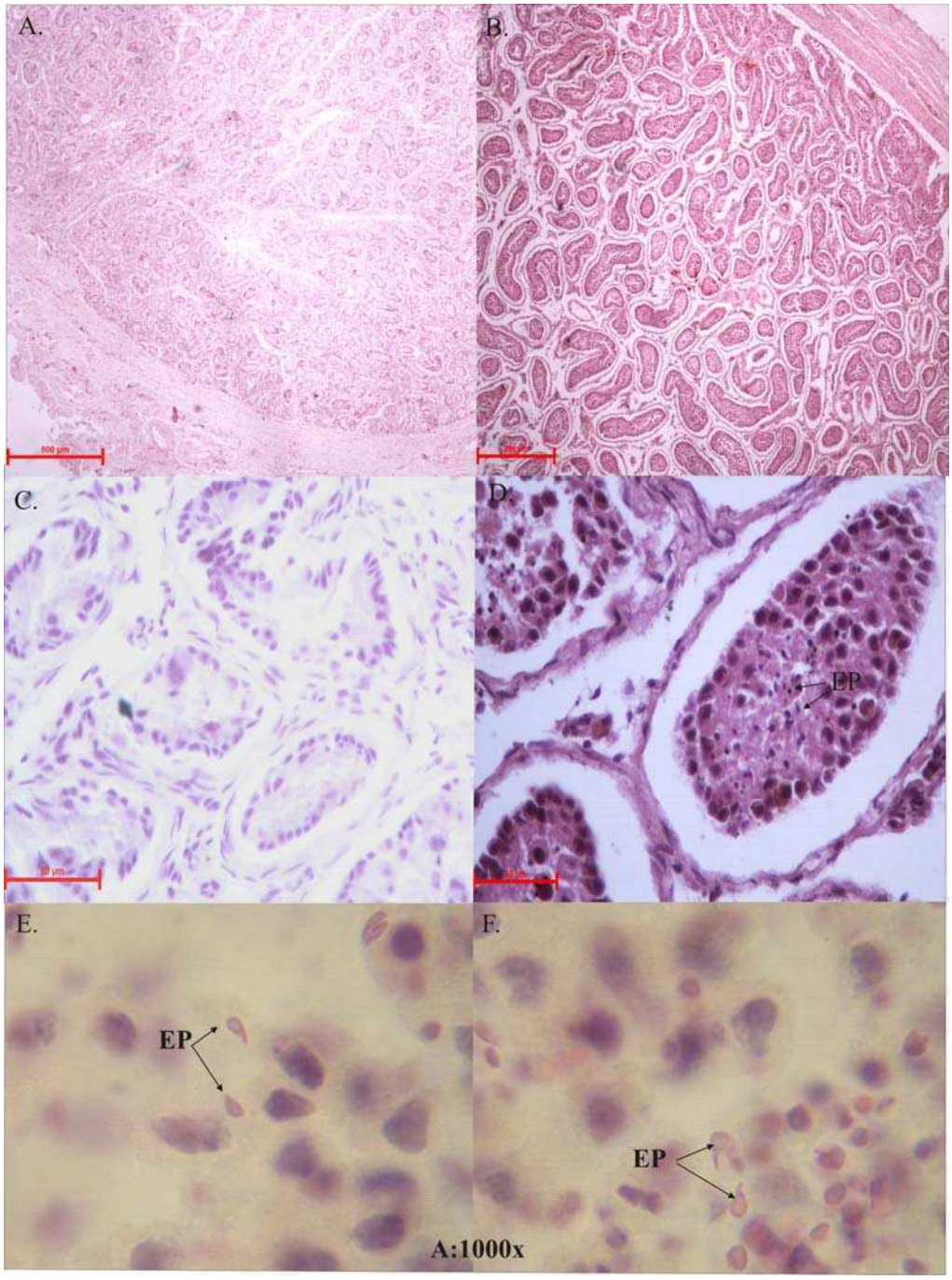


Figura 6-6: Aspecto general del corte histológico de un testículo inmaduro (A y C) y maduro (B y D). Escala 500 µm (A-B) y 50 µm (C-D). Se puede observar la mayor cantidad de tejido intersticial y el menor tamaño de los túbulos seminíferos del individuo inmaduro (A-C) respecto al maduro (B-D). Las figuras E y F muestran en detalle espermátidas (EP) en diferentes estadios de maduración en un de testículo maduro.

La Tabla 6-2 A resume los valores medios de los dos grupos de madurez según el método histológico.

Las hembras, por su parte, presentaron los valores más altos en las tres variables analizadas. La hembra inmadura de mayor tamaño presentó una talla de 147,0 cm, 32,2 kg de peso y 4 años de edad, mientras que la madura más pequeña mostró una talla de 142,0 cm, un peso de 26,9 kg y 4 años de edad y estaba preñada al momento de ser capturada (Tabla 6-2 B). Las hembras que presentaron valores de talla, peso y edad mayores a 139,2 cm, 25,3 kg y 1,6 años, respectivamente, resultaron maduras sexualmente por este método (límite inferior del IC 95%).

La hembra madura más grande presentó una talla de 160,5 cm y 8 años de edad, a su vez esta hembra fue la que presentó más cantidad de cuerpos de ovulación en el ovario derecho: 6 cuerpos blancos y dos lúteos. La misma hembra estaba amamantando al momento de ser capturada (Figura 6-7).

Figura 6-7: Hembra madura capturada accidentalmente en la costa de Claromecó. Este espécimen fue el de mayor tamaño muestreada (160,5 cm).

Tabla 6-2: Talla, peso y edad de delfines machos (A) y hembras (B), según el estado de madurez sexual estimado por el método histológico.

A.		Grupo de madurez	
		Inmaduros	Maduros
Talla (cm) n= 25	Media	109,49	126,48
	DE	15,19	6,07
	Min	81,50	119,30
	Max	135,20	136,00
Peso (kg) n= 24	Media	17,71	21,60
	DE	5,41	3,74
	Min	5,80	16,53
	Max	23,00	29,00
Edad (años) n= 24	Media	1,60	4,56
	DE	1,24	1,74
	Min	0,00	2,00
	Max	4,00	7,00

B.		Grupo de madurez	
		Inmaduras	Maduras
Talla (cm) n= 14	Media	122,40	152,75
	DE	16,49	8,49
	Min	100,00	142,00
	Max	147,00	160,50
Peso (kg) n= 14	Media	24,47	36,21
	DE	5,79	6,84
	Min	15,80	26,85
	Max	32,20	43,19
Edad (años) n= 14	Media	2,60	5,00
	DE	1,78	2,16
	Min	1,00	3,00
	Max	5,00	8,00

Morfometría gonadal

Machos

Los testículos del delfín franciscana se caracterizaron por su pequeño tamaño (%PRT= 0,02), aún en ejemplares maduros.

Las gónadas estudiadas resultaron simétricas, es decir, todas las medidas tomadas sobre los testículos (peso, largo, ancho y espesor) fueron similares en ambos (Wilcoxon: Peso: p= 0,88; Largo: p= 0,69; Ancho: p= 0,48; Espesor: p= 0,90). En aquellos casos donde sólo fue posible recuperar uno de los dos testículos se asumió que las medidas del testículo faltante eran iguales a las del testículo obtenido. La Tabla 6-3 resume los valores medios de las medidas tomadas sobre los testículos recuperados.

Todas las variables morfométricas gonadales analizadas resultaron ser significativamente diferentes entre los individuos inmaduros y maduros (Mann-Whitney: PTM p= 0,001; IM p= 0,001; PCT p= 0,003; DMT p= 0,005; LTM p= 0,007; LCT p= 0,010; %PRT p= 0,020; ver Tabla 6-4).

El PTM y PCT fueron los parámetros que presentaron menor solapamiento entre los valores de los dos grupos de madurez. El IC 95% para el PTM fue 0,83 – 1,23 gr y 2,62 – 6,39 gr para los inmaduros y maduros respectivamente. Mientras que el IC 95% del PCT de los ejemplares inmaduros varió entre 1,62 – 3,07 gr y el de los maduros entre 5,24 – 12,79 gr.

Contrariamente a lo observado con los parámetros de peso testicular, el largo combinado de testículo (LCT) y el largo testicular medio (LTM) presentaron un gran solapamiento entre los rangos de ambos grupos de madurez. El LCT presentó un IC 95% entre 5,81 – 6,74 cm y 7,73 – 10,20 cm, para los ejemplares inmaduros y los maduros, respectivamente.

El LTM presentó un rango de solapamiento menor entre 4,92 y 7,01 cm y su IC 95% para los individuos inmaduros varió entre 2,90 – 3,34 cm, mientras que para el grupo de los ejemplares maduros este rango estuvo entre 3,99 y 5,09 cm.

El rango de solapamiento del DMT entre los dos grupos de madurez fue de 0,32 a 1,58 cm, mientras que el IC 95% para los inmaduros estuvo entre 0,45 y 0,76 cm y entre 0,85 y 1,32 cm para los maduros. El rango del %PRT fue entre 0,01 y 0,11. El valor más bajo de %PRT fue de 0,007 y el más alto 0,070, perteneciendo éste ultimo al ejemplar más longevo de la muestra analizada (13 años).

El índice de madurez (IM) presentó un rango de solapamiento de 0,04 – 0,11, generado sólo por tres ejemplares, y el IC 95% varió entre 0,03 – 0,04 y 0,07 – 0,12 para los inmaduros y maduros respectivamente. El valor más bajo fue de 0,008 y el más alto 0,180, que nuevamente correspondió al ejemplar más longevo.

Las relaciones entre la talla y los parámetros medidos que presentaron los valores del coeficiente de correlación ≥ 0,70 en orden descendente, fueron PTM (R_{sp}= 0,77, p< 0,001), PCT (R_{sp}= 0,74, p< 0,001), IM (R_{sp}= 0,73, p< 0,001) y LTM (R_{sp}= 0,71, p< 0,001). Para el DMT se observó una relación con la talla significativa aunque su valor del coeficiente de correlación de Spearman (R_{sp}= 0,48, p= 0,01) estuvo entre los menores encontrados junto con el PRT (R_{sp}= 0,52, p= 0,001).

La relación entre los parámetros morfométricos gonadales con la edad y la talla, mostró que hay un aumento de los valores de todos ellos a partir de los 4 años de edad y 125 cm de talla (aproximadamente) de los ejemplares analizados (Figs. 6-8 a 6-14).

Tabla 6-3: Peso, longitud, ancho y espesor de los testículos recuperados de las carcasas de los delfines franciscana accidentalmente capturados.

Estadística	PTD (gr)	PTI (gr)	LTD (cm)	LTI (cm)	ATD (cm)	ATI (cm)	ETD (cm)	ETI (cm)
Media	2,22	2,32	3,65	3,64	0,91	0,99	0,63	0,63
DE	2,16	2,90	0,97	1,04	0,49	0,62	0,32	0,31
Mínimo	0,20	0,20	2,02	2,05	0,07	0,06	0,06	0,06
Máximo	10,00	16,00	6,53	7,49	2,00	3,54	1,32	1,35
n	37	37	38	38	35	35	33	33

Tabla 6-4: Parámetros morfométricos gonadales evaluados según el estado de madurez sexual de los delfines machos. Todos los parámetros morfométricos gonadales analizaron resultaron significativamente diferentes entre los individuos inmaduros (I) y maduros (M).

Madurez	Variables	Media	DE	Mínimo	Máximo	n
	DMT (cm)	0,62	0,33	0,06	1,58	22
	PCT (gr)	2,49	1,83	0,40	8,70	24
	LCT (cm)	6,40	1,16	4,48	9,00	25
I	IM	0,04	0,02	0,01	0,11	25
	% PRT	0,01	0,01	0,00	0,06	24
	PTM (gr)	1,17	0,54	0,20	2,50	20
	LTM (cm)	3,13	0,52	2,24	4,50	25
	DMT (cm)	1,09	0,39	0,37	1,95	13
	PCT (gr)	9,28	6,45	2,60	26,00	13
	LCT (cm)	9,16	2,23	4,50	14,02	13
M	IM	0,09	0,04	0,04	0,19	12
	% PRT	0,04	0,02	0,01	0,07	13
	PTM (gr)	4,51	3,12	1,30	13,00	13
	LTM (cm)	4,63	0,93	3,10	7,01	13

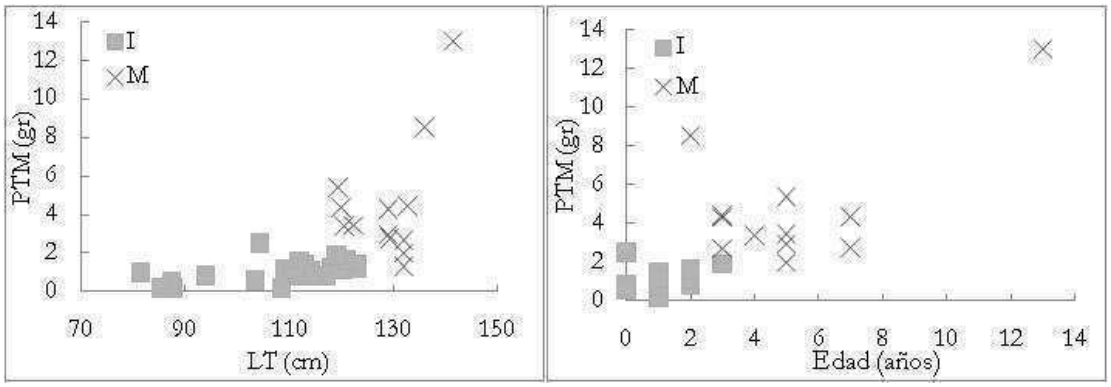


Figura 6-8: Relación entre la talla (LT) ó la edad con el peso testicular medio (PTM) para machos de delfín franciscana. I: inmaduros, M: maduros.

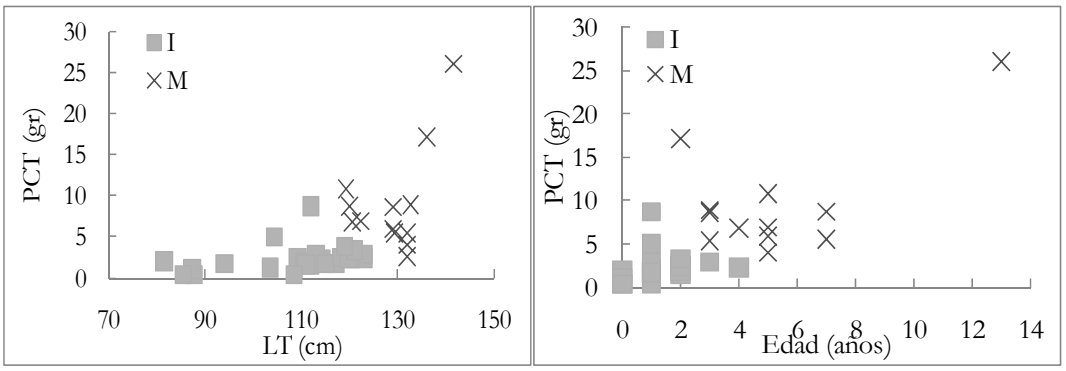


Figura 6-9: Relación entre la talla (LT) ó la edad con el peso combinado de testículos (PCT) para machos de delfín franciscana. I: inmaduros, M: maduros.

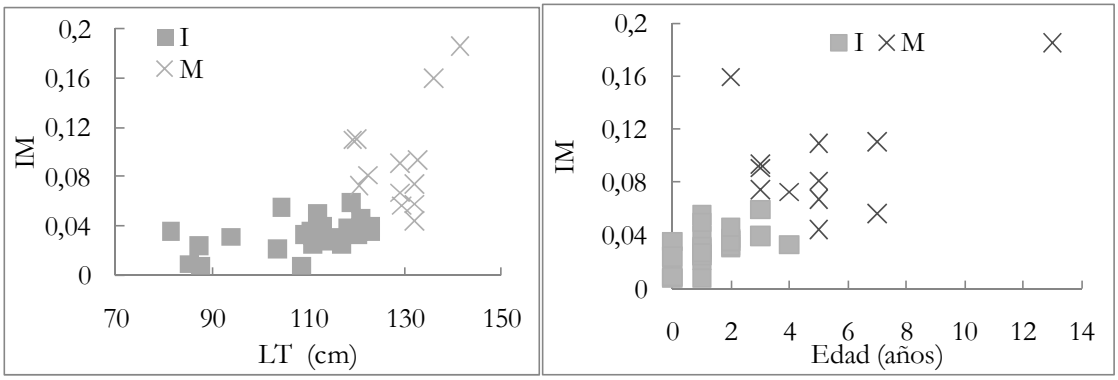


Figura 6-10: Relación entre la talla (LT) ó la edad con el índice de madurez (IM) para machos de delfín franciscana. I: inmaduros, M: maduros.

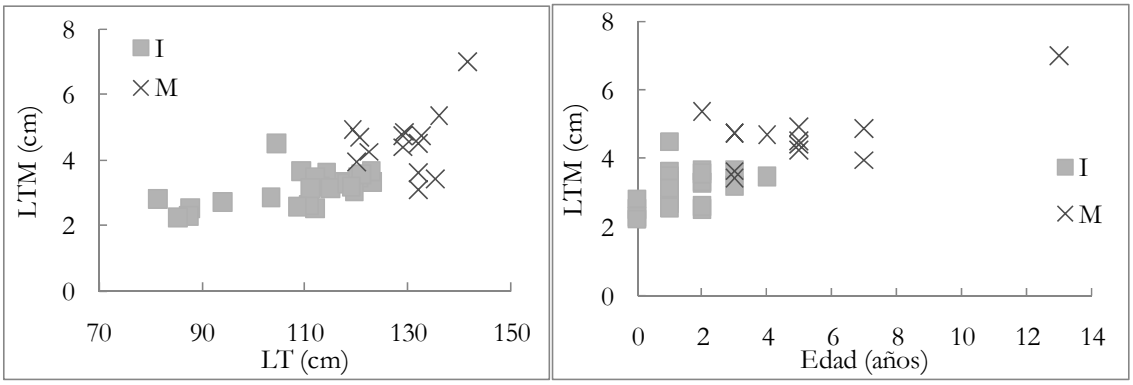


Figura 6-11: Relación entre la talla (LT) ó la edad con el largo medio testicular (LMT) para machos de delfín franciscana. I: inmaduros, M: maduros.

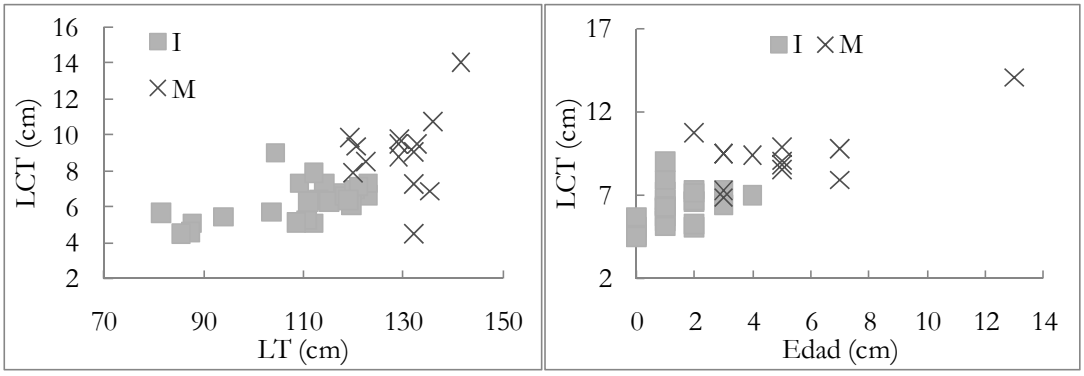


Figura 6-12: Relación entre la talla (LT) ó la edad con el largo combinado testicular (LCT) para machos de delfín franciscana. I: inmaduros, M: maduros.

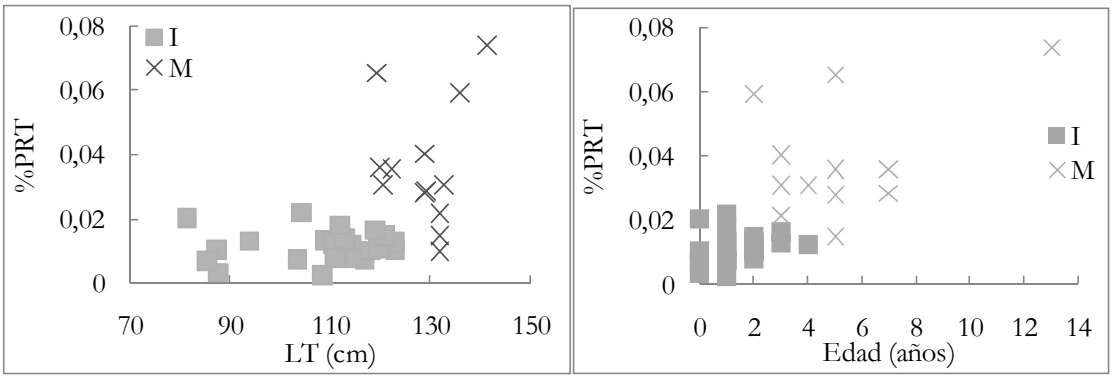


Figura 6-13: Relación entre la talla (LT) ó la edad con el peso relativo testicular (%PRT) para machos de delfín franciscana. I: inmaduros, M: maduros.

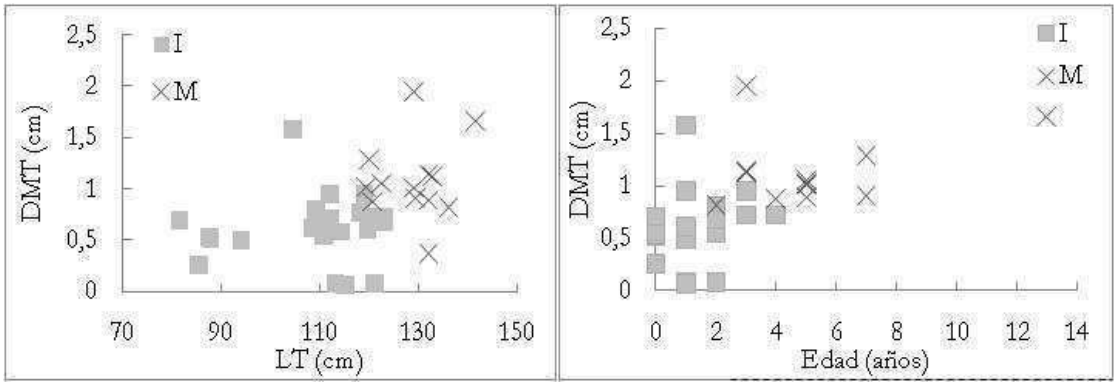


Figura 6-14: Relación entre la talla (LT) y la edad con el diámetro medio testicular (%DMT) para machos de delfín franciscana. I: inmaduros, M: maduros.

Hembras

Al igual que en los machos, los ovarios resultaron ser simétricos en cuanto a su peso, largo, ancho y espesor (Wilcoxon: Peso: p= 0,81; Largo: p= 0,70; Ancho: p= 0,33; Espesor: p= 0,11, Tabla 6-5). En consecuencia, se procedió de igual manera que como se hizo con los machos (con los ovarios inmaduros). Se calcularon los valores de peso, largo, ancho y espesor medios y combinados. Para el cálculo de los parámetros en las maduras se usaron únicamente las medidas del ovario más pesado.

Del total de hembras recuperadas (n= 27) fue posible analizar la morfometría gonadal de un máximo de entre 20 y 24 gónadas según la variable medida.

Los valores de los parámetros morfométricos ováricos se detallan en la Tabla 6-6. Todas las variables morfométricas gonadales analizadas, excepto el LCO, resultaron ser estadísticamente mayores en los individuos maduros respecto a los inmaduros (Mann-Whitney: IM p< 0,001; PCO p< 0,001; LCO p= 0,790; %PRO p< 0,001).

El PCO fue el parámetro con mayor coeficiente de correlación de Spearman (R_{sp}= 0,93, p< 0,001) y menor solapamiento de los valores entre los dos grupos de madurez con la talla y edad de los ejemplares (Figs 6-15 a 6-18). Todas las hembras cuyo valor de PCO fue mayor a 4,02 gr resultaron maduras sexualmente (límite inferior del IC 95%). Este parámetro fue seguido por el IM (R_{sp}= 0,90, p< 0,001) y el %PRO (R_{sp}= 0,82, p< 0,001). En todas las hembras se observó un aumento de los valores de los parámetros morfométricos gonadales a partir de los 3 años de edad y una talla cercana a los 140 cm.

En relación a las cicatrices de ovulación, se encontró igual cantidad de cuerpos lúteos y blancos (seis) en ambos ovarios, pero varió la distribución de ellos entre los dos ovarios. La totalidad de los cuerpos blancos estuvieron en el ovario derecho de la hembra de mayor tamaño muestreada (160,5 cm), mientras que los cuerpos lúteos se repartieron en igual proporción entre los dos ovarios.

Tabla 6-5: Peso, longitud, ancho y espesor de los ovarios recuperados de las carcasas de los delfines franciscana accidentalmente capturados.

Estadística	POD (gr)	LOD (cm)	AOD (cm)	EOD (cm)	POI (gr)	LOI (cm)	AOI (cm)	EOI (cm)
Media	1,27	1,70	0,85	0,52	1,13	1,71	0,92	0,50
DE	2,02	0,59	0,51	0,29	1,64	0,68	0,56	0,28
Mínimo	0,10	0,89	0,07	0,03	0,10	0,95	0,07	0,04
Máximo	7,10	3,21	2,30	1,20	6,00	3,94	2,44	1,20
n	23	25	24	20	23	25	24	20

Tabla 6-6: Parámetros morfométricos gonadales evaluados según el estado de madurez sexual de los delfines hembras. Todos los parámetros morfométricos gonadales analizaron resultaron significativamente diferentes entre los individuos inmaduros (I) y maduros (M), con excepción de LCO.

		PCO	LCO	POM	LOM	%PRO	IM
I	Media	0,80	2,97	0,40	1,49	0,00	0,22
	DE	0,67	0,60	0,34	0,30	0,00	0,17
	Min	0,20	1,89	0,10	0,95	0,00	0,00
	Max	2,20	3,92	1,10	1,96	0,01	0,60
	n	18	20	18	20	20	20
M*	Media	5,88	2,63	5,88	2,63	0,02	2,57
	DE	1,07	1,16	1,07	1,16	0,00	1,19
	Min	4,50	1,38	4,50	1,38	0,01	1,52
	Max	7,10	3,94	7,10	3,94	0,02	4,28
	n	4	4	4	4	4	4

*para las hembras maduras sólo se tuvo en cuenta las variables del ovario más pesado.

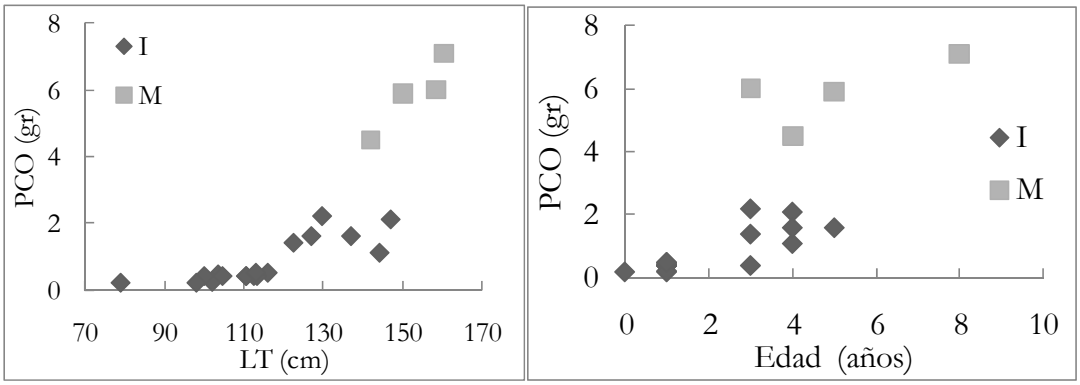


Figura 6-15: Relación entre la talla (LT) ó la edad con el peso combinado de ovarios (PCO) del delfín franciscana. I: inmaduras, M: maduras.

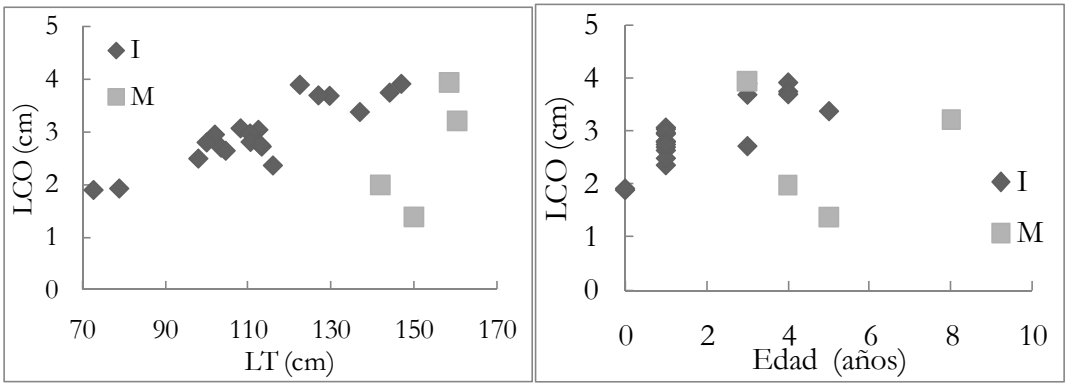


Figura 6-16: Relación entre la talla (LT) ó la edad con el largo combinado de ovarios (LCO) del delfín franciscana. I: inmaduras, M: maduras.

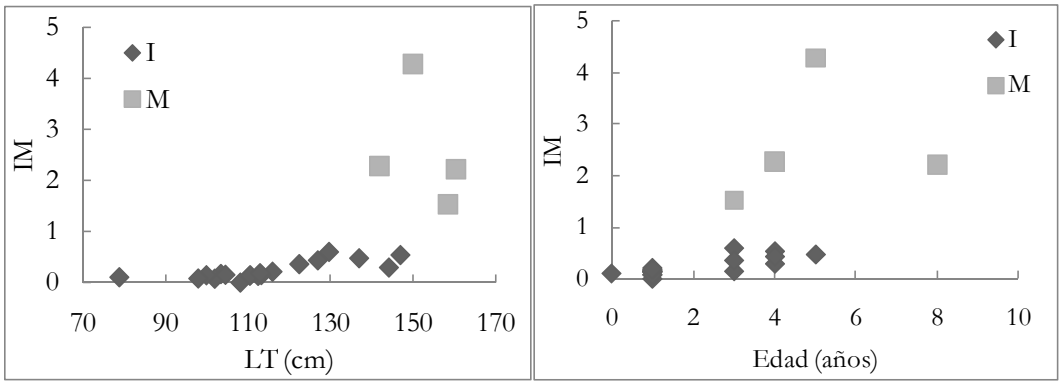


Figura 6-17: Relación entre la talla (LT) ó la edad con el índice de madurez (IM) del delfín franciscana. I: inmaduras, M: maduras.

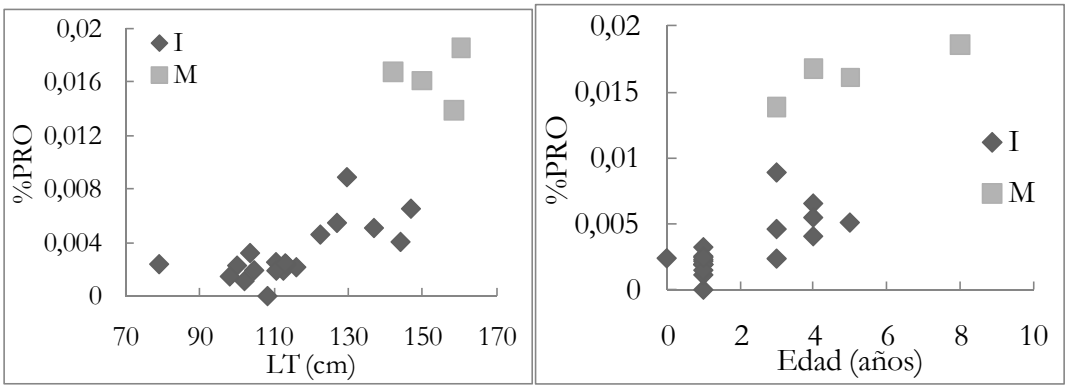


Figura 6-18: Relación entre la talla (LT) ó la edad con el peso relativo de ovarios (%PRO) del delfín franciscana. I: inmaduras, M: maduras.

Se realizó un análisis de la morfometría de las gónadas en función de la presencia de cuerpos lúteos y blancos. Del análisis se desprendieron los siguientes resultados:

Intervalo de edad de hembras sin cuerpos lúteos o blancos	0-5 años
Hembra más joven con cuerpos de ovulación	3 años
Hembra más vieja con cuerpos de ovulación	8 años
Hembra más joven preñada	3 años
Hembra más vieja preñada	8 años
Hembra más vieja muestreada	8 años

Método morfométrico corporal

A partir del análisis morfométrico corporal en base a la aplicación de los rangos de edad, talla y peso obtenidos por Kasuya y Brownell (1979), fue posible agrupar a los individuos en grupos de madurez. Tanto las hembras como los machos fueron divididos en dos grupos: inmaduros (I) y maduros (M). Para los análisis morfométricos se contó con 42 - 44 machos y 28 - 29 hembras. Los ejemplares inmaduros, tanto machos como hembras, de mayor tamaño presentaron una talla de 129,3 y 132,0 cm y 7 y 5 años de edad, respectivamente. Los maduros más pequeños; presentaron una talla de 132,0 cm y 3 años de edad, los machos y 140,0 cm y 6,0 años de edad, las hembras. Los individuos más jóvenes en alcanzar la madurez sexual presentaron dos y tres años de edad para los machos y hembras, respectivamente (Tabla 6-7). Todas las variables tenidas en cuenta en este apartado fueron mayores en las hembras respecto de los machos.

Del total de hembras maduras, cuatro se encontraron preñadas y una amamantando. En relación a ésta hembra, fue posible examinar las glándulas mamarias llenas de leche en toda su extensión (Figura 6-20). Las glándulas presentaron una longitud total de 31,5 cm (derecha) y 30,0 cm (izquierda), color rosado pálido y apariencia de bolsas ovoides. Se extendían desde la hendidura mamaria hasta el ombligo aproximadamente, con una consistencia firme y forma definida.

Entre el método histológico y el morfométrico corporal, basado en los rangos de edad, talla y peso obtenidos por Kasuya y Brownell (1979), se encontró una discrepancia en la

determinación del estado de madurez en dos hembras y nueve machos. La discrepancia surgió al determinar cómo inmaduro a individuos que a través de la observación de los cortes histológicos gónadales resultaron sexualmente maduros. En función de esta discrepancia, los valores medios de talla y peso de los machos, obtenidos por el método morfométrico corporal en base a la comparación de los resultados de Kasuya y Brownell (1979), fueron estadísticamente mayores a la de aquellos obtenidos por el método histológico (Kruskal-Wallis: Talla p= 0,010; Peso p= 0,001). Los machos cuya talla, peso y edad fueron mayores a 132,44 cm, 23,86 kg y 1,87 años, según los límites inferiores del IC 95%, se determinaron como sexualmente maduros. Las hembras cuya talla fue mayor a 143,83 cm con un peso y edad mayores a 30,16 kg y 3,85 años fueron sexualmente maduras.

Tabla 6-7: Talla, peso y edad de delfines machos (A) y hembras (B), según el estado de madurez sexual estimado por el método morfométrico corporal.

		Grupo de madurez	
A.		Inmaduros	Maduros
Talla (cm) n= 44	Media	112,88	135,04
	DE	13,02	3,38
	Min	81,50	132,00
	Max	129,30	141,50
Peso (kg) n= 44	Media	18,85	27,96
	DE	4,57	3,54
	Min	5,80	23,00
	Max	24,40	35,20
Edad (años) n= 42	Media	2,26	5,00
	DE	1,88	3,74
	Min	0,00	2,00
	Max	7,00	13,00

…continuación

B.		Grupos de Madurez	
		Inmaduros	Maduros
Talla (cm) n= 29	Media	111,80	150,60
	DE	18,21	6,81
	Min	72,70	142,00
	Max	147,00	160,50
Peso (kg) n=28	Media	21,25	37,34
	DE	8,59	9,63
	Min	3,58	26,85
	Max	42,50	52,00
Edad (años) n=29	Media	1,86	5,29
	DE	1,64	1,98
	Min	0,00	3,00
	Max	6,00	8,00

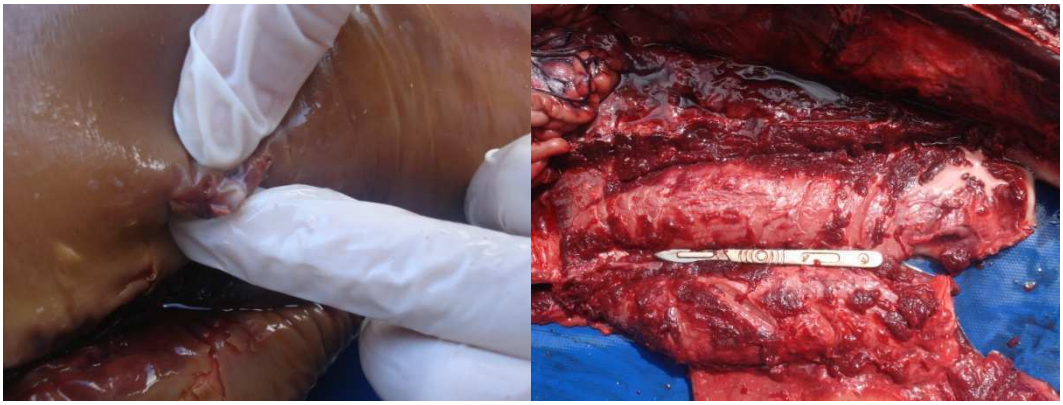


Figura 6-19: Hembra madura. Izquierda: leche brotando desde la hendidura de la glándula mamaria. Derecha: aspecto de las glándulas mamarias.

Método Multivariado descriptivo: Análisis de cluster

Del análisis de cluster se desprendieron 2 grupos de madurez para ambos sexos, con más del 50% de distancia de unión. Para los machos el método con el que se obtuvo el valor más alto de correlación cofenética (0,66) fue el método del vecino más lejano o de ligamiento completo mientras que para las hembras el método más apropiado fue el de Ward (correlación cofenética=0,71). Los grupos resultantes fueron inmaduros (I) y maduros (M). La Tabla 6-8 muestra los valores medios, desvío estándar (DE) y rangos de la

talla, peso y edad correspondientes a cada grupo de madurez y la Figura 6-20 muestra los dendogramas obtenido del análisis de cluster.

La estimación del estado de madurez obtenida por el método histológico y morfométrico multivariado discreparon en la estimación del estado de madurez sexual en 5 ejemplares machos y 4 hembras. Los valores medios de talla, peso y edad de los ejemplares de cada grupo de madurez correspondientes a las hembras no variaron significativamente entre los tres métodos (Kruskal-Wallis: I Talla: p= 0,95; Peso: p= 0,95; Edad: p= 0,98; M Talla: p= 0,50; Peso: p= 0,97; Edad: p= 0,94). Lo mismo ocurrió con los machos (Kruskal-Wallis: I Talla: p= 0,62, Peso: p= 0,77; Edad: p= 0,62; M Talla: p= 0,11, Peso: p= 0,27, Edad: p= 0,84).

Según este método multivariado el ejemplar macho inmaduro más longevo presentó siete años de edad y 120,0 cm y 24,1 kg, mientras que el maduro más pequeño presentó dos años de edad, 127,5 cm y 23,3 kg de peso. Los ejemplares cuya talla, peso y edad son mayores o iguales a 130,42 cm, 22,19 kg y 2,82 años fueron considerados maduros por el método morfométrico de cluster. Por su lado, la hembra inmadura de mayor tamaño presentó una talla de 129,7 cm y 3 años. La hembra madura más pequeña ostentó 137,0 cm y 5,0 años de edad. Por el método multivariado las hembras fueron consideradas sexualmente maduras a partir de una talla, peso y edad de 141,56 cm, 15,85 kg y 3,85 años.

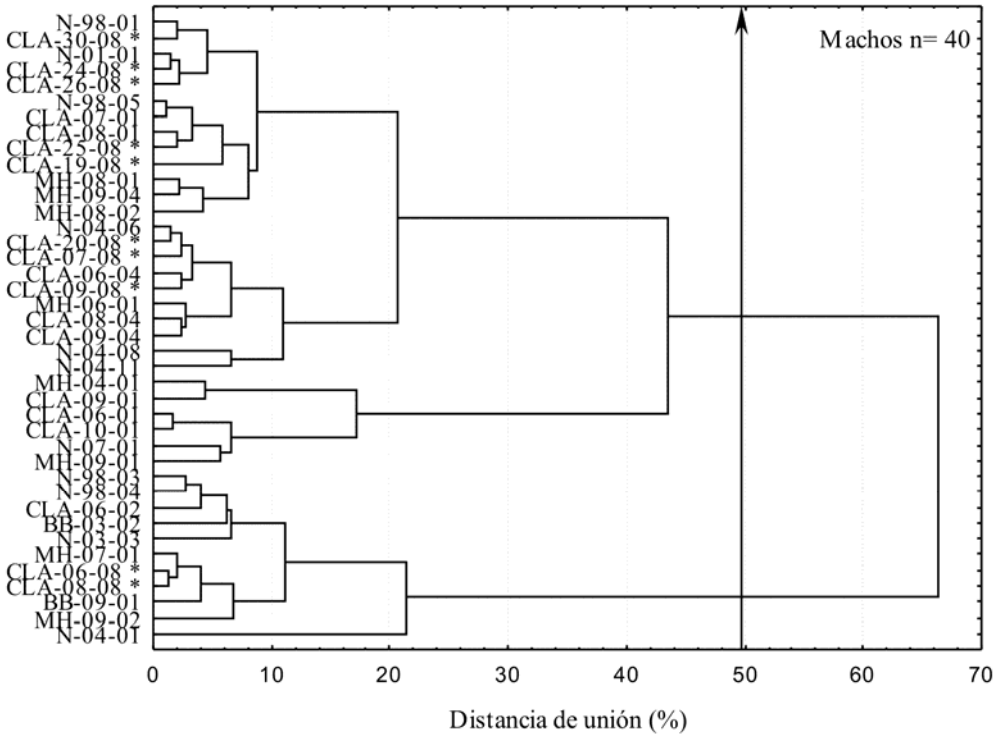
Del análisis combinado del método multivariado e histológico se estimó que los machos de la especie *P. blainvillei* del sur de la provincia de Buenos Aires pueden ser considerados sexualmente maduros a partir de una talla, peso y edad igual o superior a 126,47 cm, 21,34 kg y 3,45 años de edad (valores del límite inferior del IC 95 %) y sus valores medios fueron de 129,78 (± 6,44) cm, 23,89 (± 4,60) kg y 4,94 (± 2,79) años. Los ejemplares inmaduros presentaron una talla media de 110,32 (± 12,90) cm, un peso de 18,42 (± 4,89) kg y una edad de 1,79 (± 1,59) años. Del mismo análisis se desprenden los siguientes resultados para las hembras: 143,13 cm, 31,13 kg y 3,81 años (valores del límite inferior del IC 95 %). Sus

respectivos valores medios fueron 150,02 (± 7,50) cm, 39,89 (± 8,34) kg y 5,57 (± 1,90) años.

Tabla 6-8: Parámetros morfométricos y edad de los machos (A) y hembras (B).

A.		Grupo de madurez	
		Inmaduros	Maduros
Talla (cm)	Media	110,23	132,86
	DE	12,17	4,28
	Min	81,50	127,50
	Max	123,00	141,50
Peso (kg)	Media	18,43	25,53
	DE	4,78	4,53
	Min	5,80	19,26
	Max	24,40	35,20
Edad (años)	Media	1,93	4,69
	DE	1,69	3,09
	Min	0,00	2,00
	Max	7,00	13,00
n		26	13

B.		Grupos de madurez	
		Inmaduras	Maduras
Talla (cm)	Media	107,11	147,63
	DE	14,62	7,90
	Min	72,70	137,00
	Max	129,70	160,50
Peso (kg)	Media	19,02	36,69
	DE	6,57	8,27
	Min	3,58	26,85
	Max	30,50	52,00
Edad (años)	Media	1,53	5,22
	DE	1,39	1,79
	Min	0,00	3,00
	Max	5,00	8,00
n		19	9



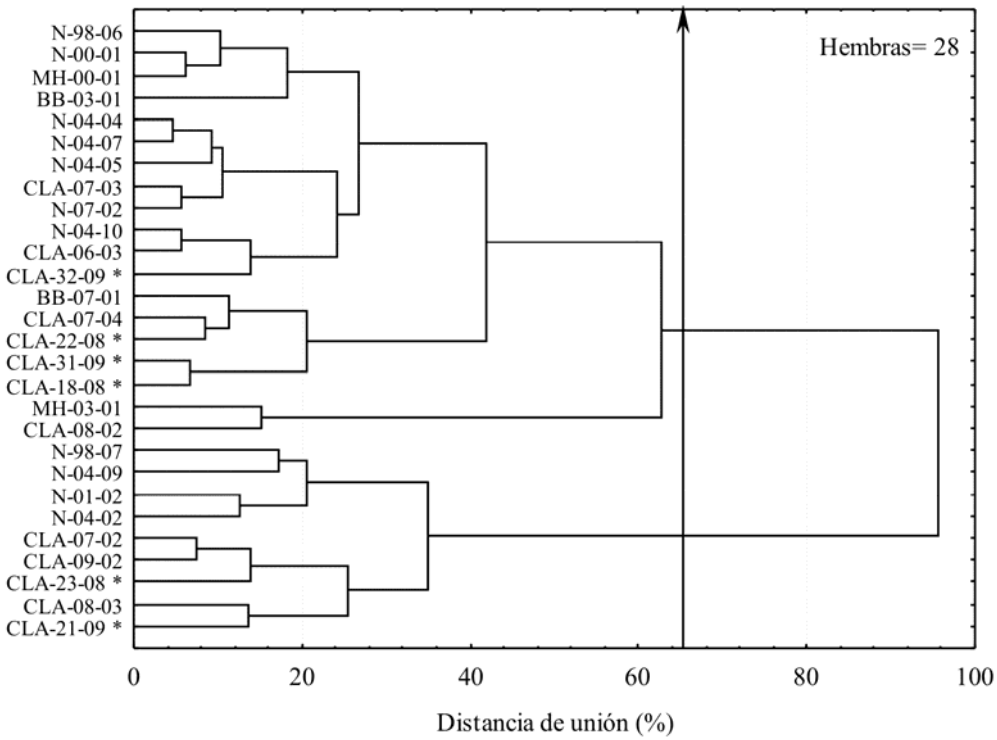


Figura 6-20: Dendograma obtenido del análisis de cluster para la determinación de los grupos de madurez sexual realizados a partir de las medidas de largo (cm), peso (kg) y edad (años). Figura superior: machos, inferior: hembras.

Determinación de la edad y talla medias de madurez sexual

El rango de tallas de machos comprendido desde los 81,5 hasta 109,0 cm y entre 0 y 1 año de edad contuvo únicamente ejemplares inmaduros, mientras que el rango de 130,0 – 141,4 cm y mayores de cinco años sólo estuvo constituido por ejemplares maduros (Figuras 6-22 y 6-23).

Para las hembras el rango de tallas que incluyó a los ejemplares desde 72,7 a 137,0 cm y desde el nacimiento hasta el primer año de edad estuvo formado por ejemplares sexualmente inmaduros en su totalidad, mientras que el rango de 150 cm y 6 años o más presentó en su totalidad ejemplares sexualmente maduros (Figuras 6-24 y 6-25).

La edad de madurez sexual estimada para los delfines machos de franciscana del sur de la provincia de Buenos Aires por el método del ajuste logístico fue: 2,92 ± 0,30 años (R^2= 57,60%, p< 0,001) y por el método de DeMaster (1978) fue de 3,54 ± 0,17 (IC95%= 2,72 - 4,36 años, Figura 6-26). Por otro lado, la talla media de madurez sexual estimada por el método logístico y de DeMaster (1979) fueron: 126,26 ± 3,97 cm (R^2= 41%, p≤0,001) y 126,19 ± 0,18 (IC 95% = 125,36 – 127,01 cm), respectivamente.

La EMS para las hembras obtenido por el método logístico y el de DeMaster (1978) fueron de 4,05±0,54 años (R^2= 47,1%, ver Figura 6-27) y 5,05 ± 0,35 (IC 95%= 3,89 - 6,21), respectivamente. Mediante el método logístico la talla de madurez se estimó en 141,97 ± 2,57 cm (R^2= 68,41%, p< 0,001), la misma variable por el método de DeMaster (1978) presentó un valor de 144,30 ± 0,60 cm (IC 95%= 142,78 – 145,82 cm).

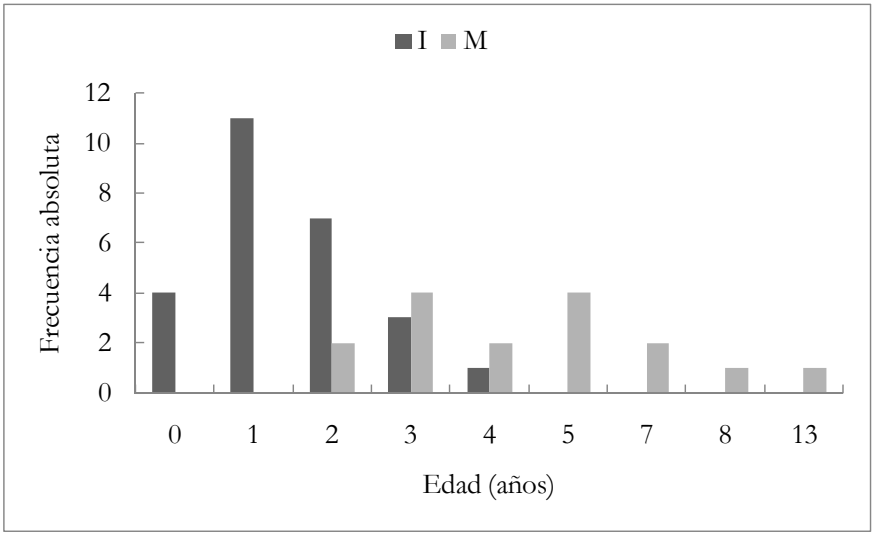


Figura 6-22: Frecuencia absoluta de machos maduros e inmaduros por clase de edad de delfines franciscana.

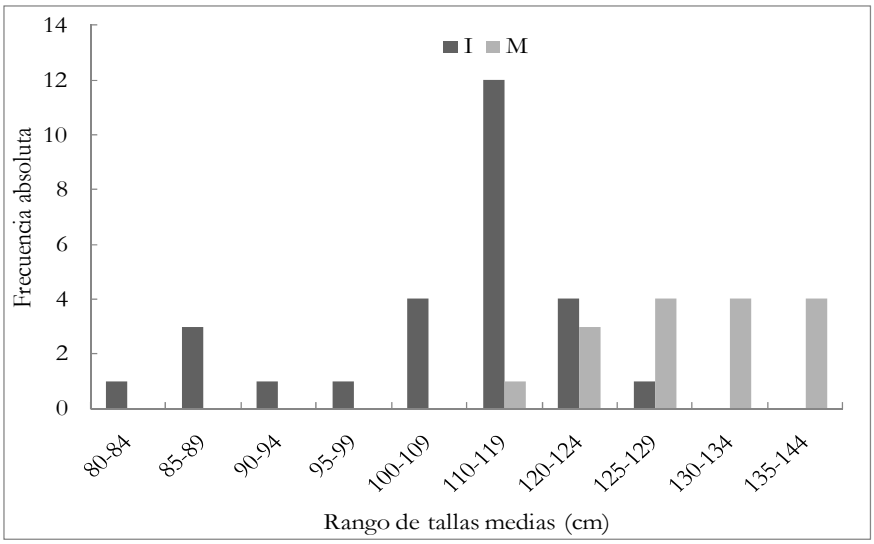


Figura 6-23: Frecuencia absoluta de machos maduros e inmaduros por rangos de tallas estudiadas en delfines franciscanas.

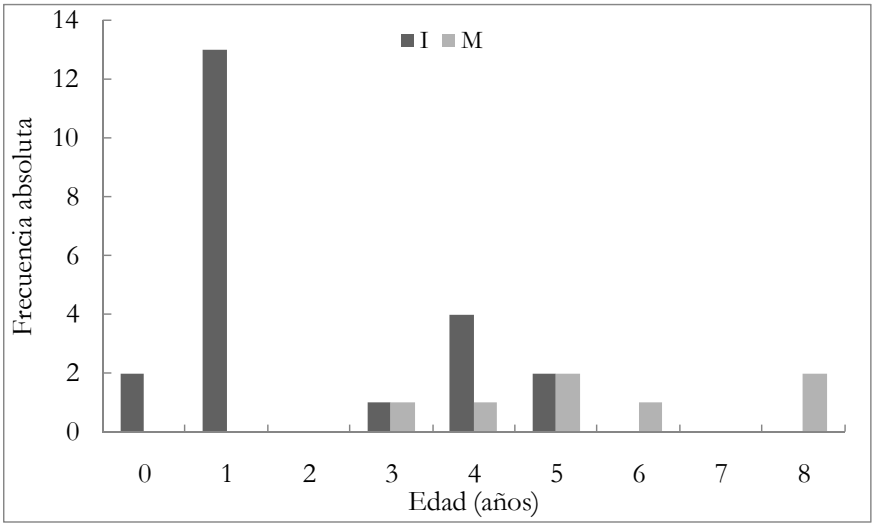


Figura 6-24: Frecuencia absoluta de hembras maduras e inmaduras clase de edad de delfines franciscanas.

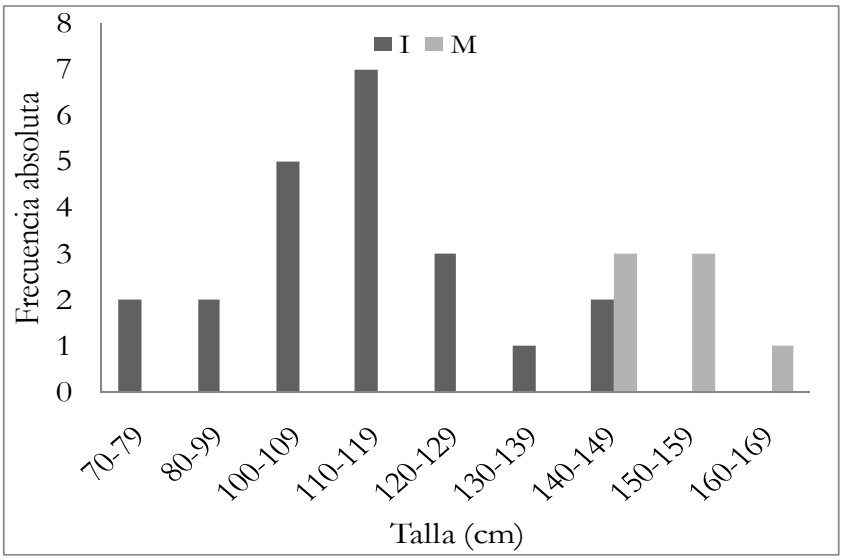


Figura 6-25: Frecuencia absoluta de hembras maduras e inmaduras por rangos de tallas estudiadas de delfines franciscanas.

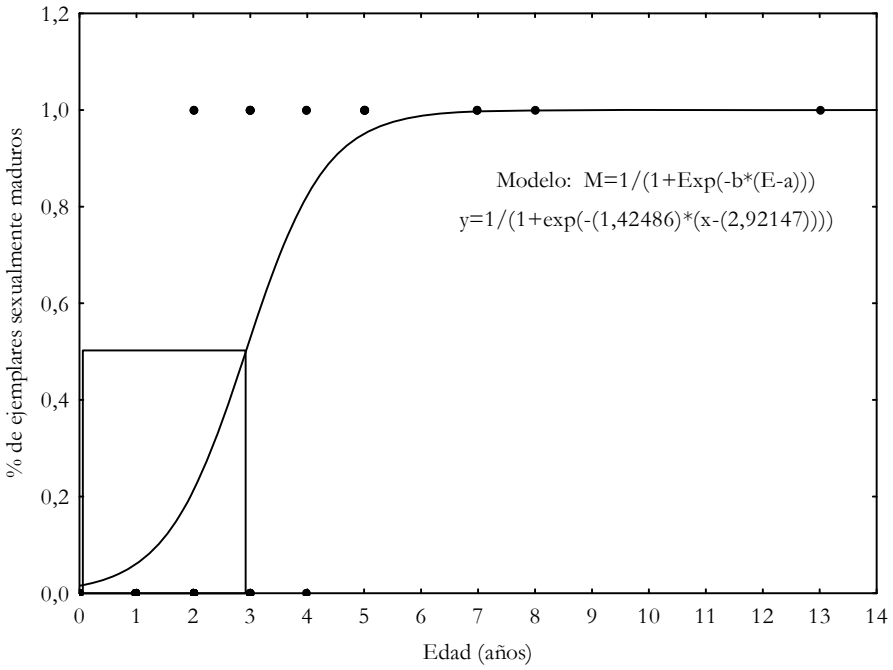


Figura 6-26: Curva sigmoidea ajustada a la función logística obtenida a partir de la edad y el estado de madurez de los ejemplares machos de franciscana. La edad en la cual el 50% de los ejemplares resultaron sexualmente maduros (Y=0,5) fue 2,92 años (EMS). R^2= 57,6 %, R= 0,76, p< 0,001.

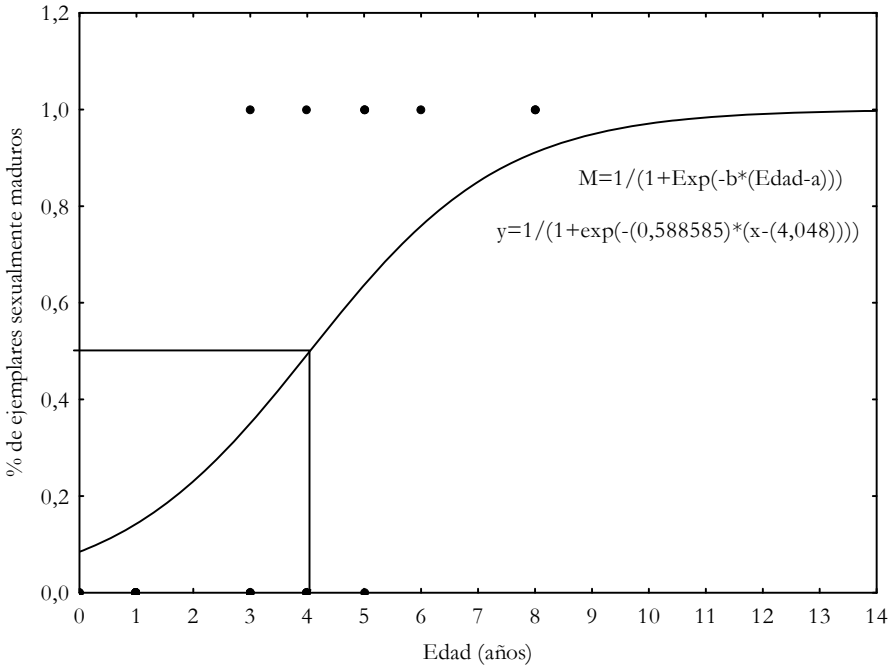


Figura 6-27: Curva sigmoidea ajustada a la función logística obtenida a partir de la edad y el estado de madurez de ejemplares hembras de franciscana. La edad en la cual el 50% de los ejemplares resultaron sexualmente maduros (Y=0,5) fue 4,05 años (EMS). R^2= 47,1%, R= 0,70, p< 0,001.

6-4 Discusión

Los ejemplares de delfín franciscana aquí analizados fueron capturados de forma accidental en redes de pesca artesanal costera o encontrados varados en las playas a lo largo del área de estudio. Los ciclos vitales de esta especie tan peculiar de delfín costero fueron exhaustivamente estudiados a lo largo de toda la costa de Brasil y Uruguay. En consecuencia, los estudios realizados hasta la actualidad en estos países resultan de gran valor para el conocimiento de su estructura poblacional y para el análisis del impacto que pueden provocar los sucesos de captura accidental y varamientos sobre la especie. Sin embargo en Argentina no existen hasta la fecha trabajos publicados donde se aborde el tema de la biología reproductiva del delfín franciscana. Consecuentemente, los resultados aquí presentados resultan de interés como primera aproximación al estudio de la biología reproductiva en Argentina, y en particular en el extremo sur de la distribución.

Establecer el estado de madurez sexual de los individuos bajo estudio es el primer paso en cualquier trabajo cuyo objetivo sea estudiar las características reproductivas o aspectos de la biología reproductiva de una especie. La mejor herramienta para establecer el estado de madurez sexual es a través del examen histológico de las gónadas (Perrin y Donovan, 1984).

Método histológico micro y macroscópico

Se confirmó para los delfines de la población del sur de la provincia de Buenos Aires, la hipótesis de simetría en la morfometría de los testículos establecida previamente para las

poblaciones de Brasil y Uruguay (Kasuya y Brownell, 1979; Danilewicz *et al.*, 2004; Botta, 2005; Bertozzi 2009).

La presencia de espermatogonias, espermatocitos I y II y espermátidas en el análisis microscópico, y la no visualización de espermatozoides, resultó similar a los resultados informados por Botta (2005). La autora analizó 80 gónadas y tampoco encontró espermatozoides. Sin embargo, sí fue posible visualizar tanto en el estudio previo como en el actual la presencia de espermátidas en avanzado estado de desarrollo.

Acerca de la simetría de los ovarios, la literatura científica nos relata que generalmente los cetáceos presentan simetría ovárica, y los folículos ovulan alternativamente en ambos ovarios en los sucesivos ciclos reproductivos (Steward y Steward, 2009). Sin embargo, dentro del grupo de los delfines existen diferentes estrategias reproductivas. Best y Silva (1984) han documentado para *Sotalia fluviatilis* que la ovulación ocurre siempre en el ovario izquierdo, lo mismo ocurre con las ballenas piloto *Globicephala melas* donde además éste ovario resultó ser de mayor tamaño que el derecho (Slijper, 1966 en Steward y Steward, 2009). En la marsopa *Phocoena phocoena* se encontró que los ovarios de los ejemplares inmaduros no eran diferentes ni en apariencia ni en tamaño, mientras que al alcanzar la madurez sexual el ovario izquierdo presentaba un incremento de tamaño respecto al derecho (Fisher y Harrison, 1970).

En el caso particular del delfín franciscana, los primeros trabajos realizados sobre aspectos reproductivos señalaron una mayor actividad del ovario izquierdo (Harrison *et al.*, 1981; Brownell 1984). Harrison y col. (1981) encontraron que el 94% de las cicatrices ováricas aparecían en el ovario izquierdo en delfines de Uruguay. Más tarde Danilewicz (2003) y Bertozzi (2009) encontraron el mismo patrón, en franciscanas de Brasil, donde la mayoría de las cicatrices estuvieron presentes en el ovario izquierdo, confirmando así una disparidad funcional de los mismos. Según este patrón se catalogó a las hembras de la especie como

"Tipo 3" dentro de la clasificación de Oshumi (1964), donde puede observarse un sesgo en la acumulación de cicatrices en el ovario izquierdo en detrimento del derecho.

Para las franciscanas de São Paulo, Brasil, Rosas y Monteiro-Filho (2001) encontraron que ambos ovarios de los ejemplares maduros eran simétricos. No obstante, debido al bajo número de ejemplares analizados los resultados deben ser interpretados como preliminares.

La cantidad de cicatrices encontradas en los ovarios de las hembras del sur de la provincia de Bueno Aires fue igual al número encontrado por Corcuera y Monzón (1990) y por Brownell (1984), Danilewicz (2000) y Rosas (2000) para franciscanas del sur de la provincia de Buenos Aires y de Río Grande do Sul respectivamente. Sin embargo, éste número fue mayor al número encontrado en Uruguay y en estados de São Paulo y Paraná, Brasil.

La hembra de mayor tamaño, que a su vez estaba amamantando, presentó una gran cantidad de cuerpos de ovulación (8 en total), donde dos de ellos resultaron cuerpos lúteos y el de mayor tamaño correspondió al de preñez, mientras que 6 fueron cuerpos blancos. Las hembras analizadas representaron un porcentaje de preñez de 71,43%, valor que fue similar al encontrado por Corcuera y Monzón en 1990 y menor a los informados por Kasuya y Brownell (1979) y Danilewicz (2003), 13,3% y 66%, respectivamente. Esta gran cantidad de cuerpos y el alto porcentaje de hembras preñadas apuntalan la idea propuesta por Corcuera y Monzón (1990) de que las franciscanas del sur de la provincia de Buenos Aires posiblemente presenten un ciclo de reproducción anual en contraposición a las franciscanas del norte de la distribución en Brasil donde el ciclo reproductivo fue estimado entre 1,8 y 2 años (Rosas y Monteiro-Filho, 2001; Bertozzi, 2009).

En resumen, en la presente investigación no se encontró diferencias significativas entre las variables analizadas en ambos ovarios, así como tampoco disparidad funcional. Sin embargo, no fue posible concluir si alguno de los dos ovarios es más frecuentemente activo o si ambos son igualmente activos, debido al bajo número de hembras maduras analizadas. Para poder confirmar la categorización propuesta por Ramos (2000) y la idea del ciclo

reproductivo anual propuesto por Corcuera y Monzón (1990) es necesario analizar un mayor número de gónadas. Por lo expuesto, los resultados que se desprenden de los análisis de los ovarios deben ser considerados como preliminares.

Morfometría gonadal

La importancia de la evaluación de las variables morfométricas gonadales radica en la dificultad del estudio de la espermatogénesis y la ovulogénesis, especialmente cuando las gónadas son muestreadas mucho después de ocurrida la muerte del animal, quedando entonces comprometido el tejido gonadal debido a la autolisis celular (Lockyer, 1984). Por lo tanto cuando no es posible obtener tejido fresco para el análisis histológico, es importante contar con otra fuente de información o variables de fácil acceso y mejor conservación a partir de las cuales se pueda estimar el estado de madurez.

Sólo tres de las 7 variables morfométricas gonadales analizadas, resultaron ser confiables para determinar del estado de madurez sexual de machos: el peso testicular medio, PTM, el peso combinado de testículo, PCT y el índice de madurez sexual o IM.

Los límites obtenidos de los parámetros morfométricos gonadales para estimar la madurez sexual, no difirieron de los previamente informados para la población de franciscanas de Río Grande do Sul, Brasil (Student: PCT t=0,25, gl=44, p=0,81; IM t=1,47, gl=43, p=0,15) y de São Paulo, Brasil (Student: PCT t=1,38, gl=34, p=0,17; IM t=0,00, gl=33, p=1,00) (Botta, 2005 y Bertozzi, 2009, respectivamente). El IM no sólo resultó confiable para la estimación del estado de madurez de la especie bajo estudio (Danilewicz *et al.*, 2004; Botta, 2005; Bertozzi, 2009) sino que también fue confirmada su confiabilidad en otras especies como por ejemplo en *Stenella atenuatta* (Hohn *et al.*, 1985). Por consiguiente, a partir de los resultados presentados se sugiere utilizar este índice de madurez testicular y el peso

combinado de los testículos para estimar el estado de madurez sexual de machos de franciscana en el área de estudio.

El DMT fue un parámetro que resultó confiable para la determinación del estado de madurez para las franciscanas estudiadas por Botta (2005), no coincidiendo con lo aquí encontrado al no resultar adecuado para la estimación del estado de madurez sexual en el presente estudio, ya que su coeficiente de correlación con la talla y edad estuvo por debajo de 0,7 por lo tanto, según el criterio utilizado no resultó un buen indicador del estado de madurez sexual. Los parámetros LTM y LCT tampoco resultaron ser confiables para la estimación del estado de madurez ya que presentaron una gran superposición entre los valores de los dos grupos de madurez analizados, este hecho coincide con lo informado por Botta (2005). De esta manera, no se aconseja hacer uso de esos parámetros para la determinación de la madurez.

La información sobre medidas morfométricas gonadales de hembras de *P. blainvillei* es aún más escasa que la existente para los machos, la información más completa procede del sur de Brasil, y no existen datos publicados para las poblaciones de Argentina. Por lo tanto, aquí se presentaron los primeros datos sobre medidas morfométricas gonadales de ejemplares hembra de delfín franciscana.

Los parámetros más confiables para estimar el estado de madurez sexual de las hembras fueron el peso del ovario más pesado y el índice de madurez ovárico, ya que fueron éstos parámetros los que presentaron menor solapamiento entre los grupos de madurez sexual y mayor valor de coeficiente de correlación con la talla y la edad. Sin embargo, éste resultado debe ser verificado con un mayor número de muestras, por lo tanto debería considerarse como un resultado preliminar. Tanto el peso de los ovarios como el IM resultaron ser estadísticamente diferentes y mayores a los valores informados para las franciscanas de São Paulo y Paraná (Student: Rosas (1997) vs el presente trabajo PCO $t= 9,54$, $gl= 8$, $p< 0,001$; Bertozzi (2009) vs el presente trabajo PCO $t= 4,07$, $gl= 19$, $p< 0,001$; IM $t= 8,23$, $gl= 19$,

p< 0,001). Esto podría responder al hecho de que las franciscanas de las poblaciones que se encuentran al sur de la distribución de la especie son de mayor tamaño que aquellas que se encuentran al norte (Pinedo 1991; Secchi *et al.*, 1998).

Morfometría corporal

Las medidas morfométricas externas son más accesibles y muchas veces, son con las únicas que se cuenta para determinar el estado de madurez sexual de un ejemplar capturado accidentalmente o varado en la costa. En este estudio fueron analizados dos métodos que involucran estas medidas. El primero de ellos se utiliza desde el año 1979 y se basa en la comparación de las medidas de talla, peso y edad obtenidas por Kasuya y Brownell, originalmente concebidos sobre la población de franciscanas de Uruguay y extensamente utilizado para estimar el estado de madurez sexual de los ejemplares de Argentina, debido a la cercanía geográfica entre ambos países (Secchi *et al.*, 2003). El segundo método analizado fue el método multivariado de cluster, que tuvo en consideración la talla, peso y edad en conjunto.

Para los machos los valores medios de talla y peso de los dos grupos de madurez obtenidos, aplicando los resultados de Kasuya y Brownell (1979), resultaron ser mayores (132,44 cm, 23,86 kg) a los obtenidos por el método histológico (126,48 cm, 21,60 kg) (Kruskal-Wallis: p= 0,02). En cuanto a las hembras no se encontraron tales diferencias significativas entre los valores medios de talla, peso y edad obtenidos por los tres métodos y sólo fueron encontradas dos discrepancias en la determinación del estado de madurez sexual entre los métodos corporales e histológico. Sin embargo, para los machos se encontraron nueve discrepancias entre los resultados obtenidos al aplicar los resultados de Kasuya y Brownell (1979) sobre los ejemplares del sur de la provincia de Buenos Aires en

comparación con los valores obtenidos por el método histológico. Siendo el número de discrepancias entre el análisis de cluster y el histológico menor (5).

A partir de estos hallazgos se sugiere utilizar el método multivariado de cluster para categorizar a los ejemplares machos según su estado de madurez cuando se cuenta con la talla, edad y peso de los mismos, ya que fue el método con el cual se obtuvo resultados similares al compararlos con el método histológico. Mientras que el análisis combinado del método multivariado e histológico resultó, también, apropiado para estimar el estado de madurez sexual de los machos de la especie *P. blainvillei* del sur de la provincia de Buenos Aires. Así, los machos pueden ser considerados sexualmente maduros a partir de una talla, peso y edad igual o superior a 128,06 cm, 21,75 kg y 3,09 años de edad. Los valores de las mismas variables obtenidas del análisis combinado de los tres métodos para las hembras fueron 143,13 cm, 31,14 kg y 3,81 años.

Talla y edad medias de madurez sexual

La información previa acerca de la talla y edad de madurez sexual para las franciscanas del sur de la provincia de Buenos Aires, se remonta a los años 1990 y 1996. Corcuera y Monzón (1990) y Monzón y Corcuera (1990) presentaron información sobre algunos aspectos reproductivos de las franciscanas provenientes de la localidad de Necochea entre los años 1988 y 1992. Más tarde, Corcuera (1996) aumento el número de ejemplares de machos y hembras (44:27) analizados. Cronológicamente, casi 10 años más tarde se presentaron dos trabajos, donde se analizó histológica y morfométricamente las gónadas de ejemplares obtenidos entre el 1998 y 2008 (Panebianco *et al.*, 2006; 2009). Sin embargo, cabe destacar que todos estos resultados aún no han sido publicados en revistas de interés científico. De esta manera, la investigación realizada en esta Tesis resulta la más completa

en ser presentada hasta la fecha (Panebianco *et al.*, en revisión) en relación con los aspectos reproductivos del delfín franciscana de Argentina.

Las tallas medias de madurez sexual de las hembras presentarían un valor mayor que los machos, coincidiendo con estudios previos, relacionado con el dimorfismo sexual sesgado hacia la hembra (Kasuya y Brownell, 1979; Danilewicz, 2000; Rosas, 2000).

A partir del análisis comparativo de las tallas y de la edad media de madurez sexual existente entre las diferentes poblaciones de franciscanas, se observó que de norte a sur de la distribución hay un aumento de dichas medidas. En el estado brasilero de Río de Janeiro, Ramos (2000) encontró una TMS de 115 cm y EMS de más de 2 años, mientras que para los estados de Paraná y São Paulo, Ramos y Monteiro-Filho (2001) y Bertozzi (2009) informaron una talla y EMS menores (103 y 107 cm; 1,3 y 1,5 años). Continuando hacia el sur en Río grande do Sul (Brasil) se informó una EMS de 3,6 años y una talla de 128,2 cm (Danilewicz *et al.*, 2004). Los delfines de las costas uruguayas presentaron una edad de madurez de entre 2 y 3 años y una talla de 131,4 cm (Kasuya y Brownell, 1979). Estudios previos realizados sobre delfines de Argentina (Monzón y Corcuera, 1990 y Corcuera, 1996) informaron una EMS de 3,3 y 4,5 años y una TMS de entre 125 y 135 cm. Finalmente en esta Tesis se encontró una TMS de 126,24 cm acompañada de una edad de madurez de 2,92 – 3,54 años. Estos últimos valores resultaron muy similares a los obtenidos para los delfines de las costas de Uruguay y Río Grande do Sul. Las hembras presentaron el mismo patrón, pero los valores de edad y talla media de madurez sexual fueron mayores en todas las regiones analizadas. Hacia el norte las poblaciones brasileras de hembras de Río de Janeiro presentaron una talla y edad media de madurez mayores (130 cm y 2 - 3 años) a las de las franciscanas de São Paulo y Paraná (115-119 cm y 1,2-1,8 años, Rosas y Monteiro-Filho, 2001; Bertozzi, 2009). Los delfines de Río Grande do Sul ostentaron una talla de madurez de 138,9 y una edad de 3,7 años (Danilewicz, 2003). Los delfines de las costas uruguayas maduran a una edad media de 2,7 años y una talla de 140

cm (Kasuya y Brownell, 1979), resultó similar a la informada por Corcuera y Monzón (1990) y la talla aquí obtenida. Sin embargo, la edad media de las hembras de Argentina fue mayor a las de Uruguay y alrededor de los 4 años (Corcuera y Monzón, 1990, presente estudio). A partir de éste análisis fue posible corroborar lo descripto por Pinedo en 1991 y ratificado genéticamente por Secchi *et al.* (1998), la existencia dos ecotipos diferentes para la especie. Distribuyéndose el primero de ellos desde el estado de Espirito Santo hasta Santa Catarina, Brasil, y el segundo, de mayor tamaño, desde el estado brasilero de Río Grande do Sul hasta Argentina.

Estrategia reproductiva

El sistema de apareamiento del delfín franciscana ha sido muy poco estudiado debido a la tímida conducta y naturaleza críptica de la especie (Brownell, 1989; Trimble y Praderi, 2008). Estas características conductuales y de coloración hacen muy difícil realizar estudios sobre el comportamiento reproductivo en estado silvestre. Aún así, se han realizado importantes avances en el estudio del comportamiento de ésta especie (Bordino *et al.*, 1999; Bordino, 2002; Failla, En prensa). Sin embargo, son escasos los trabajos publicados donde se trate el tema de la estrategia reproductiva de *P. blainvillei* (Rosas y Monteiro-Filho, 2001; Danilewicz *et al.*, 2004). Los mismos autores realizaron una aproximación para establecer el sistema de apareamiento a partir del estudio de los caracteres sexuales secundarios, el dimorfismo sexual y del tamaño relativo de los testículos, entre otras características (Kenagy y Trombulak, 1986; Ralls, 1976). Tanto la existencia de caracteres sexuales secundarios en los machos, como su intensidad (medida) resultaron mejores estimadores del grado de selección intrasexual que la talla de los ejemplares (Anderson, 1994). En los machos de los odontocetos, estos caracteres pueden aparecer en formas de "*armas*", por

ejemplo los dientes en las especies del género *Grampus*, *Physeter*, *Berardius*, *Hyperoodon* y *Mesoplodon,* están altamente modificados y especializados para las luchas entre machos (MacLeod, 1989). Sin embargo, y en concordancia con lo expuesto por Danilewicz *et al.* (2004) y Rosas y Monteiro-Filho (2001). Además, no existe evidencia que los mismos procesos evolutivos hayan ocurrido en los machos de franciscana, ya que ellos presentan dientes pequeños y funcionales, ni existe alguna característica que pueda ser considerada de defensa y tampoco hay evidencia de marcas producidas por congéneres debido a disputas por acceso a hembras. Por otro lado, las hembras son de mayor tamaño que los machos, y esta característica se denomina dimorfismo sexual inverso (DSI). Este DSI fue documentado en 12 de los 20 órdenes de mamíferos (Ralls, 1976). Dentro del orden de los odontocetos cuatro de las ocho familias presentan DSI (*Ziphidae, Pontoporiidae, Phocoenidae,* y *Delphinidae*). En las especies con DSI las hembras no se aparean con varios machos, ni son más agresivas o dominantes que éstos, tampoco muestran caracteres secundarios sexuales relacionados con selección intrasexual. Estas características en su conjunto refuerzan la hipótesis de que el sistema de apareamiento imperante sería la monogamia.

La posibilidad de un sistema monogámico se revela al estudiar el tamaño relativo del testículo, que resulta bajo a lo largo de la distribución de la especie. En la literatura científica, en general, el sistema de apareamiento de los mamíferos se divide en dos categorías: 1) sistema que involucra un único macho, con frecuencia de cópulas baja y peso relativo de testículo pequeño: monogamia y 2) sistema que involucra a múltiples machos, con una frecuencia alta de cópulas y un peso relativo de testículo importante: poligamia (Krebs y Davis, 1997). Según Rosas y Monteiro-Filho (2001) el pequeño tamaño relativo de testículo que presentan los machos (alrededor de 0,04%) de la especie responde a una baja frecuencia de copulas, sugiriendo que encuadra dentro de un sistema de apareamiento llamado monogamia serial. De acuerdo a este sistema, un macho y una hembra se aparean

durante un ciclo reproductivo, pudiéndose la hembra aparearse con un macho diferente (o no) en los sucesivos ciclos reproductivos.

En resumen, las características relativas a la reproducción que surgen de los resultados de la presente tesis (bajo tamaño testicular, dimorfismo sexual sesgado hacia la hembra, ausencia de caracteres secundarios masculinos y la ausencia de cicatrices producidas por congéneres) indicarían la ausencia de competencia espermática en la especie. Además, formaría una pareja de apareamiento única por cada ciclo reproductivo. Valsecchi y Zanelatto (2003) aportaron nueva evidencia molecular que sugiere que esta especie formaría grupos sociales pequeños conformados por una hembra, su cría y el padre biológico. Las autores sugieren que los machos proveerían de cuidado parental a sus crías de manera de prolongar el vínculo con la pareja reproductiva.

CAPÍTULO 7

Conclusiones y consideraciones finales

- En la presente tesis se logró actualizar y aportar nueva información científica sobre la presencia y la concentración de metales pesados, esenciales y no esenciales, en las distintas áreas de estudio (Necochea, Claromecó, Monte Hermoso y Bahía Blanca) y en tejidos sobre los que no se tenía información previa (piel). Se logró obtener nueva información biológica sobre aspectos reproductivos del delfín franciscana, *Pontoporia blainvillei*.
- Se determinó que todos los ejemplares estudiados presentaron un estado general de condición bueno a moderado, por lo que es posible afirmar que las concentraciones de los metales traza encontrados no estuvieron influidos por razones de salud o privación de nutrientes que impliquen enfermedad o mala condición de los individuos muertos en forma accidental en redes de pesca o varados en la costa.
- Las metodologías analíticas utilizadas en la presente Tesis probaron ser precisas, ya que los porcentajes de recuperación de todos los metales en función de los valores certificados resultaron, en todos los casos, ser mayores del 93%.
- El riñón resultó ser un tejido acumulador de Cd, mientras que el hígado lo fue de Zn. La piel resultó ser un tejido centinela de la presencia de Zn y en menor medida de Ni, en el ambiente. El músculo, por otro lado, no resultó ser una buena herramienta para estudiar la presencia de metales pesados. Se corroboró de *Pontoporia blainvillei* como especie centinela.

- La piel podría ser utilizada como una herramienta no letal y no invasiva, para el estudio del estado de condición corporal de los delfines franciscana que habitan en las costas de la provincia de Buenos Aires.
- Los parámetros biológicos: sexo y madurez sexual afectaron significativamente la acumulación de los metales pesados esenciales. Por otro lado, la acumulación de Cd se vio afectada por la edad y la dieta.
- Los niveles de Zn en piel, podrían ser utilizados como una herramienta para estimar el estado de condición de los ejemplares. Estos niveles fueron afectados por el estado de condición de los ejemplares. Mayor concentración de Zn se relacionó con un mayor %IH y %IR y menor %PG. Adicionalmente, se encontró un efecto incipiente en los niveles actuales de Zn sobre la condición de los ejemplares.
- El Ni podría ser un elemento útil para identificar stocks regionales, relacionados al hábitat de los ejemplares.
- El área de origen no influyó de manera significativa sobre los niveles de los metales pesados presentes en los órganos estudiados (hígado, riñón, piel y músculo).
- Los valores de concentración encontrados en los tejidos de los delfines que habitan las costas del sur de la provincia de Buenos Aires fueron los más bajos a lo largo de toda la distribución de la especie.
- El índice de madurez testicular y el peso de los testículos fueron los parámetros más confiables para estimar el estado de madurez de machos de franciscana. Mientras que para las hembras fueron el peso del ovario más pesado y el índice de madurez ovárico.
- El método multivariado de cluster resultó más preciso para categorizar a los ejemplares machos según su estado de madurez que aplicar el criterio de madurez propuesto por Kasuya y Brownell (1979).

- La combinación del método multivariado e histológico resultó apropiada para estimar el estado de madurez de los machos y hembras de la especie *P. blainvillei* del sur de la provincia de Buenos Aires. Los machos pueden considerarse sexualmente maduros a partir de una talla, peso y edad igual o superior a 128,06 cm, 21,75 kg y 3,09 años de edad. Las hembras pueden considerarse sexualmente maduras a partir de 143,13 cm, 31,14 kg y 3,81 años.
- No se encontraron diferencias significativas entre las variables analizadas en ambos ovarios y tampoco se observó disparidad funcional. Sin embargo, este resultado no es concluyente debido al bajo número de hembras maduras analizadas.
- Los machos presentaron una edad y talla de madurez sexual igual a: 2,92 - 3,54 años y 126,19 - 126,26 cm. Mientras que para las hembras estos valores fueron: 4,05 - 5,05 años y 141,97 - 144,30 cm.
- Del análisis comparativo de los valores de las variables reproductivas obtenidos en este trabajo con respecto a los de las restantes áreas de manejo de la franciscana (FMAs) surgió la existencia de una tendencia latitudinal. Además se confirmó la existencia de dos ecotipos; el ecotipo norte, conformado por ejemplares de menor tamaño y con una edad y longitud de primera madurez menores y el ecotipo sur, cuyas variables reproductivas fueron mayores y en el cual se incluye a los ejemplares que habitan en el área de estudio.

BIBLIOGRAFÍA

Aguilar A., Borrell A. 1990. Patterns of lipid content and stratification in the blubber of fin whales (*Balaenoptera physalus*). J Mammal. 71: 544-554.

Aguilar A., Borrell A. 1995. Pollution and harbour porpoises in the Eastern North Atlantic: a review. In: Biørge A., Donovan G.P. (eds.). Biology of the Phoecoenids. Int Whal Comm. Cambridge. p. 231–242.

Aguilar A., Borrel A., Pastor T. 1999. Biological factors affecting variability of persistent pollutants levels in cetaceas. J Cetacean Res Manag. Special issue 1: 83-116.

Aizpún J.E., Moreno V.J., Gerpe M.S., Miglioranza K.S.B., Gonzalez M., Ondarza P. 2003. Plaguicidas organoclorados y metales pesados en la biota del Río de La plata y su Frente Marítimo. 1er informe de avance. Protección ambiental del Río de La Plata y su Frente Marítimo: prevención y control de la contaminación y preservación de hábitats. Proyecto PNUD/GEF/RLA/99/G31. Acuerdo 082. 43 pp.

Andersson M. 1994. Sexual selection. Monographs in behavior and ecology. Princeton Univ. Press. Princeton, NJ. 599 pp.

Andrade A., Alonso F., Marcet P., Fernández-Covelo E. 2005. Influencia del manejo agrícola intensivo en la contaminación del suelo. Revista Pilquen Sección Agronomía. 7: 1-17.

Anke M., Angelow L., Glei M., Miller M., Illing H. 1995. The biological importance of nickel in the food chain. Fresenius J Anal Chem. 352: 92-96.

APHA, AWWA, WEF. 1998. Standard methods for the examination of water and wastewater. 20th Edition. L. S. Clesceri, A. E. Greeberg & A. D. Eaton (Eds.) Whashington DC. 1200 pp.

Bakir F., Danluji S.F., Amin-Zaki L., Murtadha A., Khalidi A., Al-Rawi N.Y., Takriti S., *et.al.* 1973. Methyl mercury poisoning in Iraq. Science 181: 230-241.

Bennett P.M., Jepson P.D., Law R.J., Jones B.R., Kuiken T., Baker, J.R., Rogan E., Kirkwood J.K. 2001. Exposure to heavy metals and infectious disease mortality in harbour porpoises from England and Wales. Environ Pollut. 112: 33-40.

Bertozzi C. 2009. Interação com a pesca: implicaçoes na conservação na toninha, *Pontoporia blainvillei* (Cetacea, Pontoporiidae) no litorial no estado de São Pablo, SP. Tesis doctoral. Instituto Oceanográfico na Universidade de São Pablo. 209 pp.

Boness D.J., Clapham P.J., Mesnick S.L. 2002. Life history and reproductive strategies. In: Hoelzel, A.R. (ed.) Marine Mammal biology. An evolutionary approach. Blackwell Publishing, Oxford. p. 278-324

Botta S. 2005. Reprodução e crescimento dos machos de toninha (*Pontoporia blainvillei*) do Rio Grande do Sul, Brasil. Tesis de maestría. Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, Brazil.124 pp.

Botté S.E. 2005. Rol de la vegetación en el ciclo biogeoquímico de los metales pesados, en humedales del estuario de Bahía Blanca. Tesis doctoral. Universidad Nacional del Sur. 317 pp.

Botté S.E., Freije R.H., Marcovecchio J.E. 2007. Dissolved Heavy Metal (Cd, Pb, Cr, Ni) Concentrations in Surface Water and Porewater from Bahía Blanca Estuary Tidal Flats. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 79: 415-421.

Bordino P., Albareda D. 2004. Incidental mortality of Franciscana dolphin *Pontoporia blainvillei* in coastal gillnet fisheries in northern Buenos Aires, Argentina. Paper SC/56/SM11 presented at the Int Whal Comm Meet. Sorrento, Italia.

Brownell R.L. Jr., Ness R. 1970. Preliminary notes on the biology of the franciscana, *Pontoporia blainvillei* (Cetacea:Platanistidae). Proc. Sixth Ann. Conf. Biol. Sonar and Diving Mammals. 23-28 pp.

Brownell R.L. Jr. 1989. Franciscana *Pontoporia blainvillei* (Gervais & d´Orbigny, 1844). In: Ridgway S.H., Harrison R. (eds.). Handbook of Marine Mammals, Vol.4: River dolphins and the larger toothed whales. Academic Press, San Diego. 442 pp.

Brownell R.L. Jr. 1975. Progress report on the biology of the franciscana dolphin, *Pontoporia blainvillei*, in Uruguayan waters. J Fish Res Bd Can. 32: 1073-1078.

Bryan C.E., Christopher S.J., Balmer B.C., Wells R.S. 2007. Establishing baseline levels of trace elements in blood and skin of bottlenose dolphins in Sarasota Bay, Florida: Implications for non-invasive monitoring. Sci Total Environ. 388: 325–342

Burmeister K.H. 1867. Preliminary observations on the anatomy of *Pontoporia blainvillei*. Proc. Zool. Soc. London. 9: 484-9.

Burmeister K.H. 1869. Descripción de cuatro especies de delfinides de la costa Argentina del Océano Atlántico. An Mus Publ Hist Nat Buenos Aires. 1: 3367-3442.

Cabana G., Tremblay A., Kalff J., Rasmussen J.B. 1994. Pelagic food-chain structure in Ontario lakes: a determinant of mercury levels in lake trout (*Salvelinus namaycush*). Can J Fish Aquat Sci. 51: 381–389.

Camelo L.G., Migues S.R., Marban L. 1997. Heavy metals input with phosphate fertilizers used in Argentina. Sci Total Environ. 204: 245-250.

Capelli R., Drava G., De Pellegrini R., Minganti V., Poggi R. 2000. Study of trace elements in organs and tissues of striped dolphins (*Stenella coeruleoalba)* found dead along the Ligurian coasts (Italy). Adv Environ Res. 4: 31–43.

Capelli R., Das K., De Pellegrini R., Dravaa G., Lepoint G., Miglioa C., Minganti V., Poggi R. 2008. Distribution of trace elements in organs of six species of cetaceans from the Ligurian Sea (Mediterranean), and the relationship with stable carbon and nitrogen ratios. Sci Total Environ. 390: 569 – 578

Caurant F., Amiar J.C., Amiard-Triquet C. 1994. Ecological and biological factors controlling the concentrations of trace elements (As, Cd, Cu, Hg, Se, Zn) in delphinids *Globicephala melas* from the North Atlantic Ocean. Mar Ecol Prog Ser. 103: 207-19.

Cappozzo, H.L., Paso Viola, M.N., Panebianco, M.V, y Negri, M.F. 2010. Transferencia de la información cienfífica sobre el delfín franciscana, *Pontoporia blainvillei*, en el extremo sur de la distribución. DT5. "VII workshop para coordenação de pesquisa e conservação de *Pontoporia blainvillei* (Gervais & D'Orbigny, 1844)". Florianópolis, Brasil, 22-24 de Octubre de 2010.

Cappozzo H.L., Negri M.F., Pérez F.H., Albareda D., Monzón F., Corcuera J.F. 2007. Incidental mortality of Franciscana Dolphin, (*Pontoporia blainvillei*), in Argentina. LAJAM. 6: 127-137.

Carbone M.E., Piccolo M.C. 2002. Humans and physical characteristics of the Claromeco River basin, Argentina. Papeles de Geogografía, 35: 27-35.

Carvalho M., Pereira R., Lailson-Brito J. 2002. Heavy metals in soft tissues of *Tursiops truncates* and *Delphinus delphis* from West Atlantic Ocean by X-ray spectrometry. Sci Total Environ. 292: 247–54.

Carvalho C.E., Di Beneditto A.P.M., Souza C.M.M., Ramos R.M.A., Rezende C.E. 2008. Heavy metal distribution in two cetacean species from Rio de Janeiro State, south-eastern Brazil. JMBA. 88: 1117–1120.

Corcuera J., Monzón F. 1990. Reproducción en hembras del delfín franciscana (*Pontoporia blainvillei*) en Necochea (Argentina). Resumen. IV Reunión de Trabajo de Especialistas en Mamíferos Acuáticos de América del Sur. Valdívia, Chile. p. 20.

Corcuera J., Monzon F., Crespo E.A., Aguilar A., Raga J.A. 1994. Interactions between marine mammals and the coastal fisheries of Necochea and Claromecó (Buenos Aires Province, Argentina). Rep. Int Whal. Commn. (Special issue). 15: 283-290.

Corcuera J. 1996. Edad de madurez sexual del delfín franciscana en el sur se la Provincia de Buenos Aires, Argentina. Resumen. VII Reunión de Trabajo de Especialistas en Mamíferos Acuáticos de América del Sur. Viña del Mar, Chile. p. 39.

Costa M., Zhitkovich A., Toniolo P., 1993. DNA-protein cross-links in welders: molecular implications. Cancer Res. 53: 460–463.

Crespo E.A., Harris G., González R. 1998. Group size and distributional range of the Franciscana *Pontoporia blainvillei*. Mar Mamm Sci. 14: 845-849.

Crespo E.A., Pedraza S.N., Grandi M.F., Dans S.L., Garaffo G.V. 2010. Abundance and distribution of endangered Franciscana dolphins in Argentine waters and conservation implications DOI: 10.1111/j.1748-7692.2009.00334.x.

Grecco L.E., Marcos A.O., Gómez E.A., Botté S., Marcovecchio J. 2006. Natural and Anthropogenic Input of Heavy Metals in Sediments from Bahía Blanca Estuary (Argentina). J Coast Res Spec Issue. 39: 1021-1025.

Danilewicz D.S. 1996. Aspectos da biologia reprodutiva do golfinho franciscana, *Pontoporia blainvillei* (Gervais et D' Orbigny, 1844) (Mammalia, Cetacea), no litoral norte do Rio Grande do Sul. BSc. Monography. Biological Sciences. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Biociencias, P. Alegre. 43 pp.

Danilewicz D., Secchi E.R., Ott P.H., Moreno I.B. 2000. Analyses of the age at sexual maturity and reproductive rates of franciscanas (*Pontoporia blainvillei*) from Rio Grande do Sul, Southern Brazil. Comum. Mus. Ciênc. Tecnol. PUCRS. 13:89−98.

Danilewicz D., Rosas F., Bastida R., Marigo J., Muelbert M., Rodríguez D, Lailson-Brito Jr.J., *et al.* 2002. Report of the working group on biology and ecology. Special issue on the biology and conservation of the franciscana. In: Secchi, E.R. (ed.). LAJAM 1: 283-294.

Danilewicz D. 2003. Reproduction of female franciscana (*Pontoporia blainvillei*) in Rio Grande do Sul, southern Brazil. LAJAM. 2: 67-78.

Danilewicz D., Claver J.A., Perez Carrera A.L., Secchi E.R., Fontoura N.F. 2004. Reproductive biology of male franciscanas (*Pontoporia blainvillei)* (Mammalia: Cetacea) from Rio Grande do Sul, southern Brazil. Fish Bull. 102: 581-592.

Das K., Lepoint G., Loizeau V., Debacker V., Dauby P., Bouquegneau J.M. 2000. Tuna and dolphin associations in the North-East Atlantic: evidence of different ecological niches from stable isotope and heavy metal measurements. Mar Pollut Bull. 40:102–109

Das K., Jacob V., Bouquegneau J.M. 2002. White-sided dolphin metallthioneins purification, characterización and potencial role. Com Biochem Physiol C. 131: 245-251.

Das K., Debacker V., Pillet S., Bouquegneau J. 2003. Heavy metals in marine mammals. In: Vos J.G., G.D. Bossart, Fournier M., O'shea T.J. (eds.).Toxicology of marine mammals. Taylor & Francis, London. p 135-167.

Das K., Siebert U., Fontaine M., Jauniaux T., Holsbeek L., Bouquegneau J.M. 2004. Ecological and pathological factors related to trace metal concentrations in harbour porpoises *Phocoena phocoena* from the North Sea and adjacent areas. Mar Ecol Prog Ser. 281: 283–295.

Das K., De Groof A., Jauniaux T., Bouquegneau JM. 2006. Zn, Cu, Cd and Hg binding to metallothioneins in harbour porpoises *Phocoena phocoena* from the southern North Sea. BMC Ecology 6:2doi:10.1186/1472-6785-6-2.

Dawes C.J. 1991. Botánica Marina. LIMUSA (ed.) México. 652 pp.

Denuncio P., Mandiola M.A., Garcia M., Polizzi P. Bastida R., Rodriguez D. 2010. Composición por edades de franciscanas (*Pontoporia* blainvillei) capturadas incidentalmente en dos sectores costeros del norte de la provincia de Buenos Aires. DT6. "VII workshop para coordenação de pesquisa e conservação de *Pontoporia blainvillei* (Gervais & D'Orbigny, 1844)". Florianópolis, Brasil, 22-24 de Octubre de 2010.

Demaster D.P. 1984. Review of techniques used to estimate the average age at attainment of sexual maturity in marine mammals. Rep Int Whal. Commn (Special issue) 6: 175-179.

Di Beneditto A.P.M., Siciliano S. 2007. Stomach contents of the marine tucuxu dolphin (*Sotalia guianensis*) form Rio de Janeiro, South-Easter Brazil. J Mar Biol. 87: 253-254.

Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzales L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2010. Grupo InfoStat, FCA, Universisdad Nacional de Córdoba, Argentina.

Dorneles P.R., Lilson-Brito J. Jr, Secchi E.S, Bassoi M., Lozinsky C.P.C., Torres J.P.M., Malm O. 2007. Cadmium concentrations in franciscana dolphin (*Pontoporia blainvillei*) from south brazilian coast. Braz J Oceanogra. 55: 179-186.

EPA. 1994. Recommended guidelines for sampling marine mammal tissue for chemical analyses in Puget Sound. U.S. Environmental Protection Agency. Puget Sound Water Quality Authotirty, Washington, EEUU. 71 pp.

Failla M., Iñiguez M., Tossenberger V., Haro C. 2010. Bioecology of franciscana (*Pontoporia blainvillei*) in northern patagonia, Argentina. J. Cetacean Res. Manage. SC/56/SM24.

Farro A.P.C., Rollo Jr. M.M., Silva Jr. J.M., Marino C.L. 2008. A simple protocol for a low invasive DNA accessing in *Stenella longirostris* (Cetacea: Delphinidae).PANAMJAS 3:130-134.

Ferrero R.C., Walker W.A. 1999. Age, growth and reproductive patterns of Dall´s porpoise (*Phocoenoides dalli*) in the central North Pacific Ocean. Mar Mamm Sci. 15: 273-313.

Fisher H.D., Harrison R.J. 1970. Reproduction in the common porpoise (*Phocoena phocoena*) of the North Atlantic. J Zool. 161: 471-486

Foglia M. 2008. Niveles de mercurio y cadmio en franciscana *Pontoporia blainvillei*, a lo largo de la costa Uruguaya. Tesis de grado, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo. 55 pp.

Fossi M.C., Marsili L., Leonzio C., Di Sciara G.N., Zanardelli M., Focardi S. 1992. The use of non-destructive biomarkers in Mediterranean cetaceans: preliminary data on MFO activity in skin biopsy. Mar Pollut Bull. 24: 459–61.

Fossi M.C., Marsili L. 1997. The use of non-destructive biomarkers in the study of the marine mammals. Biomarkers. 2: 205–16.

Fossi M.C., Marsili L., Lauriano G., Fortuna C., Canese S., Ancora S., et al. 2004. Assessment of toxicological status of a SW Mediterranean Segment population of striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*) using skin biopsy. Mar Environ Res. 58:269–74.

Frodello J.P., Romèo M., Viale D. 2000. Distribution of mercury in the organs and tissues of five toothed whale species of the Mediterranean. Environ Pollut. 108:447–52.

Frodello J.P., Marchand B. 2001. Cadmium, copper, lead and zinc in five toothed whales species of the Mediterranean Sea. Int J Toxicol. 20: 339–43.

Fujise Y., Honda K., Tatsukawa R., Mishima S. 1988. Tissue distribution of heavy metals in Dall's porpoise in the northwestern Pacific. Mar Pollut Bull. 19: 226–230.

Gerpe M.S., Rodriguez D.H., Moreno V.J., Bastida R.O., Moreno J.A.E. 2002. Accumulation of heavy metals in the Franciscana (*Pontoporia blainvillei*) from Buenos Aires Province, Argentina. LAJAM. 1: 95-106.

Giordano R., Musmeci L., Ciaralli L., Vernillo I., Chirico M., Piccioni A., Costantini S. 1992. Total contents and sequential extractions of mercury, cadmium, and lead in coastal sediments. Mar Pollut Bull. 24: 350-357.

Gönül B., Soylemezoglu T., Babul A., Celebi N. 1998. Effects of epidermal growth factor dosage forms on mice full-thickness skin wound zinc levels and relation to wound strength. J Pharm Pharmacol. 50: 641–4.

Harrison R.J., Boice R.C., Brownell Jr. R.L. 1969. Reproduction in wild and captive dolphins. Nature. 222: 1143-7.

Harrison R.J., Brownnell Jr. R.L. 1971. The gonads of the South American dolphins, Inia *geoffrensis*, *Pontoporia blainvillei*, and *Sotalia fluviatilis*. J Mamma. 52: 413-419

Harrison R.J., Brownell Jr R.L., Boice R.C. 1972. Reproduction and Gonadal Appearances in Some Odontocetos. In: Functional anatomy of marine mammals. Harrison, K.J. (ed.) London and New York: Academic Press. 1: 361-429.

Harrison R.J., Bryden M.M., McBrearty D.A., Brownell R.L. 1981. The ovaries and reproduction in *Pontoporia blainvillei* (Cetacea:Platanistidae). J Zool. 193: 563-580.

Hernandez P., Reynolds J.E., Marsh H., Marmontel M. 1995. Age and seasonality in spermatogenesis of Florida manatees. In: O'Shea T.J., Ackerman B.B., Percival H.F. (eds.). Population biology of the Florida manatee. U.S. Department of the Interior. National Biological Service. Information and Technology Report 1. 289 pp.

Hohn A., Chivers S.J., Barlow J. 1985. Reproductive maturity and seasonality of male spotted dolphins, *Stenella attenuata*, in the eastern tropical Pacific. Mar Mamm Sci. 1: 273-293.

Holden A.V. 1978. The accumulation of oceanic contaminants in marine mammals. Report V Reunion international Exploration de la mer. 169: 353-364.

Honda K., Tatsukawa R., Itano K., Niyazaki N., Fujiyama T. 1983. Heavy metal concentrations in muscle, liver and kidney tissue of striped dolphin, *Stenella coeruleoalba*, and their variations with body length, weight, age and sex. Agric Biol Chem. 47: 1219–28.

Honda K., Yamamoto Y., Kato H., Tatsukawa R. 1987. Heavy metal accumulation and their recent changes in southern minke whales *Balaenoptera acutorostrata*. Arch Environ Contam Toxicol. 16: 209-216.

Hyvärinen H., Sipilä T. 1984. Heavy metals and high pup mortality in the Saima ringed seal population in Eastern Finland. Mar Pollut Bull. 15: 335-337.

IUCN 2010. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2010.4. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 22 May 2011.

Jones R.E. 1978. Heavy Metals in the estuarine environment. Technical report TR 73. Water research centre. pp 28-89.

Julshamm K., Andersen A., Ringdal O., Morkopre J. 1987. Trace elements intake in the Faore islands: Element levels in edible parts of pilot whales (*Globicephalus melaenus*): Sci Total Environ. 65: 53-62.

Kagei N., Tobayama T., Nagasaki Y. 1976. On the helminthum of franciscana, *Pontoporia blainvillei*. Sci Rep Whales Res Inst. 28: 161-166.

Kakuschke A., Prange A. 2007. The Influence of Metal Pollution on the Immune System: A Potential Stressor for Marine Mammals in the North Sea. Int J Comp Psychology. 20: 179-193.

Kakuschke A., Griesel S., Prange A. 2008 a. Variations of metal concentration in blood of harbour seal (*Phoca vitulina*) pups of the German North Sea. Biol Trace Elem Res. In press.

Kakuschke A., Valentine-Thon E., Fonfara S., Griesel S., Rosenberger T., Siebert U., Prange A. 2008 b. Metal-induced impairment of the cellular immunity of newborn harbour seals (*Phoca vitulina*). Arch Environ Contam Toxicol. DOI: 10.1007/s00244-007-9092-3.

Kamiya T., Yamasaki F. 1974. Organ weights of *Pontoporia blainvillei* and *Platanista gangetica*. Sci Rep Whales Res Inst. 26: 265-270.

Kasuya T., Brownell R.L. 1979. Age determination, reproduction, and growth of the franciscana dolphin, *Pontoporia blainvillei*. Sci Rep Whales Res Inst. 31: 45-67.

Kenagy G.K., Trombulak S.C. 1986. Size and function of mammalian testes in relation to body size. J. Mammal. 67: 1−22.

Krebs J.R., Davis N.B. 1997. Behavioural ecology: An evolutionary approach, 4th Edition. Part 2: Mechanisms and individual behaviour. Blackwell Science Ltd. United Kingdom, University Press, Cambridge.

Kunito T., Watanabe I., Yasunaga G., Fujise Y., Tanabe S. 2002. Using trace elements in skin to discriminate the populations of minke whales in southern hemisphere. Mar Environ Res. 53: 175–97.

Kunito T., Nakamura S., Ikemoto T., Anan Y., Kubota R., Tanabe S., Rosas F.C.W., Fillmann G., Readman J.W. 2004. Concentration and subcellular distribution of trace elements in liver of small cetaceans incidentally caught along the Brazilian coast. Mar Poll Bull. 49: 574-587.

Lailson-Brito Jr. J., Azeredo M.A.A., Malm O., Ramos R.A., Di Beneditto A.P.M. Saldanha MFC. 2002 Trace metals in liver and kidney of the franciscana (*Pontoporia blainvillei*) from the northern coast of Rio de Janeiro State, Brazil. LAJAM Special issue 1: 107-114.

Lahille F. 1899. Note sur les dimensions du *Stenodelphis blainvillei*. Revta. Mus. La Plata 9: 389-392.

Law R.J., Jones B.R., Baker J.R., Kennedy S., Milne R., Morris R.J. 1992. Trace Metals in the Livers of Marine Mammals from the Welsh Coast and the Irish Sea. Mar Pollut Bull. 24: 296-304.

Law R.J. 1996. Metals in marine mammals. In: Beyer W.N., Heinz G.H., Redmon-Norwood A.W. (eds). Environmental contaminants in wildlife. Interpreting Tissue Concentrations. SETAC Special Publication Series. Boca Raton, FL: Lewis Publishers Inc/CRC Press, p. 357–76.

Le Cren E.D. 1951. The length-weight relationship and seasonal cycles in gonad weight and condition in the perch (*Perca fluviatilis*) J Animal Ecol. 20: 201-219.

Lockyer C. 1984. Review of baleen whale (Mysticeti) reproduction and implications for management. Rep Int Whal Commn (Special issue). 6: 27-50.

López Gappa J.J., Tablado A., Magaldi N.H. 1990. Influence of sewage pollution on a rocky intertidal community dominated by Mytilid *Brachidontes rodriguezi*. Mar Ecol Prog Ser. 63: 163-175.

MacLeod C.D. 1998. Intraspecific scarring in odontocete cetaceans: an indicator of male 'quality' in aggressive interactions? J Zool. 244:71−77.

Marcovecchio J.E., Moreno V.J., Bastida R.O., Gerpe M.S., Rodríguez D.H. 1990. Tissue distribution of heavy metals in small cetaceans from the Southwestern Ocean. Mar Pollut Bull. 21: 299-304.

Marcovecchio J.E., Gerpe M.S., Bastida R.O., Rodríguez D.H., Morón S.G. 1994. Environmental contamination and marine mammals in coastal waters from Argentina: an overview. Sci Total Environ. 154: 141-151.

Marcovecchio J.E. 2000. Land-based sources and activities affecting the marine environment at the Upper Southwestern Atlantic Ocean: an overview. UNEP Regional Seas Reports & Studies N°170: 67 pp.

Marcovecchio J.E., Ferrer L.D. 2005. Distribution and geochemical partitioning of heavy metals in sediments of the Bahía Blanca estuary, Argentina. J Coast Res. 21: 826-834.

Marcovecchio J.E., Botté S.E., Delucchi F., Arias A.H., Fernández-Severini M.D., De Marco S.G., Tombesi N.B., Andrade S.J., Ferrer L.D., Freije R.H. 2008. Pollution processes in Bahía Blanca estuarine environment. In: Neves R., Baretta J., Mateus M. (eds.). Perspectives on Integrated Coastal Zone Management in South America. Part B: From shallow water to the deep fjord: the study sites, IST Scientific Publishers, Portugal (Lisbon). p. 303-316.

Markussen 1995. Changes in metabolic rate and body composition during starvation and semistarvation in harbor seals. In: Blix A.S., Walloe L., Ulltang O. (eds.). Developments in marine biology. Whales, seals, fish and man, Vol 4. Elsevier, Amsterdam. p. 383–391

Méndez M., Rosenbaum H.C., Bordino P. 2008. Conservation genetics of the franciscana dolphin in Northern Argentina: population structure, by-catch impacts, and management implications. Conserv Gen. 9: 419-435.

Mendez M., Rosenbaum H.C., Subramaniam A., Yackulic C., Bordino P. 2010. Isolation by environmental distance in mobile marine species: molecular ecology of franciscana dolphins at their southern range. Mol Ecol. 19: 2212-2228.

Monaci F., Borrel A., Leonzio C., Marsili L., Calzada N. 1998. Trace elements in striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) from the western Mediterranean. Environ Pollut. 99:61–8.

Monteiro-Neto C., Itavo R.V., De Souza-Moraes L.E. 2003. Concentrations of heavy metals in *Sotalia fluviatilis* (Cetacea: Delphinidae) off the coast of Ceará, northeast Brazil. Environ Pollut. 123: 319-324

Monzón F., Corcuera J. 1990. Análisis preliminar de madurez sexual en machos de delfín franciscana (Necochea, Provincia de Buenos Aires, Argentina). VII Reunión de Trabajo de Especialistas en Mamíferos Marinos Acuáticos de América de Sur. Valdivia, Chile, 12-15 Noviembre. p. 46.

Nam D.A., Anan Y., Ikemoto T., Tanabe S. 2005. Multielemental accumulation and its intracellular distribution in tissues of some aquatic birds. Mar Pollut Bull. 50: 1347-1362.

Negri M.F. 2010. Estudio de la biología y ecología del delfín franciscana, *Pontoporia blainvillei*, y su interacción con la pesquería costera en la provincia de Buenos Aires. Tesis doctoral. Universidad de Buenos Aires. 163 pp.

Negri M.F., Panebianco M.V., Cappozzo L. 2010. Mortalidad incidental del delfín franciscana *Pontoporia blainvillei* en el sur de la provincia de Buenos Aires, Argentina. "VII workshop para coordenação de pesquisa e conservação de *Pontoporia blainvillei* (Gervais & D'Orbigny, 1844)". Florianópolis, Brasil, 22-24 de Octubre.

Nezu R., Takagi Y., Ito T., Matsuda H., Okada A. 1999. The importance of total parenteral nutrition-associated tissue zinc distribution in wounding healing. Jap J Surg. 29: 34–41.

Nriagu J.O. 1990. Global metal pollution: poisoning the biosphere. Environment 32: 8-11.

Norris K.S. 1961. Standardized Method for Measuring and Recording Data on the Smaller Cetaceans. J Mammal. 42: 471-478.

Odell D.K, Asper E.D. 1976. Studies on the biology of Kogia (Cetacea:Physeteridae) in Florida. Preliminary report to the Small Whales Subcommittee on the International Whaling Commission, London.

O'Shea T.J. 1999. Environmental contaminants and marine mammals. In: Reynolds III J.E, Rommel S.A. (eds.). Biology of marine mammals. Washington: Smithsonian Institution Press. p. 485–563.

Oshumi S. 1964. Comparison of maturity and accumulation rate of corpora albicantia between the left and right ovaries in Cetacea. Sci Rep Whales Res Inst. 18: 123-148.

Paludan-Müller P., Agger C.T., Dietz R., Kinze C.C. 1993. Mercury, cadmium, zinc, copper and selenium in harbour porpoise (*Phocoena phocoena*) from west Greenland. Polar Biol. 13: 311-320.

Panebianco, M.V., Negri, M.F., Cappozzo, H.L. Reproductive aspects of male franciscana dolphins (*Pontoporia blainvillei*) off Argentina. Enviado a J Mammal. N°: 11-MAMM-A-196.

Panebianco, M.V., Negri, M. F., Marcovecchio, J.E., Cappozzo, H.L. En prensa a. Metales pesados en el riñón del delfín franciscana, *Pontoporia blainvillei* (Cetacea: Pontoporiidae) y su relación con parámetros biológicos. Enviado. LAJAR. N° de Ref: Ms 508.

Panebianco, M.V., Botte, S.E., Negri, M.F., Marcovecchio, J.E., Cappozzo, H. L. En prensa b. Heavy Metals in liver of the franciscana dolphin (*Pontoporia blainvillei*) from the Southern coast of Buenos Aires Province, Argentina. Aceptado. JBSE, Ref. Nº:JBSE132_2009.

Panebianco M.V., Botté S., Negri M.F., Marcovecchio J.E., Cappozzo H.L. 2010. Presencia de metales traza en el delfín del plata, *Pontoporia blainvillei*, de las costas del sur de la provincia de Buenos Aires, Argentina. "VII workshop para coordenação de pesquisa e conservação de *Pontoporia blainvillei* (Gervais & D'Orbigny, 1844)". Florianópolis, Brasil, 22-24 de Octubre. DT1.

Panebianco M.V., Giaché Y.S., Negri M.F., Cappozzo H.L. 2009. Análisis comparativo de técnicas morfométricas de determinación del estado de madurez sexual en delfines franciscana machos (*Pontoporia blainvillei*) del sur de la provincia de Buenos Aires. Libro de Resúmenes de "VII Jornadas Nacionales del Ciencias del Mar". Bahía Blanca, Buenos Aires Argentina, 30 de Noviembre al 4 de Diciembre. p. 363.

Panebianco M.V., Negri M.F., Cappozzo H.L. 2006. Determinación del estado de madurez sexual del delfín franciscana (*Pontoporia blainvillei*) del sur de la provincia de Buenos Aires. Libro de Resúmenes de "VI Jornadas Nacionales del Ciencias del Mar". Puerto Madryn, Chubut, Argentina, 4 al 8 de Diciembre. p. 286.

Paso-Viola M.N., Bobinac M.A., Negri M.F., Panebianco M.V., Cappozzo H.L. 2009. Análisis de la dieta del delfín franciscana (*Pontoporia blainvillei*) en relación a parámetros biológicos. Libro de Resúmenes de "VII Jornadas Nacionales del Ciencias del Mar". Bahía Blanca, Buenos Aires Argentina, 30 de Noviembre al 4 de Diciembre. p. 364.

Paso-Viola M.N., Bobinac M.A., Negri M.F., Panebianco M.V., Cappozzo H. L. 2010. Estudio de las presas del delfín franciscana (*Pontoporia blainvillei*) en el extremo sur de su distribución. Libro de Resúmenes. XIV Reunión de Trabajo de Especialistas en Mamíferos Acuáticos de América del Sur, Florianópolis, Brasil, 24-28 de octubre.

Paso-Viola M.N., Bobinac M.A., Panebianco M.V., Negri M.F., Cappozzo, H.L. 2010. Dieta del delfín franciscana en el extremo sur de su distribución. "VII workshop para coordenação de pesquisa e conservação de *Pontoporia blainvillei* (Gervais & D'Orbigny, 1844)". Florianópolis, Brasil, 22-24 de Octubre. DT5.

Pérez J.E., Gingarelli M., Beilis A., Corcuera J. 1996. Alimentación del delfín Franciscana en el Sur de la Provincia de Buenos Aires, Argentina. Libro de resúmenes pag. 91, VII Reunión de Trabajo de Especialistas en Mamíferos Acuáticos de América del Sur, I Congreso de la Sociedad Latinoamericana de Especialistas en Mamíferos Acuáticos Villa del Mar, Chile, 22-25 de Octubre.

Pérez J.E., Tamini L.L., Chiaramonte G., Cappozzo H.L. 2000. Un nuevo enfoque de la interacción entre el delfín franciscana (*Pontoporia blainvillei*) y la pesquería costera en el área de Puerto Quequén, Pcia. de Buenos Aires, Argentina. Libro de resúmen pag 100. IX Reunión de Trabajo de Especialistas en Mamíferos Acuáticos de América del Sur, III Congreso de la Sociedad Latinoamericana Especialistas en Mamíferos Acuáticos, Buenos Aires, Argentina, 30 de Octubre – 3 de Noviembre.

Perrin W.F., Donovan G.P. 1984. Report of the Workshop on the reproduction in whales, dolphins and porpoises. Int Whal Commn. (Special Issue 6): 1-23

Pfei□ er C.J., Rowntree V.J. 1996. Epidermal ultrastructure of the southern right whale calf (Eubalaena australis). J Submicr Cytol Path. 28: 277–286.

Tinker S.W., 1988. Whales of the World. E.J. Brill Publishing Company, Leiden, New York. 310 pp.

Pinedo M.C., Praderi R., Brownell Jr. L. 1989. Review of the Biology and Status of the franciscana, *Pontoporia blainvillei*. In: Perrin W.F., Brownell Jr. R.L., Kaiyo Z., Jiankang L. (eds.). Biology and conservation of the River dolphins. Occas. pap. IUCN, 3. Gland. p. 46-51.

Pinedo M.C. 1991. Development and variation oh the franciscana *Pontoporia blainvillei*. Tesis Doctoral, University of California, Santa Cruz, USA. 406 pp.

Pinedo M.C., Hohn A.A. 2000. Growth layer patterns in teeth from the Franciscana, *Pontoporia blainvillei*: developing a model for precision in age estimation. Mar Mamm Sci. 16: 1-27.

Pillet S., Lesage V., Hammill M., Cyr D.G., Bouquegneau J.M., Fournier M. 2000. In vitro exposure of seal peripheral blood leukocytes to different metals reveal a sex-dependent effect of zinc on phagocytic activity. Mar Pollut Bull. 40: 921-927.

Polizzi P., Chiodi-Boudet L., Rodriguez D., Denuncio P., Bastida R., Gerpe M. 2010. Evaluación de estrés ambiental en *Pontoporia Blainvillei* de aguas argentinas. Situación actual y futura. "VII workshop para coordenação de pesquisa e conservação de *Pontoporia blainvillei* (Gervais & D'Orbigny, 1844)". Florianópolis, Brasil, 22-24 de Octubre. DT2.

Ponce-Velez G., Botello A.V. 1991. Aspectos geoquímicos y de contaminación por metales pesados en la laguna de Términos, Campeche. Hidrobiología. 1: 1-10.

Praderi R., Pinedo M.C., Crespo E.A. 1989. Conservation and management of *Pontoporia blainvillei* in Uruguay, Brazil and Argentina. In: Perrin W.F., Brownell R.L., Kaiya Z,

Jiankang L. (eds.). Biology and Conservation of the River Dolphins. Occasional Papers of the IUCN, N3, IUCN/SSC. p. 52-56.

Quérouil S., Freitas L., Dinis A., Alves F., Cascão I., Prieto R., Silva M.A., Magalhães S., Matos J.A., Santos R.S. 2010. Sex bias in biopsy samples collected from free-ranging dolphins. Eur J Wildl Res. 56:151–158.

Ralls K. 1976. Mammals in which females are larger than males. Q. Rev. Biol. 51:245−276.

Ramos R.M.A., Di Benedito A.P.M., Lima N.R.W. 2000. Growth parameters of *Pontoporia blainvillei* (Cetácea) in northern Río de Janeiro, Brazil. Aquat Mamm. 26: 65-75.

Reif J.S. 2011. Animal Sentinels for Environmental and Public Health. Public Health Rep. 126:50-57.

Reijnders P.J.H., Aguilar A. 2002. Pollution and Marine mammals. In: Encyclopedia of Marine mammals. Perrin W.F., Wursig B., Thewissen J.G.M. (eds.). Academic Press, San Diego.

Rink L., Gabriel P. 2001. Extracellular and immunological actions of zinc. Biometals. 14: 367–383.

Roditi-Elasar M., Kerem D., Hornung H., Kress N., Shohan-Frider E., Goffman O., et al. 2003. Heavy metal levels in bottlenose and striped dolphins off the Mediterranean coast of Israel. Mar Pollut Bull. 46: 491–521.

Rodríguez D., Rivero L., Bastida R. 2002. Feeding ecology of the franciscana (*Pontoporia blainvillei*) in marine and estuarine waters of Argentina. LAJAM. 1: 77-94.

Rosas F.C.W. 2000. Interaıes com a pesca, mortalidade, idade, reprodução e crescimento de *Sotalia guianensis* e *Pontoporia blainvillei* (Cetacea, Delphinidae e Pontoporiidae) no litoral

sul do Estado de Sao Paulo e litoral do Estado do Paraná, Brasil. Tesis doctoral. Universidad Federal de Paraná, Brasil. 145 pp.

Rosas F.C., Monteiro-Filho E.L.A. 2001. Reproductive parameters of *Pontoporia blainvillei* (cetacean, Pontoporiidae), on the coast of Sao Paulo and Paraná States, Brazil. Mammalia. 2: 231-245.

Salgueiro M.J., Zubillaga M., Lysionek A., Cremaschi G., *et al.* 2000. Zinc status and immune system relationship. A review. Biol Trace Elem Res. 76: 193–205

Shaughnessy P.D. 1993. Collection of material for the determination organochlorine and heavy metal levels. In: Antarctic seals. Research methodand techniques. Laws R.M. (ed.) Cambridge University Press. p. 194-198.

Secchi E.R., Wang J.Y., Murray B.W., Rocha-Campos C.C., White B.N. 1998. Population differention in the franciscana (*Pontoporia blainvillei*) from two geographic locations in Brazil as determined from mitochondrial DNA control region sequences. Can J Zool. 76:1622-1627.

Secchi E.R., Danilewicz D., Ott P.H. 2003. Applying the phylogeographic concept to identify franciscanas dolphin stocks: implications to meet management objectives. J Cetacean Res Manage. 5: 61–68.

Seixas T.G., Kehrig H.A., Costa M., Fillmann G., Di Beneditto A.P.M., Souza C.M.M., Secchi E.R., Moreira I., Malm O. 2007. Ecological and biological determinants of trace elements accumulation in liver and kidney of *Pontoporia blainvillei*. Sci Total Environ. 385: 208–220.

Seixas T.G., Kehrig H.A., Costa M., Fillmann G., Di Beneditto A.P.M., Secchi E.R., *et al.* 2008. Total mercury, organic mercury and selenium in liver and kidney of a South American coastal dolphin. Environ Pollut. 154: 98 106.

Seixas T.G., Kehrig H.A., Di Beneditto A.P.M., Souza C.M.M., Malm O., Moreira I. 2009. Trace Elements in Different Species of Cetacean from Rio de Janeiro. Coast J Braz Chem Soc. 2: 243-251.

Shlosberg A., Bellaiche M., Regev S., Gal R., Brizzi M., Hanji V., *et al.* 1997. Lead toxicosis in a captive bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) consequent to ingestion of air gun pellets. J Wildl Dis. 33: 135-139.

Siciliano S. 1994. Review of small cetaceans and fishery interactions in coastal waters of Brazil. In Perrin W.F., Donovan G.P., Barlow J. (eds.). Gillnets and cetaceans. Rep. Int. Whal. Commn. Special Issue 15. pp. 241-250

Shimshock N., Sennefelder G., Dueker M., Thurberg F., Arish Y. 1992. Patterns of metal accumulation in *Laminaria longicruris* form Long Island Sound (Connecticut). Arch Environ Contam Toxicol. 22: 305-312.

Singh N., Turner A. 2009. Trace metals in antifouling paint particles and their heterogeneous contamination of coastal sediments. Mar Pollut Bull. 58: 559-56.

Stavros H.C.W., Bossart D., Hulsey T.C., Fair P.A. 2007. Trace element concentrations in skin of free- ranging bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) from the southeast Atlantic coast. Sci Total Environ. 388: 300–315.

Steward R.E.A, Steward B.E. 2009. Female reproductive system. In: Perrin W.F., Würsig B., Thewissen J.G.M. (eds.). Encyclopedia of marine mammals. Second edition. 1353 pp.

Sydeman W.J., Jarman W.M., 1998. Trace Metals in Seabirds, Steller Sea Lion, and Forage Fish and Zooplankton from Central California. Mar Pollut Bull. 36: 828-832.

Trimble M., Praderi R. 2008. Assessment of Nonmetric Skull Characters of the Franciscana (*Pontoporia blainvillei*) in Determining Population Differences. Aquat Mamm. 34:338-348.

Thompson D.R. 1990. Heavy metals in marine vertebrates. In: Furness R.W., Rainbow P.S. (eds.). Heavy Metals in the Marine Environment. CRC Press, Boca Raton. p. 143-182

Valsecchi E., Zanelatto R.C. 2003. Molecular analysis of the social and population structure of the franciscana (*Pontoporia blainvillei*): conservation implications. J Cetacean Res Manag. 5: 69−75.

Varella L.B., Teruggi L.B. 2002. Caracterización hidrológica de la cuenca del Río Quequén Grande, Provincia de Buenos Aires. En: Teruggi LB. (ed.). Manejo Integral de Cuencas Hidrográficas y Planificación Territorial. Mar del Plata, Universidad Nacional de Mar del Plata. pp. 19-29

Van Erp I. 1969. In quest of the La Plata dolphin. Pac. Discovery. 22: 18-24.

Wagemann R., Muir D.C.G., 1984. Concentrations of Heavy Metals and Organochlorines in Marine Mammals of Northern Waters: Overview and Evaluation. Can Tech Rep Fish Aquat Sci. 1279: 97 p.

Wagemann R., Stewart R.E.A. 1994. Concentrations of Heavy Metals and Selenium in Tissues and Some Foods of Walrus (*Odobenus rosmarus rosmarus*) from the Eastern Canadian Arctic and Sub-Arctic, and Associations between Metals, Age, and Gender. Can J Fish Aquat Sci. 51: 426-436.

Wagemann R., Innes S., Richard P.R. 1996. Overview and regional and temporal differences of heavy metals in Arctic whales and ringed seals in the Canadian Arctic. Sci Total Environ. 186: 41–66.

Watanabe I., Tanabe S., Amano M., Miyazaki N., Petrov E.A., Tatsukawa R. 1998. Age-Dependent Accumulation of Heavy Metals in Baikal Seal (*Phoca sibirica*) from the Lake Baikal. Arch Environ Contam Toxicol. 35: 518-526.

Wood C.M., Van-Vleet E.S. 1996. Cooper, cadmium and zinc in liver, kidney and muscle tissues of bottlenose dolphins (*Tursipos truncates*) stranded in Florida. Mar Pollut Bull. 32: 886-889.

Woshner V.M., O'hara T.M., Bratton G.R., Suydam R.S., Beasley V.R. 2001. Concentrations and interactions of selected essential and non essential elements in bowhead and beluga whales of arctic Alaska. J Wildl Dis. 37: 693–710.

Yang J., Kunito T., Tanabe S., Amano M., Miyazaki N. 2002. Trace elements in skin of Dall's porpoises (*Phocoenoides dalli*) from the northern waters of Japan: an evaluation for utilization as non-lethal tracers. Mar Pollut Bull. 45:230–6.

Yang J., Miyazaki N. 2003. Moisture content in Dall's porpoise (*Phocoenoides dalli*) tissues: a reference base for conversion factors between dry and wet weight trace element concentrations in cetaceans. Environ Pollut. 121:345–7.

Zelikoff J.T, Thomas P.T. 1998. Immunotoxicology of environmental and occupational metals. Taylor & Francis, London.

APÉNDICE 1

Protocolo para la obtención de cortes histológicos de dientes de *Pontoporia blainvillie*

Fijación

Entre 1 a 3 dientes de cada ejemplar se sumergen durante 12 hs en solución de formaldehido al 10%, luego se lavan con agua corriente durante otras 12 hs.

Descalcificación

Este proceso se realiza con el fin de "ablandar" los dientes para poder cortarlos en láminas finas.

1. Se sumergen los dientes dentro de histo-cassettes rotulados en una mezcla comercial de ácidos RDO®. Por cada litro de RDO® se colocan no más de 10 cajas perforadas
2. Para evitar la decantación del ácido, éste se agitó cada media hora.
3. La descalcificación concluye cuando el diente se observa más traslúcido y con mayor flexibilidad en las puntas de la dentina y de la raíz.
4. Se aclararon los dientes descalcificados en agua corriente para remover el exceso de RDO®
5. Se conservaron en agua destilada hasta el momento del corte.

Corte

1. Los cortes se realizaron con crióstato marca *Reickert-Jung*.
2. Antes de cortar los dientes se fijaron en orientación antero-posterior a la placa del crióstato con un medio de montaje adecuado como el *Crioplast*®.
3. Se obtuvieron cortes a lo largo del plano medio longitudinal a 25 μm de espesor que se conservaron en agua destilada hasta el momento de la tinción

Tinción y montaje

1. Se colocaron pocos cortes de cada diente por histocassette (con el fin de evitar la superposición entre ellos)
2. Los histocassettes se sumergieron en 300 ml de Hematoxilina de Mayer durante 3 a 15 min según la maduración de la hematoxilina (a mayor longevidad menor tiempo de tinción).
3. Se bañaron los histocassettes en borato de sodio 1% por 1 min para remover el exceso de colorante y lograr un mejor contraste.
4. Se aclararon los cortes con un baño de agua corriente por 30 min.
5. Luego, se mantuvieron los cortes en glicerina 50% (glicerina: agua destilada) por 30 min y en glicerina 100% por 60 min. o hasta su montaje definitivo.
6. Finalmente los mejores cortes se montaron en glicerina al 100% en portaobjetos. Se dejó secar y se selló el cubreobjetos con esmalte de uñas transparente.

APÉNDICE 2

Protocolo para la obtención de cortes histológicos de gónadas de *Pontoporia blainvillie*

Fijación

Cubos/láminas de 3 mm de espesor (colocar la espira en el fijador, esperar 20 a 30 min. y cortar la feta con hoja de bisturí) se fijaron es solución de formaldehido al 10%.

Deshidratación

Este proceso se realiza con el fin de extraer la mayor cantidad de agua posible del tejido para la posterior inclusión de la pieza en parafina siguiendo el protocolo que se enuncia:

1. Se colocó la pieza de 1-3 mm del tejido gonadal en alcohol 80% durante 12 – 14 horas.
2. Se trasvasó a alcohol 96 % durante 1 hora.
3. Se colocó a la pieza en un baño en alcohol absoluto (100%) durante 1 hora.
4. Se realizaron dos baños en Xileno de 30 minutos cada uno.

Inclusión y solidificación

1. Se sometió a la pieza a tres baños en paraplast de 20-25 minutos de duración a 56-58 ºC en estufa con termostato.
2. Se dejó enfriar en un contenedor de aluminio a temperatura ambiente hasta que endureció el contenido completamente.

3. Se talló el taco con el corte incluido, usando una espátula de metal caliente y un cúter, buscando que el taco tenga una forma trapezoidal y uno de los bordes quede lo más liso posible, para el posterior corte del mismo.

Corte y montaje

1. Los cortes obtenidos con el micrótomo se sometieron a un baño térmico a 42ºC donde se estiraron para facilitar la preparación final.
2. Los cortes se extrajeron del baño térmico con el portaobjetos y se montaron sobre un portaobjetos.
3. El portaobjetos con el corte histológico se colocó - en posición vertical - en estufa a 37ºC durante 12 horas antes de la coloración.

Coloración con Hematoxilina según Mayer preparada:

1. Se sumergieron los portaobjetos con los cortes en Xilol durante tres minutos, con el fin de desparafinar el corte **(Xilol Nuevo)**.
2. Se dejaron secar a temperatura ambiente.
3. Hidratación de los cortes con alcohol en graduación decreciente (alcohol 100% - 96 % - 80% - 70%)
4. Pasaje por agua destilada.
5. Se sumergen los portaobjetos con el corte en solución de Hematoxilina según Mayer durante 14 minutos, aproximadamente.
6. Lavado con agua corriente hasta que vire de un color violeta oscuro al azulado.
7. Se secaron completamente a temperatura ambiente.
8. Inmersión de los portaobjetos en solución de Eosina durante 10-15 minutos.

9. Se realizó un pasaje de los portaobjetos por alcohol 80%, 96% y 100%.
10. Aclaración de los cortes con xilol en exceso y sin dejar secar.
11. Montado con bálsamo de Canadá sintético, Canadax.

APÉNDICE 3

Tabla de abreviaturas

Siglas	Descripción
%CV	Porcentaje de coeficiente de variación
%IH	Índice hepato-somático (Porcentaje de peso del hígado)
%IR	Índice renal-somático (Porcentaje de peso del riñón)
%PG	Índice de condición corporal (Porcentaje de peso de la grasa)
%PRT/O	Porcentaje de peso relativo de testículos y ovarios
%RE	Porcentaje de recuperación
ACC	Análisis de correspondencia canónica
ACP	Análisis de componentes principales
AFD	Análisis de función discriminante
AIC	Criterio de información de Akaike
ATD/I	Ancho de testículo derecho/izquierdo
BB	Bahía Blanca
C	Claromecó
CB	Cuerpo blanco
CL	Cuerpo lúteo
DMT	Diámetro medio testicular
DSI	Dimorfismo sexual invertido
EAA	Espectrofotómetro de Absorción Atómica
EMS	Edad de madurez sexual
EP	Espermátidas
ETD/I	Espesor de testículo derecho/izquierdo
FMAs	Área de manejo de franciscana
G de E	Grupos de edad
gl	Grados de libertad
GLGs	Grupos de líneas de crecimiento
GLZ	Modelo lineales generalizados
I	Ejemplares sexualmente Inmaduros
ICP-OES	Espectrofotómetro de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente
IM	Índice de madurez
IUCN	Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza
Kn	Índice relativo de condición corporal
LCT/O	Largo combinado de testículos y ovarios
LDI	Límite de detección del instrumento
LDM	Límite de detección del método
LOM	Largo de ovario medio
LT	Talla total del ejemplar
LTD/I	Largo de testículo derecho/izquierdo
LTM	Largo medio de testículos

Continuación…

Siglas	Descripción
M	Ejemplares sexualmente Maduros
MH	Monte Hermoso
N	Necochea
NBA	Norte de Buenos Aires
PA	Estado de Paraná (Brasil)
PCT/O	Peso combinado de testículos y ovarios
POM	Peso de ovario medio
PTD/I	Peso de testículo derecho/izquierdo
PTM	Peso medio de testículos
RG	Estado de Río Grande do Sul (Brasil)
RJ	Estado de Río de Janeiro (Brasil)
R_{sp}	Coeficiente de correlación de Spearman
SBA	Sur de Buenos Aires
SP	Estado de São Paulo (Brasil)