



**UNIVERSIDAD
DE ANTIOQUIA**

**CARACTERIZACIÓN PROTEICA DE LA
VITELOGENINA Y ANÁLISIS ESPERMÁTICO
DE TILAPIA (*Oreochromis spp.*) EXPUESTA A
DIFERENTES NIVELES DE CONCENTRACIÓN
DE TRICLOSÁN EN AGUA.**

Sylvia María Cacua Ortiz

Universidad de Antioquia

Facultad de Ingeniería, Escuela Ambiental

Medellín, Colombia

2020



Caracterización proteica de la vitelogenina y análisis espermático de Tilapia (*Oreochromis spp.*) expuesta a diferentes niveles de concentración de triclosán en agua.

Sylvia María Cagua Ortiz

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:
Magíster en Ingeniería Ambiental

Asesores (a):

Dr. Gustavo Antonio Peñuela Mesa Dr. en Química Ambiental

Néstor Jaime Aguirre Ramírez Dr. rer. nat

Línea de Investigación:

Calidad de agua y análisis de residuos tóxicos

Grupo de Investigación:

Grupo Diagnostico y Control de la Contaminación

Universidad de Antioquia

Facultad de Ingeniería, Escuela ambiental

Medellín, Colombia

2020

A mis padres Myriam Ortiz Bohórquez y Julio Alirio Cagua dedico este trabajo de investigación, porque gracias a su apoyo constante logre una nueva meta académica.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Planteamiento del problema	1
1.2 Objetivos.....	4
1.2.1 Objetivo general	4
1.2.2 Objetivos específicos.....	5
2. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE.	6
2.1 Contaminantes emergentes en las fuentes hídricas.....	6
2.2 Efectos del TCS sobre algunos organismos.	7
2.3 Tilapia.....	11
2.4 Sistema endocrino de tilapia.....	15
2.4.1 Hipófisis en peces.....	15
2.4.2 Influencia de los cambios ambientales en el funcionamiento correcto del sistema endocrino.	17
2.5 Procesos de reproducción en tilapia roja (<i>Oreochromis spp</i>).	17
2.5.1 Ovogénesis	17
2.5.2 Espermatogénesis.	19
3. METODOLOGÍA.....	21
3.1 Metodología ensayos preliminares.	21
3.1.1 Ensayo 1. Evaluación de fotodegradación del TCS.	21
3.1.2 Ensayo 2. Evaluación de la variabilidad de TCS respecto al tipo de filtro.	22
3.1.3 Ensayo 3. Evaluación de la variabilidad de la concentración de TCS respecto al tipo de difusor de oxígeno.	22
3.1.4 Ensayo 4. Evaluación de la variabilidad de TCS con la exposición de alimento.....	22
3.1.5 Ensayo 5. Evaluación variabilidad de la concentración de TCS en presencia de tilapia.	23
3.2 Metodología para las variables respuesta del diseño de experimentos del trabajo de investigación.....	24
3.2.1 Metodología de la recolección de muestras de gametos en machos Tilapia.	24
3.2.1.1 Metodología motilidad de espermatozoides en tilapia.....	25
3.2.1.2 Metodología movilidad de espermatozoides en tilapia.....	25
3.2.1.3 Metodología vitalidad de espermatozoides en tilapia.....	26

3.2.1.4 Metodología morfología de espermatozoides en tilapia.	26
3.2.1.4.1 Morfología normal de los espermatozoides.	27
3.2.1.4.2 Morfología anormal de los espermatozoides.	27
3.2.2 Metodología de la recolección de muestras de gametos en hembras Tilapia.	28
3.2.2.1 Preparación de la muestra de hembras de tilapia (óvulos).	29
3.2.2.1.1 Dilución del estándar de vitelogenina.	29
3.2.2.1.2 Dilución de las muestras.	30
3.2.3 Metodología para el análisis de las muestras de agua a través de cromatografía líquida de ultra alta eficiencia acoplado a espectrometría de masas para determinar la concentración de TCS en cada tratamiento.	31
4. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	33
4.1 Diseño experimental ensayos preliminares.	33
4.1.1 Ensayo 1. Evaluación de fotodegradación del TCS.	33
4.1.2 Ensayo 2. Evaluación de la variabilidad de TCS respecto al tipo de filtro.	34
4.1.3 Ensayo 3. Evaluación de la variabilidad de la concentración de TCS respecto al tipo de difusor de oxígeno.	36
4.1.4 Ensayo 4. Evaluación de la variabilidad de TCS con la exposición de alimento para peces.	38
4.1.5 Ensayo 5. Evaluación variabilidad de la concentración de TCS en presencia de tilapia.	39
4.2 Diseño experimental variables respuesta trabajo de investigación.	41
4.2.1 Hipótesis.	45
4.2.1.1 Hipótesis estadística	45
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	48
5.1 Ensayos preliminares.	48
5.1.1 Ensayo 1. Evaluación de fotodegradación del TCS.	48
5.1.1.1 Análisis estadístico de la fotodegradación del TCS.	52
5.1.2 Ensayo 2. Evaluación de la variabilidad de TCS respecto al tipo de filtro.	54
5.1.2.1 Análisis estadístico de la variación de TCS respecto al tipo de filtro.	58
5.1.3 Ensayo 3. Evaluación de la variabilidad de la concentración de TCS respecto al tipo de difusor de oxígeno.	59
5.1.3.1 Análisis estadístico de la variación de TCS respecto al tipo de difusor de oxígeno.	62
5.1.4 Ensayo 4. Evaluación de la variabilidad de TCS con la exposición de alimento.	64
5.1.4.4 Análisis estadístico de la variación de TCS con la exposición de alimento.	68
5.1.5 Ensayo 5. Evaluación variabilidad de TCS en presencia de tilapia.	69

5.1.5.1 <i>Análisis estadístico de la variación de TCS en presencia de tilapia.</i>	74
5.2 <i>Análisis de Motilidad en los espermatozoides de los peces Tilapia.</i>	75
5.2.1 <i>Análisis de Motilidad expuestos a TCS (50 µg/L).</i>	75
5.2.2 <i>Análisis de Motilidad expuestos a TCS (120 µg/L).</i>	81
5.2.3 <i>Análisis de Motilidad expuestos a TCS (190 µg/L).</i>	86
5.2.4 <i>Análisis de motilidad progresiva (PR).</i>	91
5.2.5 <i>Análisis estadístico de la motilidad progresiva.</i>	93
5.2.6 <i>Análisis de la Motilidad no progresiva (NP).</i>	95
5.2.7 <i>Análisis estadístico de la motilidad no progresiva.</i>	96
5.2.8 <i>Análisis de la Inmotilidad (IN).</i>	98
5.2.9 <i>Análisis estadístico de la Inmotilidad.</i>	99
5.3 <i>Análisis vitalidad en espermatozoides de peces Tilapia.</i>	101
5.3.1 <i>Análisis de la vitalidad a 50 µg/L de TCS.</i>	101
5.3.2 <i>Análisis de la vitalidad a 120 µg/L de TCS.</i>	105
5.3.3 <i>Análisis de la vitalidad a 190 µg/L de TCS.</i>	109
5.3.4 <i>Análisis estadístico de la vitalidad.</i>	113
5.4 <i>Análisis morfológico en espermatozoides de peces Tilapia.</i>	115
5.4.1 <i>Análisis morfológico de espermatozoides en peces sin estar expuestos al contaminante TCS.</i>	115
5.4.2 <i>Análisis morfológico de espermatozoides en peces expuestos a 50 µg/L de TCS.</i>	117
5.4.3 <i>Análisis morfológico de espermatozoides en peces expuestos a 120 µg/L de TCS.</i> ..	122
5.4.4 <i>Análisis morfológico de espermatozoides en peces expuestos a 190 µg/L de TCS.</i> ..	126
5.5 <i>Análisis de Residualidad de TCS en el agua.</i>	130
5.5.1 <i>Análisis de TCS en el día 1 de exposición de los peces al contaminante a 50 µg/L, 120 µg/L y 190 µg/L.</i>	130
5.5.2 <i>Análisis de TCS en el día 4 de exposición de los peces al contaminante a 50 µg/L, 120 µg/L y 190 µg/L.</i>	135
5.5.3 <i>Análisis de TCS en el día 8 de exposición de los peces al contaminante a 50 µg/L, 120 µg/L y 190 µg/L.</i>	139
5.5.4 <i>Análisis estadístico de la variabilidad de TCS en los tratamientos.</i>	143
5.6 <i>Análisis Vitelogenina en las hembras Tilapia.</i>	145
5.6.1 <i>Análisis estadístico de la variable VTG.</i>	149
6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	152
7. REFERENCIAS	155

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Ensayos preliminares en la matriz de agua.	21
Tabla 2. Curva vitelogenina (VTG) método ELISA.	29
Tabla 3. Incubación curva del estándar de VTG y muestras.	30
Tabla 4. Evaluación de fotodegradación del TCS.	33
Tabla 5. Evaluación de la variabilidad de TCS respecto al tipo de filtro.	35
Tabla 6. Evaluación de la variabilidad de la concentración de TCS respecto al tipo de aireador. ..	36
Tabla 7. Evaluación de la variabilidad de TCS con la exposición de alimento para peces.	38
Tabla 8. Evaluación variabilidad de la concentración de TCS en presencia de tilapia.	40
Tabla 9. Factores del diseño experimental del trabajo de investigación.	42
Tabla 10. Variables respuesta del diseño experimental.	43
Tabla 11. Tratamientos del diseño experimental en machos.	43
Tabla 12. Tratamientos diseño experimental en hembras.	44
Tabla 13. Hipótesis del problema con relación al efecto del TCS, el tiempo y los niveles de pH en la disrupción endocrina.	46
Tabla 14. ANOVA para la variable respuesta fotodegradación del TCS.	52
Tabla 15. Verificación de hipótesis para la variable motilidad.	53
Tabla 16. ANOVA para la variable respuesta variación de TCS respecto al tipo de filtro.	58
Tabla 17. Verificación de hipótesis para la variabilidad de TCS respecto al tipo de filtro.	59
Tabla 18. ANOVA para la variable respuesta variación en el nivel de TCS respecto al tipo de difusor de oxígeno usado.	63
Tabla 19. Verificación de hipótesis para evaluar la variabilidad de TCS respecto al tipo de difusor usado.	63
Tabla 20. ANOVA para la variable respuesta exposición al alimento.	68
Tabla 21. Tabla verificación de hipótesis para los niveles de alimento.	69
Tabla 22. ANOVA para la variable respuesta variabilidad de TCS en presencia de tilapia.	74
Tabla 23. Verificación de hipótesis para la variable de concentración de TCS con la presencia de tilapia.	75
Tabla 24. Evaluación PM, NP e IM en espermatozoides tratamiento 1 (medición 1), Concentración 50 µg/L de TCS, pH 7.	76
Tabla 25. Evaluación PM, NP e IM en espermatozoides tratamiento 7 (medición 1), Concentración 50 µg/L de TCS, pH 9.	77
Tabla 26. Evaluación PM, NP e IM en espermatozoides, tratamiento 1 (medición 2), Concentración 50 µg/L de TCS, pH 7.	78
Tabla 27. Evaluación PM, NP e IM en espermatozoides tratamiento 7 (medición 2), Concentración 50 µg/L de TCS, pH 9.	79
Tabla 28. Evaluación PM, NP e IM en espermatozoides tratamiento 1 (medición 3), Concentración 50 µg/L de TCS, pH 7.	80
Tabla 29. Evaluación PM, NP e IM en espermatozoides tratamiento 7 (medición 3), Concentración 50 µg/L de TCS, pH 9.	81

Tabla 30. Evaluación PM, NP e IM en espermatozoides, tratamiento 2 (medición 1), Concentración 120 µg/L de TCS, pH 7.....	82
Tabla 31. Evaluación PM, NP e IM en espermatozoides, tratamiento 8 (medición 1), Concentración 120 µg/L de TCS, pH 9.....	83
Tabla 32. Evaluación PM, NP e IM en espermatozoides tratamiento 2 (medición 2), Concentración 120 µg/L de TCS, pH 7.....	83
Tabla 33. Evaluación PM, NP e IM en espermatozoides, tratamiento 8 (medición 2), Concentración 120 µg/L de TCS, pH 9.....	84
Tabla 34. Evaluación PM, NP e IM en espermatozoides, tratamiento 2 (medición 3), Concentración 120 µg/L de TCS, pH 7.....	85
Tabla 35. Evaluación PM, NP e IM en espermatozoides, tratamiento 8 (medición 3), Concentración 120 µg/L de TCS, pH 9.....	86
Tabla 36. Evaluación PM, NP e IM en espermatozoides, tratamiento 3 (medición 1), Concentración 190 µg/L de TCS, pH 7.....	87
Tabla 37. Evaluación PM, NP e IM en espermatozoides tratamiento 9 (medición 1), Concentración 190 µg/L de TCS, pH 9.....	87
Tabla 38. Evaluación PM, NP e IM en espermatozoides, tratamiento 3 (medición 2), Concentración 190 µg/L de TCS, pH 7.....	88
Tabla 39. Evaluación PM, NP e IM en espermatozoides, tratamiento 9 (medición 2), Concentración 190 µg/L de TCS, pH 9.....	89
Tabla 40. Evaluación PM, NP e IM en espermatozoides, tratamiento 3 (medición 3), Concentración 190 µg/L de TCS, pH 7.....	90
Tabla 41. Evaluación PM, NP e IM en espermatozoides tratamiento 9 (medición 3), Concentración 190 µg/L de TCS, pH 9.....	91
Tabla 42. ANOVA para la variable respuesta Motilidad progresiva.....	93
Tabla 43. Verificación de hipótesis para la variable motilidad.....	94
Tabla 44. ANOVA para la variable respuesta Motilidad no progresiva.....	96
Tabla 45. Verificación de hipótesis para la variable motilidad no progresiva.....	97
Tabla 46. ANOVA para la variable respuesta Inmotilidad.....	99
Tabla 47. Verificación de hipótesis para la variable inmotilidad.....	100
Tabla 48. Evaluación de la vitalidad en espermatozoides, tratamiento 1 (medición 1), Concentración 50 µg/L de TCS, pH 7.....	102
Tabla 49. Evaluación de la vitalidad en espermatozoides, tratamiento 7 (medición 1), Concentración 50 µg/L de TCS, pH 9.....	102
Tabla 50. Evaluación de la vitalidad en espermatozoides tratamiento 1 (medición 2), Concentración 50 µg/L de TCS, pH 7.....	103
Tabla 51. Evaluación de la vitalidad en espermatozoides, tratamiento 7 (medición 2), Concentración 50 µg/L de TCS, pH 9.....	103
Tabla 52. Evaluación de la vitalidad en espermatozoides, tratamiento 1 (medición 3), Concentración 50 µg/L de TCS, pH 7.....	104
Tabla 53. Evaluación de la vitalidad en espermatozoides, tratamiento 7 (medición 3), Concentración 50 µg/L de TCS, pH 9.....	105
Tabla 54. Evaluación de la vitalidad en espermatozoides, tratamiento 2 (medición 1), Concentración 120 µg/L de TCS, pH 7.....	105
Tabla 55. Evaluación de la vitalidad en espermatozoides, tratamiento 8 (medición 1), Concentración 120 µg/L de TCS, pH 9.....	106

Tabla 56. Evaluación de la vitalidad en espermatozoides, tratamiento 2 (medición 2), Concentración 120 µg/L de TCS, pH 7.....	106
Tabla 57. Evaluación de la vitalidad en espermatozoides, tratamiento 8 (medición 2), Concentración 120 µg/L de TCS, pH 9.....	107
Tabla 58. Evaluación de la vitalidad en espermatozoides tratamiento 2 (medición 3), Concentración 120 µg/L de TCS, pH 7.....	108
Tabla 59. Evaluación de la vitalidad en espermatozoides tratamiento 8 (medición 3), Concentración 120 µg/L de TCS, pH 9.....	109
Tabla 60. Evaluación de la vitalidad en espermatozoides, tratamiento 3 (medición 1), Concentración 190 µg/L de TCS, pH 7.....	109
Tabla 61. Evaluación de la vitalidad en espermatozoides, tratamiento 9 (medición 1), Concentración 190 µg/L, pH 9.....	110
Tabla 62. Evaluación de la vitalidad en espermatozoides, tratamiento 3 (medición 2), Concentración 190 µg/L de TCS, pH 7.....	110
Tabla 63. Evaluación de la vitalidad en espermatozoides, tratamiento 9 (medición 2), Concentración 190 µg/L de TCS, pH 9.....	111
Tabla 64. Evaluación de la vitalidad en espermatozoides, tratamiento 3 (medición 3), Concentración 190 µg/L de TCS, pH 7.....	111
Tabla 65. Evaluación de la vitalidad en espermatozoides, tratamiento 9 (medición 3), Concentración 190 µg/L de TCS, pH 9.....	112
Tabla 66. ANOVA para la variable respuesta vitalidad espermática.....	114
Tabla 67. Verificación de hipótesis la variable vitalidad espermática.....	114
Tabla 68. Caracterización morfológica de espermatozoides de Tilapia sin exposición a TCS (Primera medición).....	117
Tabla 69. Caracterización morfológica de espermatozoides de Tilapia expuestos a 50 µg/L de TCS, segunda medición.....	118
Tabla 70. Caracterización morfológica de espermatozoides de Tilapia expuestos a 50 µg/L de TCS, segunda medición (Replica).....	120
Tabla 71. Caracterización morfológica de espermatozoides de Tilapia expuestos a 50 µg/L de TCS, tercera medición.....	121
Tabla 72. Caracterización morfológica de espermatozoides de Tilapia expuestos a 120 µg/L de TCS, segunda medición.....	124
Tabla 73. Caracterización morfológica de espermatozoides de Tilapia expuestos a 120 µg/L de TCS, tercera medición.....	126
Tabla 74. Caracterización morfológica de espermatozoides de Tilapia expuestos a 190 µg/L de TCS, segunda medición.....	127
Tabla 75. Caracterización morfológica de espermatozoides de Tilapia expuestos a 190 µg/L de TCS, tercera medición.....	130
Tabla 76. ANOVA para la variable respuesta nivel de TCS.....	143
Tabla 77. Verificación de hipótesis para motilidad.....	144
Tabla 78. Puntos de la curva estándar de VTG.....	145
Tabla 79. ANOVA para la variable respuesta VTG.....	150
Tabla 80. Verificación de hipótesis para VTG.....	150

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Metodología de preparación de las muestras de agua para el análisis en el UPLC MS/MS.	32
Figura 2. Variables diseño experimental.	47
Figura 3. Diagrama de cajas para la variación de la concentración de TCS a 50 µg /L a través de los días.	49
Figura 4. Diagrama de cajas para la variación de la concentración de TCS a 120 µg /L a través de los días.	49
Figura 5. Diagrama de cajas para la variación de la concentración de TCS a 190 µg/L a través de los días.	49
Figura 6. Diagrama de cajas para la variación de la concentración de TCS a 50 µg /L en ausencia (1) o presencia de luz (2).	50
Figura 7. Diagrama de cajas para la variación de la concentración de TCS a 120 µg /L en ausencia (1) o presencia de luz (2).	50
Figura 8. Diagrama de cajas para la variación de la concentración de TCS a 190 µg/L en ausencia (1) o presencia de luz (2).	50
Figura 9. Interacción entre niveles de luz y concentración de TCS.	52
Figura 10. Interacción entre niveles de luz y concentración de TCS.	52
Figura 11. Interacción entre niveles de luz y concentración de TCS.	52
Figura 12. Diagrama de cajas para la variación de la concentración a 50 µg/L de TCS respecto al tipo de filtro usado durante una semana.	55
Figura 13. Diagrama de cajas para la variación de la concentración a 120 µg/L de TCS respecto al tipo de filtro usado durante una semana.	55
Figura 14. Diagrama de cajas para la variación de la concentración a 190 µg/L de TCS respecto al tipo de filtro usado durante una semana.	55
Figura 15. Diagrama de cajas para la variación de la concentración a 50 µg/L de TCS respecto al tipo de filtro usado. Filtración química (1) y filtración mecánica (2).	56
Figura 16. Diagrama de cajas para la variación de la concentración a 120 µg/L de TCS respecto al tipo de filtro usado. Filtración química (1) y filtración mecánica (2).	56
Figura 17. Diagrama de cajas para la variación de la concentración a 190 µg/L de TCS respecto al tipo de filtro usado. Filtración química (1) y filtración mecánica (2).	56
Figura 18. Interacción entre niveles de filtros con los días y concentración de TCS.	57
Figura 19. Interacción entre niveles de filtros, día y concentración de TCS.	57
Figura 20. Interacción entre niveles de filtros, día y concentración de TCS.	57
Figura 21. Diagrama de cajas para la variación de la concentración a 50 µg/L de TCS respecto al tipo de difusor usado durante una semana.	60
Figura 22. Diagrama de cajas para la variación de la concentración a 120 µg/L de TCS respecto al tipo de difusor usado durante una semana.	60
Figura 23. Diagrama de cajas para la variación de la concentración a 190 µg/L de TCS respecto al tipo de difusor usado durante una semana.	60

Figura 24. Diagrama de cajas para la variación de la concentración a 50 µg/L de TCS respecto al tipo de difusor usado: piedra porosa difusora (1) y manguera difusora (2).	61
Figura 25. Diagrama de cajas para la variación de la concentración a 120 µg/L de TCS respecto al tipo de difusor usado: piedra porosa difusora (1) y manguera difusora (2).	61
Figura 26. Diagrama de cajas para la variación de la concentración a 190 µg/L de TCS respecto al tipo de difusor usado: piedra porosa difusora (1) y manguera difusora (2).	61
Figura 27. Interacción entre niveles de difusores de oxígeno, día y concentración de TCS. El difusor de piedra porosa es el nivel 1 y el difusor de manguera el nivel 2.	62
Figura 28. Interacción entre niveles de filtros, día y concentración de TCS.	62
Figura 29. Interacción entre niveles de filtros, día y concentración de TCS.	62
Figura 30. Diagrama de cajas para la variación de la concentración a 50 µg/L de TCS respecto a la exposición con alimento usado durante una semana.	65
Figura 31. Diagrama de cajas para la variación de la concentración a 50 µg/L de TCS respecto a la exposición con alimento usado durante una semana.	65
Figura 32. Diagrama de cajas para la variación de la concentración a 50 µg/L de TCS respecto a la exposición con alimento usado durante una semana.	65
Figura 33. Diagrama de cajas para la variación de la concentración a 50 µg/L de TCS respecto al alimento. De tal forma el nivel 1 corresponde a 22 g de alimento y el nivel 2 a 10 g de alimento.	66
Figura 34. Diagrama de cajas para la variación de la concentración a 120 µg/L de TCS respecto al tipo de filtro usado. De tal forma el nivel 1 corresponde a 22 g de alimento y el nivel 2 a 10 g de alimento.	66
Figura 35. Diagrama de cajas para la variación de la concentración a 190 µg/L de TCS respecto al tipo de filtro usado. De tal forma el nivel 1 corresponde a 22 g de alimento y el nivel 2 a 10 g de alimento.	66
Figura 36. Interacción entre niveles de alimento, día y concentración de TCS. El Alimento con 10 g corresponde al nivel 2 y el alimento con 22 g corresponde al nivel 1.	67
Figura 37. Interacción entre niveles de alimento, día y concentración de TCS. El Alimento con 10 g corresponde al nivel 2 y el alimento con 22 g corresponde al nivel 1.	67
Figura 38. Interacción entre niveles de alimento, día y concentración de TCS. El Alimento con 10 g corresponde al nivel 2 y el alimento con 22 g corresponde al nivel 1.	67
Figura 39. Diagrama de cajas para la variación de la concentración a 50 µg/L de TCS respecto al tiempo de exposición del pez.	71
Figura 40. Diagrama de cajas para la variación de la concentración a 120 µg/L de TCS respecto al tiempo de exposición del pez.	71
Figura 41. Diagrama de cajas para la variación de la concentración a 190 µg/L de TCS respecto al tiempo de exposición del pez.	71
Figura 42. Diagrama de cajas para la variación de concentración a 50 µg/L de TCS con cada nivel, 1(Macho) y 2 (Hembra).	72
Figura 43. Diagrama de cajas para la variación de concentración a 120 µg/L de TCS con cada nivel, 1(Macho) y 2 (Hembra).	72
Figura 44. Diagrama de cajas para la variación de concentración a 190 µg/L de TCS con cada nivel, 1(Macho) y 2 (Hembra).	72

Figura 45. Interacción entre niveles de sexo de los peces y el tiempo con el nivel de concentración de TCS.....	73
Figura 46. Interacción entre niveles de sexo de los peces y el tiempo con el nivel de concentración de TCS.....	73
Figura 47. Interacción entre niveles de sexo de los peces y el tiempo con el nivel de concentración de TCS.....	73
Figura 48. Motilidad progresiva a las diferentes concentraciones de TCS y niveles de pH.	92
Figura 49. Motilidad no progresiva a diferentes concentraciones y niveles de pH.....	95
Figura 50. Inmotilidad a diferentes concentraciones y niveles de pH.....	98
Figura 51. Vitalidad espermática a diferentes concentraciones y niveles de pH.	113
Figura 52. Espermatozoides, primera medición sin TCS.	116
Figura 53. Espermatozoides a 50 µg/L de TCS, segunda medición.....	118
Figura 54. Espermatozoides a 50 µg/L de TCS, segunda medición (Replica).....	119
Figura 55. Espermatozoides a 50 µg/L de TCS, tercera medición.	121
Figura 56. Espermatozoides a 120 µg/L de TCS, Segunda medición.....	123
Figura 57. Espermatozoides a 120 µg/L de TCS, Tercera medición.....	125
Figura 58. Espermatozoides a 190 µg/L de TCS, Segunda medición.....	127
Figura 59. Espermatozoides a 190 µg/L de TCS, Tercera medición.....	129
Figura 60. Diagrama de cajas para la variación de la concentración de TCS en el agua con cada nivel de pH (7 y 9), a 50 µg/L de TCS.....	131
Figura 61. Diagrama de cajas para la variación de la concentración de TCS en el agua con cada nivel de pH (7 y 9), a 120 µg/L de TCS.....	131
Figura 62. Diagrama de cajas para la variación de la concentración de TCS en el agua con cada nivel de pH (7 y 9), a 190 µg/L de TCS.....	131
Figura 63. Diagrama de cajas para la variación de absorción de TCS por los peces de acuerdo al sexo, 1M (Primer macho), 2M (Segundo macho) y 3M (Tercer macho); 4H (Primera hembra), 5H (Segunda hembra) y 6H (Tercera hembra).....	133
Figura 64. Diagrama de cajas para la variación de absorción de TCS en la concentración de 120 µg/L de TCS por los peces de acuerdo al sexo.....	133
Figura 65. Diagrama de cajas para la variación de absorción de TCS en la concentración de 190 µg/L de TCS por los peces de acuerdo al sexo.....	133
Figura 66. Interacción entre los niveles de pH y los peces a 50 µg/L de TCS.....	135
Figura 67. Interacción entre los niveles de pH y los peces a 120 µg/L de TCS.....	135
Figura 68. Interacción entre los niveles de pH y los peces a 190 µg/L de TCS.....	135
Figura 69. Diagrama de cajas para la variación de la concentración de TCS con cada nivel de pH (7 y 9), a 50 µg/L de TCS.....	137
Figura 70. Diagrama de cajas para la variación de la concentración de TCS con cada nivel de pH (7 y 9), a 120 µg/L de TCS.....	137
Figura 71. Diagrama de cajas para la variación de la concentración de TCS con cada nivel de pH (7 y 9), a 190 µg/L de TCS.....	137
Figura 72. Diagrama de cajas para la variación de absorción de TCS por los peces de acuerdo al sexo, 1M (Primer macho).....	138

Figura 73. Diagrama de cajas para la variación de absorción de TCS a 120 µg/L por los peces de acuerdo al sexo.....	138
Figura 74. Diagrama de cajas para la variación de absorción de TCS a 190 µg/L por los peces de acuerdo al sexo.....	138
Figura 75. Interacción entre los niveles de pH y los peces a 50 µg/L de TCS.....	139
Figura 76. Interacción entre los niveles de pH y los peces a 120 µg/L de TCS.....	139
Figura 77. Interacción entre los niveles de pH y los peces a 190 µg/L de TCS.....	139
Figura 78. Diagrama de cajas para la variación de la concentración de TCS con cada nivel de pH (7 y 9), a 50 µg/L de TCS.	140
Figura 79. Diagrama de cajas para la variación de la concentración de TCS con cada nivel de pH (7 y 9), a 120 µg/L de TCS.	140
Figura 80. Diagrama de cajas para la variación de la concentración de TCS con cada nivel de pH (7 y 9), a 190 µg/L de TCS.	140
Figura 81. Diagrama de cajas para la variación de absorción de TCS por los peces de acuerdo al sexo, 1M (Primer macho).....	141
Figura 82. Diagrama de cajas para la variación de absorción de TCS en la concentración de 120 µg/L de TCS por los peces de acuerdo al sexo.....	141
Figura 83. Diagrama de cajas para la variación de absorción de TCS en la concentración de 190 µg/L de TCS por los peces de acuerdo al sexo.....	141
Figura 84. Interacción entre los niveles de pH y los peces a 50 µg/L de TCS.....	142
Figura 85. Interacción entre los niveles de pH y los peces a 120 µg/L de TCS.....	142
Figura 86. Interacción entre los niveles de pH y los peces a 190 µg/L de TCS.....	142
Figura 87. Factor de corrección de absorbancia para la curva del estándar de VTG y las muestras analizadas.	146
Figura 88. Diagrama de cajas para la variación de concentración de VTG a diferentes concentraciones de exposición de TCS.	147
Figura 89. Diagrama de cajas para la variación de concentración de VTG en los días 4 y 8 de exposición al contaminante emergente.	148
Figura 90. Interacción entre los niveles de TCS, concentración de VTG y las mediciones 2 y 3.	149

RESUMEN

El Triclosán (TCS) es un producto usado para el cuidado y aseo personal. Éste llega a las fuentes hídricas a través de los desechos domésticos e industriales. En éste trabajo se evaluó el TCS como un posible disruptor endocrino en gametos del pez tilapia (*Oreochromis spp*) usando 3 diferentes concentraciones de TCS similares a las encontradas en algunas aguas superficiales (50 µg/L, 120 µg/L y 190 µg/L). También se evaluó la influencia del pH, a dos niveles (7, 9), ya que el TCS tiene un pka de 8.1, que hace éste tenga un comportamiento diferente a pH menos de 8.1 y otro a más 8.1, como ocurre con su fotoestabilidad (Martínez-Zapata, Aristizábal, y Peñuela, 2013). Los ensayos se hicieron a 23°C. Los experimentos tuvieron un diseño factorial de dos factores con tres y dos niveles para el TCS y el pH, respectivamente, con 12 tratamientos que incluyó a peces hembras y machos. Con base en este diseño experimental los gametos fueron parámetros de disrupción endocrina evaluando variables respuesta como síntesis de vitelogenina (VTG) en los óvulos de las hembras, concentración de espermatozoides por mililitro, vitalidad, motilidad y morfología en los espermatozoides de los machos.

Palabras clave: Contaminantes emergentes, Disrupción endocrina, Movilidad espermática, Vitelogenina

ABSTRACT

Emerging contaminant triclosán (TCS) is used in personal care products. This reaches water sources through municipal, departmental and industrial wastes. In this work the principal goal was evaluate TCS as endocrine disruptor using gametes from Tilapia fish (*Oreochromis spp*). In this investigation was chosen the more usual concentrations found in surface waters of TCS (50 µg/L, 120 µg/L and 190 µg/L) combined with pH levels (7, 9) with a constant temperature of 23°C. The chosen conditions simulate a natural aquatic environment by this species. The experiments followed a factorial design for two factors each one with three levels and two levels for TCS and pH respectively, it had 12 treatments including females and males. Based on this experimental design gametes were evaluated as parameters of endocrine disruption. The response variables are vitellogenin synthesis in the eggs of females, sperm concentration per milliliter, vitality, motility and morphology of sperm in males.

Keywords: Emerging pollutants, Endocrine disruption, Sperm motility, Vitellogenin

INTRODUCCIÓN

1.1 Planteamiento del problema

El uso de productos de aseo personal, farmacéuticos, perfumes y cosméticos han estado usándose con frecuencia y de manera extensa en los últimos años, éstos contaminantes emergentes encontrados en el agua han sido considerados como disruptores endocrinos (Nakada, Tanishima, Shinohara, Kiri, y Takada, 2006) por lo tanto, son de potencial riesgo para la salud en los seres vivos debido a la capacidad de bioacumulación en el organismo en especial en el tejido adiposo, ya que la mayoría de estos productos tienen una naturaleza lipofílica, y en consecuencia, generan alteraciones en los procesos biológicos y bioquímicos en los organismos. En un estudio realizado en el laboratorio de remediación ambiental de la Universidad Tianjin en China, se demostró la acumulación de compuestos emergentes como el Bisfenol A (BPA) y TCS detectados en el tejido adiposo de seres humanos a concentraciones de 3.95 ng/g para el BPA y 7.21 ng/g para el TCS (Wang, Asimakopoulos, y Kannan, 2015).

El TCS es un agente microbiano usado en la cotidianidad como en productos de aseo, cuidado personal, en industrias agroalimentarias y para el cuidado de la salud. Éste se ha convertido en un producto de gran consumo en nuestra sociedad actual, ya que se encuentra en productos de uso diario como la pasta de dientes, talcos, enjuagues bucales, antibacteriales, desodorantes, jabones líquidos, textiles, polímeros entre otros. Debido al contacto frecuente con este tipo de productos de manera inevitable han generado contaminación en diversas fuentes de agua como aguas crudas, residuales y potables, ya que pese a los procedimientos aplicados en las plantas de tratamiento de agua los contaminantes emergentes siguen siendo detectados incluso después de estos (Dhillon et al., 2015).

El TCS y otros contaminantes emergentes han tenido interacción con los ecosistemas acuáticos incidiendo en la calidad de vida, alterando funciones metabólicas y en consecuencia a otros ecosistemas e individuos en la cadena trófica. En la Universidad Nankai, en China, se investigaron los efectos tóxicos del TCS en lombrices de tierra a diferentes rangos de concentración (Lin, Li, Zhou, Xu, y Wang, 2014), donde los factores estudiados fueron la capacidad de reproducción, el daño al ADN y el nivel de expresión proteica de Hsp 70, mostrando que la reproducción de las lombrices de tierra se redujo significativamente cuando se expusieron a concentraciones entre 50 a 300 mg kg⁻¹ determinándose que 142.11 mg kg⁻¹ del compuesto corresponde al 50% de su efecto máximo (EC₅₀), y se comprobó una correlación significativa entre la concentración de TCS y el daño del ADN con un valor de EC₅₀ de 8.85 mg kg⁻¹ y en consecuencia la alteración de la expresión proteica (Lin et al., 2014).

El TCS es un disruptor endocrino para varios organismos acuáticos, especialmente peces, ya que se bioacumula en ellos (Aranami y Readman, 2007) y tiene una correlación directa con el tiempo de exposición a los contaminantes durante el periodo de vida de cualquier organismo. Además, las concentraciones de los disruptores endocrinos también están asociadas al riesgo de subfertilidad debido a las alteraciones hormonales que éstos generan (Den Hond et al., 2015). Los peces son afectados notablemente en su actividad reproductiva y en consecuencia hay baja eclosión de los huevos, demora en el tiempo de eclosión y reducción del nado ocasionados por la disrupción endocrina (Hontela y Habibi, 2013).

Los peces denominados genéricamente "tilapias" han recibido, quizás, mayor atención que cualquier otro grupo de peces en todo el mundo (Wicki y Gromenida, 1997). La especie Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) es considerada como una especie de agua dulce, su nombre incluye los géneros *Tilapia* y *Oreochromis* son originarias de África, y se fueron extendiendo al norte de Israel y Jordán. Luego de la segunda guerra mundial estas fueron introducidas en países de Asia y América (Bardach, 1990).

Por lo tanto, la tilapia es de alto consumo humano por su riqueza proteica, por el contenido de aminoácidos esenciales, nutrientes como vitaminas y minerales siendo decisiva para impulsar los mercados en cuanto a la demanda y los consumos mundiales por la producción acuícola, permitiendo mayor comercialización de esta especie por sus bajos precios, siendo China el productor más importante a nivel mundial en producción. De tal forma el consumo de pescado se ha mantenido por encima del crecimiento demográfico creciendo en una tasa media anual de 32% (1961-2013) en comparación con el crecimiento demográfico mundial que fue del 16% en este periodo (FAO, 2016).

La producción acuícola a nivel mundial represento 44.1 % de la producción total de la pesca de captura y acuicultura en el 2014 superando las cifras de producción de 31.1 % en 2004 y 42.1 % en 2012, por lo cual se estima que casi todo el pescado producido en acuicultura se destina como consumo humano, siendo la tilapia un producto de gran aceptación en el mercado en países de Asia y América Central, aumentando la producción en África, América del sur y Asia (FAO, 2016).

Por otra parte la producción de piscicultura continental está representada por tilapia, trucha, cachama y especies nativas, en Colombia con especies como (*Oreochromis niloticus* y *Oreochromis spp*), la trucha arcoíris (*Onchorhynchus mykiss*), la cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) y la cachama negra (*Colossoma macropomum*). La producción de especies como tilapia a nivel nacional en el año 2015 fue de 61.25% con destinos de exportación del 95% para los Estados Unidos y 5% para el mercado suramericano según la Autoridad Nacional de acuicultura y pesca (AUNAP, 2014).

Desafortunadamente las condiciones ambientales de la tilapia se pueden alterar por la presencia de contaminantes emergentes en ríos, lagos y estanques de agua dulce que pueden causarle efectos adversos al organismo del pez (Kolpin et al., 2002). Algunos biomarcadores han sido utilizados con el fin de comparar los efectos de contaminantes emergentes en el sistema

endocrino, como el análisis de espermatozoides de la especie *Micropterus salmoides* en la Universidad de Texas Tech (Goodbred et al., 2015) evaluando la incidencia de 252 químicos orgánicos, entre éstos el TCS, mostrando que altas concentraciones de policlorobifenilos (PCBs), Dicloro Difenil Tricloroetano (DDT), polibromodifenil éteres (PBDEs), galaxolide y metil triclosán disminuyen la concentración de ketotestosterona, aunque el índice gonadosomático y la motilidad espermática no difirieron en los resultados con base en los sitios de muestreo, sin embargo, el conteo de espermatozoides disminuyó en un 50%, reduciendo la reproducción por la exposición a los contaminantes (Goodbred et al., 2015).

Además el TCS es un contaminante emergente que podría alterar el correcto funcionamiento del sistema endocrino de quienes lo consumen, se decidió estudiar la influencia del contaminante emergente TCS como disruptor endocrino en el organismo de la tilapia (*Oreochromis spp*), evaluándose biomarcadores biológicos que demuestren el proceso de disrupción endocrina a través del análisis de sus gametos. Evaluándose el análisis espermático con variables como: motilidad, vitalidad y morfología; análisis de los gametos de la hembra con el fin de determinar la alteración proteica de la VTG a diferentes concentraciones y niveles de pH, similares a las que existen en el medio donde vive la tilapia.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo general

Evaluar la afectación de los gametos de la especie *Oreochromis spp.* (tilapia) cuando está en presencia de Triclosán.

1.2.2 Objetivos específicos

- Evaluar la influencia de la concentración de Triclosán y variación de pH en agua en la síntesis de proteínas en los óvulos de tilapia (*Oreochromis spp.*) que permita establecer relaciones de disrupción endocrina en gametos.

- Caracterizar la molécula de Vitelogenina en óvulos bajo la influencia de Triclosán y variación de pH en agua para contrastar la afectación de síntesis proteica en el vitelo de tilapia (*Oreochromis spp.*)

- Evaluar la influencia de la concentración de Triclosán y variación de pH en agua en la motilidad, vitalidad y morfología de los espermatozoides de la especie tilapia (*Oreochromis spp.*) como biomarcador de disrupción endocrina.

2. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE.

2.1 Contaminantes emergentes en las fuentes hídricas.

La industria farmacéutica ha ido incrementando el suministro de medicamentos para la población humana y la ganadería para protegerlos de una gran cantidad de microorganismos patógenos, pero también está produciendo una gran variedad de productos de higiene personal. Estos productos llegan como residuos a las aguas superficiales, creando un problema ambiental en los ecosistemas acuáticos, poniendo en riesgo la salud de los organismos acuáticos. A pesar de que los desechos municipales e industriales son tratados, varios contaminantes emergentes no son removidos en las plantas de tratamiento (Hirsch, Ternes, Haberer, y Kratz, 1999). En Alemania, Suiza, Dinamarca, Estados Unidos y Canadá, en los efluentes de las plantas de tratamientos de aguas residuales domésticas e industriales, han encontrado productos de cuidado personal y farmacéuticos (PPCP) en los ecosistemas acuáticos (Hirsch et al., 1999). Esto indica que las tecnologías usadas en las plantas de tratamiento son insuficientes para eliminar dichos residuos. Lo más sorprendente es que se han encontrado en aguas potables, así en un estudio se escogieron 30 productos representativos farmacéuticos, de cuidado personal y perturbadores endocrinos (EDC), comprobándose que en el agua potable se encontró una media de 98 ng/L de los PPCPs y las concentraciones individuales por debajo de 5 ng/L. Generalmente las concentraciones de disruptores endocrinos en el medio ambiente oscilan entre 2 a < 250 ng/L (Hirsch et al., 1999).

Desde los años 70 es común encontrar contaminantes emergentes en afluentes como el TCS, éste se encuentra en productos de aseo personal como la pasta de dientes, el enjuague bucal, jabones líquidos, shampoos, desodorantes, plásticos, antibacteriales, polímeros para usos médicos y otros. El TCS es un fenol fenoxi clorado que generalmente sirve como antifúngico y antibacteriano que causa efectos fisiológicos adversos a los ecosistemas acuáticos por la

exposición a éste y su potencial de bioacumulación en organismos vivos en concentraciones halladas en afluentes de residuos urbanos.

2.2 Efectos del TCS sobre algunos organismos.

El TCS inhibe el crecimiento de algunos peces (Pomati y Nizzetto, 2013) produciendo disminución del periodo y capacidad de eclosión de los huevos con pérdida de natación (Honkisz, Zieba-Przybylska, y Wojtowicz, 2012). Entre los efectos causados por los contaminantes emergentes se ha comprobado que alteran los niveles circulantes de las hormonas Tiroideas (THS), y por lo tanto, afectan la homeostasis del sistema endocrino (crecimiento y desarrollo) y nervioso de algunas especies (Honkisz et al., 2012). También se ha comprobado que algunos PPCP alteran la glándula tiroides y las enzimas reguladoras de ésta (Honkisz et al., 2012).

En la Universidad de Alabama (Birmingham) estudiaron la disrupción endocrina del TCS en peces de la especie *Gambusia affinis* (Raut y Angus, 2010). En dicho trabajo se experimentó con machos sexualmente maduros, los cuales fueron expuestos a concentraciones de TCS de 29.0, 57.9 y 101.3 mg/L durante 35 días. Como biomarcador de la disrupción endocrina se hizo seguimiento a la expresión del gen de la VTG y la reducción de conteo de los espermatozoides. Se encontró que el ARNm de VTG fue elevado por la exposición a 101,3 mg/L de TCS, y el conteo de espermatozoides se redujo significativamente (Rauty, et al., 2010).

La Universidad de Agricultura en Cracovia (Polonia) realizó un estudio de carpas cabezonas (*Pimephales promelas*), recién nacidas de machos y hembras, que fueron expuestas durante 12 días y carpas cabezonas maduras durante 21 días a diferentes concentraciones de TCS y Triclocarban (TCC) en el orden de ng/L (Schultz, Bartell, y Schoenfuss, 2012). La exposición al TCS no causó efectos significantes en el crecimiento y en las concentraciones de VTG en el plasma para las carpas maduras, pero hubo efecto en el comportamiento de las carpas machos adultos

expuestos a 1,6 mg/L de TCC o a la mezcla (560 ng/L TCS + 179 ng/L TCC y 1,6 mg/L TCS + 450 ng/L TCC) (Schultz et al., 2012), manifestándose una disminución en el comportamiento en el lugar de incubación para el desove y la reproducción.

Por otra parte en anfibios se ha demostrado la influencia de los contaminantes emergentes en su metabolismo modificando estructuras fisiológicas, bioquímicas y comportamentales de éstos. El Instituto Nacional para la Investigación Médica y la Fundación EJLB demostraron que el TCS induce a cambios en la hormona tiroidea en el proceso de metamorfosis de la rana toro, alterando el perfil de expresión de receptores hormonales de la tiroidea (TR) α y β , elemento básico de la transcripción de proteínas (BTEB) y la proliferación de núcleos de células antígeno (PCNA) en las transcripciones de genes (Veldhoen et al., 2006). A éstas también se les controlaron mediciones morfométricas durante la exposición de TCS y los ARNm en estado estacionario. Los renacuajos se expusieron a concentraciones bajas de TCS $0,15 \pm 0,03$ g/L durante 4 días donde se evidenció un mayor desarrollo de las extremidades posteriores y la disminución de peso corporal. El TCS también alteró el receptor de la hormona tiroidea α , los niveles de transcripción en el cerebro de los renacuajos premetamórficos e indujo una pérdida de peso transitoria (Veldhoen et al., 2006). En consecuencia, el TCS puede generar alteración en el crecimiento del individuo, y por lo tanto, perturbar el metabolismo endocrino que se encarga de regular el crecimiento de los individuos.

Así mismo, en la India comprobaron que el TCS afecta las células de Leydig en las ratas (*Rattus norvegicus*) de machos albinos que fueron expuestos a tres concentraciones diferentes de TCS durante 60 días porque impide la segregación normal de andrógenos (Kumar, Chakraborty, Kural, y Roy, 2009). El experimento fue realizado con células purificadas de Leydig expuestas a 0,001, 0,01, 0,1, 1 y 10 mM de TCS, evidenciándose una disminución en la actividad de la enzima adenilato ciclasa, y por lo tanto, una baja función del adenosin monofosfato cíclico (AMPc). Esta disminución en el nivel del cAMP dio lugar a la interrupción de toda la cascada esteroideogénica causando una síntesis de depresión de la testosterona. Así mismo se encontró que la concentración más alta que altera las células de Leydig fue la exposición a la concentración de TCS de 1 mM

(Kumar et al., 2009) a las cuales se les realizaron análisis bioquímicos como la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) ocurriendo una disminución significativa en el ARN mensajero (ARNm) para la proteína esteroidogénesis testicular (StAR), citocromo P450 (SCC), el citocromo P450 C17, 3 β - hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 β - HSD), 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 β - HSD) y de andrógenos receptor (AR) en los ratones tratados con TCS. De igual manera se encontró una reducción en la hormona luteinizante (LH), hormona folículo estimulante (FSH), el colesterol, la pregnenolona y testosterona. Aunque no se observaron malformaciones en los ratones tratados, en los tejidos testiculares y sexuales se comprobó que se redujo la presencia de andrógenos, y por lo tanto, la síntesis de esperma (Kumar et al., 2009).

En la Universidad Nacional de Pusan a ratones se les administró por vía intragástrica una dosis de 50 mg/kg de TCS, para evaluar la cinética de TCS en el plasma y los órganos reproductivos. En este estudio se sugiere que el TCS tiene una mayor acumulación en el epidídimo en comparación al plasma y se comprobó la toxicidad inducida al esperma realizando cambios histopatológicos de los órganos reproductivos en ratas (Lan, Kim, Bi, Chen, y Kim, 2015). También fueron expuestas a dosis de 10, 50 y 200 mg/kg durante 8 semanas y se demostró que los ratones expuestos a la concentración más alta de TCS inciden en una disminución de la producción de esperma diario e inducen al daño del epidídimo por acumulación (Lan et al., 2015).

En Corea se comprobó la alteración de las hormonas tiroideas por la exposición al TCS generando disminución en la descendencia (Paul et al., 2012). En este caso se evaluó la síntesis de tiroxina en condiciones de exposición al TCS en crías de ratones antes del destete y ratas preñadas Long-Evans recibieron TCS por sonda oral (0-300 mg/kg/d) en aceite de maíz a partir del sexto día gestacional hasta el día 21 postnatal. La tiroxina sérica se redujo el 31% en las ratas en el día 22 postnatal, y en las crías se observó hipotiroxinemia dado que la tiroxina sérica disminuyó 27% en el día 4 postnatal, y el cambio de comportamiento y falta de vigor en las ratas fue notorio en el día postnatal 14 y 21, contribuyendo a un efecto toxicocinético por la exposición al TCS (Paul et al., 2012).

De tal forma, más de un centenar de compuestos naturales y sintéticos considerados disruptores endocrinos afectan a la tiroides y pueden inhibir la absorción de yodo tiroideo (perclorato, iones tiocianato y nitrato), o tiroperoxidasa actividad (isoflavonas), actuar directamente sobre el receptor de la hormona tiroidea (bifenilos policlorados, bifenilos polibromados, bisfenol - A y TCS), o afectar el transporte y el metabolismo de las hormonas tiroideas (bifenilos policlorados, bifenilos polibromados, la genisteína, dioxinas y otros) (Kousta y Mastorakos, 2012).

En Cracovia, Polonia, se comprobó que el TCS tiene acción sobre la secreción placentaria de progesterona, estradiol y gonadotropina coriónica humana *in vitro* en células coriocarcinoma humana (JEG - 3). Las células JEG - 3 se cultivaron con dosis crecientes de TCS (10^{-9} - 10^{-4} M) para 24, 48 y 72h (Honkisz et al., 2012). Por esta exposición, el TCS causó un efecto significativo en la Gonadotropina Corionica Humana (hCG - β) y en concentraciones de TCS de 50 y 100 μ M se evidenció un marcado efecto citotóxico. Por lo tanto, se comprobó que puede afectar la esteroidogénesis, y en consecuencia, el desarrollo de la placenta y el crecimiento fetal. Así mismo, la exposición a bajos niveles de TCS altera la expresión del gen de la hormona de la Tiroides que inhibe órdenes necesarias para el crecimiento adecuado de los embriones (Honkisz et al., 2012).

Se ha demostrado que las células BLTK1 poseen una vía esteroidogénica completamente funcional que produce bajos niveles basales de testosterona (T) y expresa todas las enzimas esteroidogénicas necesarias cuando las células de Leydig son expuestas a diferentes disruptores endocrinos, también se comprobó que el TCS reduce la rhCG con inducción de Testosterona (Forgacs et al., 2012).

Aunque se han realizado investigaciones acerca de la afectación del TCS en el metabolismo de varios organismos, la información aún es insuficiente para demostrar que el TCS afecta el desarrollo de los organismos, la anatomía en cuanto a índices histológicos y morfológicos, a la fisiología y producción de la VTG, y al campo conductual de las especies. La detección de VTG

ha sido un biomarcador fundamental en vertebrados ovíparos para el estudio en la exposición de productos químicos y las consecuencias frente a su exposición. De igual manera aún no está claro si el TCS tiene efectos en el espermatozoides y en órganos reproductivos de ciertos mamíferos, pero si se conoce que los contaminantes emergentes implican una reacción en el hipotálamo, la hipófisis y las gónadas.

2.3 Tilapia

La tilapia se encuentra distribuida en América Central, Caribe, sur de Norte América, Sudeste Asiático, Medio Oriente, América del Sur y África adaptándose a medios tropicales y subtropicales. A Colombia se introdujeron directamente desde el Instituto Nacional de piscicultura en la ciudad de Buga, provenientes de Brasil en el año 1957 y reintroducida nuevamente desde México en el año 1959 siendo usada principalmente en piscicultura en la producción rural (Castillo, 1994).

La primera especie de tilapia fue la *Oreochromis mossambicus* pertenece a la familia Cichlidae en el orden de los Perciformes y es conocida como Tilapia mozambica, Tilapia de Java o Tilapia negra (Castillo, 1994), nativa de África Oriental en los Ríos de Illovo, Mazoe, y Zambezi, traída al Japón desde Tailandia en 1954, esta especie ha sido distribuida en zonas de aguas termales de corriente lenta, canales y estanques de Hokkaido a Kyushu y Okinawa, Taiwán, el sudeste asiático e India (FAO, 2016).

Dentro del género *Oreochromis* apareció como una mutación albina en un cultivo artesanal de Tilapia *Oreochromis mossambicus* de coloración normal (negra) cerca de la población de Tainan (Taiwán) en 1968, convirtiéndose años después en una especie que inicio al desarrollo acelerado de la piscicultura en la década de los 80 en países como Colombia, Venezuela y Ecuador (Castillo, 1994).

De tal forma, la tilapia roja (*Oreochromis spp*) es el pez más cultivado comercialmente en Colombia siendo un híbrido del cruce entre dos, tres o cuatro especies del género *Oreochromis* originarias de África o Israel que le otorgan ventajas respecto a otras especies como la ganancia rápida de peso, teniendo un crecimiento de más de 600 g al año con rendimientos de más de 600 toneladas por hectárea al año en cultivos de producción acuícola (Instituto Colombiano de desarrollo rural, 2014).

La tilapia es de aguas cálidas con una temperatura óptima para el cultivo entre 25°C a 30°C y acidez de 5 a 9 de pH, siendo resistentes a ambientes con bajas concentraciones de oxígeno en el agua, aunque este factor es importante para optimizar el crecimiento, la capacidad de sobrevivir y de alimentarse, el productor debe procurar mantener los niveles de oxígeno disuelto (OD) en agua por encima del 40% de la saturación, o sea, en los 3 mg/L o más de este gas (Kubitza, 2009), asimismo resisten a cambios de temperatura y salinidad por lo que pueden vivir en aguas dulces, salobres e incluso en el mar. La tilapia es omnívora ya que suelen alimentarse de fitoplancton, perifiton, plantas acuáticas, larvas de insectos o alimentos concentrados (Instituto Colombiano de desarrollo rural, 2014).

Al elegir el tipo de alimento para la especie (*Oreochromis spp*) se tuvo en cuenta la calidad y cantidad adecuada de alimento que cumpliera con los requerimientos nutricionales en los peces, de tal forma que les permitirá desarrollar sus actividades metabólicas de una manera normal. En consecuencia se utilizaron alimentos balanceados para peces que garantizaran su crecimiento.

El requerimiento de proteínas de los peces es inversamente proporcional a la edad del pez, es así que los peces adultos requieren menor proporción de proteína dividiendo la porción dividiendo la ración en dos o tres dosis diarias (Instituto Colombiano de desarrollo rural, 2014).

La cantidad de alimentación se determinó por el peso promedio del lote, en este caso se tuvo en cuenta como peso promedio 300 g y se realizaron ajustes a la alimentación en cada uno de los muestreos de material biológico con el fin de ajustar la tasa de alimentación.

Para lo cual se usó la siguiente fórmula propuesta por el Instituto Colombiano de desarrollo rural en 2014:

- a) Biomasa productiva = Numero de peces en la pecera x peso del pez
- b) Cantidad de alimento por día: Biomasa productiva x % según el peso.

El alimento fue suministrado a diario en la mañana y al finalizar la tarde para garantizar que la temperatura del agua no es muy alta y que favorece a su vez la concentración de oxígeno disuelto son adecuados para acostumar a los peces a comer (Instituto Colombiano de desarrollo rural, 2014).

Por otra parte el proceso de reproducción de la tilapia empieza a partir de los 2-3 meses, se da cuando el macho establece un territorio realizando un nido en donde la hembra puede desovar (una hembra de 100 g desovara aproximadamente 100 huevos) y esperar que los huevos sean fertilizados por el macho con el fin de incubarlos en las bocas de las hembras (Autoridad Nacional de acuicultura y pesca, 2015).

Por otra parte la diferenciación de los sexos se puede notar también por el desarrollo de la papila genital y se puede empezar a hacerse con animales de más de 10 cm. En el macho, la papila genital posee dos orificios, el ano y el poro urogenital (uretra) y en la hembra presenta tres, el ano, el oviducto y la uretra (Instituto Colombiano de desarrollo rural, 2014).

A nivel mundial la producción acuícola ha mostrado un gran crecimiento al contrario de la pesca de captura, en el 2010 la producción mundial fue de 59.87 mil millones de toneladas, siendo Asia el primero en producción. Por otra parte América Latina paso de un crecimiento de 0.2 millones de toneladas en 1990 a 1.9 millones de toneladas en 2010 liderando la producción Chile, seguidos por países como Brasil, Ecuador, México, Colombia y Perú (FAO, 2016).

En Colombia la acuicultura comenzó con la introducción de la trucha arcoíris *Onchorhynchus mykiss* en 1938 para repoblar las lagunas de aguas frías de la región Andina, sin embargo para los campesinos surgieron otras fuentes de ingresos, iniciando la piscicultura comercial en 1980 con especies foráneas como la carpa, la tilapia, la trucha y la cachama como especie nativa (Ministerio de agricultura y desarrollo rural, Autoridad Nacional de acuicultura y pesca y Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 2014).

De tal forma el crecimiento de la acuicultura en Colombia crece a partir de 1990 con las principales especies cultivadas de diez departamentos donde se concentra aproximadamente el 92% de la producción del país: Antioquia, Boyacá, Casanare, Córdoba, Cundinamarca, Huila, Meta, Santander, Tolima y Valle del Cauca. En 1992 se aumenta la producción acuícola en América para exportar a Estados Unidos y en 1995 la tilapia gana alto valor comercial por su carne, de tal manera de los cinco países más poblados del mundo entre los mayores productores y consumidores de tilapia son: China, Estados Unidos, Indonesia y Brasil (Castillo, 1994).

La producción nacional en el 2011 fue de 82.733 toneladas donde la mitad de la producción corresponde a la tilapia plateada y roja, el 20% a cachama blanca y negra, cerca de un 7% a trucha, 10% a camarón, un poco más del 0,13% a cobia *Rachycentrum canadum* y el resto a otras especies nativas y exóticas. En consecuencia en los últimos años la pesca y la acuicultura son actividades importantes para el gobierno Nacional de Colombia ya que es un elemento productivo del desarrollo agropecuario en el país (Ministerio de agricultura y desarrollo rural, et al, 2014).

2.4 Sistema endocrino de tilapia.

En cuanto al sistema endocrino de los peces, éste es similar al de los seres humanos, cuya función es regular la síntesis y segregación hormonal para funciones bioquímicas vitales. De tal forma las neurohormonas regulan la actividad de la hipófisis que permite se produzcan reacciones endocrinas propias de la reproducción estimulando o inhibiendo la síntesis y secreción de gonadotrofinas hipofisarias, que regulan a su vez la espermatogénesis y la esteroidogénesis gonadal (Kah, Anglade, Leprêtre, Dubourg y De Monbrison, 1993; Trudeau, 1997).

2.4.1 Hipófisis en peces.

La hipófisis de los peces se encuentra unida al hipotálamo por un tallo llamado neurohipófisis constituido por los axones de las células neurosecretoras que penetran en la hipófisis desde el cerebro. De tal forma, las neurohormonas que controlan la actividad de las células endocrinas de la hipófisis son liberadas desde los terminales neurosecretores al entorno de las células diana (Batten e Ingleton, 1987). La presencia de terminales secretores de hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH), dopamina, neuropéptido Y o ácido gamma-amino butírico en el entorno de las células gonadotropas permite identificar la acción de estas neurohormonas sobre la secreción de las gonadotrofinas y el ciclo reproductivo de los peces (Kah, Dulka, Dubourg, Thibault y Peter, 1987; Kah, Danger, Dubourg, Pelletier, Vaudry y Calas, 1989; Kah, Trudeau, Sloley, Duborg, Chang, Yu y Peter, 1992).

Breton, Weil, Jalabert y Billard (1972) demostraron que GnRH estimula la liberación de gonatropinas en la carpa y Nancy Sherwood, Eiden, Brownstein, Spiess, Rivier y Vale (1983) lo hicieron en salmón lo cual ha generado gran interés en las investigaciones para la aplicación en los sistemas de acuicultura (Zohar y Mylonas, 2001). A su vez se descubrieron factores cerebrales que se transportaban del sistema vascular hacia la hipófisis para regular la secreción de gonadotrofinas

y del desarrollo gonadal (Donovan y Harris, 1954). En la década de 1970 se descubrió un decapeptido del hipotálamo de mamíferos que se llamó LH-RH por su potencia estimuladora de la secreción de hormona luteinizante. Luego se descubrió que también estimula la secreción de hormona estimulante del folículo (FSH), por lo que se denominó de forma genérica GnRH. (Burgus, et al., 1971; Matsuo, Baba, Nair, Arimura y Schally, 1971).

En la década de los ochenta se identificaron dos gonadotrofinas diferentes en la hipófisis de *Onchorhynchus keta* la GTH-I y la GTH-II (Kawauchi, et al., 1989). Posteriormente y en base a las secuencias aminoacídicas, se estableció la homología entre la GTH-I y la GTH-II de los peces con la FSH (hormona foliculoestimulante) y la LH (hormona luteinizante), respectivamente (Li y Ford, 1998; Quérat, Sellouk y Salmon, 2000).

Por otra parte otros estudios muestran que la GnRH estimula las subunidades α y β de la LH y la FSH relacionados con la madurez sexual del individuo (Khakoo, Bathia, Gedamu y Habibi, 1994; Dickey y Swanson, 2000; Mateos, Mañanós, Carrillo y Zanuy, 2002; Yaron, Gur, Melamed, Rosenfeld, Elizur y Levavi - Sivan, 2003).

En estudios realizados con especies de teleósteos en los que se ha logrado cuantificar ambas gonadotrofinas en el plasma, se evidencia que la GTH- I está presente en todo el ciclo incrementándose durante la ovogénesis y espermatogénesis así como en la postovulación y en la postespermioogénesis, en cambio los niveles de GTH – II son bajos en las primeras fases de desarrollo gonadal y se elevan en la ovulación de las hembras y espermiogénesis de los machos (Swanson, 1991; Prat, Sumpter y Tyler, 1996; Gómez, Weil, Le Bail, Breton y Le Gac, 1999). Además las gonadotropinas estimulan la producción de prolactina (Weber, et al., 1997) en *Oreochromis mossambicus* y la expresión del ARN mensajero (ARN_m) de prolactina (Bhandari et al., 2003).

De tal forma las acciones hipofisiotróficas de la GnRH están mediadas por su unión a receptores específicos presentes en la membrana de las células gonadotropas adenohipofisarias (Conn y Crowley, 1994). En peces, los primeros receptores de GnRH fueron detectados en la hipófisis pero también se expresan en tejidos extrahipofisarios como el cerebro, las gónadas, riñon e hígado actuando como neurotransmisores y como factores autocrinos o paracrinos en las gónadas (Marshall, Shakesper y Odell, 1976; Habibi y Pati, 1993; Yu, He, Chik, Lin, Chang y Peter, 1998).

2.4.2 Influencia de los cambios ambientales en el funcionamiento correcto del sistema endocrino.

Algunas sustancias químicas interfieren en el sistema hormonal, como los disruptores endocrinos que alteran la síntesis, liberación, transporte y el funcionamiento del metabolismo, y generan alteraciones al sistema reproductor ejerciendo una presión de supervivencia de la especie. De tal forma los cambios generados en el ambiente generan alteraciones en las secreciones hormonales a lo largo del eje del cerebro, hipófisis y gónadas siendo responsables de la alteración de los ciclos hormonales incidiendo en la época del inicio de la gametogénesis, de la maduración, de la ovulación o de la puesta de los peces (Carrillo, Zanuy, Prat, Serrano y Bromage, 1993, 1995)

Por último, estos factores son capaces de alterar la amplitud de un ritmo endocrino, pudiendo llevar incluso a la desaparición de los mismos y por tanto a la pérdida de la función reproductora que controlan (Carrillo, et al., 2007).

2.5 Procesos de reproducción en tilapia roja (*Oreochromis spp*).

2.5.1 Ovogénesis

En las hembras ocurre el proceso de ovogénesis que permite la viabilidad reproductiva con el macho. El ovario o gónada femenina en los peces se origina a partir de repliegues peritoneales (pliegues ovígeros) donde se encuentran los vasos sanguíneos y las células más primitivas de la estirpe del ovocito: las ovogonias, que permiten el desarrollo del ovocito y que tienen la capacidad de convertirse en ovocitos durante toda la vida de la hembra (Benítez, 1992; Zanuy y Carrillo, 1987). Esto se logra cuando las ovogonias entran en la profase de la primera división meiótica, convirtiéndose de esta manera en ovocitos primarios (Zanuy, et al, 1987) que se rodean de células foliculares las cuales constituirán el folículo (Benítez, 1992). Además los ovocitos tienen como característica el aumento de volumen por la acumulación de sustancias diferentes al vitelo (previtelogénesis) y a su vez en el citoplasma de éstos aparecen unas vesículas vitelínicas compuestas por mucopolisacáridos ocupando gran parte del citoplasma (Benítez, 1992). En esta fase el ovocito está rodeado por células foliculares (granulosa) y tecales separadas por una membrana basal (Verreth, Storch, y Segner, 1987).

Por otra parte se ha demostrado que el ovario es capaz de sintetizar corticosteroides, andrógenos y estrógenos (17β -estradiol), importantes para la vitelogénesis, y progestágenos: dihidroxiprogesterona ($17\alpha20\beta$ -diOHP) para la maduración de los ovocitos (Verreth, et al, 1987). Luego aparecen las vesículas vitelínicas en el citoplasma del ovocito y con ellas los gránulos de vitelo con los cuales aumenta la fase de crecimiento obteniendo grandes reservas nutritivas en los ovocitos (Benítez, 1992; Zanuy, et al, 1987).

De tal manera, la síntesis de vitelo ocurre dentro del ovocito (*Vitelogénesis Endógena*) como fuera de éste (*Vitelogénesis Exógena*) (Ho, 1987; Zanuy, et al, 1987). En el vitelo endógeno se forman las vesículas vitelínicas las cuales son precursoras de los alveolos corticales, estructuras que liberan su contenido en el espacio previtelínico en el momento de la fecundación del ovocito (Zanuy, et al, 1987) y la VTG exógena tiene que internalizar la VTG (sintetizada en el hígado por la estimulación de estrógenos) formando gránulos de vitelo que entran al ovocito y desplazan las vesículas vitelínicas hacia la periferia (Ng y Idler, 1983). Cuando la VTG entra al ovocito esta se disocia proteolíticamente en lipovitelina y fosvitina (Zanuy, et al, 1987).

Un indicador de VTG plasmática es una lipoglicofosfocarotenoproteína de las hembras cuando están en la fase de reproducción. La molécula es de alto peso molecular por su composición (lípidos, carbohidratos, calcio, hierro y fósforo) (Hori, Kodoma y Tanahashi, 1979; De Vlaming, Wiley, Delahanty y Wallace 1980; Ho, 1987; Riazi y Fremont, 1988; Waagboe y Sandnes, 1988; Campbell y Idler, 1980; Tyler y Sumpter, 1990; Matsubara y Sawano, 1995; Komatsu, Matsumoto and Hayashi, 1996; Nuñez, Bon y Le Menn, 1996; Rodríguez y Le Menn, 1996). Un rango de peso molecular para la VTG es de 326.000 – 550.000 kDa en diferentes especies de peces (Specker y Sulliang, 1994) describieron la composición química de la especie *Oreochromis mossambicus* con carotenoides como productos secundarios que sirven de protección contra la luz, reserva de energía y antioxidantes; un porcentaje de proteína de 0.10% y 1.70% de fósforo y carbohidratos permiten el reconocimiento de receptores específicos en la síntesis de VTG (Opresko, Wiley y Wallace, 1981; Mommsen y Walsh, 1988). Estos receptores específicos tienen alto peso molecular (500.000 kDa), los cuales reconocen a la VTG y se unen a través de la región del fosforo (Mommsen, et al, 1988). Por último se obtienen las lipovitelinas, fosvitinas y fosvetas en el citoplasma del ovocito que constituyen el vitelo (Wallace y Selman, 1985).

Después el óvulo se induce a una etapa de maduración debido al proceso de vitelogénesis permitiendo que el núcleo migre a la periferia del ovocito (condensación de cromosomas y origen del cuerpo polar) (Benítez, 1992; Jalabert, 1976; Nagahama, 1990) generando la ruptura de la vesícula germinativa para preparar al ovocito para el proceso de ovulación (Zanuy, et al, 1987).

2.5.2 Espermatogénesis.

Otro proceso que hace parte de la reproducción en la tilapia es la espermatogénesis que tiene etapas proliferativas (renovación de las células madre y proliferación mitótica de las espermatogonias), seguidas por meiosis y espermiogénesis, durante la cual las espermatidas haploides se transforman en espermatozoides (Nóbrega et al., 2010). Por lo tanto, en anamniotas, todos los miembros de una cohorte proveniente de una célula germinal están agrupados en un

espermatocisto limitado por un número de células de Sertoli (espermatogénesis cística). Por esa razón, las células de Sertoli son el soporte estructural y funcional de las células germinales en un tiempo determinado separándolas de otras que están en otros estadios de desarrollo (Nóbrega et al., 2010).

Además, las células madre espermatogonias tienen la capacidad de renovarse a espermatogonias A (mitosis) y especializarse a células espermatogonias B (mitosis) para especializarse como espermatozoides (De Rooij y Russell, 2000). Las espermatogonias B hacen parte de la fase final de la mitosis para entrar a meiosis para formar el espermatocito primario en la fase preleptonema (Profase I temprana), luego pasa a ser un espermatocito secundario (haploides), así, éste se diferencia en espermátida a través del proceso de espermiogénesis (empaquetamiento de cromatina y formación del flagelo), y en la fase final de cada espermátida se especializa como espermatozoide durante la espermiación (Rey, 2012). Cuando se completa la espermiogénesis los espermatozoides son liberados a la luz tubular y de allí al conducto deferente para ser expulsados al exterior (Schulz y Miura, 2002).

Jamieson y Leung (1991) clasificaron a los espermatozoides en las siguientes categorías con base a estudios realizados en diferentes tipos de especies y al tipo de fecundación:

- a) Acuasperma: Liberación de esperma en el agua, fecundación externa
 - Acuasperma acrosomal
 - Acuasperma anacrosomal (uniflagelado, biflagelado, flagelado)
- b) Intrasperma. Se da en especies de fecundación interna
 - Intrasperma acrosomal
 - Intrasperma anacrosoma

3. METODOLOGÍA.

3.1 Metodología ensayos preliminares.

Con el fin de garantizar una óptima fase experimental se realizaron ensayos previos que permitieron definir factores que no alteraran la concentración de TCS definidos en la fase experimental, ya que algunas interacciones podrían variar la concentración propuesta del contaminante emergente y afectaría los resultados de las variables respuestas del diseño experimental propuesto. De tal forma se evaluó cada uno de los factores que intervienen en el sistema como se muestra en la tabla 1 y con base en los resultados se descartaron del montaje experimental aquellos que alteraron la concentración de TCS.

Tabla 1

Ensayos preliminares en la matriz de agua

Ensayos preliminares	Factores
1	Fotodegradación del TCS
2	Filtro
3	Tipo de difusor de oxígeno
4	Alimento del pez
5	tilapia hembra – tilapia macho

3.1.1 Ensayo 1. Evaluación de fotodegradación del TCS.

Este ensayo se hizo teniendo en cuenta la presencia y ausencia de luz, y se evaluó si estos factores influían en la fotodegradación de TCS en el transcurso de una semana. De tal forma se realizó el montaje de peceras con 40 litros de agua dopadas con las concentraciones: 50 µg/L, 120 µg/L y 190 µg/L unas sin exposición a la luz y otras en presencia de luz para cada concentración.

3.1.2 Ensayo 2. Evaluación de la variabilidad de TCS respecto al tipo de filtro.

Éste montaje se realizó en peceras de 40 litros donde se tuvieron en cuenta dos tipos de filtración: mecánica (malla de filtración de residuos y el perlón) y química (carbón activado) con el fin de evaluar la incidencia del método de filtración en la variabilidad de concentración a 50 µg/L, 120 µg/L y 190 µg/L de TCS presente para cada tratamiento durante una semana y la eficiencia de cada uno de los sistemas para mantener el agua clara reducir la materia orgánica biodegradable en el sistema.

3.1.3 Ensayo 3. Evaluación de la variabilidad de la concentración de TCS respecto al tipo de difusor de oxígeno.

Se evaluó el tipo de difusor de oxígeno, ya que algunos materiales pueden incidir en la concentración de oxígeno disuelto en el agua necesario para que los peces puedan desarrollar sus funciones metabólicas vitales, asimismo pueden incidir en la concentración del TCS, por lo tanto se probó un difusor de oxígeno de piedra porosa y otro con manguera difusora de oxígeno. Estos se evaluaron con 3 niveles del TCS en el transcurso de siete días, tomando una muestra diaria de agua por triplicado. Éste montaje se realizó en una pecera de 40 litros donde se tuvieron en cuenta dos tipos difusores con características diferentes en diseño con el fin de evaluar la variación de la concentración de TCS y la constante de oxígeno disuelto suficiente en el agua durante una semana.

3.1.4 Ensayo 4. Evaluación de la variabilidad de TCS con la exposición de alimento.

Se evaluó la interacción de la presencia de alimento con la variabilidad de concentración de TCS propuesta en los diferentes tratamientos, debido a que algunos peces al ser expuestos al contaminante no ingieren el alimento suministrado y la acumulación de algunos componentes de

éste como lípidos podrían asociarse con el contaminante y disminuir la concentración de TCS en la matriz agua propuesta en el diseño experimental y además aumentar los nutrientes lo que podría generar una disminución de oxígeno disuelto e influir en las funciones metabólicas de los peces, de tal forma fue necesario evaluar cómo podría afectar la acumulación del alimento en la pecera a las diferentes concentraciones de TCS. Por lo tanto, se propuso un peso estimado de 10 gramos de acumulación de alimento a la mitad del tratamiento y al final del tratamiento aproximadamente 22 gramos teniendo en cuenta la biomasa de la pecera y se realizó la medición diaria de parámetros físico químicos en el agua que permitieron monitorear la calidad de ésta en el transcurso de la semana de tratamiento, así mismo se evaluó la concentración de TCS diariamente.

El montaje se realizó en peceras de 40 litros por triplicado, donde se agregó la cantidad de alimento mencionado para peces aplicando un diseño factorial teniendo en cuenta el tiempo con el fin de evidenciar en que día empezaba a decaer la concentración para definir un límite de consumo de alimento que no afectara el tratamiento, sin embargo es un factor no controlable ya que depende de la capacidad de adaptación de cada pez a las condiciones planteadas.

3.1.5 Ensayo 5. Evaluación variabilidad de la concentración de TCS en presencia de tilapia.

Este ensayo se realizó con peces para determinar si éstos absorbían el contaminante en peceras de 40 litros dopadas a 50 µg/L, 120 µg/L y 190 µg/L con el fin de medir el nivel de tolerancia y evaluar la absorción de TCS en el transcurso de una semana. De tal forma se hizo el montaje por duplicado para hembras y machos con dos blancos para ambos sexos durante una semana. Así mismo para garantizar la exposición de los peces a las concentraciones propuestas se tuvo en cuenta los ensayos preliminares con agua, de tal forma para la concentración de 50 µg/L y 120 µg/L los peces se expusieron al segundo día de haber preparado la pecera debido a la lenta solubilidad del TCS y para la concentración de 190 µg/L los peces se expusieron al séptimo día.

En el primer día no se les agregó alimento a los peces para observar su comportamiento y adaptación al medio, además se añadió aireación con difusor de manguera para mantener el oxígeno disuelto entre 6 mg/L y 8 mg/L en el agua teniendo en cuenta que este no interfiere en la concentración de TCS como se muestra en los resultados de los ensayos preliminares.

3.2 Metodología para las variables respuesta del diseño de experimentos del trabajo de investigación.

3.2.1 Metodología de la recolección de muestras de gametos en machos Tilapia.

Por cada tratamiento planteado en el diseño experimental se expusieron tres tilapias por una semana, durante la cual se hicieron tres mediciones a cada uno de los peces para realizar la evaluación de las variables, la primera al iniciar el tratamiento (sin exposición al contaminante), la segunda durante el tratamiento y la última al final del tratamiento. Los análisis se hicieron por triplicado en cada uno de los tratamientos propuestos incluidos los peces de la línea base.

Cada uno de los machos fue extraído de la pecera y se aplicó una presión abdominal para ocasionar la expulsión de orina o heces fecales y así se evitó la contaminación de la muestra del esperma. De tal forma de nuevo se realizó la presión abdominal para coleccionar la muestra de semen en tubos de vidrio de 15 ml esterilizados y secos. Una vez se colectó la muestra, se llevó al laboratorio inmediatamente para ser analizada en cada una de las variables propuestas.

Para el estudio de las variables analizadas en los espermatozoides se utilizó el Microscopio Carl Zeiss Axio Imager A2, cámara AxioCan ICc5 con software ZEN Imaging 2012, cámara Neubauer, pipetas, portaobjetos, cubreobjetos y aceite de inmersión.

3.2.1.1 Metodología motilidad de espermatozoides en tilapia.

Respecto a la aplicación de la técnica para el conteo de espermatozoides en la variable de motilidad la muestra se analizó tan pronto ocurrió el proceso de licuefacción (después de 30 minutos de haber sido tomada la muestra), a temperatura ambiente para evitar la deshidratación de las células analizadas o cambios en la temperatura que pudieran afectar la estabilidad de la muestra. La muestra se homogenizó mezclando bien para tomar la primera alícuota, de igual forma se toma la réplica para el análisis.

En cada muestra que se preparó se obtuvo una profundidad de 20 μm con el fin de permitir la movilidad de los espermatozoides cuando la muestra se estuvo analizando. De tal forma se tomó 10 μL de la muestra que se ubicó entre la cámara Neubauer y el cubre objetos retirando el exceso de la muestra después de haber llenado en su totalidad la cámara, se esperó 60 segundos a que desaparecieran las burbujas. El parámetro de motilidad se analizó en el objetivo x 400 contado por muestra 200 espermatozoides.

3.2.1.2 Metodología movilidad de espermatozoides en tilapia.

El estudio de la movilidad se realizó con el fin de obtener el porcentaje de motilidad de los espermatozoides, para ello con la ayuda de la cámara se contaron los espermatozoides que se mueven activamente linealmente o en largos círculos a la que se le denomina motilidad progresiva (PR), también se contaron los espermatozoides que nadan en pequeños círculos o donde el flagelo hace un esfuerzo en mover la cabeza del espermatozoide, a esta variable se le denomina motilidad no progresiva (NP), y por último, se evaluó la inmotilidad que hace referencia a células sin movimiento (IM). El total de la motilidad se reportó con la suma de la motilidad progresiva y no progresiva (PR + NP), y se reportó el total de células que no presentan movimiento.

3.2.1.3 Metodología vitalidad de espermatozoides en tilapia.

La evaluación de la vitalidad de los espermatozoides permite identificar la integridad de la membrana dando cuenta de la motilidad, en el que el porcentaje de las células muertas no debe exceder el porcentaje de motilidad en los espermatozoides, y es importante cuando el porcentaje de motilidad progresiva es inferior al 40%.

Por otra parte, la vitalidad se midió usando eosina y nigrosina ya que los espermatozoides muertos poseen membranas permeables a los colorantes, por lo tanto, esta cualidad hace que se puedan discriminar de los espermatozoides vivos. Para preparar las muestras se tomaron 50 μ L de alícuota de la muestra de semen y 50 μ L de los reactivos eosina y nigrosina, se homogenizó la mezcla y se esperó 30 segundos para tomar las muestras, al igual que para las muestras para evaluar motilidad, se mezcla bien la muestra antes de tomarla, y para cada suspensión se coloca una gota en el porta objetos y se deja secar, analizándose la muestra con el objetivo x1000, 24 horas después de haberla fijado. Por último se estima el porcentaje de espermatozoides vivos o muertos a partir de la totalidad de 200 espermatozoides contados, la técnica descrita se conoce como el test de Williams Pollack.

3.2.1.4 Metodología morfología de espermatozoides en tilapia.

El último parámetro a evaluar fue morfología, en la que se analizaron los espermatozoides por una placa que fue coloreada con coloración Papanicolaou o con coloración de Gram, y que se hizo por duplicado. Los reactivos usados fueron: alcohol metílico, solución de May Grumwald, solución de Giemsa, agua de phi y aceite de inmersión. Con el fin de fijar la muestra se cubrió con alcohol metílico durante 5 minutos dejándola secar al aire. De esta forma se cubrió la muestra con May Grumwald durante 4 minutos y se diluyo con la misma cantidad de gotas de agua con pH 7,2 durante 4 minutos.

Luego de decantar y lavar, se cubrió la extensión de la muestra con una dilución de Giemsa diluida (3 gotas de colorante x mililitro de agua de pH 7,2) durante 12 minutos.

En la evaluación de las anormalidades se incluyeron defectos de la cabeza, del segmento intermedio, y la cola de los espermatozoides. Para el conteo discriminado en la morfología se incluyeron los espermatozoides con cola, las células inmaduras no se contaron.

3.2.1.4.1 Morfología normal de los espermatozoides.

La morfología de espermatozoides está asociada con la reproducción normal. El método usado para evaluar la morfología de los espermatozoides es clasificar los espermatozoides observados a las diferentes concentraciones del TCS con el fin de observar el cambio estructural de las células identificando los espermatozoides normales y los anormales. Los criterios descritos a continuación serán aplicados cuando exista normalidad morfológica (Kruger, et al., 1986)

A los espermatozoides se les observó la cabeza, cuello y cola (pieza intermedia y pieza principal) para todas las células analizadas que se consideraban normales. La cabeza debe ser regularmente ovalada y la zona acrosomal debe comprender del 40 al 70% de la cabeza (Menkveld, et al., 2001). La pieza intermedia debe ser alargada, regular y con la longitud aproximada de la cabeza del espermatozoide, y la pieza debe estar alienada con la punta de la cabeza. Por último, la pieza principal debe ser uniforme y más delgada que la pieza intermedia formando curvas frecuentes.

3.2.1.4.2 Morfología anormal de los espermatozoides.

En el estudio de la morfología de los espermatozoides también se observan aquellos con anormalidades que pueden estar asociadas a defectos en el proceso de espermatogénesis o a otras

patologías, para lo cual se requiere comprobar como la exposición a TCS puede alterar el funcionamiento del sistema endocrino, y por lo tanto, alterar la producción de células normales que faciliten sus procesos reproductivos ya que disminuyen los procesos de fertilización, ha atribuido al incremento de la fragmentación del ADN (Gandini et al., 2000) debido al proceso disruptivo.

Algunos defectos en los espermatozoides se pueden encontrar en las cabezas, por ejemplo, el tamaño de las cabezas pueden ser grandes, pequeñas, cónicas, redondas, cabezas dobles o llenas de vacuolas. Además en el cuello y en la parte media del espermatozoide los defectos pueden deberse a la inserción asimétrica de la cabeza, siendo gruesas, flexionadas o extremadamente delgadas. En cuanto a la pieza principal los defectos pueden ser que la cola sea corta, este rota, de ancho anormal, curvas en ángulo o en espiral.

Teniendo en cuenta las indicaciones señaladas para categorizar los espermatozoides, se analizaron los peces sometidos a 50 µg/L, 120 µg/L y 190 µg/L de TCS (contrastándolo con los peces blanco que se encontraban sin exposición al contaminante).

3.2.2 Metodología de la recolección de muestras de gametos en hembras Tilapia.

Las muestras de gametos (óvulos) en las hembras maduras se recolectaron tres veces a la semana antes del inicio del tratamiento (sin exposición al contaminante), en la fase intermedia y al final de éste para cada una de las tres hembras expuestas por tratamiento, bajo las condiciones establecidas en el diseño experimental a través de un masaje abdominal desde la aleta ventral hasta la aleta anal, depositando los óvulos en recipientes de 15 ml esterilizados y secos de vidrio. Una vez colectada la muestra se llevó al laboratorio y se refrigeró hasta su análisis posterior.

A continuación se describe la metodología para la preparación de las muestras de gametos hembra que permitirá caracterizar la síntesis de vitelogenina.

3.2.2.1 Preparación de la muestra de hembras de tilapia (óvulos).

Con el fin de procesar las muestras de óvulos de tilapia se requirió preparar diluciones del estándar de VTG y de las muestras obtenidas para aplicar el test ELISA como se describe a continuación con el fin de determinar la VTG presente en las muestras analizadas.

3.2.2.1.1 Dilución del estándar de vitelogenina.

Se realizó una curva con 11 puntos a partir del estándar de vitelogenina de 5 µg VTG/ml para ser analizados por el método de ELISA, como se puede observar en la tabla 2.

Tabla 2

Curva vitelogenina (VTG) método ELISA

Concentración de VTG (ng/ml)	
1	50
2	25
3	12.5
4	6.25
5	3.13
6	1.56
7	0.78
8	0.39
9	0.20
10	0.10
11	0.05

3.2.2.1.2 Dilución de las muestras.

Para las muestras de óvulos se prepararon dos diluciones 1:50 (se añadió 10 µL de la muestra a 490 µL del buffer) y la última se realizó a 1:5000 (se añadieron 10 µL de la dilución realizada de 1:50 a 990 µL del buffer).

Las soluciones del standard de vitelogenina y las diluciones de las muestras mientras se prepararon y durante su preservación se guardaron en hielo.

Una vez la curva y las muestras se diluyeron se procedió a realizar la incubación de la curva y las muestras en el plato como se muestra en la tabla 3. De tal forma los puntos de la curva y las muestras del ensayo ELISA se dispusieron en una placa con 96 pozos los cuales tienen posiciones determinadas en cuanto a la ubicación de sensores ópticos del equipo que permitieron la automatización de los ensayos realizados.

Tabla 2
Incubación curva del estándar de VTG y muestras

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NSB	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11
B	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
C	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12
D	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
E	P13	P14	P15	P16	P17	P18	P19	P20	P21	P22	P23	P24
F	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
G	P25	P26	P27	P28	P29	P30	P31	P32	P33	P34	P35	P36
H	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓

Nota. Donde S1 – S11 representa la curva realizada para los experimentos y la P representa las muestras que se incuban para cada uno de los pozos con su réplica respectiva.

Como se muestra en la tabla 3, en la primera fase de la incubación se añadió a cada pozo identificado como NSB, 100 μ L del buffer con el fin de determinar la unión no específica. Luego se añadió por duplicado 100 μ L de las diluciones de la curva respectivas del standard de VTG en los pozos y se añadió 100 μ L de cada una de las diluciones de las muestras por duplicado.

Cuando las muestras y la curva estuvieron listas, se incubaron y se sellaron con la cinta adherente dejándolas por una hora y media a temperatura ambiente (20° - 25° C).

Después se lavaron los platos 3 veces con 300 μ L por pozo con la solución buffer, posteriormente se añadieron 100 μ L del detector de anticuerpo diluido, se sellaron los platos y se incubaron a una temperatura ambiente durante 30 minutos. Luego de este tiempo se lavaron los platos 5 veces con la solución buffer añadiendo 300 μ L de ésta en cada pozo, se añadieron 100 μ L de la solución de sustrato a cada uno de los pozos y se incubaron cubriéndolos con papel aluminio a temperatura ambiente durante 20 minutos.

Por último, se detuvo la reacción añadiendo 100 μ L 0.3 M H₂SO₄ al pozo, luego se pasó por el lector de microplatos ELISA con absorbancia de 450 nm.

3.2.3 Metodología para el análisis de las muestras de agua a través de cromatografía líquida de ultra alta eficiencia acoplado a espectrometría de masas para determinar la concentración de TCS en cada tratamiento.

Con el fin de analizar la absorción del TCS de cada uno de los peces en los diferentes tratamientos se cuantificó el TCS presente en el agua a medida que transcurrían los tratamientos. Se tomaron 15 ml de agua en viales estériles al día durante una semana, correspondiente al tiempo

de exposición de cada tratamiento en cada una de las peceras y se procesaron para el análisis en el UPLC MS/MS. A continuación se muestra el diagrama metodológico en la figura 1.

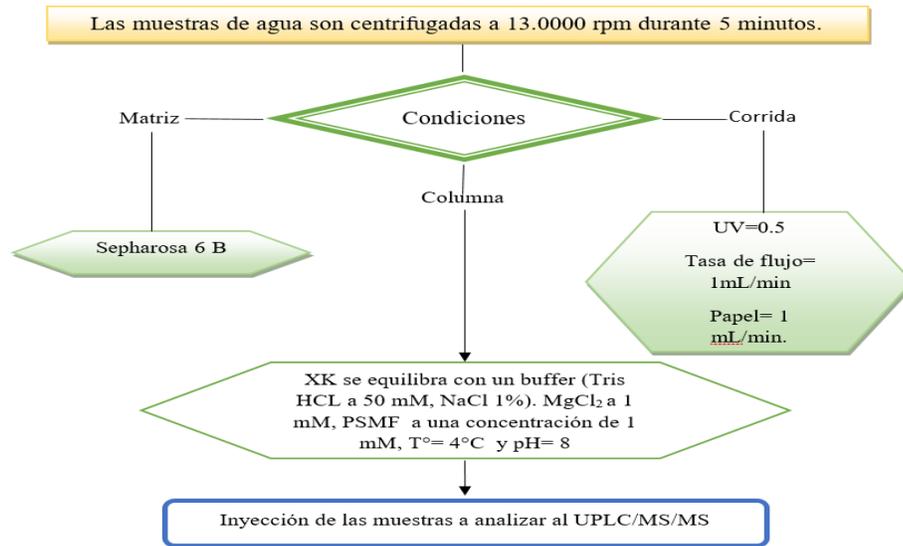


Figura 1. Metodología de preparación de las muestras de agua para el análisis en el UPLC MS/MS.

4. DISEÑO EXPERIMENTAL

4.1 Diseño experimental ensayos preliminares.

Se tuvieron en cuenta los factores propuestos para cada uno de los ensayos preliminares evaluando como variable respuesta el nivel de TCS durante una semana con el fin de elegir los factores que no inciden en la variación significativa de concentración del contaminante. El diseño experimental factorial fue 7x3x2 con 42 tratamientos para la variable respuesta nivel de TCS, éstos se realizaron por triplicado en peceras de 40 litros.

4.1.1 Ensayo 1. Evaluación de fotodegradación del TCS.

El ensayo se realizó con el fin de evaluar la fotodegradación del TCS en ausencia y presencia de luz en peceras de 40 litros de agua y dopadas a concentraciones de 50 µg/L, 120 µg/L y 190 µg/L, los ensayos se realizaron de acuerdo a los tratamientos planteados en la tabla 4.

Tabla 3

Evaluación de fotodegradación del TCS

Tiempo	Ausencia de luz (1) /Luz (2)	Concentración TCS (µg/L)
Día 1	1	50
		120
		190
	2	50
		120
		190
Día 2	1	50
		120
		190

		50
	2	120
		190
Día 3	1	50
		120
		190
		50
		120
		190
Día 4	1	50
		120
		190
		50
	2	120
		190
Día 5	1	50
		120
		190
		50
	2	120
		190
Día 6	1	50
		120
		190
		50
	2	120
		190
Día 7	1	50
		120
		190
		50
	2	120
		190

4.1.2 Ensayo 2. Evaluación de la variabilidad de TCS respecto al tipo de filtro.

Se tuvo en cuenta dos tipos de filtro que permitieran mantener la calidad de agua y que a su vez favorecieran mantener la concentración de oxígeno disuelto en el agua, de tal forma se eligió un filtro de cascada con el cual se evaluó la filtración mecánica y química para escoger aquella que no interfiriera en la variación de la concentración de TCS propuesta durante cada tratamiento por una semana como se muestra en la tabla 5.

Tabla 4

Evaluación de la variabilidad de TCS respecto al tipo de filtro

Tiempo	Filtro mecánico (1) /Filtro Químico (2)	Concentración TCS ($\mu\text{g/L}$)
Día 1	1	50
		120
		190
	2	50
		120
		190
Día 2	1	50
		120
		190
	2	50
		120
		190
Día 3	1	50
		120
		190
	2	50
		120
		190
Día 4	1	50
		120
		190
	2	50
		120
		190
Día 5	1	50
		120

		190
		50
	2	120
		190
Día 6		50
	1	120
		190
	2	50
		120
		190
Día 7		50
	1	120
		190
	2	50
		120
		190

Nota. Material A: Filtro mecánico (malla de filtración de residuos y perlón); Material B: Filtro químico (carbón activado).

4.1.3 Ensayo 3. Evaluación de la variabilidad de la concentración de TCS respecto al tipo de difusor de oxígeno.

En este ensayo preliminar se tuvo en cuenta dos tipos de aireadores uno de ellos con bola porosa y el otro con manguera difusora con el fin de evaluar la menor interferencia de los tipos de materiales con las concentraciones de TCS propuestas como se muestra en el diseño experimental propuesto en la tabla 6 y además mantener la concentración de oxígeno disuelto en el agua.

Tabla 5

Evaluación de la variabilidad de la concentración de TCS respecto al tipo de aireador

Tiempo	Aireador con bola porosa (1) / Aireador con manguera difusora (2)	Concentración TCS (µg/L)
---------------	--	---------------------------------

Día 1	1	50
		120
		190
	2	50
		120
		190
Día 2	1	50
		120
		190
	2	50
		120
		190
Día 3	1	50
		120
		190
	2	50
		120
		190
Día 4	1	50
		120
		190
	2	50
		120
		190
Día 5	1	50
		120
		190
	2	50
		120
		190
Día 6	1	50
		120
		190
	2	50
		120
		190
Día 7	1	50
		120

	190
	50
2	120
	190

Nota. Material A: Difusor de oxígeno de piedra porosa; Material B: Difusor de oxígeno con manguera.

4.1.4 Ensayo 4. Evaluación de la variabilidad de TCS con la exposición de alimento para peces.

Con el fin de evaluar cómo podría afectar la acumulación de alimento a la concentración de TCS debido a la afinidad lipídica del contaminante emergente se evaluaron dos pesos aproximados de alimento acumulado a la mitad del tratamiento y al final del tratamiento, ya que esto podría incidir en las variables respuesta a evaluar. De tal forma se propuso realizar el montaje experimental por triplicado en peceras de 40 litros de agua dopadas a concentraciones de TCS de 50 µg/L, 120 µg/L y 190 µg/L como se muestra en la tabla 7.

Tabla 6

Evaluación de la variabilidad de TCS con la exposición de alimento para peces

Tiempo	Alimento 10g (1) /Alimento 22 g (2)	Concentración TCS (µg/L)
Día 1	1	50
		120
		190
	2	50
		120
		190
Día 2	1	50
		120
		190
	2	50
		120

		190
		50
Día 3	1	120
		190
		50
		120
		190
		50
Día 4	1	120
		190
		50
		120
		190
	2	120
		190
		50
Día 5	1	120
		190
		50
		120
		190
	2	120
		190
		50
Día 6	1	120
		190
		50
		120
		190
	2	120
		190
		50
Día 7	1	120
		190
		50
		120
		190
	2	120
		190

4.1.5 Ensayo 5. Evaluación variabilidad de la concentración de TCS en presencia de tilapia.

Para evaluar como vario la concentración de TCS a 50 µg/L, 120 µg/L y 190 µg/L a medida que pasaba el tratamiento durante la semana, se expusieron a peces machos y hembras, cada individuo en una pecera de 40 litros dopada con TCS como se propone en el diseño experimental de la tabla 8.

Tabla 7

Evaluación variabilidad de la concentración de TCS en presencia de tilapia

Tiempo	Pez macho (1) /Pez hembra(2)	Concentración TCS (µg/L)
Día 1	1	50
		120
		190
	2	50
		120
		190
Día 2	1	50
		120
		190
	2	50
		120
		190
Día 3	1	50
		120
		190
	2	50
		120
		190
Día 4	1	50
		120
		190
	2	50
		120
		190
Día 5	1	50
		120
		190

		50
	2	120
		190
Día 6		50
	1	120
		190
		50
	2	120
		190
Día 7		50
	1	120
		190
		50
	2	120
		190

4.2 Diseño experimental variables respuesta trabajo de investigación.

Se escogió un diseño factorial con niveles mixtos con el fin de detectar la influencia de los factores en las variables respuestas planteadas y determinar la combinación de los niveles entre factores donde se identifique la mayor influencia de disrupción endocrina en las variables respuestas durante una semana.

En este estudio se analizaron los efectos de los factores: concentración de TCS, pH y tiempo que podrían influir en la disrupción endocrina y la interacción de los niveles escogidos para cada uno de éstos en las variables respuestas.

En el diseño K= 3 factores, TCS y el tiempo de exposición con tres niveles cada uno y el pH con 2 niveles. Por lo tanto, el diseño factorial es $3^2 \times 2$, con un total de dieciocho tratamientos, cada uno de éstos tendrá tres replicas.

Los factores propuestos para evaluar la incidencia en las variables respuestas se muestran en la tabla 9.

Tabla 8

Factores del diseño experimental del trabajo de investigación

Tiempo	pH	Concentración TCS ($\mu\text{g/L}$)
Día 1	7	50
		120
		190
	9	50
		120
		190
Día 4	7	50
		120
		190
	9	50
		120
		190
Día 7	7	50
		120
		190
	9	50
		120
		190

La concentración del TCS y el pH se escogieron como factores principales que podían incidir en la disrupción endocrina, ya que el TCS cambia su estructura molecular en función del pH (Pka 8.1), y por lo tanto, se propusieron dos niveles de éste, en el cual se pretende evaluar la interacción de éstos factores con el tiempo de exposición al contaminante, los cuales podrían incidir en las variables respuestas planteadas en la investigación.

Las variables respuestas que se analizaron en la ejecución de la fase experimental del trabajo de investigación se presentan en las tablas 10, 11 y 12.

Tabla 9

Variables respuesta del diseño experimental

	Variables respuesta	Sexo
Y₁	% Vitelogenina en óvulos	H
Y₂	% Motilidad en espermatozoides	M
Y₃	% Motilidad no progresiva en espermatozoides	M
Y₄	% Inmotilidad en espermatozoides	M
Y₅	% de vitalidad en espermatozoides	M
Y₆	% Morfología en espermatozoides	M
Y₇	Nivel de concentración de TCS en agua	M y H

Tabla 10

Tratamientos del diseño experimental en machos

Numero de tratamientos	Nombre de Tratamientos	Concentración	pH	Tiempo	Variables respuesta
1	1	50 µg/L	7	Día 1	Y ₂ , Y ₃ , Y ₄ , Y ₅ , Y ₆ , Y ₇ .
2	2	120 µg/L			Y ₂ , Y ₃ , Y ₄ , Y ₅ , Y ₆ , Y ₇ .
3	3	190 µg/L			Y ₂ , Y ₃ , Y ₄ , Y ₅ , Y ₆ , Y ₇ .
4	7	50 µg/L	9	Día 1	Y ₂ , Y ₃ , Y ₄ , Y ₅ , Y ₆ , Y ₇ .
5	8	120 µg/L			Y ₂ , Y ₃ , Y ₄ , Y ₅ , Y ₆ , Y ₇ .
6	9	190 µg/L			Y ₂ , Y ₃ , Y ₄ , Y ₅ , Y ₆ , Y ₇ .
7	1	50 µg/L	7	Día 4	Y ₂ , Y ₃ , Y ₄ , Y ₅ , Y ₆ , Y ₇ .
8	2	120 µg/L			Y ₂ , Y ₃ , Y ₄ , Y ₅ , Y ₆ , Y ₇ .
9	3	190 µg/L			Y ₂ , Y ₃ , Y ₄ , Y ₅ , Y ₆ , Y ₇ .

10	7	50 µg/L	9	Día 7	Y ₂ , Y ₃ , Y ₄ , Y ₅ , Y ₆ , Y ₇ .
11	8	120 µg/L			Y ₂ , Y ₃ , Y ₄ , Y ₅ , Y ₆ , Y ₇ .
12	9	190 µg/L			Y ₂ , Y ₃ , Y ₄ , Y ₅ , Y ₆ , Y ₇ .
13	1	50 µg/L	7		Y ₂ , Y ₃ , Y ₄ , Y ₅ , Y ₆ , Y ₇ .
14	2	120 µg/L			Y ₂ , Y ₃ , Y ₄ , Y ₅ , Y ₆ , Y ₇ .
15	3	190 µg/L			Y ₂ , Y ₃ , Y ₄ , Y ₅ , Y ₆ , Y ₇ .
16	7	50 µg/L	9		Y ₂ , Y ₃ , Y ₄ , Y ₅ , Y ₆ , Y ₇ .
17	8	120 µg/L			Y ₂ , Y ₃ , Y ₄ , Y ₅ , Y ₆ , Y ₇ .
18	9	190 µg/L			Y ₂ , Y ₃ , Y ₄ , Y ₅ , Y ₆ , Y ₇ .

Tabla 11

Tratamientos diseño experimental en hembras

Número de tratamientos	Nombre de tratamientos	Concentración	pH	Tiempo	Variables respuesta
1	4	50 µg/L	7	Día 1	Y ₁ , Y ₇ .
2	5	120 µg/L			Y ₁ , Y ₇ .
3	6	190 µg/L			Y ₁ , Y ₇ .
4	10	50 µg/L	9		Y ₁ , Y ₇ .
5	11	120 µg/L			Y ₁ , Y ₇ .
6	12	190 µg/L			Y ₁ , Y ₇ .
7	4	50 µg/L	7	Día 4	Y ₁ , Y ₇ .
8	5	120 µg/L			Y ₁ , Y ₇ .
9	6	190 µg/L			Y ₁ , Y ₇ .
10	10	50 µg/L	9		Y ₁ , Y ₇ .
11	11	120 µg/L			Y ₁ , Y ₇ .
12	12	190 µg/L			Y ₁ , Y ₇ .
13	4	50 µg/L	7	Día 7	Y ₁ , Y ₇ .
14	5	120 µg/L			Y ₁ , Y ₇ .
15	6	190 µg/L			Y ₁ , Y ₇ .
16	10	50 µg/L	9		Y ₁ , Y ₇ .
17	11	120 µg/L			Y ₁ , Y ₇ .

18	12	190 µg/L	Y ₁ , Y ₇ .
----	----	----------	-----------------------------------

4.2.1 Hipótesis.

4.2.1.1 Hipotesis estadística

Cada uno de los tratamientos propuestos en el diseño experimental tendrá una incidencia de disrupción endocrina en el pez Tilapia de más del 5% con base en las variables respuestas analizadas en los gametos del pez.

5.2.1.1.1 Modelo de efectos

El modelo estadístico de efectos para este tipo de diseño está dado por:

$$y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}; \quad i = 1, \dots, a; j = 1, \dots, b; k = 1, \dots, n.$$

Donde para nuestro caso:

- a : Numero de niveles de la concentración de TCS, 3 para la investigación: 50 µg/L, 120 µg/L y 190 µg/L
- b : Número de niveles de pH (7,9)
- c : Numero de niveles respecto al tiempo (Día 1, Día 4 y el día 7)
- i : i – esimo nivel del factor concentración de TCS, en este caso asociado a la i – esima concentración de TCS (50 µg/L, 120 µg/L y 190 µg/L), para este caso $i = 1,2,3$ pues existen 3 niveles asociados al factor concentración.
- j : j – esimo nivel del factor pH, en este caso asociado al j – esimo contenido de pH (7 y 9), para este caso $j = 1,2$ pues existen 2 niveles asociados al factor pH.
- K : k – esimo nivel del factor tiempo, en este caso asociado al k – esimo contenido del tiempo (1,4 y 7), para este caso $k = 1,2,3$ pues existen 3 niveles asociados al factor de tiempo.

- y_{ijk} : evaluación de gametos de tilapia al i – nivel del factor concentración de TCS del j – esimo nivel del factor pH y k – esimo nivel del factor tiempo y l – esima replica realizada.
 - μ : Media global.
 - α_i : Efecto debido al i – esimo nivel del factor A (Concentración de TCS).
 - β_j : Efecto debido al j – esimo nivel del factor B (pH).
 - γ_K : Efecto debido al K – esimo nivel del factor C (Tiempo).
 - $(\alpha\beta\gamma)_{ijk}$: Efecto de la interacción en la combinación ijk (Interacción entre concentración, pH y tiempo).
 - ε_{ijk} : Error aleatorio asociado a los factores
- Donde para el caso, las hipótesis de interés se muestran en la tabla 13.

Tabla 12

Hipótesis del problema con relación al efecto del TCS, el tiempo y los niveles de pH en la disrupción endocrina

Factor	Observaciones
Concentración de TCS	$H_0: \alpha_1 = \alpha_2 = \alpha_3 = 0$ $H_1: \alpha_i \neq 0, \text{ para algun } i$ Donde para el caso tenemos que: • H_0 : El efecto de la concentración del TCS no influye en la disrupción endocrina del pez tilapia. H_1 : El efecto de la concentración de TCS influye en la disrupción endocrina del pez tilapia
pH	$H_0: \beta_1 = \beta_2 = \beta_3 = 0$ $H_1: \beta_i \neq 0, \text{ para algun } i$ Donde para el caso tenemos que: • H_0 : El efecto de los niveles de pH no influye en la disrupción endocrina del pez tilapia. H_1 : El efecto de los niveles de pH influyen en la disrupción endocrina del pez tilapia
Tiempo	$H_0: \gamma = \gamma_2 = \gamma = 0$ $H_1: \gamma_i \neq 0, \text{ para algun } i$ Donde para el caso tenemos que: • H_0 : El transcurso del tiempo en cada uno de los tratamientos no influye en la disrupción endocrina del pez tilapia. H_1 : El transcurso del tiempo en cada uno de los tratamientos influye en la disrupción endocrina del pez tilapia.
Interacción	$H_0: (\alpha\beta\gamma)_{ijk} = 0, \text{ para todo } ijk$ $H_1: (\alpha\beta\gamma)_{ijk} \neq 0, \text{ para algun } i$ Donde para el caso tenemos que:

- H_0 : No existe efecto para la interacción entre todos los niveles de concentración de triclosán, niveles de pH y el tiempo sobre la disrupción endocrina.
- H_1 : Existe efecto para la interacción entre todos los niveles de concentración de triclosán, niveles de pH y el tiempo sobre la disrupción endocrina.

En la figura 2 se describen las variables a tener en cuenta en el diseño experimental, los factores principales y secundarios en los tratamientos a realizar en la fase experimental del trabajo de investigación.

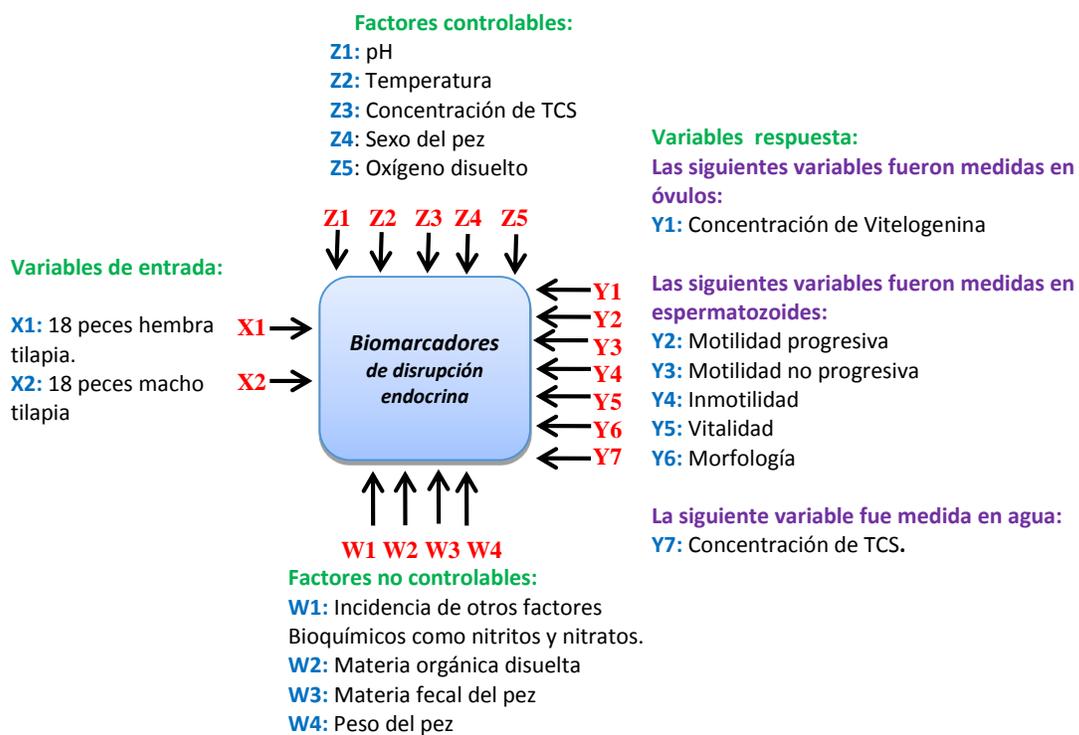


Figura 2. Variables diseño experimental.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

5.1 Ensayos preliminares.

5.1.1 Ensayo 1. Evaluación de fotodegradación del TCS.

Las figuras 3 a 5 muestran el diagrama de cajas para evaluar la variación de concentración de TCS en los tratamientos a través de factores como el tiempo durante 7 días consecutivos, la concentración de TCS con tres niveles: 50 µg/L, 120 µg/L y 190 µg/L, la exposición a la luz con dos niveles: uno en ausencia de luz y otro con presencia de luz artificial. De tal forma se considera que el TCS puede sufrir una transformación fotolítica en aguas superficiales con la luz solar, por lo tanto los procesos de fotólisis son importantes en la superficie de las masas de agua, pero no lo son en aguas subterráneas, residuales o de grifo (Aranami K, et al., 2007).

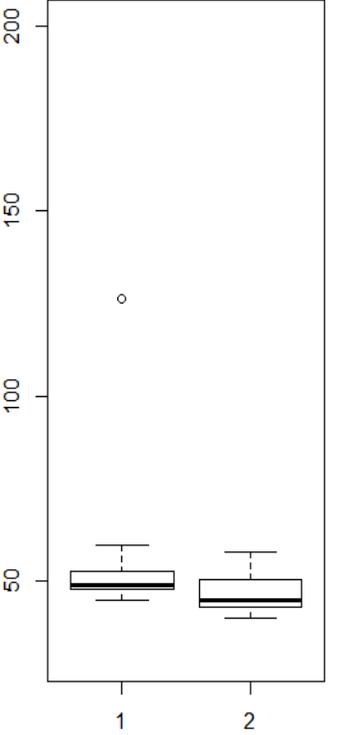
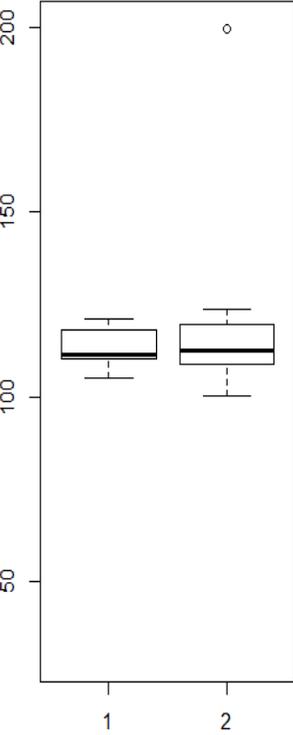
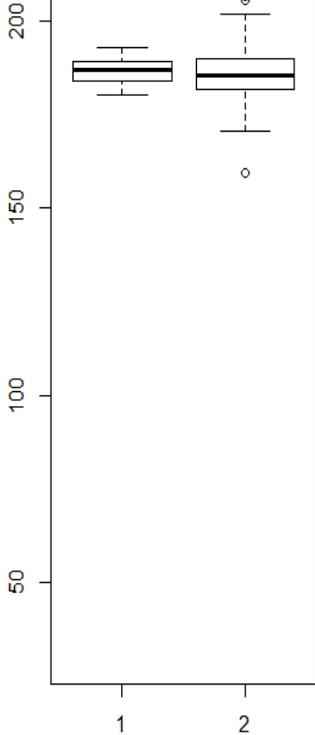
De tal manera se quiso determinar a través de estos ensayos que la incidencia de la luz artificial no afecta la variable respuesta estudiada, en este caso la concentración de TCS propuesta para el diseño experimental del trabajo de investigación, ya que si esto pasara podría incidir en las variables respuestas analizadas en peces.

Como se aprecia en la figura 3 y 4 la concentración de TCS no varía significativamente respecto a la exposición o ausencia de luz evaluada ya que tiende a mantenerse constante, asimismo en el análisis de la tabla ANOVA el factor de luz no tiene incidencia en la concentración de TCS para ninguna de las concentraciones evaluadas.

Por otra parte en la figura 5, la concentración de TCS incrementó después del cuarto día, lo cual se debe a que el TCS se concentraba por una combinación entre la disolución lenta del TCS en el agua y la evaporación del agua permitiendo alcanzar la concentración esperada en el día seis y siete, de tal forma para esta concentración se determinó exponer al pez una vez la disolución de TCS en el agua se haya completado alcanzando la concentración propuesta.

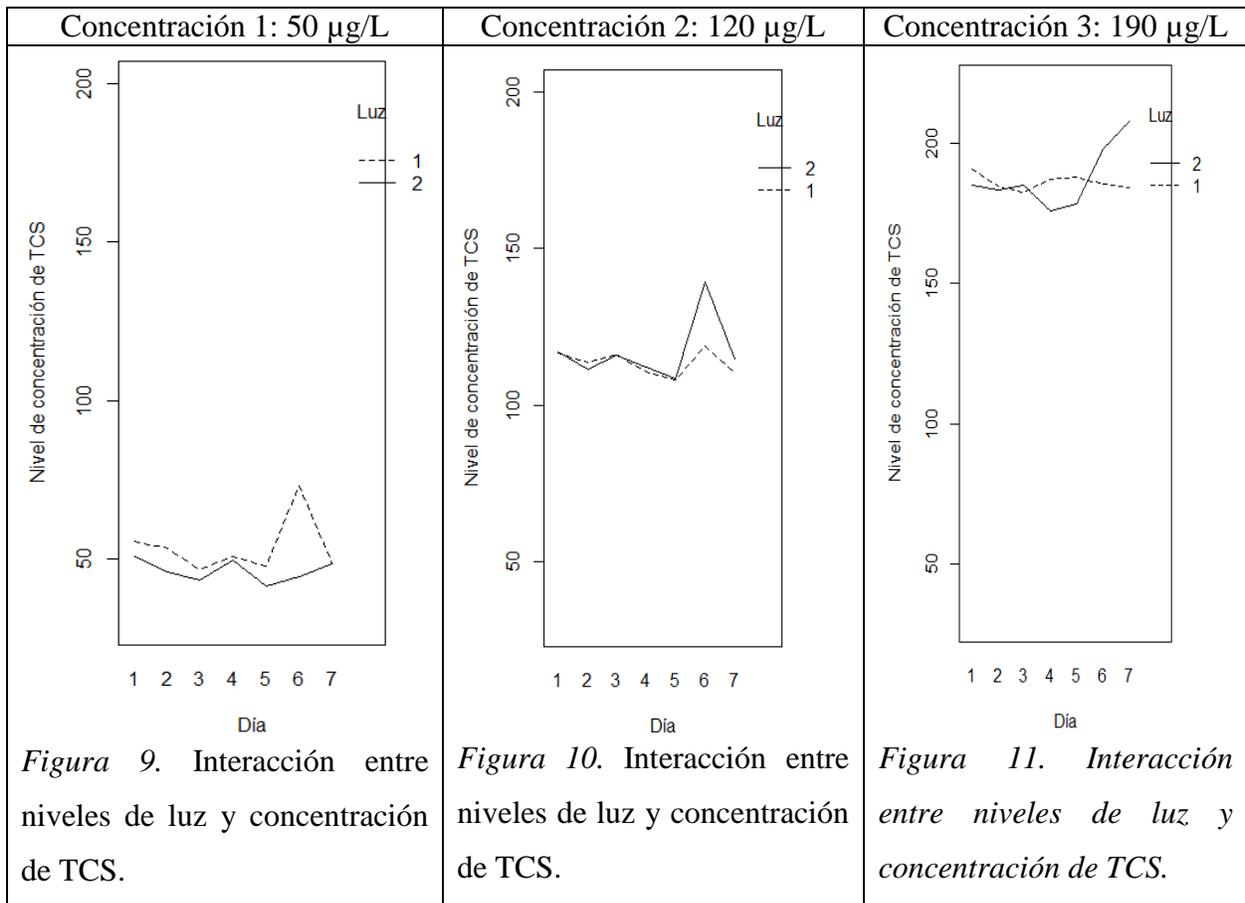
Concentración 1: 50 µg/L	Concentración 2: 120 µg/L	Concentración 3: 190 µg/L
<p><i>Figura 3.</i> Diagrama de cajas para la variación de la concentración de TCS a 50 µg /L a través de los días.</p>	<p><i>Figura 4.</i> Diagrama de cajas para la variación de la concentración de TCS a 120 µg /L a través de los días.</p>	<p><i>Figura 5.</i> Diagrama de cajas para la variación de la concentración de TCS a 190 µg/L a través de los días.</p>

Así mismo se realizó el análisis para cada uno de los niveles en ausencia o presencia de luz, como se muestra en la figura 7 y 8 la presencia o ausencia de luz no incide en la concentración de TCS propuesta en los ensayos, por otra parte en la figura 6 se encuentra una variabilidad no muy significativa de la disminución de la concentración de TCS al ser expuesta a la luz, sin embargo en el análisis estadístico no presenta significancia para la variable respuesta.

Concentración 1: 50 µg/L	Concentración 2: 120 µg/L	Concentración 3: 190 µg/L
 <p data-bbox="266 1394 553 1419">En ausencia o presencia de Luz</p>	 <p data-bbox="672 1394 935 1419">En ausencia o presencia de Luz</p>	 <p data-bbox="1081 1394 1360 1419">En ausencia o presencia de Luz</p>
<p data-bbox="201 1436 592 1682"><i>Figura 6.</i> Diagrama de cajas para la variación de la concentración de TCS a 50 µg /L en ausencia (1) o presencia de luz (2).</p>	<p data-bbox="617 1436 1008 1682"><i>Figura 7.</i> Diagrama de cajas para la variación de la concentración de TCS a 120 µg /L en ausencia (1) o presencia de luz (2).</p>	<p data-bbox="1032 1436 1424 1682"><i>Figura 8.</i> Diagrama de cajas para la variación de la concentración de TCS a 190 µg/L en ausencia (1) o presencia de luz (2).</p>

En las figura 9, al comparar la variación de la concentración del TCS sin presencia de luz (línea discontinua) y la variación de la concentración del TCS con presencia de luz (línea continua) se observa que no hay interacción para los dos niveles propuestos en el factor luz para la concentración de 50 $\mu\text{g/L}$ manteniendo constante la concentración propuesta durante la semana de tratamiento, de tal forma no se presentó fotodegradación. Asimismo la literatura reporta que el TCS es fotodegradable en aguas de grifo cuando está expuesta a pH 7 y a una fuente de irradiación de $320 < \lambda < 400$, sin embargo en aguas residuales la degradación es más rápida (Mezcua, Gómez, Ferrer, Agüera, Hernández y Fernández, 2004). En la figura 10 y 11 a la concentración de 120 $\mu\text{g/L}$ se observa que hay interacción entre los niveles de luz y ausencia de luz hasta el quinto día de exposición sin embargo en día sexto y séptimo ya no presentan interacción entre los niveles y aumenta la concentración del contaminante como ya se explicó, esto se debe a la combinación de la solubilidad del TCS en agua y la evaporación del agua en el tiempo expuesto. Así mismo se observa que ambos niveles del factor inciden en la concentración de TCS evaluada.

De tal forma se decidió realizar los ensayos del diseño experimental en presencia de luz ya que de acuerdo al análisis de varianza la presencia o ausencia de luz no afecta la concentración de TCS planteada en los tratamientos.



5.1.1.1 Análisis estadístico de la fotodegradación del TCS.

Con el fin de evaluar la influencia de los factores y las posibles interacciones entre éstos en la fotodegradación del TCS, para esto se realizó la tabla el análisis de varianza para analizar la significancia de las fuentes de variación del modelo (tabla 14).

Tabla 13

ANOVA para la variable respuesta fotodegradación del TCS

Fuente de variabilidad	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F_0	valor - p
------------------------	-------------------	--------------------	----------------	-------	-----------

A: Luz	SS_A	21	$a - 1$	1	MS_A	21	$\frac{MS_A}{MS_E}$	0.151	0.6987
B: Día	SS_B	2489	$b - 1$	6	MS_B	415	$\frac{MS_B}{MS_E}$	2.930	0.0121
C: Concentración	SS_C	391990	$c - 1$	2	MS_C	195995	$\frac{MS_C}{MS_E}$	1384.499	2 e-16
AB: Luz* Día	SS_{AB}	679	$(a - 1)(b - 1)$	6	MS_{AB}	113	$\frac{MS_{AB}}{MS_E}$	0.799	0.5735
AC: Luz* Concentración	SS_{AC}	700	$(a - 1)(c - 1)$	2	MS_{AC}	350	$\frac{MS_{AC}}{MS_E}$	2.471	0.0906
BC: Día* Concentración	SS_{BC}	1037	$(b - 1)(c - 1)$	12	MS_{BC}	86	$\frac{MS_{BC}}{MS_E}$	0.610	0.8278
ABC: Luz* Día* Concentración	SS_{ABC}	2150	$(a - 1)(b - 1)(c - 1)$	12	MS_{ABC}	179	$\frac{MS_{ABC}}{MS_E}$	1.266	0.2542
Residuales	SS_r	11891	$abc(n - 1)$	84	MS_r	142			
Total	SS_T	410957	$abcn - 1$	125		197301			

De acuerdo al análisis obtenido de la tabla ANOVA se realizó la verificación de hipótesis de la variable de fotodegradación del TCS como se muestra en la tabla 15.

Tabla 14.

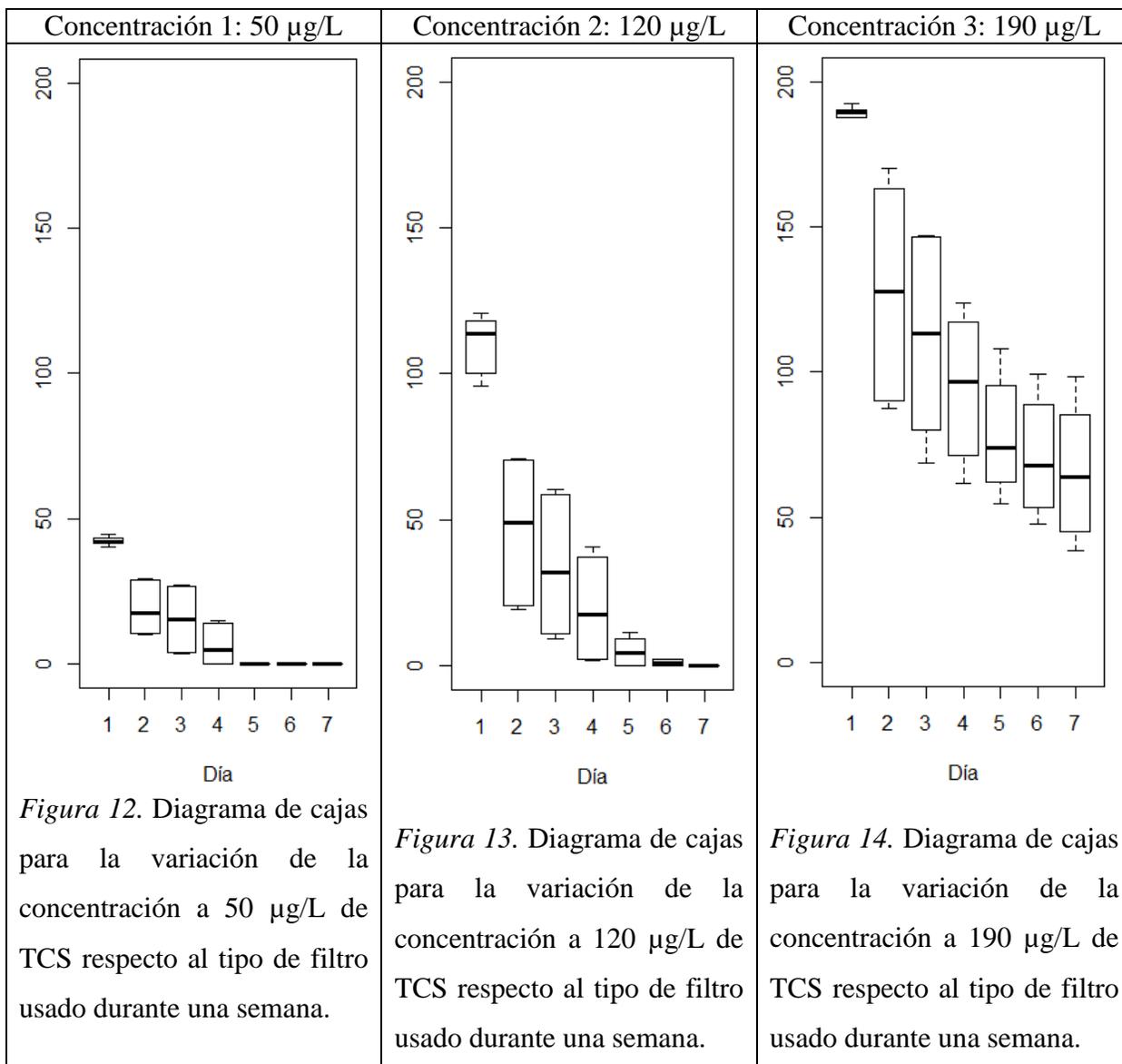
Verificación de hipótesis para la variable motilidad

Factor	Verificación de las hipótesis
A: Luz	Para este factor el <i>valor</i> $- p = 0.6987 > 0.05$ por lo que se rechaza H_1 y se acepta H_0 , luego el efecto del factor luz evaluado no tiene influencia en el nivel de TCS.
B: Día	Para este factor el <i>valor</i> $- p = 0.0121 < 0.05$ por lo que se rechaza H_0 y se acepta H_1 , luego, el efecto del tiempo tiene influencia en el nivel de TCS.

C: Concentración (µg/l)	Para este factor el $valor - p = 2 e - 16 < 0.05$ por lo que se rechaza H_0 y se acepta H_1 , luego, el efecto de la concentración tiene influencia en la variación de nivel de TCS.
Interacción ABC: Luz * Día * Concentración	Al evaluar esta interacción entre luz, día y concentración el $valor - p = 0.2542 > 0.05$ por lo que se rechaza H_1 y se acepta H_0 , luego el efecto de la interacción no tiene influencia en el nivel de TCS.
AC: Luz* Concentración	Al evaluar la interacción entre luz y concentración el $valor - p = 0.0906 > 0.05$ por lo que se rechaza H_1 y se acepta H_0 , luego el efecto de la interacción evaluada no tiene influencia en el nivel de TCS.
BC: Día* Concentración	En la interacción entre el tiempo y concentración el $valor - p = 0.8278 > 0.05$ por lo que se rechaza H_1 y se acepta H_0 , luego el efecto de la interacción entre tiempo y concentración evaluado no tiene influencia en el nivel de TCS.
AB: Luz* Día	Tenemos que para esta interacción de los factores luz y tiempo el $valor - p = 0.5735 > 0.05$ por lo que se rechaza H_1 y se acepta H_0 , luego la interacción evaluada no tiene influencia en el nivel de TCS

5.1.2 Ensayo 2. Evaluación de la variabilidad de TCS respecto al tipo de filtro.

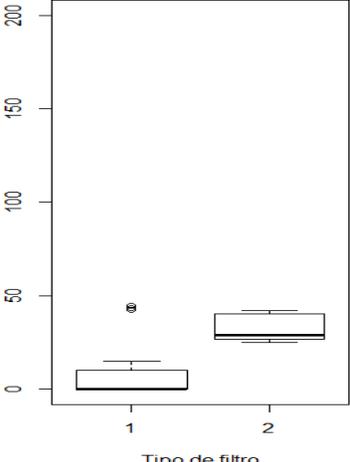
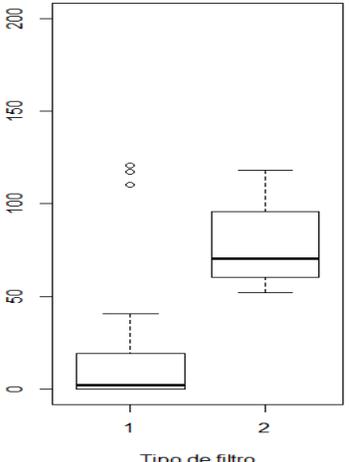
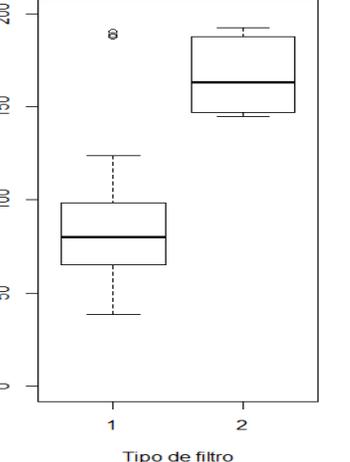
En las figuras 12, 13 y 14 se observa que el uso de filtro para la concentración de 50 µg/L, 120 µg/L y 190 µg/L de TCS incide en la disminución de la concentración del contaminante. Esto se podría deber a que en algunos tratamientos de agua se utilizan membranas de filtración que son tecnologías usadas para el tratamiento de aguas y aguas residuales que permiten mejorar la calidad del agua (Acero, 2012). Así mismo en la figura 12 y 13 se observa que al final del tratamiento no se detecta concentración de TCS, propiedad que se le atribuye al filtro con carbón activado que tiene la capacidad de adsorción de compuestos de masa molar baja, además la capacidad de la membrana para retener compuestos de partículas de alto peso molecular (Acero, 2012).



Por otra parte, en la figura 14 al final del tratamiento se observa un comportamiento similar en la concentración de TCS en los días 6 y 7 presentado una disminución no muy significativa en la concentración de TCS, lo cual podría deberse a que los tratamientos con filtración algunas veces son inefectivos para la remoción de contaminantes emergentes debido a que las membranas de carbón activado tienen una capacidad de retención limitada (Acero, 2012).

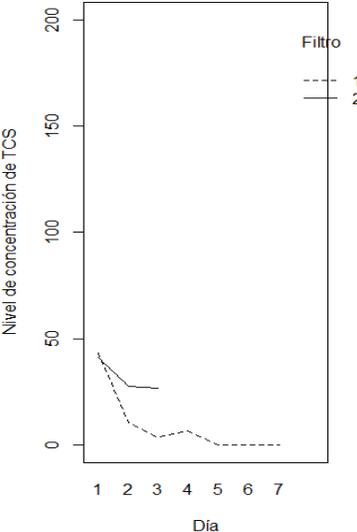
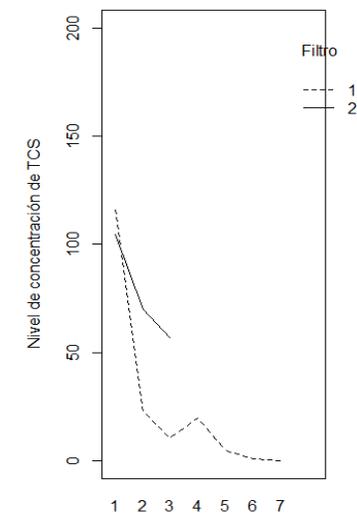
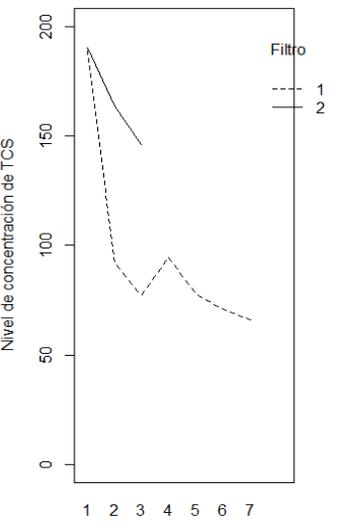
Se realizaron los diagramas de cajas para la variación de concentración de TCS en cada uno de los filtros propuestos: filtro químico constituido por malla de perlón con carbón activado (1) y filtración mecánica constituida por una rejilla plástica para la filtración de residuos (2).

En el análisis de la tabla ANOVA se evidencia que los tipos de filtro inciden en la concentración de TCS evaluada como se muestra en las figuras 15,16 y 17, ya que para ambos tipos de filtro se muestra una disminución de la concentración de TCS. Con base en los resultados la mayor retención de la concentración de TCS se da en la filtración química debido a la capacidad de retención de partículas de alto y bajo peso molecular.

Concentración 1: 50 µg/L	Concentración 2: 120 µg/L	Concentración 3: 190 µg/L
 <p style="text-align: center;">Tipo de filtro</p>	 <p style="text-align: center;">Tipo de filtro</p>	 <p style="text-align: center;">Tipo de filtro</p>
<p><i>Figura 15.</i> Diagrama de cajas para la variación de la concentración a 50 µg/L de TCS respecto al tipo de filtro usado. Filtración química (1) y filtración mecánica (2).</p>	<p><i>Figura 16.</i> Diagrama de cajas para la variación de la concentración a 120 µg/L de TCS respecto al tipo de filtro usado. Filtración química (1) y filtración mecánica (2).</p>	<p><i>Figura 17.</i> Diagrama de cajas para la variación de la concentración a 190 µg/L de TCS respecto al tipo de filtro usado. Filtración química (1) y filtración mecánica (2).</p>

Por otra parte, los ensayos con filtración mecánica también inciden en la disminución de concentración de TCS a través del tiempo, en este caso el contaminante se retiene en las paredes de la rejilla del filtro.

Así mismo se evaluó la interacción entre los niveles de filtro evaluados para la variable respuesta nivel de concentración de TCS, sin embargo como se muestra en las figura 18, 19 y 20 solo presenta interacción entre los niveles de filtro en el primer día y en los días posteriores los niveles no tienen interacción, sin embargo cada uno de los filtros tiene incidencia en la disminución de la concentración de TCS. Con base en los resultados obtenidos se decide no utilizar ningún tipo de filtración de las evaluadas y realizar la remoción de materia orgánica diariamente con el fin de evitar que la concentración de oxígeno disuelto disminuya y por lo tanto los parámetros de calidad de agua no sean óptimos para el adecuado funcionamiento del metabolismo de los peces.

Concentración 1: 50 µg/L	Concentración 2: 120 µg/L	Concentración 3: 190 µg/L
		
<p><i>Figura 18. Interacción entre niveles de filtros con los días y concentración de TCS.</i></p>	<p><i>Figura 19. Interacción entre niveles de filtros, día y concentración de TCS.</i></p>	<p><i>Figura 20. Interacción entre niveles de filtros, día y concentración de TCS.</i></p>

5.1.2.1 Análisis estadístico de la variación de TCS respecto al tipo de filtro.

Con el fin de evaluar la influencia de los factores y las posibles interacciones entre éstos en la variación de TCS respecto al tipo de filtro, de tal manera se realizó la tabla del análisis de varianza para identificar la significancia de las fuentes de variación del modelo (tabla 16).

Tabla 15

ANOVA para la variable respuesta variación de TCS respecto al tipo de filtro

Fuente variabilidad	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F_0	valor - p
A:Filtro	SS_A 51343	$a - 1$ 1	MS_A 51343	$\frac{MS_A}{MS_E}$ 1307.19 1	2 e-16
B: Día	SS_B 97253	$b - 1$ 6	MS_B 16209	$\frac{MS_B}{MS_E}$ 412.674	2 e-16
C: Concentración	SS_C 18256 7	$c - 1$ 2	MS_C 91284	$\frac{MS_C}{MS_E}$ 2324.06 1	2 e-16
AB: Filtro* Día	SS_{AB} 11551	(a - 1)(b - 1) 6	MS_{AB} 1925	$\frac{MS_{AB}}{MS_E}$ 49.013	2 e-16
AC: Filtro* Concentración	SS_{AC} 13494	(a - 1)(c - 1) 2	MS_{AC} 6747	$\frac{MS_{AC}}{MS_E}$ 171.777	2 e-16
BC: Día* Concentración	SS_{BC} 11602	(b - 1)(c - 1) 12	MS_{BC} 967	$\frac{MS_{BC}}{MS_E}$ 24.615	2 e-16
ABC: Filtro* Día* Concentración	SS_{ABC} 1383	(a - 1)(b - 1)(c - 1) 8	MS_{ABC} 173	$\frac{MS_{ABC}}{MS_E}$ 4.402	0.00016 6
Residuales	SS_r 3456	$abc(n - 1)$ 88	MS_r 39		
Total	SS_T 37264 9	$abcn - 1$ 5	16868 7		

De acuerdo al análisis obtenido de la tabla ANOVA se realizó la verificación de hipótesis de la variable nivel de TCS como se muestra en la tabla 17.

Tabla 16

Verificación de hipótesis para la variabilidad de TCS respecto al tipo de filtro

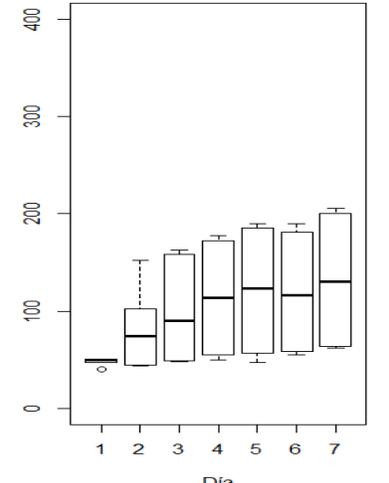
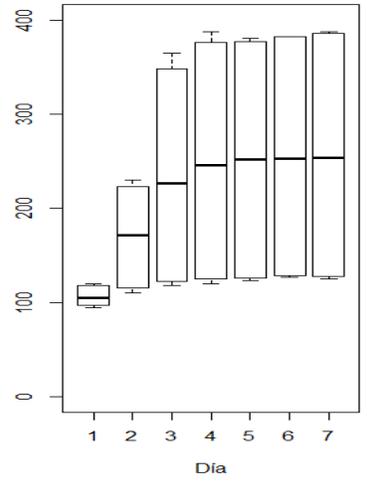
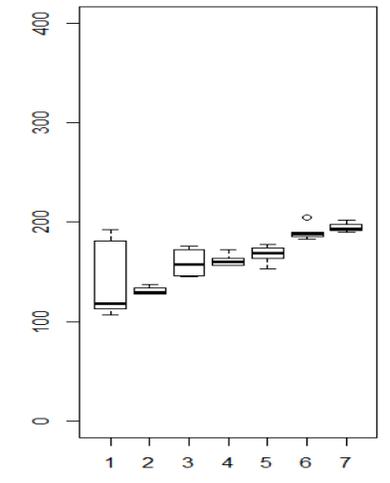
Factor	Verificación de las hipótesis
A:Filtro	Para este factor el $valor - p = 2 e - 16 < 0.05$ por lo que se rechaza H_0 y se acepta H_1 , luego, el efecto del tipo de filtro tiene influencia en el nivel de TCS evaluado.
B: Día	Para este factor el $valor - p = 2 e - 16 < 0.05$ por lo que se rechaza H_0 y se acepta H_1 , luego, el efecto del tiempo tiene influencia en el nivel de TCS.
C: Concentración (µg/l)	Para este factor el $valor - p = 2 e - 16 < 0.05$ por lo que se rechaza H_0 y se acepta H_1 , luego, el efecto de la concentración tiene influencia en la variación de nivel de TCS.
Interacción ABC: Filtro * Día * Concentración	Al evaluar esta interacción entre filtro, día y concentración el $valor - p = 0.000166 < 0.05$ por lo que se rechaza H_0 y se acepta H_1 , luego, el efecto de la interacción tiene influencia en el nivel de TCS evaluado.
AC: Filtro* Concentración	Al evaluar la interacción entre el tipo de filtro y concentración el $valor - p = 2 e - 16 < 0.05$ por lo que se rechaza H_0 y se acepta H_1 , luego la interacción tiene influencia en el nivel de TCS evaluado.
BC: Día* Concentración	En la interacción entre el tiempo y concentración el $valor - p = 2 e - 16 < 0.05$ por lo que se rechaza H_0 y se acepta H_1 , luego la interacción entre tiempo y concentración tiene influencia en el nivel de TCS.
AB: Filtro * Día	Tenemos que para esta interacción de los factores filtro y tiempo el $valor - p = 2 e - 16 < 0.05$ por lo que se rechaza H_0 y se acepta H_1 , por lo tanto tiene influencia en el nivel de TCS evaluado.

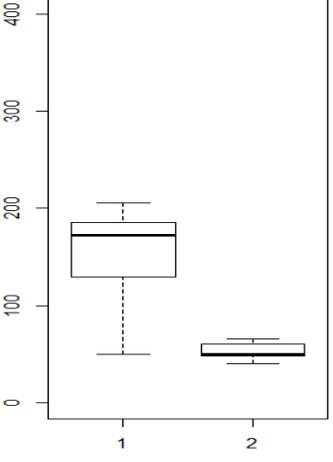
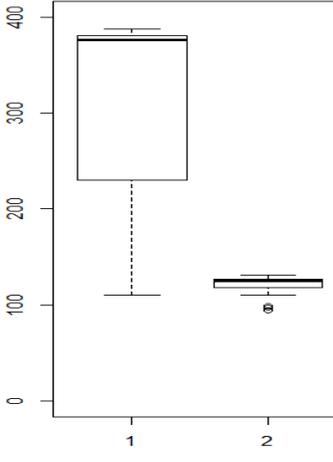
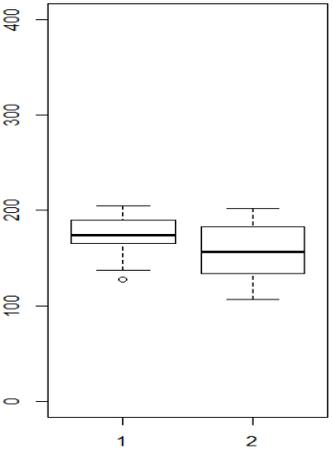
5.1.3 Ensayo 3. Evaluación de la variabilidad de la concentración de TCS respecto al tipo de difusor de oxígeno.

Según las figuras 21, 22 y 23 cuando se realizaron los ensayos a la concentración de 50 µg/L, 120 µg/L y 190 µg/L de TCS, se observa que el tipo de difusor de oxígeno utilizado incide en la concentración de TCS a los niveles propuestos aumentando su concentración a medida que pasan los días de exposición a éste.

Sin embargo en la figura 24, 25 y 26 se hizo un análisis de diagrama de cajas para cada uno de los niveles del factor tipo de difusor. En las concentraciones de 50 µg/L, 120 µg/L y 190 µg/L de TCS se evidencia que el difusor de oxígeno con piedra porosa incrementa la concentración en el agua, de igual forma ocurre con el paso de los días.

En oposición a lo que ocurre con la manguera difusora de oxígeno, ya que ésta mantiene los niveles de concentración de TCS esperados en los experimentos realizados, éstos cambios en la concentración se pueden explicar por el efecto combinado entre disolución lenta del TCS y evaporación del agua como se había explicado anteriormente (Figura 24, 25 y 26).

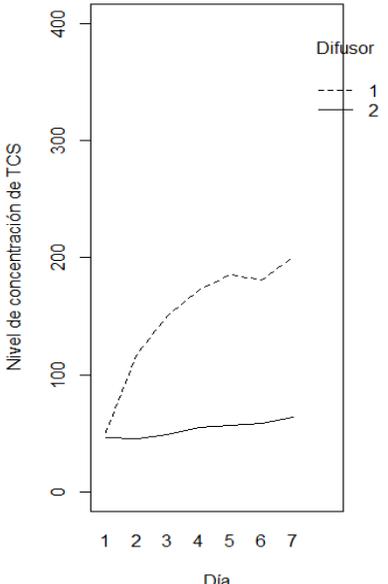
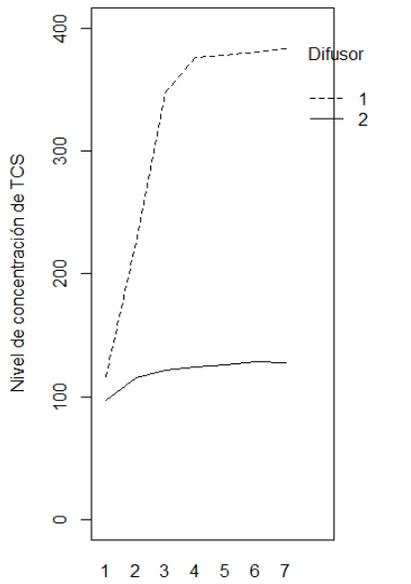
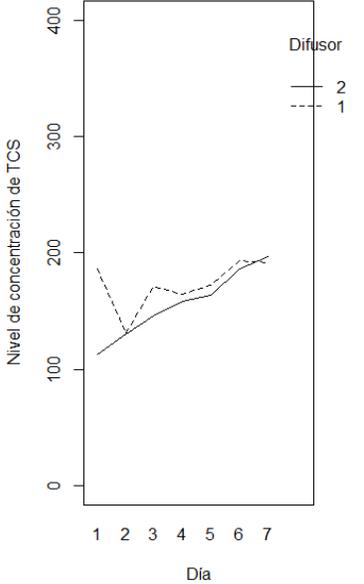
Concentración 1: 50 µg/L	Concentración 2: 120 µg/L	Concentración 3: 190 µg/L
		
<p><i>Figura 21.</i> Diagrama de cajas para la variación de la concentración a 50 µg/L de TCS respecto al tipo de difusor usado durante una semana.</p>	<p><i>Figura 22.</i> Diagrama de cajas para la variación de la concentración a 120 µg/L de TCS respecto al tipo de difusor usado durante una semana.</p>	<p><i>Figura 23.</i> Diagrama de cajas para la variación de la concentración a 190 µg/L de TCS respecto al tipo de difusor usado durante una semana.</p>

Concentración 1: 50 µg/L	Concentración 2: 120 µg/L	Concentración 3: 190 µg/L
		
<p><i>Figura 24.</i> Diagrama de cajas para la variación de la concentración a 50 µg/L de TCS respecto al tipo de difusor usado: piedra porosa difusora (1) y manguera difusora (2).</p>	<p><i>Figura 25.</i> Diagrama de cajas para la variación de la concentración a 120 µg/L de TCS respecto al tipo de difusor usado: piedra porosa difusora (1) y manguera difusora (2).</p>	<p><i>Figura 26.</i> Diagrama de cajas para la variación de la concentración a 190 µg/L de TCS respecto al tipo de difusor usado: piedra porosa difusora (1) y manguera difusora (2).</p>

La interacción entre los niveles del tipo de difusor de oxígeno en las figuras 27 y 28 no tienen interacción entre ellos, sin embargo el difusor de manguera es el que mantiene la concentración propuesta en los dos tratamientos. Por otra parte el comportamiento de los difusores a la concentración de 190 µg/L es similar y tienen una interacción al principio del tratamiento y al final de éste (figura 29), sin embargo hay que tener en cuenta que la solubilidad del TCS en la concentración más alta se alcanza entre el día sexto y séptimo del tratamiento.

Con base en los resultados analizados se escogió para el diseño experimental tener en cuenta al difusor de oxígeno con manguera ya que este mantiene las concentraciones de TCS

propuestas y no altera las concentraciones de oxígeno disuelto en el agua con base a la medición diaria de este parámetro.

Concentración 1: 50 µg/L	Concentración 2: 120 µg/L	Concentración 3: 190 µg/L
 <p data-bbox="203 1071 591 1396"><i>Figura 27.</i> Interacción entre niveles de difusores de oxígeno, día y concentración de TCS. El difusor de piedra porosa es el nivel 1 y el difusor de manguera el nivel 2.</p>	 <p data-bbox="613 1071 1024 1396"><i>Figura 28.</i> Interacción entre niveles de filtros, día y concentración de TCS.</p>	 <p data-bbox="1047 1071 1411 1396"><i>Figura 29.</i> Interacción entre niveles de filtros, día y concentración de TCS.</p>

5.1.3.1 Análisis estadístico de la variación de TCS respecto al tipo de difusor de oxígeno.

Con el fin de evaluar la influencia de los factores y las posibles interacciones entre éstos en la variabilidad del nivel de TCS, para esto se realizó la tabla el análisis de varianza para analizar la significancia de las fuentes de variación del modelo (tabla 18).

Tabla 17

ANOVA para la variable respuesta variación en el nivel de TCS respecto al tipo de difusor de oxígeno usado

Fuente de variabilidad	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F_0	valor - p
A: Difusor	SS_A 334939	$a - 1$ 1	MS_A 33493 9	MS_A 5493.6 $/MS_E$ 3	2 e-16
B: Día	SS_B 126017	$b - 1$ 6	MS_B 21003	MS_B 344.49 $/MS_E$	2 e-16
C: Concentración	SS_C 279335	$c - 1$ 2	MS_C 13966 7	MS_C 2290.8 $/MS_E$ 1	2 e-16
AB: Difusor* Día	SS_{AB} 41959	$(a - 1)(b - 1)$ 6	MS_{AB} 6993	MS_{AB} 114.70 $/MS_E$	2 e-16
AC: Difusor* Concentración	SS_{AC} 167296	$(a - 1)(c - 1)$ 2	MS_{AC} 83648	MS_{AC} 1371.9 $/MS_E$ 8	2 e-16
BC: Día* Concentración	SS_{BC} 40327	$(b - 1)(c - 1)$ 12	MS_{BC} 3361	MS_{BC} 55.12 $/MS_E$	2 e-16
ABC: Difusor* Día* Concentración	SS_{ABC} 62679	$(a - 1)(b - 1)(c - 1)$ 12	MS_{ABC} 5223	MS_{ABC} 85.67 $/MS_E$	2 e-16
Residuales	SS_r 5121	$abc(n - 1)$ 84	MS_r 61		
Total	SS_T 105767 3	$abcn - 1$ 12 5	59489 5		

De acuerdo al análisis obtenido de la tabla ANOVA (tabla 19) se realizó la verificación de hipótesis de la variable nivel de TCS.

Tabla 18

Verificación de hipótesis para evaluar la variabilidad de TCS respecto al tipo de difusor usado

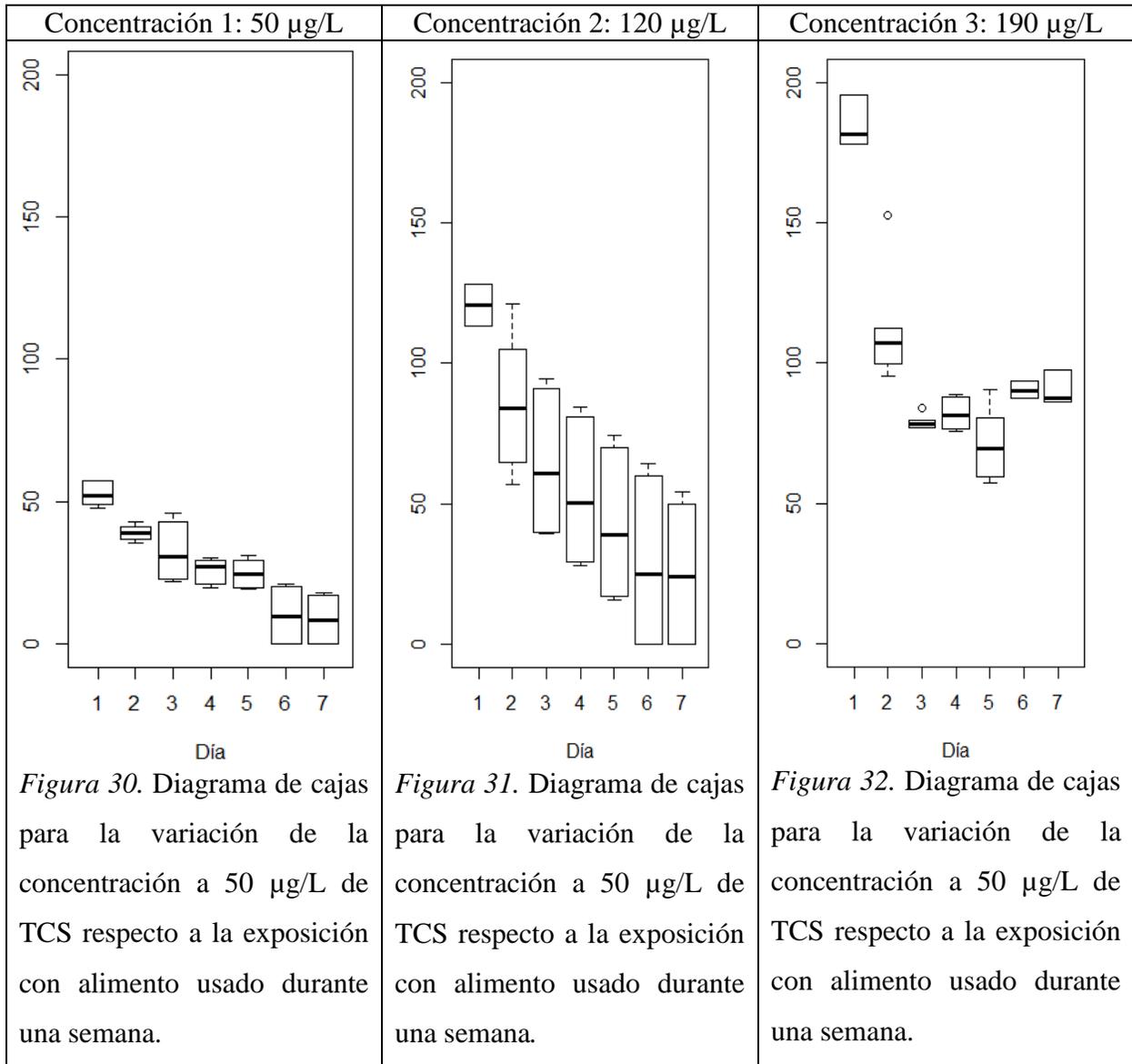
Factor	Verificación de las hipótesis
--------	-------------------------------

A: Difusor	Para este factor el $valor - p = 2 e - 16 < 0.05$ por lo que se rechaza H_0 y se acepta H_1 , luego, el efecto del tipo de difusor tiene influencia en la concentración TCS.
B: Día	Para este factor el $valor - p = 2 e - 16 < 0.05$ por lo que se rechaza H_0 y se acepta H_1 , luego, el efecto del tiempo tiene influencia en el nivel de TCS.
C: Concentración (µg/l)	Para este factor el $valor - p = 2 e - 16 < 0.05$ por lo que se rechaza H_0 y se acepta H_1 , luego, el efecto de la concentración tiene influencia en la variación de nivel de TCS.
Interacción ABC: Difusor * Día * Concentración	Al evaluar esta interacción entre difusor, día y concentración el $valor - p = 2 e - 16 < 0.05$ por lo que se rechaza H_0 y se acepta H_1 , luego, el efecto de la interacción tiene influencia en el nivel de TCS evaluado.
AC: Difusor* Concentración	Al evaluar la interacción entre difusor y concentración el $valor - p = 2 e - 16 < 0.05$ por lo que se rechaza H_0 y se acepta H_1 , luego la interacción tiene influencia en el nivel de TCS evaluado.
BC: Día* Concentración	En la interacción entre el tiempo y concentración el $valor - p = 2 e - 16 < 0.05$ por lo que se rechaza H_0 y se acepta H_1 , luego la interacción entre tiempo y concentración tiene influencia en el nivel de TCS.
AB: Difusor * Día	Tenemos que para esta interacción de los factores difusor y tiempo el $valor - p = 2 e - 16 < 0.05$ por lo que se rechaza H_0 y se acepta H_1 , por lo tanto tiene influencia en el nivel de TCS evaluado.

5.1.4 Ensayo 4. Evaluación de la variabilidad de TCS con la exposición de alimento.

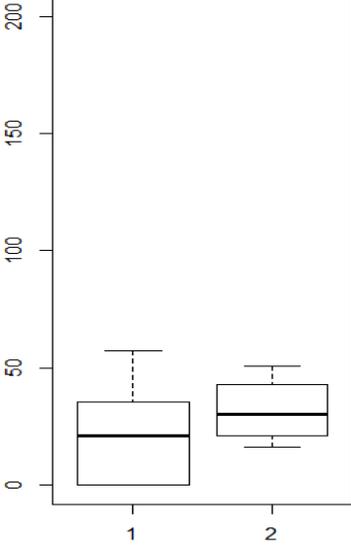
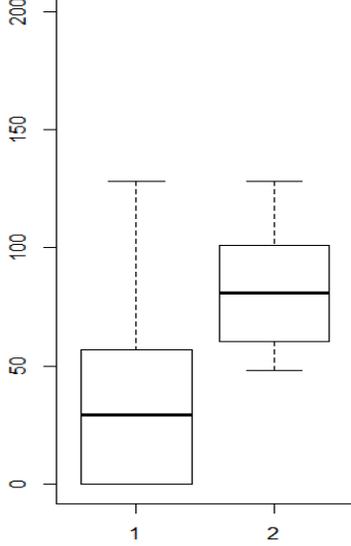
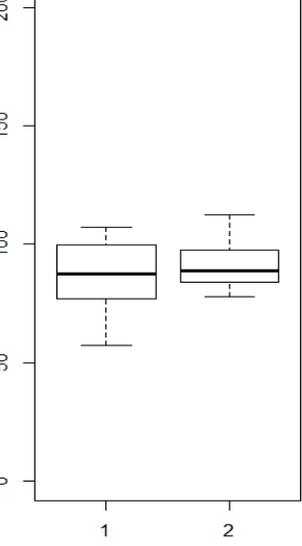
En la figura 30, 31 y 32 se observa que la concentración del TCS no se afectó por el alimento en el primer día de exposición debido a que se mantiene en suspensión, sin embargo el alimento desde el segundo día de exposición se solubiliza en la matriz de agua y disminuye la concentración del TCS significativamente lo cual es debido a que el triclosán tiene afinidad por adsorberse sobre materia orgánica (Hale y Smith, 1996), debido a que tienen una alta naturaleza lipofílica $\log K_{ow}$ 4.8, por lo tanto su acumulación en compuestos sólidos es mayor que en el agua (Bester, 2003), en este caso sobre el alimento, disminuyendo la concentración del triclosán en el agua a través de los días. De tal forma si el alimento es consumido por el pez será más fácil la ingesta por parte de éste del contaminante debido a que se encuentra retenido en la matriz orgánica,

además la concentración que este en el agua tendría tendencia a acumularse en los tejidos y por lo tanto ser potencialmente más tóxico (Hansch y Dunn, 1972).



En las figuras 33 y 34 para la concentración de 50 µg/L y 120 µg/L se observa que la adherencia al alimento es proporcional a la cantidad de alimento expuesto en la pecera, es decir que a menor cantidad de alimento menor absorción del contaminante, en este caso en el nivel 1 con 22 gramos de alimento la adsorción del contaminantes es mayor al contrario que para el nivel

2 con 10 gramos, sin embargo el comportamiento en la figura 35 se observa que la adsorción del contaminante en ambos niveles de alimento es similar a una concentración de 190 µg/L.

Concentración 1: 50 µg/L	Concentración 2: 120 µg/L	Concentración 3: 190 µg/L
 <p style="text-align: center;">Alimento</p>	 <p style="text-align: center;">Alimento</p>	 <p style="text-align: center;">Alimento</p>
<p><i>Figura 33.</i> Diagrama de cajas para la variación de la concentración a 50 µg/L de TCS respecto al alimento. De tal forma el nivel 1 corresponde a 22 g de alimento y el nivel 2 a 10 g de alimento.</p>	<p><i>Figura 34.</i> Diagrama de cajas para la variación de la concentración a 120 µg/L de TCS respecto al tipo de filtro usado. De tal forma el nivel 1 corresponde a 22 g de alimento y el nivel 2 a 10 g de alimento.</p>	<p><i>Figura 35.</i> Diagrama de cajas para la variación de la concentración a 190 µg/L de TCS respecto al tipo de filtro usado. De tal forma el nivel 1 corresponde a 22 g de alimento y el nivel 2 a 10 g de alimento.</p>

En la figura 36 y 37 se aprecia que los niveles de alimento propuestos tienen interacción los dos primeros días, sin embargo en días posteriores del tratamiento estos ya no tienen interacción. Por otra parte la cantidad de alimento propuesto incide en la variable respuesta de la concentración de TCS debido a su adherencia a la fase lipídica del alimento. Por último en la figura

38 se observa interacción entre los dos niveles de alimento propuesto lo cual incide significativamente en la disminución de concentración de TCS propuesta, por otra parte entre el tercer y quinto día ya no se presenta interacción, sin embargo al final del tratamiento se restablece el comportamiento inicial de interacción entre los niveles de alimento propuestos.

De tal forma para el diseño experimental se sugiere que el pez consuma el alimento en el primer día debido a la flotabilidad y poca disolución en el agua del alimento, sin embargo si el pez ingiere el alimento en días posteriores parte de la concentración de TCS estará retenida en la materia orgánica del alimento lo cual permitirá al pez otro medio de asimilación del contaminante en su organismo sin interferir en las variables respuesta propuestas en el diseño experimental.

Concentración 1: 50 µg/L	Concentración 2: 120 µg/L	Concentración 3: 190 µg/L
<p><i>Figura 36.</i> Interacción entre niveles de alimento, día y concentración de TCS. El Alimento con 10 g corresponde al nivel 2 y el alimento con 22 g corresponde al nivel 1.</p>	<p><i>Figura 37.</i> Interacción entre niveles de alimento, día y concentración de TCS. El Alimento con 10 g corresponde al nivel 2 y el alimento con 22 g corresponde al nivel 1.</p>	<p><i>Figura 38.</i> Interacción entre niveles de alimento, día y concentración de TCS. El Alimento con 10 g corresponde al nivel 2 y el alimento con 22 g corresponde al nivel 1.</p>

5.1.4.4 Análisis estadístico de la variación de TCS con la exposición de alimento.

Con el fin de evaluar la influencia de los factores y las posibles interacciones entre éstos en la variabilidad de TCS respecto a la exposición con alimento. De tal forma se realizó la tabla el análisis de varianza para analizar la significancia de las fuentes de variación del modelo (tabla 20).

Tabla 19
ANOVA para la variable respuesta exposición al alimento

Fuente de variabilidad	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F_0	valor - p
A:Alimento	SS_A 13044	$a - 1$ 1	MS_A 1304 4	MS_A / MS_E 314.729	2 e-16
B: Día	SS_B 84235	$b - 1$ 6	MS_B 1403 9	MS_B / MS_E 338.732	2 e-16
C: Concentración	SS_C 11507 5	$c - 1$ 2	MS_C 5753 8	MS_C / MS_E 1388.24 1	2.36 e-16
AB: Alimento* Día	SS_{AB} 2859	$(a - 1)(b - 1)$ 6	MS_{AB} 477	MS_{AB} / MS_E 11.497	2 e-09
AC: Alimento* Concentración	SS_{AC} 8466	$(a - 1)(c - 1)$ 2	MS_{AC} 4233	MS_{AC} / MS_E 102.137	2 e-16
BC: Día* Concentración	SS_{BC} 20487	$(b - 1)(c - 1)$ 12	MS_{BC} 1707	MS_{BC} / MS_E 41.192	2 e-16
ABC: Alimento* Día* Concentración	SS_{ABC} 2234	$(a - 1)(b - 1)(c - 1)$ 12	MS_{ABC} 186	MS_{ABC} / MS_E 4.492	1.54 e-05
Residuales	SS_r 3481	$abc(n - 1)$ 84	MS_r 41		
Total	SS_T 24988 1	$abcn - 1$ 12 5	9126 5		

De acuerdo al análisis obtenido de la tabla ANOVA se realizó la verificación de hipótesis de la variable variación del nivel de TCS respecto a la exposición de alimento como se muestra en la tabla 21.

Tabla 20

Tabla verificación de hipótesis para los niveles de alimento

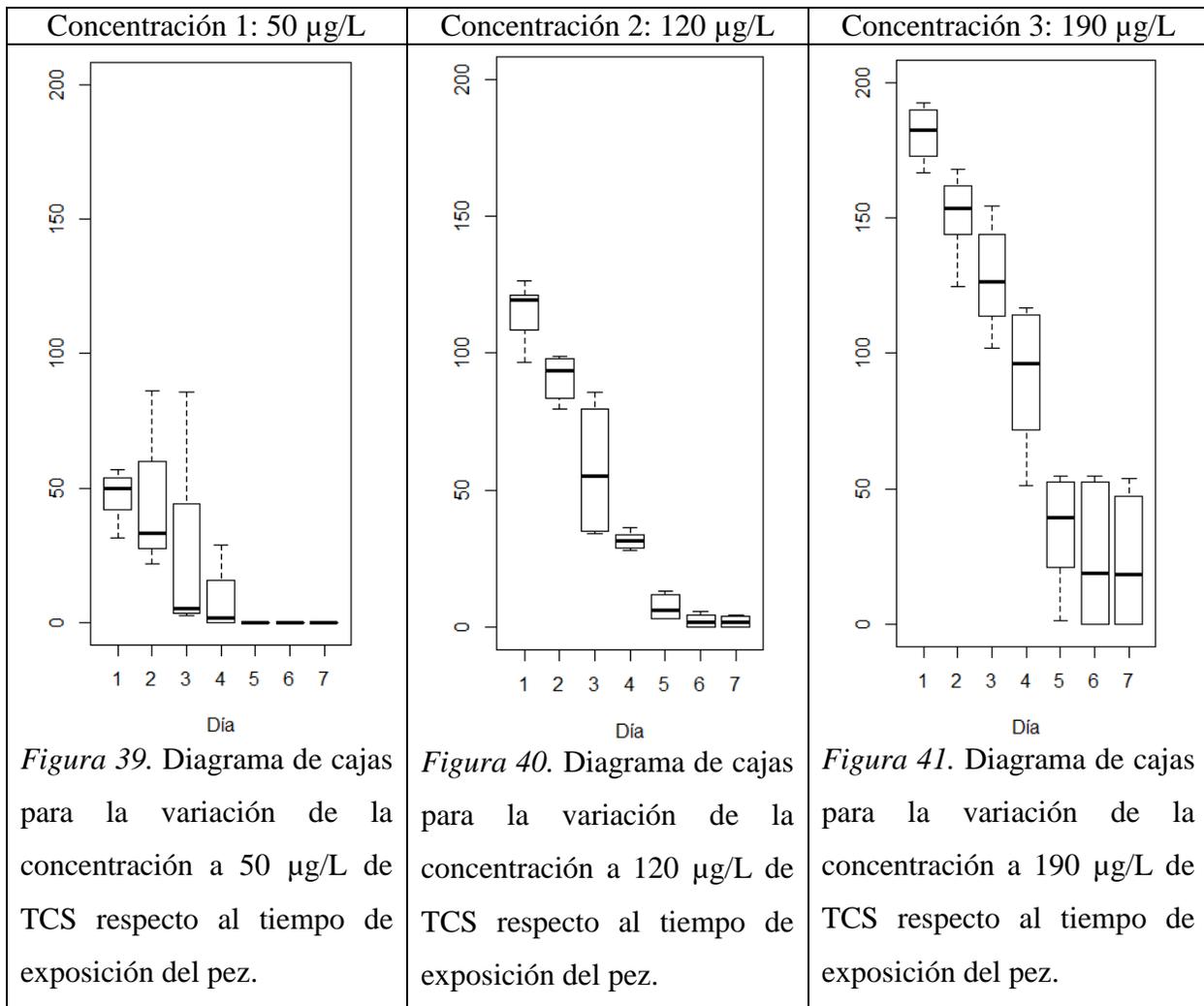
Factor	Verificación de las hipótesis
A:Alimento	Para este factor el $valor - p = 2 e - 16 < 0.05$ por lo que se rechaza H_0 y se acepta H_1 , luego, el efecto del alimento tiene influencia en el nivel de TCS evaluado.
B: Día	Para este factor el $valor - p = 2 e - 16 < 0.05$ por lo que se rechaza H_0 y se acepta H_1 , luego, el efecto del tiempo tiene influencia en el nivel de TCS.
C: Concentración (µg/l)	Para este factor el $valor - p = 2.36 e - 16 < 0.05$ por lo que se rechaza H_0 y se acepta H_1 , luego, el efecto de la concentración tiene influencia en la variación de nivel de TCS.
Interacción ABC: Alimento * Día * Concentración	Al evaluar esta interacción entre alimento, día y concentración el $valor - p = 1.54 e - 05 < 0.05$ por lo que se rechaza H_0 y se acepta H_1 , luego, el efecto de la interacción tiene influencia en el nivel de TCS evaluado.
AC: Alimento* Concentración	Al evaluar la interacción entre alimento y concentración el $valor - p = 2 e - 16 < 0.05$ por lo que se rechaza H_0 y se acepta H_1 , luego la interacción tiene influencia en el nivel de TCS evaluado.
BC: Día* Concentración	En la interacción entre el tiempo y concentración el $valor - p = 2 e - 16 < 0.05$ por lo que se rechaza H_0 y se acepta H_1 , luego la interacción entre tiempo y concentración tiene influencia en el nivel de TCS.
AB: Alimento * Día	Tenemos que para esta interacción de los factores alimento y tiempo el $valor - p = 2 e - 09 < 0.05$ por lo que se rechaza H_0 y se acepta H_1 , por lo tanto tiene influencia en el nivel de TCS evaluado.

5.1.5 Ensayo 5. Evaluación variabilidad de TCS en presencia de tilapia.

Algunos contaminantes emergentes causan efectos negativos en el comportamiento de los peces, disminuyendo su audacia, actividad y socialización (Brodin, Fick, Jonsson y Klaminder, 2013). De tal forma en los ensayos realizados cabe resaltar que en el primer día de exposición de los peces al primer tratamiento el comportamiento fue errático en el caso de los machos, debido a que los primeros días los peces se mantuvieron aislados y sin movimiento, sin embargo las hembras mantuvieron un comportamiento normal.

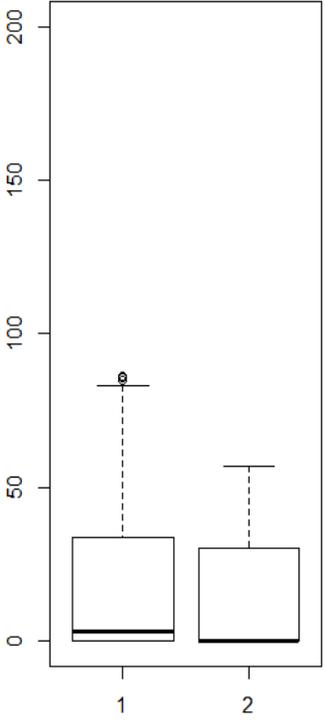
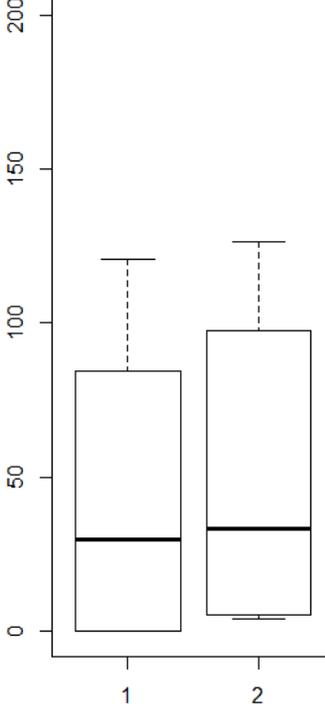
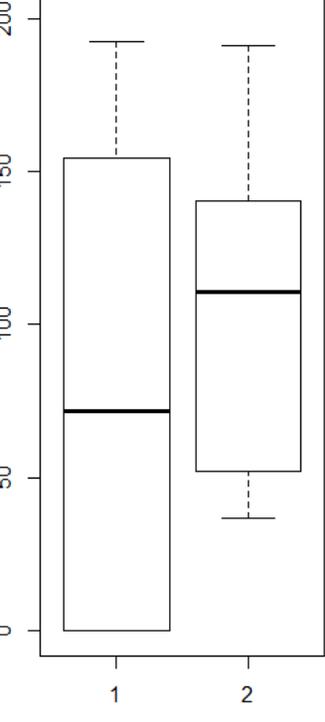
En este ensayo se buscó evaluar la absorción del contaminante por el pez a través del tiempo y teniendo en cuenta los factores evaluados en los ensayos anteriores que no interfieren con la concentración del contaminante. En las figuras 39, 40 y 41 se observa que el nivel de concentración de TCS es influenciado por la presencia de los peces a través del tiempo. Es así que para la concentración de 50 µg/L la detección del contaminante emergente en los días 5, 6 y 7 no son detectables por el cromatógrafo (figuras 39), así mismo en la concentración de 120 µg/L se observa el mismo comportamiento en los días 6 y 7 (Figura 40) y por último en la concentración de 190 µg/L se observa una disminución significativa del contaminante entre el día 2 al 5 y sigue disminuyendo al final del tratamiento. Esta reducción del contaminante en la matriz de agua se puede deber a la bioacumulación del contaminante en los peces ya que estudios realizados en éstos han cuantificado la presencia de TCS en el plasma de 0.61 – 10.4 ng/g (Valters, et al., 2005), en la bilis entre 14-80 µg/mL y respecto al peso total del pez entre 10-710 ng/g (Adolfsson – Erics, Pettersson, Parkkonen y Sturve 2002; Houtman, Van, Brouwer, Lamoree y Legler, 2004).

Así mismo en el análisis de la tabla ANOVA para este factor el valor $-p = 2 e - 16 < 0.05$ por lo que se rechaza H_0 y se acepta H_1 , luego, el efecto de la exposición del pez al contaminante tiene influencia en el nivel de TCS, así mismo el tiempo de exposición en los tratamientos tiene incidencia en la concentración de TCS con un valor $-p = 2 e - 16 < 0.05$



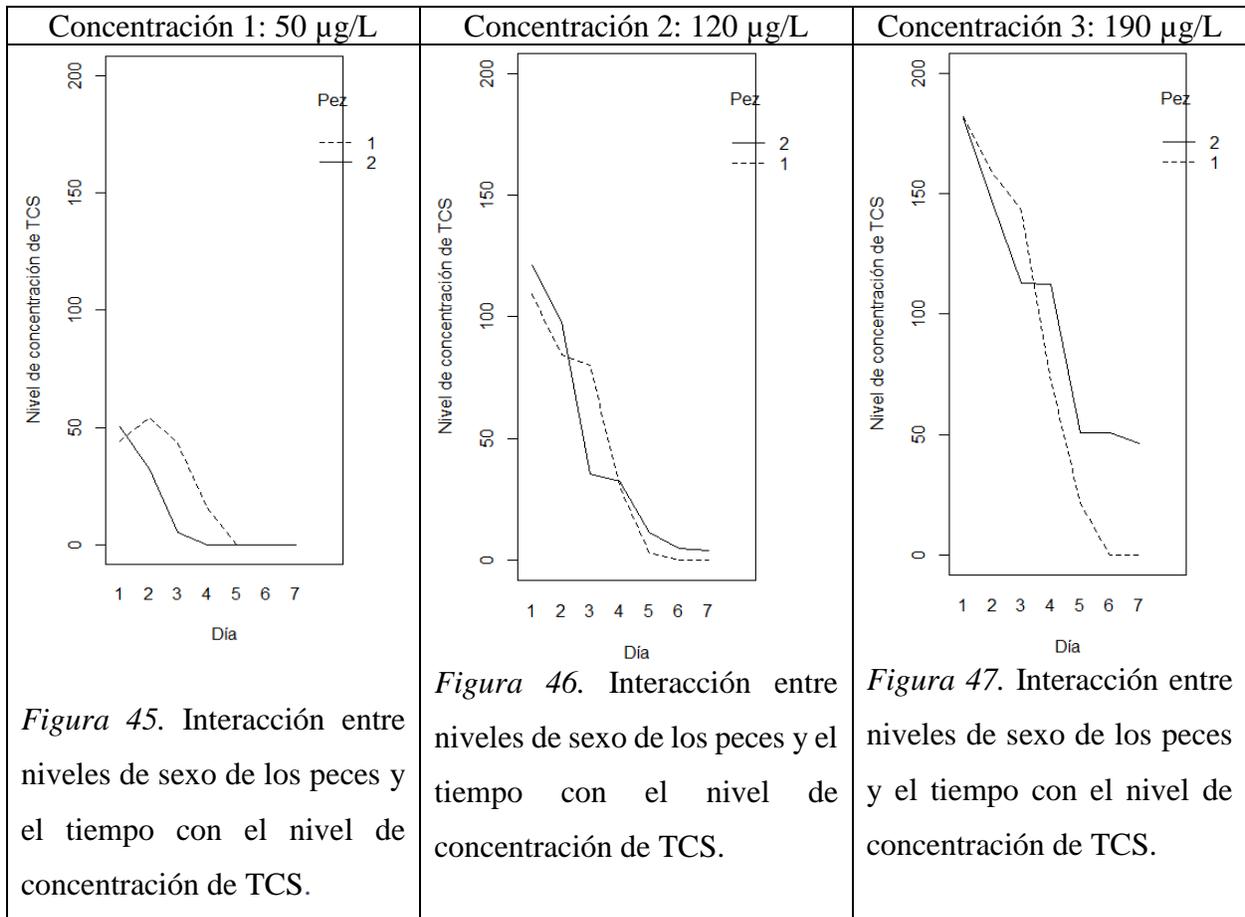
Con base en los resultados se realizó el diagrama de cajas para la variación de TCS a dos niveles dependiendo del sexo del pez, de tal forma el nivel 1 corresponde al macho y el nivel 2 a la hembra (Figuras 42, 43 y 44). En la exposición de los peces a la concentración de 50 µg/L y 120 µg/L se observa un comportamiento de asimilación similar del contaminante independientemente del sexo del pez (figura 42), sin embargo en la concentración de 190 µg/L el macho tiende a asimilar mejor la concentración que la hembra manteniendo unos niveles más bajos de concentración de TCS (figura 44) sin embargo la hembra también influye en la disminución de la concentración con el paso del tiempo, por lo tanto, los peces absorbieron el TCS, sin embargo, el

otro factor que podía disminuir la concentración del TCS era el alimento pero se descarta debido a que los peces ingirieron el alimento de inmediato sin dejar residuos.

Concentración 1: 50 µg/L	Concentración 2: 120 µg/L	Concentración 3: 190 µg/L
 <p style="text-align: center;">Sexo del pez</p>	 <p style="text-align: center;">Sexo del pez</p>	 <p style="text-align: center;">Sexo del pez</p>
<p><i>Figura 42.</i> Diagrama de cajas para la variación de concentración a 50 µg/L de TCS con cada nivel, 1(Macho) y 2 (Hembra).</p>	<p><i>Figura 43.</i> Diagrama de cajas para la variación de concentración a 120 µg/L de TCS con cada nivel, 1(Macho) y 2 (Hembra).</p>	<p><i>Figura 44.</i> Diagrama de cajas para la variación de concentración a 190 µg/L de TCS con cada nivel, 1(Macho) y 2 (Hembra).</p>

Por último se evalúa la posible interacción entre los niveles del factor sexo del pez y como se muestra en las figuras 45, 46 y 47 se presenta interacción entre machos y hembras los cuales inciden en la disminución de concentración de TCS en todos los tratamientos, esto se debe a su capacidad de bioacumulación del contaminante en las matrices biológica como se describió anteriormente.

Con estos ensayos realizados en peces teniendo en cuenta los resultados de los ensayos realizados con los otros factores con el fin de controlar las condiciones para que no afectara la concentración de TCS, se evidencia que los peces cuando son expuestos al contaminante asimilan la concentración del contaminante de la matriz de agua y del alimento que se le suministra dado que este también retiene el contaminante en la fase orgánica.



De tal forma teniendo en cuenta los resultados de los factores analizados en los ensayos preliminares se propone un diseño experimental con los factores que no incidieron en la variación de concentración de TCS y en las variables físico químicas que pudieran alterar la calidad del agua con el fin de no alterar los resultados en las variables respuesta analizadas en los gametos de los peces.

5.1.5.1 Análisis estadístico de la variación de TCS en presencia de tilapia.

Con el fin de evaluar la influencia de los factores y las posibles interacciones entre éstos en la variación de TCS en presencia de tilapia como se muestra en la tabla el análisis de varianza (tabla 22) para analizar la significancia de las fuentes de variación del modelo.

Tabla 21

ANOVA para la variable respuesta variabilidad de TCS en presencia de tilapia

Fuente de variabilidad	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F_0	valor - p
A: Pez	SS_A 13901	$a - 1$ 1	MS_A 13901	$\frac{MS_A}{MS_E}$ 89.716	2 e-16
B: Día	SS_B 34218 3	$b - 1$ 6	MS_B 57031	$\frac{MS_B}{MS_E}$ 368.06 7	2 e-16
C: Concentración	SS_C 22059 5	$c - 1$ 2	MS_C 11029 8	$\frac{MS_C}{MS_E}$ 711.84 4	2 e-16
AB: Pez* Día	SS_{AB} 10260	$(a - 1)(b - 1)$ 6	MS_{AB} 1710	$\frac{MS_{AB}}{MS_E}$ 11.036	1.52 e-10
AC: Pez* Concentración	SS_{AC} 16912	$(a - 1)(c - 1)$ 2	MS_{AC} 8456	$\frac{MS_{AC}}{MS_E}$ 54.574	2 e-16
BC: Día* Concentración	SS_{BC} 62926	$(b - 1)(c - 1)$ 12	MS_{BC} 5244	$\frac{MS_{BC}}{MS_E}$ 33.843	2 e-16
ABC: Pez* Día* Concentración	SS_{ABC} 9672	$(a - 1)(b - 1)(c - 1)$ 8	MS_{ABC} 1209	$\frac{MS_{ABC}}{MS_E}$ 7.803	4.82 e-09
Residuales	SS_r 29440	$abc(n - 1)$ 19 0	MS_r 155		
Total	SS_T 70588 9	$abcn - 1$ 22 7	19800 4		

De acuerdo al análisis obtenido de la tabla ANOVA se realizó la verificación de hipótesis de la variable variabilidad de TCS en presencia de tilapia muestra en la tabla 23.

Tabla 22

Verificación de hipótesis para la variable de concentración de TCS con la presencia de tilapia

Factor	Verificación de las hipótesis
A: Pez	Para este factor el $valor - p = 2 e - 16 < 0.05$ por lo que se rechaza H_0 y se acepta H_1 , luego, el efecto de la exposición del pez al contaminante tiene influencia en el nivel de TCS.
B: Día	Para este factor el $valor - p = 2 e - 16 < 0.05$ por lo que se rechaza H_0 y se acepta H_1 , luego, el efecto del tiempo tiene influencia en el nivel de TCS.
C: Concentración (µg/l)	Para este factor el $valor - p = 2 e - 16 < 0.05$ por lo que se rechaza H_0 y se acepta H_1 , luego, el efecto de la concentración tiene influencia en el nivel de TCS.
Interacción ABC: Pez * Día * Concentración	Al evaluar esta interacción entre pez, día y concentración el $valor - p = 4.82 e - 09 < 0.05$ por lo que se rechaza H_0 y se acepta H_1 , luego, el efecto de la interacción tiene influencia en el nivel de TCS.
AC: Pez* Concentración	Al evaluar esta interacción entre pez y concentración el $valor - p = 2 e - 16 < 0.05$ por lo que se rechaza H_0 y se acepta H_1 , luego, el efecto de la interacción tiene influencia en el nivel de TCS.
BC: Día* Concentración	Al evaluar esta interacción entre día y concentración el $valor - p = 2 e - 16 < 0.05$ por lo que se rechaza H_0 y se acepta H_1 , por lo tanto el efecto de la interacción tiene influencia en el nivel de TCS.
AB: Pez* Día	Tenemos que para esta interacción de los factores pez y tiempo $valor - p = 1.52 e - 10 < 0.05$ por lo que se rechaza H_0 y se acepta H_1 , por lo tanto el efecto de la interacción tiene influencia en el nivel de TCS.

5.2 Análisis de Motilidad en los espermatozoides de los peces Tilapia.

5.2.1 Análisis de Motilidad expuestos a TCS (50 µg/L).

Se realizó el análisis espermático en cada uno de los tratamientos propuestos a diferentes niveles de pH (7 y 9) y TCS (50 µg/L, 120 µg/L y 190 µg/L) en los días de exposición 1, 4 y 7. Las muestras se tomaron en cada uno de los tratamientos antes de que los peces fueran sometidos

al contaminante, durante la exposición a éste y al final de cada tratamiento. En el primer y séptimo tratamiento se expusieron por triplicado los peces a la concentración baja del contaminante emergente, 50 µg/L.

La motilidad espermática se determinó por el conteo de 200 espermatozoides por duplicado. Esta se ha considerado una de las variables más utilizadas para medir la calidad espermática (Moore y Akhondi, 1996) ya que esta le permitirá una exitosa fertilización del ovulo (Tabares, Tarazona, Olivera, 2005), además algunos autores sugieren que hay buena correlación entre motilidad y fertilidad (Lahnsteiner, 2000).

Como se puede observar en las tablas 24 y 25, la categoría más frecuente es motilidad progresiva para los dos tratamientos a diferentes niveles de pH, antes de ser expuestos al contaminante así como se ha observado porcentajes de motilidad alta en semen de bocachico de 76,8% sin exposición a ningún contaminante (Arroyo y Vergara, 2010).

Para el tratamiento 1, el promedio de motilidad progresiva es 95.6% con una diferencia con el promedio de la réplica de 0.5, lo cual es una diferencia aceptable. Por lo tanto se reportan los siguientes valores: PR (95.6%), NP (4.3%) y IM (0.1%) (Tabla 24).

Tabla 23

Evaluación PM, NP e IM en espermatozoides tratamiento 1 (medición 1), Concentración 50 µg/L de TCS, pH 7

200 espermatozoides			Replica 200 espermatozoides		
Promedio espermatozoides evaluados por triplicado.					
Motilidad Progresiva	Motilidad no progresiva	Inmotilidad	Motilidad Progresiva	Motilidad no progresiva	Inmotilidad
191,66	8,33	0	190,66	9	0,33
Porcentaje espermatozoides evaluados.					

95,80%	4,20%	0%	95,30%	4,50%	0,20%
Categoría más frecuente					
Motilidad Progresiva	Promedio Motilidad Progresiva	Diferencia entre promedios.	Rango aceptable de diferencia		
	95,6 %	0,5	5 %		
PR	NP	IM			
95,6 %	4,3 %	0,1 %			

Nota. PR (Motilidad Progresiva), NP (Motilidad no progresiva) e IM (Inmotilidad).

Para el tratamiento 7, el promedio de motilidad progresiva es 74.3% con una diferencia con el promedio de la réplica de 2.5%, lo cual es una diferencia aceptable. Por lo tanto, se reportan los siguientes valores: PR (74.3%), NP (3.16%) y IM (0.25%) (tabla 25). Así mismo se han realizado estudios que evalúan la calidad seminal del esperma de *Oreochromis spp.* donde se reportan porcentajes de motilidad superiores al 94% (Guerrero, Roa, Moreno, Taylor, León, Avalos, 2008)

La motilidad no progresiva e inmotilidad tienen un porcentaje poco representativo respecto al promedio de motilidad progresiva en los dos tratamientos, lo cual indica que la motilidad de los espermatozoides es aceptable para su reproducción, en los peces de bagre blanco se ha reportado un porcentaje de inmotilidad de 0.5 % en muestras frescas y de motilidad no progresiva 21.2 % para este individuo (Universidad CES. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia., Salas Villalva, Reza Gaviria, Espinosa Araujo, y Atencio-García, 2015).

Tabla 24

Evaluación PM, NP e IM en espermatozoides tratamiento 7 (medición 1), Concentración 50 µg/L de TCS, pH 9

200 espermatozoides			Replica 200 espermatozoides		
Promedio espermatozoides evaluados por triplicado.					
Motilidad Progresiva	Motilidad no progresiva	Inmotilidad	Motilidad Progresiva	Motilidad no progresiva	Inmotilidad
192,66	6,66	0,66	193,66	6	0,33

Porcentaje espermatozoides evaluados.					
73%	3,33%	0,33%	75,50%	3%	0,16%
Categoría más frecuente					
Motilidad Progresiva	Promedio Motilidad Progresiva	Diferencia entre promedios.	Rango aceptable de diferencia		
	74,3 %	2,5 %	9 %		
PR	NP	IM			
74,30%	3,16%	0,25%			

Nota. PR (Motilidad Progresiva), NP (Motilidad no progresiva) e IM (Inmotilidad).

Los peces se evaluaron al cuarto día de exposición al TCS a la concentración más baja, evidenciándose la disminución de los porcentajes en la motilidad progresiva y el aumento en las variables de motilidad no progresiva e inmotilidad, siendo la categoría más frecuente en los dos tratamientos la motilidad no progresiva.

En el tratamiento 1, el promedio de motilidad no progresiva es 53.62 % con una diferencia con el promedio de la réplica de 1.25%, lo cual es una diferencia aceptable. En consecuencia se reportan los siguientes valores: PR (44.1%), NP (53.6%) y IM (2.6%). Por lo tanto, la motilidad de espermatozoides disminuyó cuando el pez estuvo expuesto a dicha concentración a la mitad del tratamiento (Tabla 26). Así mismo se evidencia que cuando se evalúan biomarcadores endocrinos y reproductivos en ambientes contaminados estos factores influyen en la disminución de las variables gonadosomáticas a evaluar (Goodbred et al., 2015).

Tabla 25

Evaluación PM, NP e IM en espermatozoides, tratamiento 1 (medición 2), Concentración 50 µg/L de TCS, pH 7

200 espermatozoides	Replica 200 espermatozoides
Promedio espermatozoides evaluados por triplicado.	

Motilidad Progresiva	Motilidad no progresiva	Inmotilidad	Motilidad Progresiva	Motilidad no progresiva	Inmotilidad
87,5	108,5	5,5	89	106	5
Porcentaje espermatozoides evaluados.					
43,75%	54,25%	2,75%	44,50%	53%	2,50%
Categoría más frecuente.					
Motilidad No Progresiva	Promedio Motilidad No Progresiva	Diferencia entre promedios.	Rango aceptable de diferencia		
	53.62 %	1,25%	10%		
PR	NP	IM			
44,12%	53,62%	2,62%			

Nota. PR (Motilidad Progresiva), NP (Motilidad no progresiva) e IM (Inmotilidad).

Los resultados en el tratamiento 7 son acordes con el tratamiento 1 debido a que el porcentaje de los espermatozoides en la variable motilidad progresiva disminuyeron respecto a la primera medición en un 34% de tal forma se reporta PR (40.3%), NP (59.5%) y IM (0.25%) donde se evidencia que en el tratamiento 1 a pH 1 tiene un mayor porcentaje de disminución en la motilidad progresiva respecto al tratamiento 7 con pH 2 (Tabla 27).

Tabla 26

Evaluación PM, NP e IM en espermatozoides tratamiento 7 (medición 2), Concentración 50 µg/L de TCS, pH 9

200 espermatozoides			Replica 200 espermatozoides		
Promedio espermatozoides evaluados por triplicado.					
Motilidad Progresiva	Motilidad no progresiva	Inmotilidad	Motilidad Progresiva	Motilidad no progresiva	Inmotilidad
78,67	121	0,33	82,33	117	0,67
Porcentaje espermatozoides evaluados.					
39,30%	60,50%	0,20%	41,20%	58,50%	0,30%
Categoría más frecuente.					
Motilidad no Progresiva	Promedio Motilidad no Progresiva.	Diferencia entre promedios.	Rango aceptable de diferencia		

	59,5%	2%	9%
PR	NP	IM	
40,30%	59,50%	0,25%	

Nota. PR (Motilidad Progresiva), NP (Motilidad no progresiva) e IM (Inmotilidad).

Al finalizar los tratamientos se cuantificaron las mismas variables, las que mostraron disminución en el parámetro de motilidad y aumento en la motilidad no progresiva. Esta vez en el tratamiento 1, el promedio de motilidad no progresiva es 35.3% con una diferencia con el promedio de la réplica de 2.0%, lo cual es una diferencia aceptable, siendo PR (35.3%) disminuyendo 8.8% respecto a la segunda medición, por otra parte NP (64%) se incrementó un 5.9% y IM (0.8%) (Tabla 28).

Tabla 27

Evaluación PM, NP e IM en espermatozoides tratamiento 1 (medición 3), Concentración 50 µg/L de TCS, pH 7

200 espermatozoides			Replica 200 espermatozoides		
Promedio espermatozoides evaluados por triplicado.					
Motilidad Progresiva	Motilidad no progresiva	Inmotilidad	Motilidad Progresiva	Motilidad no progresiva	Inmotilidad
68	130	2	73	126	1
Porcentaje espermatozoides evaluados.					
34%	65%	1%	36,50%	63%	0,50%
Categoría más frecuente.					
Motilidad no Progresiva	Promedio Motilidad No Progresiva	Diferencia entre promedios.	Rango aceptable de diferencia		
	64%	2%	10%		
PR	NP	IM			
35,30%	64%	0,80%			

Nota. PR (Motilidad Progresiva), NP (Motilidad no progresiva) e IM (Inmotilidad).

En el tratamiento 7, la categoría más frecuente es motilidad no progresiva con un 66.92%, la cual sigue incrementándose desde la primera medición con una diferencia con la réplica de 2.50% donde la diferencia es aceptable para los resultados PR (33%) disminuyendo 7.3% respecto a la segunda medición, por otra parte NP (66.92%) se incrementó un 5.9% e IM (0.08%) (Tabla 29).

Se muestra la influencia de la variación del pH ya que a pH 9, la disminución en la motilidad es mayor en el tratamiento 1 respecto del 7.

Tabla 28

Evaluación PM, NP e IM en espermatozoides tratamiento 7 (medición 3), Concentración 50 µg/L de TCS, pH 9

200 espermatozoides			Réplica 200 espermatozoides		
Promedio espermatozoides evaluados por triplicado.					
Motilidad Progresiva	Motilidad no progresiva	Inmotilidad	Motilidad Progresiva	Motilidad no progresiva	Inmotilidad
68,33	131,33	0,33	63,67	136,33	0
Porcentaje espermatozoides evaluados.					
34,17%	65,67%	0,17%	31,83%	68,17%	0%
Categoría más frecuente.					
Motilidad No Progresiva	Promedio Motilidad No Progresiva	Diferencia entre promedios.	Rango aceptable de diferencia		
	66,92%	2,50%	9%		
PR	NP	IM			
33%	66,92%	0,08%			

Nota. PR (Motilidad Progresiva), NP (Motilidad no progresiva) e IM (Inmotilidad).

5.2.2 Análisis de Motilidad expuestos a TCS (120 µg/L).

Al inicio del tratamiento 2 se obtuvieron los siguientes resultados que se relacionan en la tabla 30, PR (85.42%), NP (10.08%) y IM (4.50%), de tal forma se podría contrastar con la motilidad evaluada para bagre blanco ya que se reportan porcentajes superiores al 90% (Universidad CES. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia., Salas Villalva, et al., 2015).

Tabla 29

Evaluación PM, NP e IM en espermatozoides, tratamiento 2 (medición 1), Concentración 120 µg/L de TCS, pH 7

200 espermatozoides			Replica 200 espermatozoides		
Promedio espermatozoides evaluados por triplicado.					
Motilidad Progresiva	Motilidad no progresiva	Inmotilidad	Motilidad Progresiva	Motilidad no progresiva	Inmotilidad
170,33	21,33	8,33	171,33	19	9,67
Porcentaje espermatozoides evaluados.					
85,17%	10,67%	4,17%	85,67%	9,50%	4,83%
Categoría más frecuente.					
Motilidad Progresiva	Promedio Motilidad Progresiva	Diferencia entre promedios.	Rango aceptable de diferencia		
	85,42%	0,50%	7%		
PR	NP	IM			
85,42%	10,08%	4,50%			

Nota. PR (Motilidad Progresiva), NP (Motilidad no progresiva) e IM (Inmotilidad).

Al igual que en tratamiento 2, en el 8 se encuentran buenos resultados como se observa en la tabla 31 respecto a la motilidad evaluada en los espermatozoides reportando PR (98.75 %), NP (1.25 %) y IM (0.00 %). En contraste con los resultados reportados en el semen de *Pseudoplatystoma metaense* presentó una movilidad mayor al 90%, con el menor valor de movilidad progresiva lineal rápida (34.9±9.0%) y en general valores de espermatozoides inmóviles menores al 10% (Universidad de Cordoba (Colombia). Facultad de Medicina veterinaria y zootecnia., Medina – Robles, et al., 2011).

Tabla 30

Evaluación PM, NP e IM en espermatozoides, tratamiento 8 (medición 1), Concentración 120 µg/L de TCS, pH 9

200 espermatozoides			Replica 200 espermatozoides		
Promedio espermatozoides evaluados por triplicado.					
Motilidad Progresiva	Motilidad no progresiva	Inmotilidad	Motilidad Progresiva	Motilidad no progresiva	Inmotilidad
197,67	2,33	0	197,33	2,67	0
Porcentaje espermatozoides evaluados.					
98,83%	1,17%	0%	98,67%	1,33%	0%
Categoría más frecuente.					
Motilidad Progresiva	Promedio Motilidad Progresiva	Diferencia entre promedios.	Rango aceptable de diferencia		
	98.75 %	0,16%	3%		
PR	NP	IM			
98,75 %	1,25%	0%			

Nota. PR (Motilidad Progresiva), NP (Motilidad no progresiva) e IM (Inmotilidad).

Por otra parte al comparar las cargas corporales de contaminantes en peces analizando 252 sustancias químicas se demuestra que estos influyen en la motilidad espermática (Goodbred et al., 2015). De tal forma, en la segunda medición se encontró una diferencia significativa entre el tratamiento 2 y 8, ya que en el tratamiento 2 la motilidad progresiva aunque se redujo 10.92% sigue siendo el grupo que predomina, de esta forma como se aprecia en la tabla 32 se reporta PR (72.42%), NP (23.67%) y IM (2.92%).

Tabla 31

Evaluación PM, NP e IM en espermatozoides tratamiento 2 (medición 2), Concentración 120 µg/L de TCS, pH 7

200 espermatozoides			Réplica 200 espermatozoides		
Promedio espermatozoides evaluados por triplicado.					

Motilidad Progresiva	Motilidad no progresiva	Inmotilidad	Motilidad Progresiva	Motilidad no progresiva	Inmotilidad
149	46	5	140,67	48,67	6,67
Porcentaje espermatozoides evaluados.					
74,50%	23%	2,50%	70,33%	24,33%	3,33%
Categoría más frecuente.					
Motilidad Progresiva	Promedio Motilidad Progresiva	Diferencia entre promedios.	Rango aceptable de diferencia		
	72,42%	4,17%	9%		
PR	NP	IM			
72,42%	23,67%	2,92%			

Nota. PR (Motilidad Progresiva), NP (Motilidad no progresiva) e IM (Inmotilidad).

Por otra parte en el tratamiento 8 se reporta una disminución en la motilidad progresiva en un 69%, siendo los resultados de motilidad: PR (29.75%), NP (1.25%) y IM (0%) que se observan en la tabla 33. Se comprueba que en el tratamiento 2 con la concentración con la concentración de 120 µg/L y a una exposición de pH 7, la incidencia disruptiva es inferior, en comparación con el tratamiento 8 de pH 9, sin embargo, en ambos tratamientos disminuyó la motilidad progresiva y aumentó la motilidad no progresiva e inmotilidad lo cual sugiere que ambos tratamientos tienen afectación.

Tabla 32

Evaluación PM, NP e IM en espermatozoides, tratamiento 8 (medición 2), Concentración 120 µg/L de TCS, pH 9

200 espermatozoides			Réplica 200 espermatozoides		
Promedio espermatozoides evaluados por triplicado.					
Motilidad Progresiva	Motilidad no progresiva	Inmotilidad	Motilidad Progresiva	Motilidad no progresiva	Inmotilidad
60,67	136	3,33	58,33	137	4,67
Porcentaje espermatozoides evaluados.					
30,30%	68%	1,70%	29,20%	68,50%	2,30%
Categoría más frecuente.					

Motilidad no Progresiva	Promedio Motilidad no Progresiva	Diferencia entre promedios.	Rango aceptable de diferencia
	68,30%	0,50%	9%
PR	NP	IM	
29,75%	68,25%	2%	

Nota. PR (Motilidad Progresiva), NP (Motilidad no progresiva) e IM (Inmotilidad).

En las ultimas muestras de los tratamientos 2 y 8, se evidencia la disminución de motilidad progresiva un poco superior a la segunda medición en la concentración con la concentración de 120 µg/L del tratamiento 2, lo cual es debido a que los peces al inicio de los tratamientos tienden a tener movimientos lentos y pausados evitando el gasto de energía lo que se puede reflejar en los resultados, ya que al pasar los días, el pez empieza a nadar normalmente y termina adaptándose al medio en el que se encuentra. Por lo tanto, la motilidad progresiva disminuyó un 42.67% respecto a la segunda medición en el tratamiento 2, donde se reporta PR (67.75%), NP (31%) y IM (1.13%) como se observa en la tabla 34.

Tabla 33

Evaluación PM, NP e IM en espermatozoides, tratamiento 2 (medición 3), Concentración 120 µg/L de TCS, pH 7

200 espermatozoides			Réplica 200 espermatozoides		
Promedio espermatozoides evaluados por triplicado.					
Motilidad Progresiva	Motilidad no progresiva	Inmotilidad	Motilidad Progresiva	Motilidad no progresiva	Inmotilidad
133,5	67	1,5	137,5	57	3
Porcentaje espermatozoides evaluados.					
66,75%	33,50%	0,75%	68,75%	28,50%	1,50%
Categoría más frecuente.					
Motilidad Progresiva	Promedio Motilidad Progresiva	Diferencia entre promedios.	Rango aceptable de diferencia		
	67,75%	2%	9%		
PR	NP	IM			

67,75%	31%	1,13%
--------	-----	-------

Nota. PR (Motilidad Progresiva), NP (Motilidad no progresiva) e IM (Inmotilidad).

En el tratamiento 8, en comparación con el tratamiento 2, la motilidad progresiva aumentó 0.75%, en la motilidad no progresiva disminuyó 3.17% y el parámetro de inmotilidad aumentó 2.42%. Sin embargo, el grupo más frecuente sigue siendo la motilidad no progresiva al igual que en la segunda medición, como se muestra en la tabla 35 y el promedio tiene una diferencia aceptable. Los resultados que se reportan son: PR (30.50%), NP (65.08%) y IM (4.42%).

Tabla 34

Evaluación PM, NP e IM en espermatozoides, tratamiento 8 (medición 3), Concentración 120 µg/L de TCS, pH 9

Original 200 espermatozoides			Replica 200 espermatozoides		
Promedio espermatozoides evaluados por triplicado.					
Motilidad Progresiva	Motilidad no progresiva	Inmotilidad	Motilidad Progresiva	Motilidad no progresiva	Inmotilidad
65,33	126	8,67	56,67	134,33	9
Porcentaje espermatozoides evaluados.					
32,70%	63%	4,30%	28,30%	67,20%	4,50%
Categoría más frecuente.					
Motilidad no Progresiva	Promedio Motilidad no Progresiva	Diferencia entre promedios.	Rango aceptable de diferencia		
	65,10%	4,20%	10%		
PR	NP	IM			
30,50%	65,08%	4,42%			

Nota. PR (Motilidad Progresiva), NP (Motilidad no progresiva) e IM (Inmotilidad).

5.2.3 Análisis de Motilidad expuestos a TCS (190 µg/L).

Por último, se evaluó la motilidad con 190 µg/L en los 2 niveles de pH, en el que los tratamientos 3 y 9 se evaluaron los peces sin estar sometidos al contaminante. Para el tratamiento 3 se obtuvo los siguientes resultados: PR (76.83%), NP (14.42%) y IM (8.75%) (Tabla 36).

Tabla 35

Evaluación PM, NP e IM en espermatozoides, tratamiento 3 (medición 1), Concentración 190 µg/L de TCS, pH 7

200 espermatozoides			Réplica 200 espermatozoides		
Promedio espermatozoides evaluados por triplicado.					
Motilidad Progresiva	Motilidad no progresiva	Inmotilidad	Motilidad Progresiva	Motilidad no progresiva	Inmotilidad
151	28,33	20,67	156,33	29,33	14,33
Porcentaje espermatozoides evaluados.					
75,50%	14,17%	10,33%	78,17%	14,67%	7,17%
Categoría más frecuente.					
Motilidad Progresiva	Promedio Motilidad Progresiva	Diferencia entre promedios.	Rango aceptable de diferencia		
	76,83%	2,67%	8%		
PR	NP	IM			
76,83%	14,42%	8,75%			

Nota. PR (Motilidad Progresiva), NP (Motilidad no progresiva) e IM (Inmotilidad).

Los resultados de la motilidad en el tratamiento 9 a una exposición de la concentración más alta y pH 9 fueron: PR (96.33%), NP (3.50%) y IM (6.0%), donde el grupo que predomina es la motilidad progresiva para ambos tratamientos (Tabla 37).

Tabla 36

Evaluación PM, NP e IM en espermatozoides tratamiento 9 (medición 1), Concentración 190 µg/L de TCS, pH 9

200 espermatozoides	Réplica 200 espermatozoides
---------------------	-----------------------------

Promedio espermatozoides evaluados por triplicado.					
Motilidad Progresiva	Motilidad no progresiva	Inmotilidad	Motilidad Progresiva	Motilidad no progresiva	Inmotilidad
192,33	7	0,67	193	7	0
Porcentaje espermatozoides evaluados.					
96,17%	3,50%	0,33%	96,50%	3,50%	0%
Categoría más frecuente.					
Motilidad Progresiva	Promedio Motilidad Progresiva	Diferencia entre promedios.	Rango aceptable de diferencia		
	3,50%	0%	6%		
PR	NP	IM			
96,33%	3,50%	0,17%			

Nota. PR (Motilidad Progresiva), NP (Motilidad no progresiva) e IM (Inmotilidad).

Con base en los anteriores resultados comparándolos con los de bagre rayado *Pseudoplatystoma sp* presenta una movilidad mayor al 90% presente en toda la estación reproductiva (Universidad de Córdoba (Colombia). Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia., Medina-Robles, y Cruz-Casallas, 2011).

Cuando se realiza la segunda medición en la concentración 3 para el tratamiento 3 se encuentra que se reduce el porcentaje de la motilidad progresiva en 13.45% y aumentando la motilidad no progresiva e inmotilidad (Tabla 38). De tal forma, se ha demostrado que a concentraciones más altas de contaminantes como PCBS, DDTs, PBDEs galaxolide y methyl triclosán encontrados en las Vegas inciden en el conteo de espermatozoides fue inferior en casi el 50% (Goodbred et al., 2015). En la tabla 38 se obtuvo como resultado: PR (63.38%), NP (26.75%) e IM (9.63%).

Tabla 37

Evaluación PM, NP e IM en espermatozoides, tratamiento 3 (medición 2), Concentración 190 µg/L de TCS, pH 7

200 espermatozoides	Replica 200 espermatozoides
Promedio espermatozoides evaluados por triplicado.	

Motilidad Progresiva	Motilidad no progresiva	Inmotilidad	Motilidad Progresiva	Motilidad no progresiva	Inmotilidad
128,5	52	18,5	125	55	20
Porcentaje espermatozoides evaluados.					
64,25%	26%	9,25%	62,50%	27,50%	10%
Categoría más frecuente.					
Motilidad Progresiva	Promedio Motilidad Progresiva	Diferencia entre promedios.	Rango aceptable de diferencia		
	63,38 %	1,75 %	5 %		
PR	NP	IM			
63,38 %	26,75 %	9,63 %			

Nota. PR (Motilidad Progresiva), NP (Motilidad no progresiva) e IM (Inmotilidad).

En contraste con el tratamiento 9, la motilidad progresiva se redujo significativamente en un 72.75%, en el parámetro de la motilidad no progresiva aumentó 70.5%, por lo tanto, se reportan los siguientes resultados PR (23.58%), NP (74%) e IM (2.42%) (Tabla 39), teniendo en cuenta que hay una diferencia aceptable del promedio de la variable más frecuente, en este caso motilidad no progresiva.

Tabla 38

Evaluación PM, NP e IM en espermatozoides, tratamiento 9 (medición 2), Concentración 190 µg/L de TCS, pH 9

200 espermatozoides			Replica 200 espermatozoides		
Promedio espermatozoides evaluados por triplicado.					
Motilidad Progresiva	Motilidad no progresiva	Inmotilidad	Motilidad Progresiva	Motilidad no progresiva	Inmotilidad
46	149,67	4,33	48,33	146,33	5,33
Porcentaje espermatozoides evaluados.					
23%	74,83%	2,17%	24,17%	73,17%	2,67%
Categoría más frecuente.					
Motilidad no Progresiva	Promedio Motilidad no Progresiva	Diferencia entre promedios.	Rango aceptable de diferencia		

	74%	1,67%	6%
PR	NP	IM	
23,58%	74%	2,42%	

Nota. PR (Motilidad Progresiva), NP (Motilidad no progresiva) e IM (Inmotilidad).

Por último, cuando se realizó la última medición a 190 µg/L, en la cual el parámetro de motilidad progresiva se incrementó un 3.5%, sin embargo, la motilidad no progresiva aumentó en un 5.75% en comparación con la segunda medición. Con base en estos resultados se obtuvieron los siguientes resultados del tratamiento 3: PR (66.88%), NP (32.50%) e IM (0.63%) (Tabla 40).

Tabla 39

Evaluación PM, NP e IM en espermatozoides, tratamiento 3 (medición 3), Concentración 190 µg/L de TCS, pH 7

200 espermatozoides			Replica 200 espermatozoides		
Promedio espermatozoides evaluados por triplicado.					
Motilidad Progresiva	Motilidad no progresiva	Inmotilidad	Motilidad Progresiva	Motilidad no progresiva	Inmotilidad
143,5	55	1,5	124	75	1
Porcentaje espermatozoides evaluados.					
71,75%	27,50%	0,75%	62%	37,50%	0,50%
Categoría más frecuente.					
Motilidad Progresiva	Promedio Motilidad Progresiva	Diferencia entre promedios.	Rango aceptable de diferencia		
	66,88%	9,75%	5%		
PR	NP	IM			
66,88%	32,50%	0,63%			

Nota. PR (Motilidad Progresiva), NP (Motilidad no progresiva) e IM (Inmotilidad).

Por otra parte, en el tratamiento 9 se obtuvo en los diferentes parámetros: PR (25.17%), NP (73.83%) e IM (1%) donde los resultados no difieren mucho de los obtenidos en la segunda

medición (Tabla 41), sin embargo se evidencia que la concentración de cargas de contaminantes en los individuos como los peces además de reducir niveles de ketotestosterona, sugiere que la condición reproductiva masculina es influenciada por la exposición a los contaminantes emergentes (Goodbred et al., 2015).

Tabla 40

Evaluación PM, NP e IM en espermatozoides tratamiento 9 (medición 3), Concentración 190 µg/L de TCS, pH 9

200 espermatozoides			Réplica 200 espermatozoides		
Promedio espermatozoides evaluados por triplicado.					
Motilidad Progresiva	Motilidad no progresiva	Inmotilidad	Motilidad Progresiva	Motilidad no progresiva	Inmotilidad
51,67	145,67	2,67	49	149,67	1,33
Porcentaje espermatozoides evaluados.					
25,83%	72,83%	1,33%	24,50%	74,83%	0,67%
Categoría más frecuente.					
Motilidad no Progresiva	Promedio Motilidad no Progresiva	Diferencia entre promedios.	Rango aceptable de diferencia		
	73,83%	2%	6%		
PR	NP	IM			
25,17%	73,83%	1%			

Nota. PR (Motilidad Progresiva), NP (Motilidad no progresiva) e IM (Inmotilidad).

5.2.4 Análisis de motilidad progresiva (PR).

De tal forma al comparar la motilidad progresiva en los diferentes tratamientos (Figura 48), se aprecia que la PR en la primera medición para todos los tratamientos es alta respecto a las mediciones posteriores, a pesar de que cada organismo tiene unas características específicas de acuerdo a sus funciones metabólicas y a que la adaptación a los factores fisicoquímicos en el que habita son diferentes.

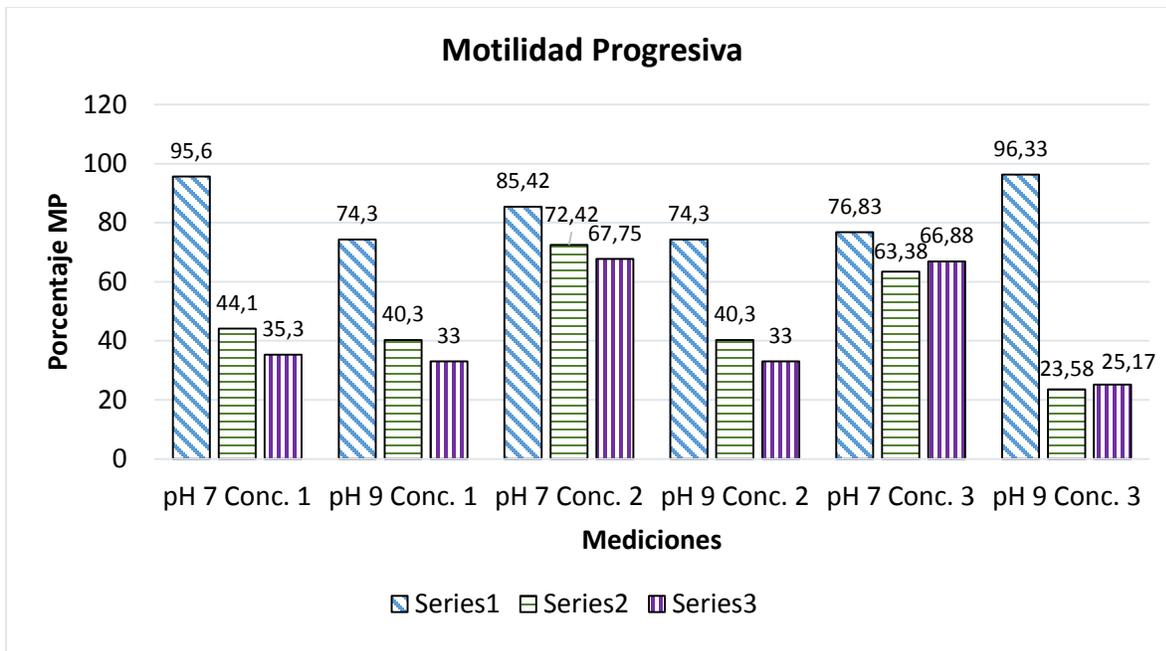


Figura 48. Motilidad progresiva a las diferentes concentraciones de TCS y niveles de pH.

En la concentración 1, los tratamientos a pH 9 y pH 7, en la segunda medición, la motilidad progresiva disminuyó significativamente respecto a la medición 1 que se realizó sin la exposición al TCS, así mismo en la tercera medición, la PR siguió en la tendencia a la disminución del porcentaje de PR, por lo tanto, se presenta un proceso disruptivo en los dos tratamientos con la concentración más baja de TCS.

En los tratamientos expuestos a la concentración 2 se observa una disminución gradual en la PR con el paso de los días de exposición al contaminante emergente, aunque la disminución de PR en el tratamiento con pH 7 es inferior entre la medición 1 y 2 respecto al tratamiento con pH 9 a esta concentración, sin embargo, al comparar estos resultados con los otros tratamientos a diferentes concentraciones se comprueba que los tratamientos a pH 9 tienen una mayor incidencia de interrupción en la motilidad progresiva respecto a los peces que se encontraban a pH 7.

De acuerdo a la figura 48 se puede apreciar que la motilidad progresiva en la medición 1 de la concentración 3 es mayor en el tratamiento a pH 9 respecto a la medición que se realiza en el tratamiento a pH 7, siendo en la segunda medición afectada significativamente la motilidad progresiva para ambos tratamientos, pero a pH 9 fue más sensible la interrupción. En la tercera medición, el porcentaje de motilidad se incrementó un poco en ambos tratamientos, sin embargo, el porcentaje en ambos casos no es representativo para la viabilidad de reproducción.

5.2.5 Análisis estadístico de la motilidad progresiva.

Con el fin de evaluar la influencia de los factores y las posibles interacciones entre éstos en la motilidad progresiva se realizó la tabla de análisis de varianza (tabla 42) para analizar la significancia de las fuentes de variación del modelo.

Tabla 41

ANOVA para la variable respuesta Motilidad progresiva

Fuente de variabilidad	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F_0	valor - p
A: Día	SS_A 36141	$a - 1$ 2	MS_A 18070	$\frac{MS_A}{MS_E}$ 43.298	2.64 e-10
B: Concentración	SS_B 1068	$b - 1$ 2	MS_B 534	$\frac{MS_B}{MS_E}$ 1.280	0.291
C: pH	SS_C 300	$c - 1$ 1	MS_C 300	$\frac{MS_C}{MS_E}$ 0.719	0.402
AB: Día* Concentración	SS_{AB} 769	$(a - 1)(b - 1)$ 4	MS_{AB} 192	$\frac{MS_{AB}}{MS_E}$ 0.461	0.764
AC: Día* pH	SS_{AC} 1424	$(a - 1)(c - 1)$ 2	MS_{AC} 712	$\frac{MS_{AC}}{MS_E}$ 1.706	0.196
BC: Concentración* pH	SS_{BC} 1294	$(b - 1)(c - 1)$ 2	MS_{BC} 647	$\frac{MS_{BC}}{MS_E}$ 1.550	0.226

ABC: Día* Concentración* pH	SS_{ABC}	3318	$(a - 1)(b - 1)(c - 1)$	4	MS_{ABC}	830	MS_{ABC} / MS_E	1.988	0.117
Residuales	SS_r	15025	$abc(n - 1)$	36	MS_r	417			
Total	SS_T	59339	$abcn - 1$	53					

De acuerdo al análisis obtenido de la tabla ANOVA se realizó la verificación de hipótesis de la variable motilidad como se muestra en la tabla 43.

Tabla 42

Verificación de hipótesis para la variable motilidad

Factor	Verificación de las hipótesis
A:Día	Para este factor el $valor - p = 2.64 e - 10 < 0.05$ por lo que se rechaza H_0 y se acepta H_1 , luego el efecto del tiempo tiene influencia en el factor de motilidad progresiva evaluado en los espermatozoides.
B:Concentración (µg/l)	Tenemos que para este factor el $valor - p = 0.291 > 0.05$ por lo que se rechaza H_1 y se acepta H_0 , luego el efecto de la concentración no tiene influencia en la variable motilidad progresiva de los espermatozoides.
C: pH	En este factor el $valor - p = 0.402 > 0.05$ por lo que se rechaza H_1 y se acepta H_0 , luego el pH no tiene influencia en la variable motilidad progresiva de los espermatozoides.
Interacción ABC: Día * Concentración* pH	Para esta interacción el $valor - p = 0.117 > 0.05$ por lo que se rechaza H_1 y se acepta H_0 , luego el efecto entre los factores día, concentración y pH no tiene influencia en la variable motilidad progresiva de los espermatozoides.
AC: Día* pH	Para la interacción entre el día y el pH el $valor - p = 0.196 > 0.05$ por lo que se rechaza H_1 y se acepta H_0 , por lo tanto la interacción entre los factores día y pH no tiene influencia en la variable motilidad progresiva de los espermatozoides.
BC: Concentración* pH	Para la interacción concentración y pH el $valor - p = 0.226 > 0.05$ por lo que se rechaza H_1 y se acepta H_0 , luego, el efecto del pH no tiene influencia en la variable motilidad progresiva de los espermatozoides.

AB: Día* Concentración

Para la interacción concentración y día el *valor - p* = 0.764 > 0.05 por lo que se rechaza H_1 y se acepta H_0 , luego, el efecto de la interacción entre la concentración y el pH no tiene influencia en la variable motilidad progresiva de los espermatozoides.

5.2.6 Análisis de la Motilidad no progresiva (NP).

Por otra parte se analizó el parámetro de la motilidad no progresiva (Figura 49), en la que en la primera medición para todos los tratamientos fue inferior el porcentaje en contraste con las mediciones posteriores a cualquier concentración de TCS. En el análisis de la segunda medición, los tratamientos expuestos a un pH 9 tienen un porcentaje mayor de motilidad no progresiva mayor que en los tratamientos expuestos al pH 7 lo que coincide con los resultados obtenidos en el análisis de la variable de motilidad progresiva.

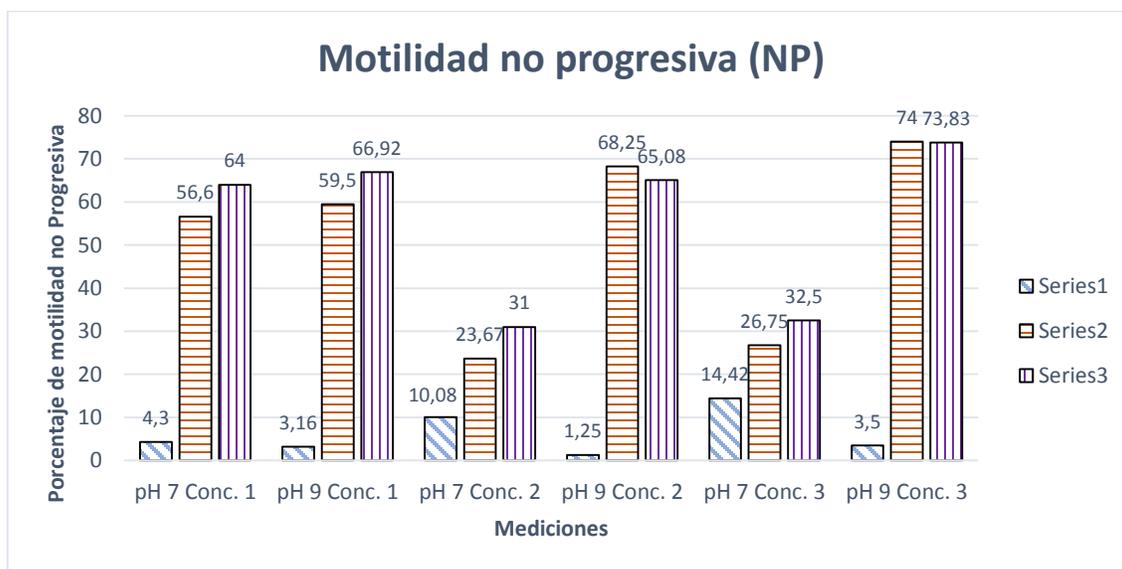


Figura 49. Motilidad no progresiva a diferentes concentraciones y niveles de pH.

Por último, el porcentaje de motilidad no progresiva en la última medición aumentó para todos los tratamientos excepto para las concentraciones 2 y 3 a pH 9, sin embargo, la diferencia con la segunda medición no es significativa.

5.2.7 Análisis estadístico de la motilidad no progresiva.

Con el fin de evaluar la influencia de los factores y las posibles interacciones entre éstos en la motilidad no progresiva se realizó la tabla de análisis de varianza para cada uno de los factores como se observa en la tabla 44.

Tabla 43

ANOVA para la variable respuesta Motilidad no progresiva

Fuente de variabilidad	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F_0	valor - p
A: Día	SS_A 18824	$a - 1$ 2	MS_A 9412	$\frac{MS_A}{MS_E}$ 35.064	3.54 e-09
B: Concentración	SS_B 79	$b - 1$ 2	MS_B 39	$\frac{MS_B}{MS_E}$ 0.146	0.864
C: pH	SS_C 10070	$c - 1$ 1	MS_C 10070	$\frac{MS_C}{MS_E}$ 37.515	4.73 e-07
AB: Día* Concentración	SS_{AB} 93	$(a - 1)(b - 1)$ 4	MS_{AB} 23	$\frac{MS_{AB}}{MS_E}$ 0.087	0.986
AC: Día* pH	SS_{AC} 8012	$(a - 1)(c - 1)$ 2	MS_{AC} 4006	$\frac{MS_{AC}}{MS_E}$ 14.924	1.90 e-05
BC: Concentración* pH	SS_{BC} 217	$(b - 1)(c - 1)$ 2	MS_{BC} 109	$\frac{MS_{BC}}{MS_E}$ 0.404	0.670
ABC: Día* Concentración* pH	SS_{ABC} 724	$(a - 1)(b - 1)(c - 1)$ 4	MS_{ABC} 181	$\frac{MS_{ABC}}{MS_E}$ 0.674	0.614
Residuales	SS_r 9663	$abc(n - 1)$ 36	MS_r 268		

Total	SS_T	47603	$\frac{abcn}{-1}$	53
--------------	--------	-------	-------------------	----

De acuerdo al análisis obtenido de la tabla ANOVA se realizó la verificación de hipótesis de la variable motilidad como se muestra en la tabla 45.

Tabla 44

Verificación de hipótesis para la variable motilidad no progresiva

Factor	Verificación de las hipótesis
A:Día	Tenemos que para este factor el $valor - p = 3.54 e - 09 < 0.05$ por lo que se rechaza H_0 y se acepta H_1 , luego, el efecto del tiempo tiene influencia en la variable de motilidad no progresiva evaluado en los espermatozoides.
B:Concentración (µg/l)	Tenemos que para este factor el $valor - p = 0.864 > 0.05$ por lo que se rechaza H_1 y se acepta H_0 , luego el efecto de la concentración no tiene influencia en la variable motilidad no progresiva de los espermatozoides.
C: pH	Tenemos que para este factor el $valor - p = 4.73 e - 07 < 0.05$ por lo que se rechaza H_0 y se acepta H_1 , por lo tanto el efecto del pH tiene influencia en la variable evaluada de motilidad no progresiva en espermatozoides.
Interacción ABC: Día * Concentración* pH	Al evaluar esta interacción entre día, concentración y pH el $valor - p = 0.614 > 0.05$ por lo que se rechaza H_1 y se acepta H_0 , luego, el efecto de la interacción evaluada no tiene influencia en la variable evaluada de motilidad no progresiva en espermatozoides.
AC: Día* pH	Tenemos que para este factor el $valor - p = 1.90 e - 05 < 0.05$ por lo que se rechaza H_0 y se acepta H_1 , luego, el efecto de la interacción entre día y pH tiene influencia en la variable motilidad no progresiva evaluada en espermatozoides.
BC: Concentración* pH	Tenemos que para este factor el $valor - p = 0.670 > 0.05$ por lo que se rechaza H_1 y se acepta H_0 , luego el efecto de la interacción entre concentración y pH no tiene influencia en la variable motilidad no progresiva de los espermatozoides.
AB: Día* Concentración	Tenemos que para esta interacción de los factores el $valor - p = 0.986 > 0.05$ por lo que se rechaza H_1 y se acepta H_0 , luego el efecto de la interacción entre concentración y tiempo no tiene influencia en la variable motilidad no progresiva de los espermatozoides.

5.2.8 Análisis de la Inmotilidad (IN).

Por ultimo en la Figura 50 se presenta el análisis de IM con las diferentes concentraciones de TCS a diferentes niveles de pH, observándose que no presenta un patrón generalizado para los diferentes tratamientos, no obstante se relacionan respecto al incremento del porcentaje de IM cuando aumenta la concentración de TCS, por ejemplo para el tratamiento a pH 7, el porcentaje de IM en la medición 2 es proporcional al incremento de la concentración del contaminante, así mismo ocurre en la secuencia de mediciones a pH 9.

En la última medición con la que se terminan los tratamientos para ambos niveles de pH, la concentración de IM en los espermatozoides presentó un porcentaje bajo de IM, en la segunda medición este porcentaje aumentó en todos los experimentos y en la tercera medición disminuyó de nuevo el porcentaje de IM.

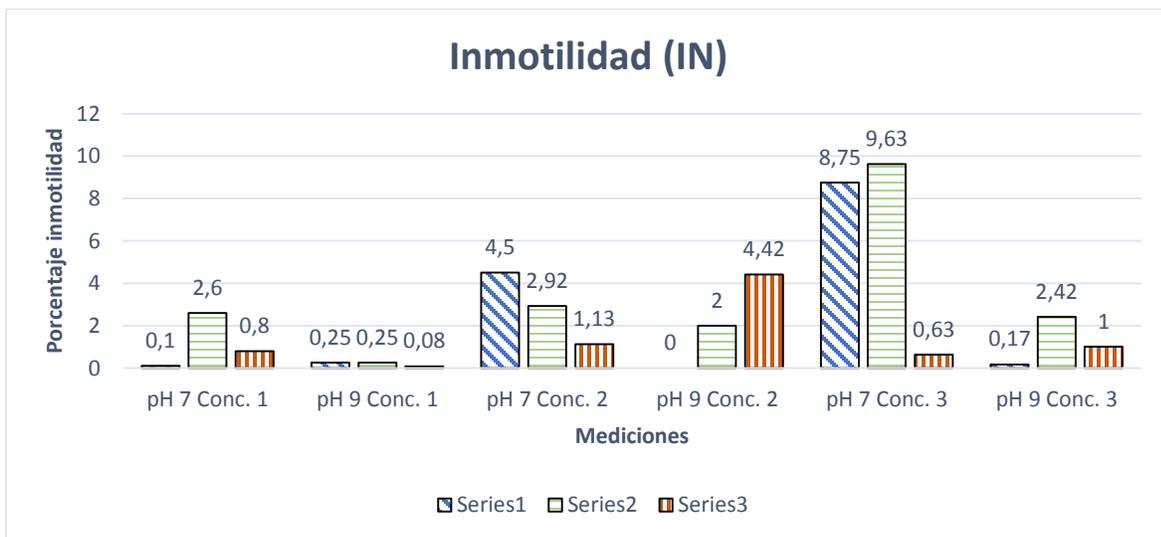


Figura 50. Inmotilidad a diferentes concentraciones y niveles de pH.

Con base en los parámetros analizados a diferentes concentraciones del TCS y a diferentes niveles de pH se comprobó que en todos los tratamientos hubo disrupción endocrina afectando las variables de motilidad en cada uno de los tratamientos y en cada uno de los peces estudiados en la fase experimental, lo que induce a una disminución de la capacidad de fertilidad del pez por la baja producción de espermatozoides viables para su reproducción.

5.2.9 Análisis estadístico de la Inmotilidad

Con el fin de evaluar la influencia de los factores y las posibles interacciones entre éstos en la inmotilidad se realizó la tabla del análisis de varianza para analizar la significancia de las fuentes de variación del modelo (tabla 46).

Tabla 45

ANOVA para la variable respuesta Inmotilidad

Fuente de variabilidad	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F_0	valor - p
A: Día	SS_A 21.42	$a - 1$ 2	MS_A 10.71	$\frac{MS_A}{MS_E}$ 1.770	0.18491
B: Concentración	SS_B 72.66	$b - 1$ 2	MS_B 36.33	$\frac{MS_B}{MS_E}$ 6.004	0.00562
C: pH	SS_C 39.10	$c - 1$ 1	MS_C 39.10	$\frac{MS_C}{MS_E}$ 6.462	0.1547
AB: Día* Concentración	SS_{AB} 37.66	$(a - 1)(b - 1)$ 4	MS_{AB} 9.41	$\frac{MS_{AB}}{MS_E}$ 1.556	0.20708
AC: Día* pH	SS_{AC} 73.71	$(a - 1)(c - 1)$ 2	MS_{AC} 36.86	$\frac{MS_{AC}}{MS_E}$ 6.091	0.00527
BC: Concentración* pH	SS_{BC} 35.67	$(b - 1)(c - 1)$ 2	MS_{BC} 17.84	$\frac{MS_{BC}}{MS_E}$ 2.947	0.06525

ABC: Día* Concentración* pH	SS_{ABC}	42.14	$(a-1)(b-1)(c-1)$	4	MS_{ABC}	10.54	MS_{ABC}/MS_E	1.741	0.16238
Residuales	SS_r	217.84	$abc(n-1)$	36	MS_r	6.05			
Total	SS_T	540.2	$abcn-1$	53					

De acuerdo al análisis obtenido de la tabla ANOVA se realizó la verificación de hipótesis de la variable inmotilidad como se muestra en la tabla 47.

Tabla 46

Verificación de hipótesis para la variable inmotilidad

Factor	Verificación de las hipótesis
A:Día	Tenemos que para este factor el $valor - p = 0.18491 > 0.05$ por lo que se rechaza H_1 y se acepta H_0 , luego el efecto del tiempo no tiene influencia en la variable evaluada de inmotilidad de los espermatozoides.
B:Concentración (µg/l)	Tenemos que para este factor el $valor - 0.00562 < 0.05$ por lo que se rechaza H_0 y se acepta H_1 , por lo tanto el efecto de la concentración tiene influencia en la variable evaluada de inmotilidad en espermatozoides.
C: pH	Tenemos que para este factor el $valor - p = 0.1547 > 0.05$ por lo que se rechaza H_1 y se acepta H_0 , luego el efecto del pH no tiene influencia en la variable evaluada de inmotilidad de los espermatozoides.
Interacción ABC: Día * Concentración* pH	Al evaluar esta interacción entre día, concentración y pH el $valor - p = 0.16238 > 0.05$ por lo que se rechaza H_1 y se acepta H_0 , luego, el efecto de la interacción evaluada no tiene influencia en la variable evaluada de inmotilidad en espermatozoides.
AC: Día* pH	Tenemos que para la interacción entre el factor día y pH el $valor - p = 0.00527 < 0.05$ por lo que se rechaza H_0 y se acepta H_1 , luego, el efecto de la interacción entre día y pH tiene influencia en la variable de inmotilidad evaluada en espermatozoides.
BC: Concentración* pH	Tenemos que para este factor el $valor - p = 0.06525 > 0.05$ por lo que se rechaza H_1 y se acepta H_0 , luego el efecto de la

	interacción entre concentración y pH no tiene influencia en la variable motilidad no progresiva de los espermatozoides.
AB: Día* Concentración	Tenemos que para esta interacción de los factores el <i>valor - p</i> = 0.20708 > 0.05 por lo que se rechaza H_1 y se acepta H_0 , luego el efecto de la interacción entre concentración y tiempo no tiene influencia en la variable inmotilidad de los espermatozoides.

5.3 Análisis vitalidad en espermatozoides de peces Tilapia.

5.3.1 Análisis de la vitalidad a 50 µg/L de TCS.

Esta variable permite analizar la integridad de la membrana en las células, identificando el porcentaje de células viables y a su vez las células no vitales, las cuales son teñidas con los reactivos eosina y nigrosina con los cuales se puede identificar un daño en la membrana celular.

Con el fin de comparar la variación de vitalidad y el daño en la integridad de las membranas celulares en los diferentes tratamientos se realizó un análisis contrastando la exposición de los peces a pH 7 y 9, a diferentes concentraciones de TCS (50 µg/L, 120 µg/L y 190 µg/L). Al igual que para la variable motilidad se realizó el análisis con base en 200 espermatozoides por duplicado para cada uno de los peces en cada uno de los tratamientos antes, durante y al finalizar la exposición a TCS, en cada uno de los tratamientos ya que este es considerado como un potente disruptor que provoca toxicidad reproductiva (Lan, et al., 2015).

Por consiguiente en los tratamientos 1 y 7 se utilizó 50 µg/L de TCS como se puede observar en las tablas 48 y 49, ya que estos tratamientos fueron aceptados debido a que la diferencia en el porcentaje de vitalidad es aceptable. Antes de exponer a los peces al TCS, la diferencia en el porcentaje de vitalidad para los tratamientos 1 y 7 es 16.16% y la diferencia en las células muertas es 16.17%, siendo el mayor porcentaje de células muertas en el tratamiento a pH 7. De tal forma el porcentaje de vitalidad es alta, si se compara con el bagre rayado

Pseudoplatystoma sp para el cual reportan una viabilidad espermática superior al 61 % en las diferentes estaciones de muestreo, teniendo en cuenta que las muestras fueron tomadas in situ (Universidad de Córdoba (Colombia). Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia., Medina-Robles, et al., 2011)

Tabla 47

Evaluación de la vitalidad en espermatozoides, tratamiento 1 (medición 1), Concentración 50 µg/L de TCS, pH 7

Promedio espermatozoides evaluados por triplicado			
Células vivas	Células muertas	Células vivas	Células muertas
141,33	58,67	143	57
Porcentaje espermatozoides evaluados.			
70,67%	29,33%	71,50%	28,50%
Porcentaje células vivas.	71,08%	Diferencia entre porcentajes células vivas.	0,83%
		Diferencia entre promedios.	9%

Tabla 48

Evaluación de la vitalidad en espermatozoides, tratamiento 7 (medición 1), Concentración 50 µg/L de TCS, pH 9

Promedio espermatozoides evaluados por triplicado			
Células vivas	Células muertas	Células vivas	Células muertas
173,67	26,33	175,33	24,67
Porcentaje espermatozoides evaluados.			
86,83%	13,17%	87,67%	12,33%
Porcentaje células vivas.	87,25%	Diferencia entre porcentajes células vivas.	0,83%
		Diferencia entre promedios.	7%

A la mitad del tratamiento, al cuarto día de exposición de los peces se analizaron con el fin de observar la variabilidad de la vitalidad de los espermatozoides, de tal forma en el tratamiento 1 disminuyó el porcentaje de vitalidad en un 31% y el porcentaje de células muertas se incrementó en igual porcentaje (Tabla 50).

Tabla 49

Evaluación de la vitalidad en espermatozoides tratamiento 1 (medición 2), Concentración 50 µg/L de TCS, pH 7

Promedio espermatozoides evaluados por triplicado			
Células vivas	Células muertas	Células vivas	Células muertas
78,67	121,33	81,67	118,33
Porcentaje espermatozoides evaluados.			
39,33%	60,67%	40,83%	59,17%
Porcentaje células vivas.	40,08%	Diferencia entre porcentajes células vivas.	1,5%
		Diferencia entre promedios.	10%

Para el tratamiento 7, el porcentaje de vitalidad disminuyó 19.42% como se presenta en la tabla 51, valor inferior al obtenido en el tratamiento 1.

Tabla 50

Evaluación de la vitalidad en espermatozoides, tratamiento 7 (medición 2), Concentración 50 µg/L de TCS, pH 9

Promedio espermatozoides evaluados por triplicado			
Células vivas	Células muertas	Células vivas	Células muertas
135,67	64,33	135,67	64,33
Porcentaje espermatozoides evaluados.			
67,83%	32,17%	67,83%	32,17%
Porcentaje células vivas.	67,83%	Diferencia entre porcentajes células vivas.	0%

Diferencia entre promedios.

9%

Al finalizar el tratamiento 1 disminuyó la vitalidad 56.83% como se observa en la tabla 52, respecto a la primera medición, por lo tanto, el porcentaje de células muertas aumentó significativamente. El porcentaje de vitalidad se redujo 25.83% respecto a la segunda medición lo que indica que a medida que el pez se encuentra expuesto al TCS hay disrupción endocrina, reflejada en las variables evaluadas en los espermatozoide, lamentablemente las condiciones ambientales de la tilapia se pueden alterar por la presencia de contaminantes emergentes en ríos, lagos y estanques de agua dulce que causan alteraciones metabólicas en el pez (Kolpin, et al., 2002).

Tabla 51. Evaluación de la vitalidad en espermatozoides, tratamiento 1 (medición 3), Concentración 50 µg/L de TCS, pH 7.

Promedio espermatozoides evaluados por triplicado			
Células vivas	Células muertas	Células vivas	Células muertas
28	172	29	171
Porcentaje espermatozoides evaluados.			
14%	86%	14,50%	85,50%
Porcentaje células vivas.	14,25%	Diferencia entre porcentajes células vivas.	0,50%
		Diferencia entre promedios.	7%

Para el tratamiento 7, la vitalidad en la medición 3 fue 63.25% como se aparece en la tabla 53, teniendo una diferencia de 24% respecto a la primera medición y de 4.58% respecto a la segunda medición, lo cual indica que el porcentaje de vitalidad en los dos tratamientos a la concentración de 50 µg/L, fue más afectada cuando los peces estuvieron expuestos al tratamiento 7, sin embargo, en ambos tratamientos se presenta una disminución en la variable lo que indica un proceso de disrupción endocrina.

Tabla 52

Evaluación de la vitalidad en espermatozoides, tratamiento 7 (medición 3), Concentración 50 µg/L de TCS, pH 9

Promedio espermatozoides evaluados por triplicado			
Células vivas	Células muertas	Células vivas	Células muertas
125,33	74,67	127,67	72,33
Porcentaje espermatozoides evaluados.			
62,67%	37,33%	63,83%	36,17%
Porcentaje células vivas.	63,25%	Diferencia entre porcentajes células vivas.	1,17%
		Diferencia entre promedios.	10%

5.3.2 Análisis de la vitalidad a 120 µg/L de TCS.

En el tratamiento 2, el porcentaje obtenido en la vitalidad fue 89.58% que al compararlo en un estudio realizado también en semen de *oreochromis spp.* se obtuvieron porcentajes de vitalidad superiores al 80% (Guerrero, et al., 2008) y el de células muertas fue 10.41% como se observa en la tabla 54, en el que los peces no estaban expuestos a TCS, siendo la diferencia aceptable entre los porcentajes de la vitalidad entre la muestra original y la réplica.

Tabla 53

Evaluación de la vitalidad en espermatozoides, tratamiento 2 (medición 1), Concentración 120 µg/L de TCS, pH 7

Promedio espermatozoides evaluados por triplicado			
Células vivas	Células muertas	Células vivas	Células muertas
179	21	179,33	20,67
Porcentaje espermatozoides evaluados.			
89,50%	10,50%	89,67%	10,33%

Porcentaje células vivas.	89,58%	Diferencia entre porcentajes células vivas.	0,17%
		Diferencia entre promedios.	6%

Por otra parte para el tratamiento 8 se observa en la tabla 55 que el porcentaje de vitalidad es 80.42% y el porcentaje de células con daño en la membrana fue 19.58%.

Tabla 54

Evaluación de la vitalidad en espermatozoides, tratamiento 8 (medición 1), Concentración 120 µg/L de TCS, pH 9

Promedio espermatozoides evaluados por triplicado			
Células vivas	Células muertas	Células vivas	Células muertas
156,33	43,67	165,33	34,67
Porcentaje espermatozoides evaluados.			
78,17%	21,83%	82,67%	17,33%
Porcentaje células vivas.	80,42%	Diferencia entre porcentajes células vivas.	4,50%
		Diferencia entre promedios.	9%

El porcentaje de vitalidad en la segunda medición disminuyó para el tratamiento 2 en 31.16% respecto a la primera medición como se observa en la tabla 56 y aumentó el porcentaje de células muertas, siendo coherentes los resultados con los obtenidos para la concentración de 50 µg/L, por lo tanto, los resultados son aceptados ya que la diferencia entre los porcentajes de vitalidad de la medición original y la réplica es 3.50% y la diferencia para ser aceptable debe ser de máximo 10.

Tabla 55

Evaluación de la vitalidad en espermatozoides, tratamiento 2 (medición 2), Concentración 120 µg/L de TCS, pH 7

Promedio espermatozoides evaluados por triplicado			
--	--	--	--

Células vivas	Células muertas	Células vivas	Células muertas
113,33	86,67	120,33	79,67
Porcentaje espermatozoides evaluados.			
56,67%	43,33%	60,17%	39,83%
Porcentaje células vivas.	58,42%	Diferencia entre porcentajes células vivas.	3,50%
		Diferencia entre promedios.	10%

En la medición 2, para el tratamiento 8 disminuyó el porcentaje de vitalidad en 4.75% como se muestra en la tabla 57 y la diferencia entre los porcentajes de vitalidad en la medición 2 entre los tratamientos 2 y 8 es de 17.25% siendo superior en el tratamiento 2. Además hay que tener en cuenta que la disminución de la vitalidad espermática en cada uno de los tratamientos propuestos se podría atribuir al cambio histopatológico al que es sometido el epidídimo con exposición al TCS debido a su acumulación impidiendo la especialización de las células sexuales (Lan, et al., 2015).

Tabla 56

Evaluación de la vitalidad en espermatozoides, tratamiento 8 (medición 2), Concentración 120 µg/L de TCS, pH 9

Promedio espermatozoides evaluados por triplicado			
Células vivas	Células muertas	Células vivas	Células muertas
151	49	151,67	48,33
Porcentaje espermatozoides evaluados.			
75,50%	24,50%	75,83%	24,17%
Porcentaje células vivas.	75,67%	Diferencia entre porcentajes células vivas.	0,33%
		Diferencia entre promedios.	9%

En la última medición para la concentración de 120 µg/L de TCS en el tratamiento 2, la vitalidad en los tratamientos disminuyó significativamente respecto a las mediciones anteriores. Por ejemplo, en el tratamiento 2 disminuyó la vitalidad 75.83% como se relaciona en la tabla 58,

respecto a la primera medición, teniendo en cuenta que en ésta los peces no estuvieron expuestos al TCS pero respecto a la segunda medición se redujo el porcentaje de vitalidad a 44.67%, siendo más alta la disminución de la variable entre el cuarto y octavo día de exposición al contaminante en la concentración 2.

Tabla 57

Evaluación de la vitalidad en espermatozoides tratamiento 2 (medición 3), Concentración 120 µg/L de TCS, pH 7

Promedio espermatozoides evaluados por triplicado			
Células vivas	Células muertas	Células vivas	Células muertas
27,5	172,5	27,5	172,5
Porcentaje espermatozoides evaluados.			
13,75%	86,25%	13,75%	86,25%
Porcentaje células vivas.	13,75%	Diferencia entre porcentajes células vivas.	0%
		Diferencia entre promedios.	7%

En el tratamiento 8 hubo una disminución significativa del porcentaje de vitalidad respecto a la primera medición de 45.84% (Tabla 59), inferior al valor obtenido en el tratamiento 2, y la diferencia con la segunda medición es de 41.09%. Por lo tanto, para los tratamientos 2 y 8, en la concentración de 120 µg/L de TCS se redujo la vitalidad a 42.88% entre el cuarto día al octavo día de exposición al contaminante, por lo tanto, el porcentaje de células muertas a medida que transcurren los tratamientos aumentan generando un daño irreversible en la integridad de las membranas celulares de los espermatozoides. Esto se podría explicar ya que el TCS ha mostrado una vida media de eliminación más larga en el epidídimo que en el plasma lo cual incide en la vitalidad para los espermatozoides (Lan, et al., 2015).

Tabla 58

Evaluación de la vitalidad en espermatozoides tratamiento 8 (medición 3), Concentración 120 µg/L de TCS, pH 9

Promedio espermatozoides evaluados por triplicado			
Células vivas	Células muertas	Células vivas	Células muertas
66	134	72,33	127,67
Porcentaje espermatozoides evaluados.			
33%	67%	36,17%	63,83%
Porcentaje células vivas.	34,58%	Diferencia entre porcentajes células vivas.	3,17%
		Diferencia entre promedios.	10%

5.3.3 Análisis de la vitalidad a 190 µg/L de TCS.

Los porcentajes de vitalidad en las primeras mediciones en los peces fueron muy altos respecto a la exposición gradual a los peces con el TCS en cada uno de los tratamientos. Para el tratamiento 3, el porcentaje de vitalidad fue 82.33% y el de células muertas fue 17.67% con una diferencia aceptable con la réplica que se realizó ya que la diferencia entre los porcentajes es 1 (Tabla 60).

Tabla 59

Evaluación de la vitalidad en espermatozoides, tratamiento 3 (medición 1), Concentración 190 µg/L de TCS, pH 7

Promedio espermatozoides evaluados por triplicado			
Células vivas	Células muertas	Células vivas	Células muertas
165,67	34,33	163,67	36,33
Porcentaje espermatozoides evaluados.			
82,83%	17,17%	81,83%	18,17%
Porcentaje células vivas.	82,33%	Diferencia entre porcentajes células vivas.	1%

Diferencia entre promedios.	8%
------------------------------------	----

En el tratamiento 9, el porcentaje de células vitales fue 81.42% como se observa en la tabla 61, muy similar al tratamiento 3 con el cual se contrastaran los resultados posteriores.

Tabla 60

Evaluación de la vitalidad en espermatozoides, tratamiento 9 (medición 1), Concentración 190 µg/L, pH 9

Promedio espermatozoides evaluados por triplicado			
Células vivas	Células muertas	Células vivas	Células muertas
164,67	35,33	161	39
Porcentaje espermatozoides evaluados.			
82,33%	17,67%	80,50%	19,50%
Porcentaje células vivas.	81,42%	Diferencia entre porcentajes células vivas.	1,83%
		Diferencia entre promedios.	8%

Cuando se realizó la segunda medición, los peces estaban expuestos a una concentración de 190 µg/L, la vitalidad en el tratamiento 3 disminuyó 10.58% (Tabla 62).

Tabla 61

Evaluación de la vitalidad en espermatozoides, tratamiento 3 (medición 2), Concentración 190 µg/L de TCS, pH 7

Promedio espermatozoides evaluados por triplicado			
Células vivas	Células muertas	Células vivas	Células muertas
148,33	51,67	138,67	61,33
Porcentaje espermatozoides evaluados.			
74,17%	25,83%	69,33%	30,67%
Porcentaje células vivas.	71,75%	Diferencia entre porcentajes células vivas.	4,83%

Para el tratamiento 9 (Tabla 63), la vitalidad mantuvo un porcentaje similar a la medición que se realizó al inicio del tratamiento como se muestra en la tabla 61, esto se explica porque el comportamiento de algunos peces cuando estaban expuestos al TCS era de evitar nadar y se quedaban estáticos durante días, lo cual incidió en que disminuyera el metabolismo y las células germinales fueran menores, a pesar de la perseverancia en los peces de no tener movilidad en los primeros días de exposición, al cuarto día asumían de nuevo su comportamiento habitual lo que incidía en que las variables evaluadas cambiaban el patrón de los resultados en la fase inicial.

Tabla 62

Evaluación de la vitalidad en espermatozoides, tratamiento 9 (medición 2), Concentración 190 µg/L de TCS, pH 9

Promedio espermatozoides evaluados por triplicado			
Células vivas	Células muertas	Células vivas	Células muertas
162,33	37,67	165,67	34,33
Porcentaje espermatozoides evaluados.			
81,17%	18,83%	82,83%	17,17%
Porcentaje células vivas.	82%	Diferencia entre porcentajes células vivas.	1,67%
		Diferencia entre promedios.	8%

Ahora bien en la fase final para el tratamiento 3 disminuyó la vitalidad espermática 41.08% respecto a la medición inicial como se muestra en la tabla 64, y 30.5% respecto a la segunda medición, y el porcentaje de células muertas fue 58.75%, el cual aumentó respecto a las mediciones anteriores con la concentración de 190 µg/L.

Tabla 63

Evaluación de la vitalidad en espermatozoides, tratamiento 3 (medición 3), Concentración 190 µg/L de TCS, pH 7

Promedio espermatozoides evaluados por triplicado			
Células vivas	Células muertas	Células vivas	Células muertas
76,5	123,5	88,5	111,5
Porcentaje espermatozoides evaluados.			
38,25%	61,75%	44,25%	55,75%
Porcentaje células vivas.	41,25%	Diferencia entre porcentajes células vivas.	6%
		Diferencia entre promedios.	10%

El porcentaje de vitalidad para el tratamiento 9 disminuyó 30.17% respecto a la primera medición y el porcentaje de células muertas fue 48.75%, aumentando 30.75% (Tabla 65). Por lo tanto, con la concentración 3 se evidencia que el porcentaje de vitalidad disminuyó más en el tratamiento 3 que en el 9 y el porcentaje en las células muertas es mayor para el tratamiento 3 que en el 9 respecto a medición inicial en la que los peces no estuvieron expuestos al contaminante, así mismo en un estudio realizado con ratas se les administro 10, 50 y 20 mg/kg de TCS durante 8 semanas demostró que al ser expuestas a concentraciones altas del contaminante mostraba una disminución en la producción de esperma diario (Lan, et al., 2015).

Tabla 64

Evaluación de la vitalidad en espermatozoides, tratamiento 9 (medición 3), Concentración 190 µg/L de TCS, pH 9

Promedio espermatozoides evaluados por triplicado			
Células vivas	Células muertas	Células vivas	Células muertas
104,33	95,67	100,67	99,33
Porcentaje espermatozoides evaluados.			
52,17%	47,83%	50,33%	49,67%
Porcentaje células vivas.	51,25%	Diferencia entre porcentajes células vivas.	1,83%
		Diferencia entre promedios.	10%

Como se observa en la figura 51 la vitalidad espermática disminuyó en todos los tratamientos en cada una de las mediciones a diferentes concentraciones del TCS. En tanto, el porcentaje de vitalidad en todos los tratamientos con pH 9, en la segunda y tercera mediciones fueron superiores al pH 7.

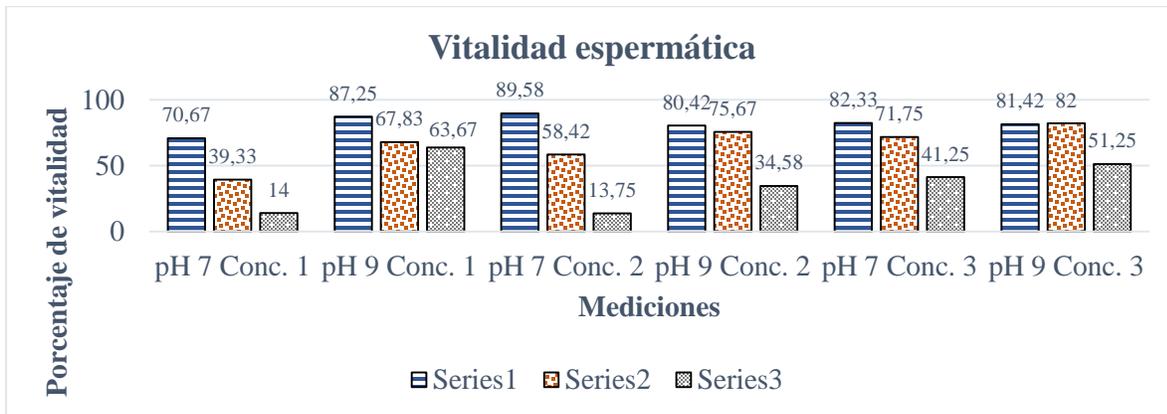


Figura 51. Vitalidad espermática a diferentes concentraciones y niveles de pH.

Se evidencia que el porcentaje de más baja vitalidad fue con la concentración de 50 µg/L respecto a las otras concentraciones en la segunda medición de exposición de los peces TCS. En la tercera medición hubo una mayor incidencia en la disminución del porcentaje de vitalidad a 50 µg/L y 120 µg/L respecto a la concentración de 190 µg/L a pH 7, sin embargo, a pH 9 hubo una disminución gradual del porcentaje de vitalidad a 50 µg/L y a 120 µg/L, pero con 190 µg/L se elevó de nuevo la vitalidad en un 10%. Los porcentajes de vitalidad en los espermatozoides son bajos respecto a las mediciones iniciales lo que impide que las células sean aptas para la reproducción ya que a menores concentraciones de células vitales menos porcentaje de fecundación.

5.3.4 Análisis estadístico de la vitalidad.

Con el fin de evaluar la influencia de los factores y las posibles interacciones entre éstos en la vitalidad espermática se realizó la tabla el análisis de varianza para analizar la significancia de las fuentes de variación del modelo (tabla 66).

Tabla 65

ANOVA para la variable respuesta vitalidad espermática

Fuente variabilidad	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F_0	valor - p
A: Día	SS_A 23953	$a - 1$ 2	MS_A 1197 6	MS_A / MS_E 87.63 6	1.47 e-14
B: Concentración	SS_B 1014	$b - 1$ 2	MS_B 507	MS_B / MS_E 3.709	0.034319
C: pH	SS_C 4685	$c - 1$ 1	MS_C 4685	MS_C / MS_E 34.28 5	1.08 e-06
AB: Día* Concentración	SS_{AB} 1580	$(a - 1)(b - 1)$ 4	MS_{AB} 395	MS_{AB} / MS_E 2890	0.035766
AC: Día* pH	SS_{AC} 2513	$(a - 1)(c - 1)$ 2	MS_{AC} 1256	MS_{AC} / MS_E 9.194	0.000595
BC: Concentración * pH	SS_{BC} 1624	$(b - 1)(c - 1)$ 2	MS_{BC} 812	MS_{BC} / MS_E 5.943	0.005883
ABC: Día* Concentración * pH	SS_{ABC} 312	$(a - 1)(b - 1)(c - 1)$ 4	MS_{ABC} 78	MS_{ABC} / MS_E 0.571	0.685579
Residuales	SS_r 4920	$abc(n - 1)$ 3 6	MS_r 137		
Total	SS_T 17,394 5	$abcn - 1$ 5 3			

De acuerdo al análisis obtenido de la tabla ANOVA se realizó la verificación de hipótesis de la variable vitalidad como se muestra en la tabla 67.

Tabla 66

Verificación de hipótesis la variable vitalidad espermática

5.4 Análisis morfológico en espermatozoides de peces Tilapia.

5.4.1 Análisis morfológico de espermatozoides en peces sin estar expuestos al contaminante

Factor	Verificación de las hipótesis
A:Día	Tenemos que para este factor el $valor - p = 1.47 e - 14 < 0.05$ por lo que se rechaza H_0 y se acepta H_1 , luego, el efecto del tiempo tiene influencia en el factor de vitalidad evaluado en los espermatozoides.
B:Concentración (µg/l)	Tenemos que para este factor el $valor - p = 0.034319 < 0.05$ por lo que se rechaza H_0 y se acepta H_1 , luego, el efecto de la concentración si tiene influencia en la variable evaluada de vitalidad en espermatozoides.
C: pH	Tenemos que para este factor el $valor - p = 1.08 e - 06 < 0.05$ por lo que se rechaza H_0 y se acepta H_1 , por lo tanto el efecto del pH tiene influencia en la variable evaluada de vitalidad en espermatozoides.
Interacción ABC: Día * Concentración* pH	Al evaluar esta interacción entre día, concentración y pH el $valor - p = 0.685579 > 0.05$ por lo que se rechaza H_1 y se acepta H_0 , luego, el efecto de la interacción evaluada no tiene influencia en la variable evaluada de vitalidad en espermatozoides.
AC: Día* pH	Tenemos que para este factor el $valor - p = 0.000595 < 0.05$ por lo que se rechaza H_0 y se acepta H_1 , luego, el efecto de la interacción entre día y pH tiene influencia en la variable evaluada de vitalidad en espermatozoides.
BC: Concentración* pH	Tenemos que para este factor el $valor - p = 0.005883 < 0.05$ por lo que se rechaza H_0 y se acepta H_1 , por lo tanto el efecto de la interacción entre concentración y pH tiene influencia en la vitalidad de los espermatozoides.
AB: Día* Concentración	Tenemos que para este factor el $valor - p = 0.035766 < 0.05$ por lo por lo que se rechaza H_0 y se acepta H_1 , luego, el efecto de la interacción entre concentración y tiempo tiene influencia en la vitalidad de los espermatozoides.

TCS.

En la figura 52 se observan los espermatozoides de peces Tilapia sin ser sometidos a TCS, para lo cual se identifican 8 espermatozoides para analizarles la forma de la cabeza, pieza

intermedia y la pieza principal, estos se consideran uniflagelados con cabeza en forma cilíndrica como en el bagre rayado y las tilapias (Universidad de Córdoba (Colombia). Facultad de medicina veterinaria y zootecnia. Medina – Robles, et al., 2011). Así mismo se considera que en los peces la morfología es muy variada en los teleósteos, teniendo como característica principal la ausencia de acrosoma (Billard, 1988; Mattei, 1993),

En éste caso los espermatozoides 1, 2, 6 y 7 presentan una morfología normal pero el espermatozoide 3 se clasificó como anormal debido a que la pieza principal esta doblada impidiendo su desplazamiento; los espermatozoides 5 y 8 tienen cabeza amorfa, ésta característica inhibe la fecundación, además presentan anomalía en la pieza intermedia y pieza principal, de tal forma las anomalías más frecuentes son la presencia de gotas citoplasmáticas en la cabeza y cuerpo del espermatozoide, lo cual se podría asociar a espermatozoides inmaduros según Bearden en 1982. Por último, se observa que el número cuatro tiene dos células, las cuales no se pueden caracterizar. En la tabla 68 se encuentra la evaluación realizada a los espermatozoides del pez blanco con las características de cada una de las células descritas.



Figura 52. Espermatozoides, primera medición sin TCS.

Tabla 67

Caracterización morfológica de espermatozoides de Tilapia sin exposición a TCS (Primera medición)

Espermatozoide	Forma de la cabeza	Pieza intermedia	Pieza principal	Clasificación general del espermatozoide
1	Normal	Normal	Normal	Normal
2	Normal	Normal	Normal	Normal
3	Normal	Normal	Doblado	Anormal
4	NA	NA	NA	Dos células
5	Anormal amorfa	Delgada	Enroscada	Anormal
6	Normal	Normal	Normal	Normal
7	Normal	Normal	Normal	Normal
8	Anormal amorfa	Gruesa	Normal	Anormal

*Nota.** NA (No aplica).

5.4.2 Análisis morfológico de espermatozoides en peces expuestos a 50 µg/L de TCS.

En la figura 53 se observa la fotografía de los 14 espermatozoides evaluados a la concentración de 50 µg/L en la mitad del tratamiento, dos de ellos presentan normalidad (1 y 13), el numero 11 no se puede evaluar debido a que hay dos células; los espermatozoides 2, 5 y 14 presentan defecto en la forma de la cabeza de la célula y en la pieza intermedia de cada una de las estructuras; el 4 presenta anormalidad en la cabeza por su forma redonda, las piezas media y principal son normales; los espermatozoides 3 y 10 presentan alteración en la parte intermedia siendo una delgada y la otra gruesa, respectivamente; el 8 y 9 tienen cabezas anormales pero el resto de la estructura celular es normal, y por último el espermatozoide 12 tiene el cuello doblado lo que impide un movimiento rápido (Tabla 69), este tipo de caracterización morfológica puede deberse a cambios en la morfología e histopatología epididimaria (Lan, et al., 2015).

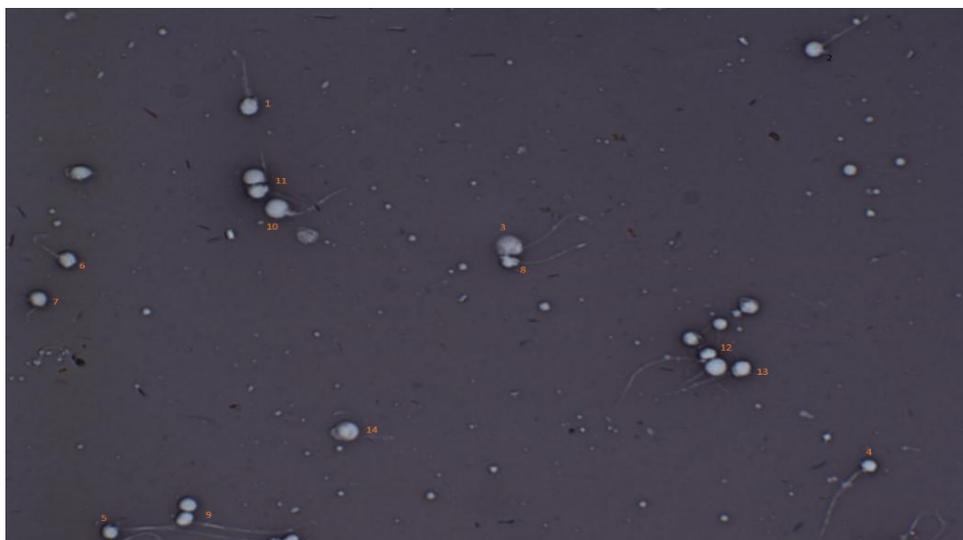


Figura 53. *Espermatozoides a 50 µg/L de TCS, segunda medición.*

Tabla 68

Caracterización morfológica de espermatozoides de Tilapia expuestos a 50 µg/L de TCS, segunda medición

Espermatozoide	Forma de la cabeza	Pieza intermedia	Pieza principal	Clasificación general del espermatozoide
1	Normal	Normal	Normal	Normal
2	Anormal redonda	Delgada	Normal	Anormal
3	Normal	Delgada	Normal	Anormal
4	Anormal redonda	Normal	Normal	Anormal
5	Anormal redonda	Cuello doblado	Normal	Anormal
6	Anormal	Normal	Enroscado	Anormal
7	Normal	Asimétrica	Enroscado	Anormal
8	Anormal amorfa	Normal	Normal	Anormal
9	Anormal	Normal	Normal	Anormal
10	Normal	Inserción gruesa	Normal	Anormal
11	NA	NA	NA	Dos células
12	Anormal	Cuello doblado	Normal	Anormal
13	Normal	Normal	Normal	Normal

14	Anormal redonda	Asimétrica	Enroscado	Anormal
-----------	--------------------	------------	-----------	---------

*Nota.** NA (No aplica).

En la figura 54 se muestra la fotografía de los espermatozoides que se encuentran expuestos a 50 µg/L de TCS, en la segunda medición. En ésta se pueden evaluar 10 espermatozoides en su morfología, todos son anormales. Los espermatozoides 9 y 10 presentan una cabeza anormal redonda, mientras que la pieza intermedia y principal son normales, sin embargo cuando el espermatozoide presenta al menos un defecto en la célula se clasifica con anomalía en su estructura; las células 1, 2 y 5 presentan una cabeza redonda con estructura de la pieza intermedia normal, pero con la pieza principal corta lo que impide su rápido desplazamiento; el espermatozoide 3 también tiene una cabeza anormal redonda, con estructura normal en la pieza intermedia pero con irregularidad en la pieza principal ya que presenta dos colas; el espermatozoide 4 es anormal por tener más de dos vacuolas en la cabeza; los espermatozoides 6 y 7 tienen forma anormal redonda en la cabeza y su inserción en la pieza intermedia es gruesa y el espermatozoide 8 presenta una cabeza amorfa con el resto de su estructura celular normal (Tabla 70).

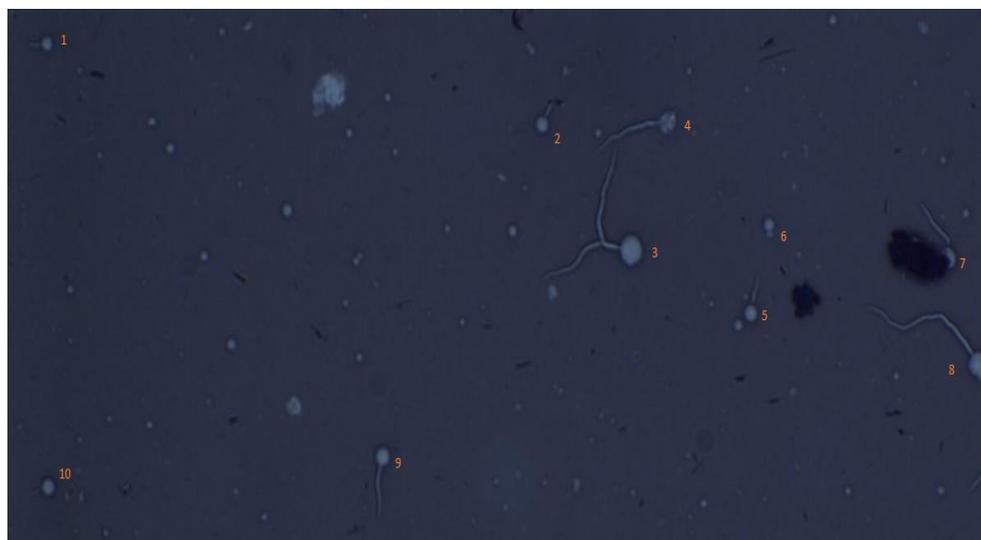


Figura 54. Espermatozoides a 50 µg/L de TCS, segunda medición (Replica).

Tabla 69

Caracterización morfológica de espermatozoides de Tilapia expuestos a 50 µg/L de TCS, segunda medición (Replica)

Espermatozoide	Forma de la cabeza	Pieza intermedia	Pieza principal	Clasificación general del espermatozoide
1	Anormal redonda	Normal	Corta	Anormal
2	Anormal redonda	Normal	Corta	Anormal
3	Anormal redonda	Normal	Doble	Anormal
4	Anormal más de 2 vacuolas	Asimétrico	Normal	Anormal
5	Anormal redonda	Normal	Corta	Anormal
6	Anormal redonda	Grueso	No se ve	Anormal
7	Anormal redonda	Grueso	Doblada	Anormal
8	Anormal amorfa	Normal	Normal	Anormal
9	Anormal redonda	Normal	Normal	Anormal
10	Anormal redonda	Normal	No se ve	Anormal

Así mismo se evaluaron los espermatozoides de los peces que estuvieron expuestos a 50 µg/L de TCS, en la última medición del tratamiento, para lo cual se lograron caracterizar 16 espermatozoides (Figura 55 y tabla 71). Todos presentan anomalía excepto el espermatozoide 16, predominan espermatozoides con cabezas redondas y las piezas intermedias son difíciles de estudiar debido a que no son visibles como es el caso de los espermatozoides 2, 3, 4 y 9; por otra parte se encontraron células con cabezas amorfas y con anomalías en la pieza intermedia y pieza principal como por ejemplo los espermatozoides 8, 10 y 12; hay células cabezas redondas anormales pero con la pieza intermedia y principal con normalidad; los espermatozoides 13, 14 y 15 tienen estructura anormal redonda de la cabeza, sin embargo, la parte intermedia presenta normalidad y la parte principal tiene colas cortas lo que impide que el desplazamiento sea rápido;

los espermatozoides 1 y 11 presentan estructura redonda en la cabeza y su estructura intermedia y principal es normal; los espermatozoides 5 y 6 presentan anomalías en la cabeza, asimétricas en la pieza intermedia y dobladas en la pieza principal.

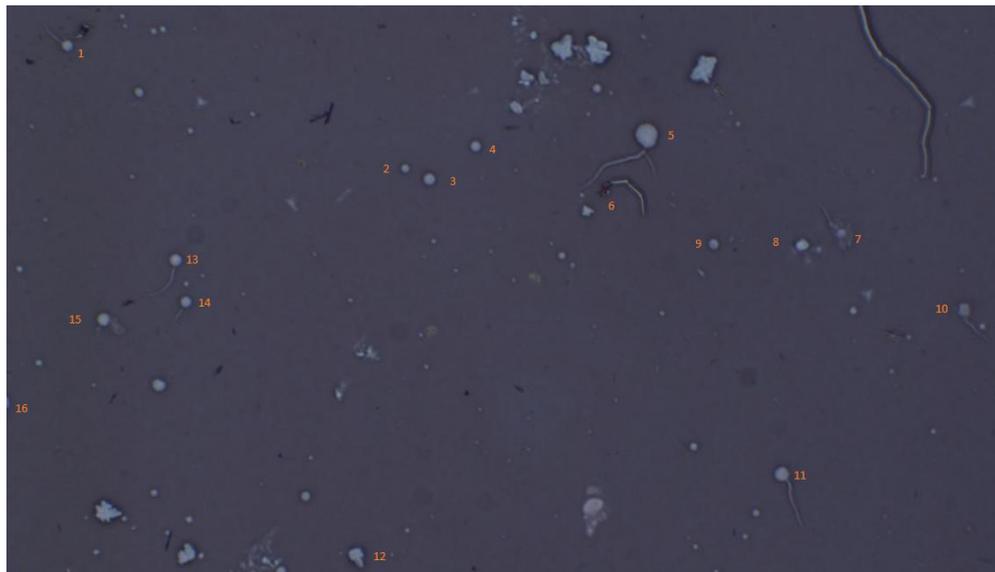


Figura 55. Espermatozoides a 50 $\mu\text{g/L}$ de TCS, tercera medición.

Tabla 70

Caracterización morfológica de espermatozoides de Tilapia expuestos a 50 $\mu\text{g/L}$ de TCS, tercera medición

Espermatozoide	Forma de la cabeza	Pieza intermedia	Pieza principal	Clasificación general del espermatozoide
1	Anormal redonda	Normal	Normal	Anormal
2	Anormal redonda	No se ve	No se ve	Anormal
3	Anormal redonda	No se ve	No se ve	Anormal
4	Anormal redonda	No se ve	No se ve	Anormal
5	Anormal cónica	Asimétrica	Doble	Anormal
6	Anormal amorfa	Asimétrica	Doblada	Anormal

7				No clasificable, espermatozoide anormal.
8	Anormal amorfa	No se ve	No se ve	Anormal
9	Anormal redonda	No se ve	No se ve	Anormal
10	Anormal amorfa	Asimétrica	Corta	Anormal
11	Anormal redonda	Normal	Normal	Anormal
12	Anormal amorfa	Gruesa	No se ve	Anormal
13	Anormal redonda	Normal	Corta	Anormal
14	Anormal redonda	Normal	Corta	Anormal
15	Anormal redonda	Normal	Corta	Anormal
16	Normal	Normal	No se ve	Normal si la cola siguiera la misma normalidad.

5.4.3 Análisis morfológico de espermatozoides en peces expuestos a 120 µg/L de TCS.

Además se realizó el análisis morfológico de los espermatozoides cuando los peces se encuentran expuestos a la concentración de TCS de 120 µg/L en la segunda medición como se observa en la figura 56 donde se caracterizaron 27 espermatozoides, de los cuales ninguno presenta normalidad, debido a que algunos autores relacionan la motilidad y morfología espermática con los resultados de motilidad al ser expuestos al TCS que implican que algunos espermatozoides no posean la pieza principal de la cola (Flores, Lobo, Chelhod, Rojas, Salazar y Alvarado, 2012), lo cual les impide el desplazamiento para lograr la fecundación y por lo tanto se hace necesario la caracterización morfológica de éstos que puedan afectar su capacidad reproductiva. Además, las concentraciones en medios naturales de estos contaminantes están asociadas al riesgo de subfertilidad debido a las alteraciones hormonales que éstos provocan (Den Hond et al., 2015) y

disminuyen la actividad reproductiva ocasionados por la disrupción endocrina (Hontela y Habibi, 2013).

En los resultados se evidencia la tendencia de que los espermatozoides evaluados en su mayoría presentan cabeza anormal redonda excepto para los espermatozoides 2 y 24 que presentan cabezas amorfas y para los espermatozoides 8, 11, 16, 20 y 22 que presentan una cabeza normal. Por otra parte, 10 espermatozoides presentan inserción gruesa en la pieza intermedia (2, 5, 7, 11, 12, 13, 16, 18, 19 y 27); 10 presentan normalidad (1, 3, 6, 8, 9, 10, 14, 17, 20 y 23) mientras que los espermatozoides 21 y 22 tienen una pieza intermedia asimétrica. Respecto a la pieza principal, 8 espermatozoides presentan anomalía con cola corta (3, 5, 6, 8, 10, 13, 16 y 22); 5 con cola doblada (2, 7, 12, 17 y 21); 6 con cola normal (1, 9, 11, 20, 23 y 27) y a los otros 8 (4, 14, 15, 18, 19, 24, 25 y 26) las colas no se alcanzan a ver (Tabla 72).

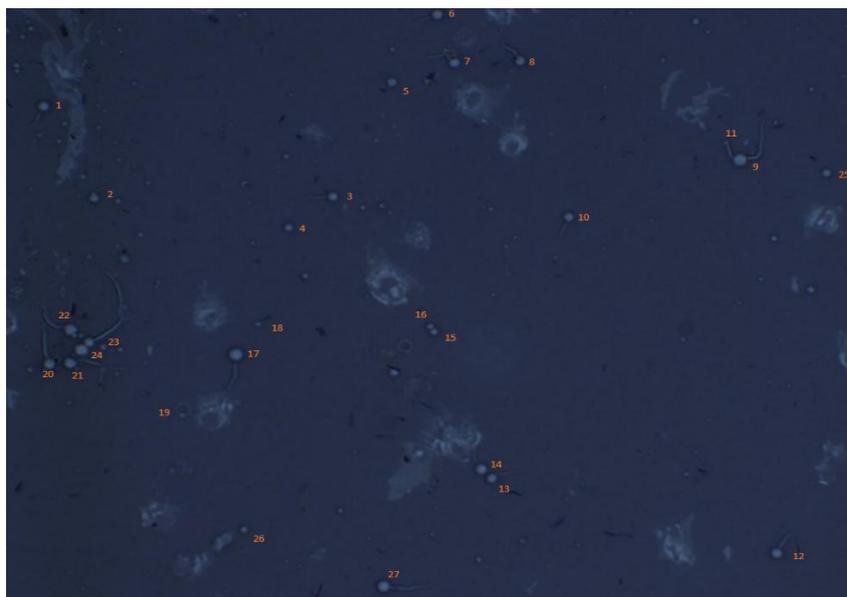


Figura 56. Espermatozoides a 120 µg/L de TCS, Segunda medición.

Tabla 71

Caracterización morfológica de espermatozoides de Tilapia expuestos a 120 µg/L de TCS, segunda medición

TCS Concentración 120 µg/L Medición 2				
Espermatozoide	Forma de la cabeza	Pieza intermedia	Pieza principal	Clasificación general del espermatozoide
1	Anormal redonda	Normal	Normal	Anormal
2	Anormal amorfa	Gruesa	Doblada	Anormal
3	Anormal redonda	Normal	Corta	Anormal
4	Anormal redonda	No se ve	No se ve	Anormal
5	Anormal redonda	Gruesa	Corta	Anormal
6	Anormal redonda	Normal	Corta	Anormal
7	Anormal redonda	Gruesa	Doblada	Anormal
8	Normal	Normal	Corta	Anormal
9	Anormal redonda	Normal	Normal	Anormal
10	Anormal redonda	Normal	Corta	Anormal
11	Normal	Gruesa	Normal	Anormal
12	Anormal redonda	Gruesa	Doblada	Anormal
13	Anormal redonda	Gruesa	Corta	Anormal
14	Anormal redonda	Normal	No se ve	Anormal
15	Anormal redonda	No se ve	No se ve	Anormal
16	Normal	Gruesa	Corta	Anormal
17	Anormal redonda	Normal	Doblada	Anormal
18	Anormal redonda	Gruesa	No se ve	Anormal
19	Anormal redonda	Gruesa	No se ve	Anormal
20	Normal	Normal	Normal	Normal
21	Anormal amorfa	Asimétrica	Doblada	Anormal
22	Normal	Asimétrica	Corta	Anormal
23	Anormal redonda	Normal	Normal	Anormal
24	Anormal amorfa	No se ve	No se ve	Anormal
25	Anormal redonda	No se ve	No se ve	Anormal
26	Anormal redonda	No se ve	No se ve	Anormal
27	Anormal redonda	Gruesa	Normal	Anormal

En la figura 57 está la foto de la que se realizó la caracterización de 13 espermatozoides de una muestra de pez Tilapia que estaba expuesto a 120 µg/L de TCS, la cual se tomó al final del tratamiento. Todas las células analizadas presentaron anomalía como se muestra en la tabla 73,

sin embargo, se observa diversidad en la clasificación de las estructuras celulares, por ejemplo las cabezas de los espermatozoides presentaron formas anormales (redondas y amorfas) y normales en una proporción similar, sin embargo, el espermatozoide 7 tenía una cabeza cónica. Por otra parte, la estructura de la pieza intermedia en la mayoría de los espermatozoides evaluados presentó normalidad excepto para los espermatozoides 2 y 3 que tenían una inserción gruesa.

Por último la mayoría de los espermatozoides evaluados presentaron como característica común colas cortas en la parte principal, lo cual imposibilita la facilidad de movimiento para lograr una rápida fecundación, además los espermatozoides con alteraciones morfológicas e inmóviles están asociadas a daños al ADN, en el genoma nuclear y mitocondrial relacionándose con la disminución de la capacidad de fertilización (Cruz I, et al., 2010).

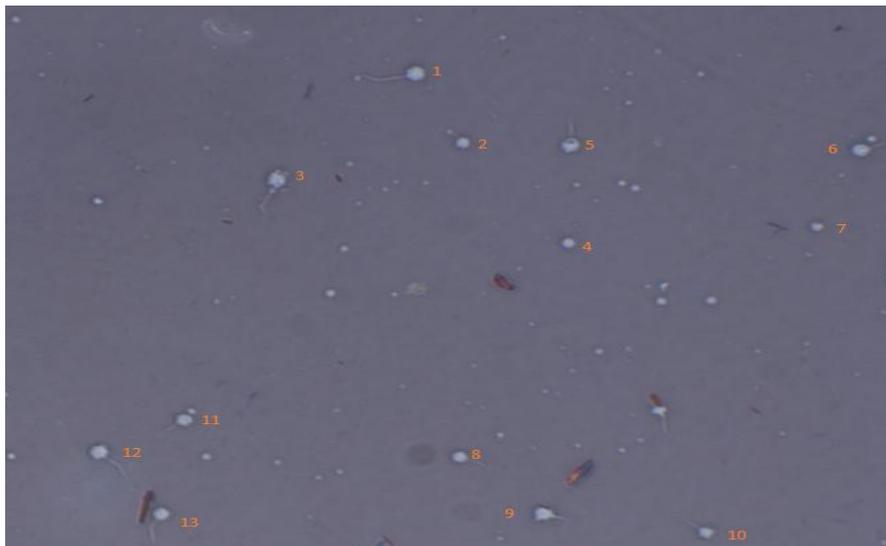


Figura 57. Espermatozoides a 120 µg/L de TCS, Tercera medición.

Tabla 72

Caracterización morfológica de espermatozoides de Tilapia expuestos a 120 µg/L de TCS, tercera medición

Espermatozoide	Forma de la cabeza	Pieza intermedia	Pieza principal	Clasificación general del espermatozoide
1	Anormal redondo	Normal	Corta	Anormal
2	Anormal redondo	Gruesa	Corta	Anormal
3	Anormal amorfo	Gruesa	Corta	Anormal
4	Anormal redondo	No se ve	No se ve	Anormal
5	Normal	Normal	Corta	Anormal
6	Normal	Normal	Corta	Anormal
7	Anormal cónico	No se ve	No se ve	Anormal
8	Normal	Normal	Corta	Anormal
9	Anormal amorfo	Normal	Corta	Anormal
10	Anormal amorfo	Normal	Corta	Anormal
11	Normal	Normal	Corta	Anormal
12	Anormal redondo	Normal	Corta	Anormal
13	Normal	Normal	Corta	Anormal

5.4.4 Análisis morfológico de espermatozoides en peces expuestos a 190 µg/L de TCS.

Para terminar se realizó la caracterización de las muestras de gametos de los peces Tilapia que estuvieron expuestos a 190 µg/L de TCS, lográndose evaluar 29 espermatozoides como se muestra en la figura 58 y en la tabla 74. De los espermatozoides evaluados solo 3 de ellos presentan normalidad (4, 5 y 16) y la mayoría presentan anormalidad en todas las partes de la estructura celular analizada como se aprecia en la figura 58, lo que implica que la fertilidad se vea afectada cuando el número de espermatozoides anormales es mayor de 20 a 25% (Bearden, 1982). En este

caso las cabezas también tiene diversidad en su clasificación, por ejemplo, los espermatozoides 1, 2, 3, 17, 18 y 26 presentan cabeza anormal amorfa; 10 de los espermatozoides evaluados presentan cabeza anormales redondas; 8 células presentan estructura normal y el espermatozoide 19 presenta una cabeza anormal. Por otra parte, al evaluar la pieza intermedia, la mayoría de los espermatozoides presentan cuello doblado, grueso y delgado respecto a la inserción y en el estudio de la pieza terminal predominan las colas cortas y enroscadas, por ejemplo, los espermatozoides 2, 3, 6, 8, 11, 18, 19, 26 y 27, y normales en los espermatozoides 4, 5, 9, 16, 17, 23, 24, 28 y 29; colas cortas para los espermatozoides 10, 12 y 15. Por último los espermatozoides 13 y 14 no son clasificables debido a que la estructura intermedia y la pieza principal no se ven con claridad para ser evaluadas.

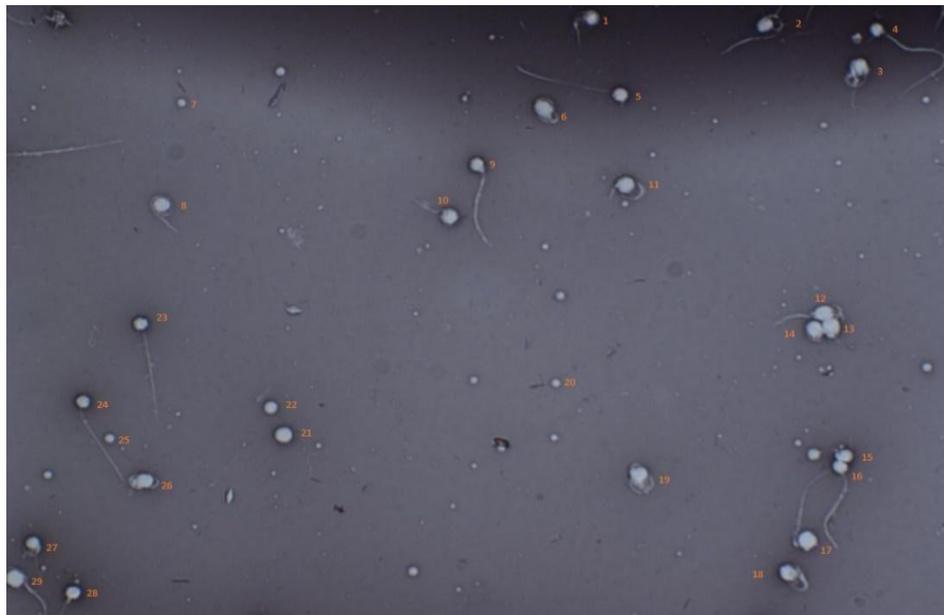


Figura 58. Espermatozoides a 190 µg/L de TCS, Segunda medición.

Tabla 73

Caracterización morfológica de espermatozoides de Tilapia expuestos a 190 µg/L de TCS, segunda medición

Espermatozoide	Forma de la cabeza	Pieza intermedia	Pieza principal	Clasificación general del espermatozoide
----------------	--------------------	------------------	-----------------	--

1	Anormal amorfo	Cuello doblado	Corta	Anormal
2	Anormal amorfo	Cuello doblado	Corta y enroscada	Anormal
3	Anormal amorfo	Cuello doblado	Corta y enroscada	Anormal
4	Normal	Normal	Normal	Normal
5	Normal	Normal	Normal	Normal
6	Normal	Normal	Corta y enroscada	Anormal
7	Anormal redondo	No se ve	No se ve	Anormal
8	Anormal redondo	Doblado	Corta y enroscada	Anormal
9	Normal	Grueso	Normal	Anormal
10	Normal	Normal	Corta	Anormal
11	Anormal redondo	No se ve	Corta y enroscada	Anormal
12	Normal	Grueso	Corta	Anormal
13	Normal	No se ve	No se ve	No clasificable
14	Normal	No se ve	No se ve	No clasificable
15	No se ve	No se ve	Corta	Anormal
16	Normal	Normal	Normal	Normal
17	Anormal amorfo	Doblado	Normal	Anormal
18	Anormal amorfo	Asimétrico	Corta y enroscada	Anormal
19	Anormal	Doblado	Corta y enroscada	Anormal
20	Anormal redondo	No se ve	No se ve	Anormal
21	Anormal redondo	No se ve	No se ve	Anormal
22	Anormal redondo	No se ve	No se ve	Anormal
23	Anormal redondo	Delgado	Normal	Anormal
24	Anormal redondo	Delgado	Normal	Anormal
25	Anormal redondo	No se ve	No se ve	Anormal
26	Anormal amorfo	Doblado	Corta y enroscada	Anormal
27	Anormal	Doblado	Corta y enroscada	Anormal

28	Anormal redondo	Normal	Normal	Anormal
29	Normal	Doblado	Normal	Anormal

En la figura 59 se muestra la identificación de los espermatozoides de los peces que fueron expuestos a concentraciones de TCS de 190 $\mu\text{g/L}$ en la tercera medición, es decir al finalizar el tratamiento. En la tabla 75 se muestra la caracterización de los 9 espermatozoides evaluados en la etapa final del tratamiento, todos presentaron estructura celular anormal excepto el espermatozoide 8; 5 de los espermatozoides evaluados presentaron estructura de la cabeza redonda (3, 4, 5 y 6), 2 anormal amorfa (7 y 9) y 2 normales (8 y 2). La estructura intermedia y pieza principal fue difícil de evaluar debido que para los espermatozoides 2, 3, 4, 5 y 6 no era visible la estructura, pero para los espermatozoides 1 y 8 la estructura intermedia es normal; para los espermatozoides 7 y 9 es gruesa y delgada la inserción en la parte intermedia, respectivamente.



Figura 59. Espermatozoides a 190 $\mu\text{g/L}$ de TCS, Tercera medición.

Tabla 74

Caracterización morfológica de espermatozoides de Tilapia expuestos a 190 µg/L de TCS, tercera medición.

Espermatozoide	Forma de la cabeza	Pieza intermedia	Pieza principal	Clasificación general del espermatozoide
1	Anormal redonda	Normal	Corta	Anormal
2	Normal	No se ve	No se ve	No es clasificable
3	Anormal redonda	No se ve	No se ve	Anormal
4	Anormal redonda	No se ve	No se ve	Anormal
5	Anormal redonda	No se ve	No se ve	Anormal
6	Anormal redonda	No se ve	No se ve	Anormal
7	Anormal amorfa	Gruesa	Corta	Anormal
8	Normal	Normal	Normal	Normal
9	Anormal amorfa	Delgada	Corta	Anormal

5.5 Análisis de Residualidad de TCS en el agua.

5.5.1 Análisis de TCS en el día 1 de exposición de los peces al contaminante a 50 µg/L, 120 µg/L y 190 µg/L.

En la figura 60 se observa el diagrama de cajas para los tratamientos 1, 4, 7 y 10 de machos y hembras en la medición del día 1 de exposición de los peces al contaminante, siendo la absorción del contaminante mayor en los peces que se encontraban expuestos a pH 7 en comparación a los que estaban a pH 9, a la concentración más baja, esto se debe a que la distribución del TCS en el medio ambiente depende del pH, de tal forma que si el pH aumenta, la relación TCS ionizado y TCS sin ionizar también aumenta (Sabaliunas, Webb, Hauk, Jacob y Eckhoff, 2003).

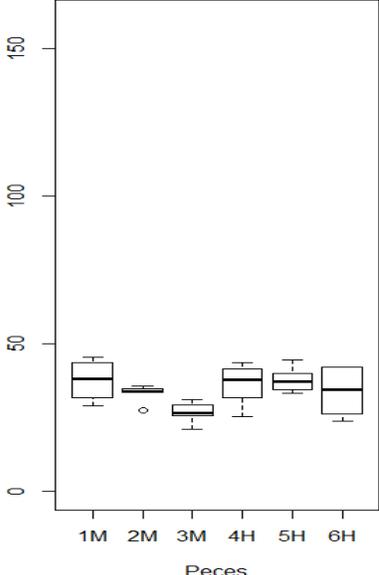
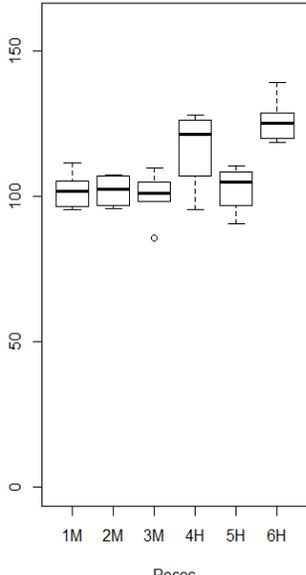
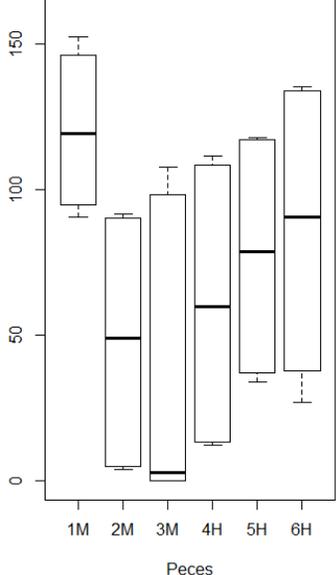
De tal forma, en los tratamientos 2, 5, 8 y 11 como se observa en la figura 61, los peces absorbieron más rápido el TCS cuando estaban expuestos a pH 9 en contraste con los que se encontraban a pH 7, y por último, a la concentración de 190 µg/L, la asimilación al contaminante fue mayor cuando los peces estaban expuestos a pH 7 (Figura 62).

Así mismo se realizó el análisis de varianza con el fin de estudiar la interacción entre los factores: tiempo, pH y TCS en el transcurso de los tratamientos en las diferentes mediciones, la cual comprobó que la interacción entre los factores no influye en la concentración de TCS evaluado en cada uno de los tratamientos, así mismo como se comprobó en los ensayos preliminares los procesos de fotodegradación del TCS solo es significativa en la superficie de las masa de aguas bajo la influencia de la luz solar, pero no en aguas subterráneas o residuales (Aranami, et al., 2007)

TCS 50 µg/L, Día 1	TCS 120 µg/L, Día 1	TCS 190 µg/L, Día 1
<p><i>Figura 60.</i> Diagrama de cajas para la variación de la concentración de TCS en el agua con cada nivel de pH (7 y 9), a 50 µg/L de TCS.</p>	<p><i>Figura 61.</i> Diagrama de cajas para la variación de la concentración de TCS en el agua con cada nivel de pH (7 y 9), a 120 µg/L de TCS.</p>	<p><i>Figura 62.</i> Diagrama de cajas para la variación de la concentración de TCS en el agua con cada nivel de pH (7 y 9), a 190 µg/L de TCS.</p>

Por otra parte se presentan los tratamientos 1, 4, 7 y 10 en el primer día de exposición, los cuales fueron sometidos a dos niveles de pH tanto las hembras como los machos, realizándose por triplicado, de esta forma se puede evidenciar que a pesar de ser peces de la misma especie reaccionan diferente en cuanto a la absorción del contaminante, así mismo cabe resaltar que cada uno de los peces estuvo expuesto a la misma concentración en peceras diferentes. De acuerdo a la figura 63, la tendencia de asimilación del contaminante para la concentración 1 es mayor en los machos que para las hembras, ya que en los machos 2 y 3 es inferior la concentración de TCS en agua, respecto a los otros peces expuestos en agua, en el primer día de exposición. Así mismo para los tratamientos 2, 5, 8 y 11 que se muestran en la figura 64 que estuvieron expuestos a la concentración de 120 µg/L de TCS, para los peces machos la asimilación del contaminante es más rápido a diferencia de las hembras que estuvieron expuestos a las mismas condiciones y que son independientes del pH en el que se encontraban, esto podría atribuirse a que el TCS tiene una elevada lipofilidad lo que hace su posible acumulación en matrices orgánicas (Bester, 2003), en este caso en los peces.

Para finalizar, en la figura 65 se observan los tratamientos 3, 6, 9 y 12 que presentaron una conducta similar que las concentraciones anteriores donde la tendencia de los machos es similar ya que absorben más rápido la concentración a diferencia de las hembras, aunque hubo una excepción con el primer pez macho en la concentración de 190 µg/L, ya que fue el de mayor resistencia al contaminante.

TCS 50 $\mu\text{g/L}$, Día 1	TCS 120 $\mu\text{g/L}$, Día 1	TCS 190 $\mu\text{g/L}$, Día 1
		
<p><i>Figura 63.</i> Diagrama de cajas para la variación de absorción de TCS por los peces de acuerdo al sexo, 1M (Primer macho), 2M (Segundo macho) y 3M (Tercer macho); 4H (Primera hembra), 5H (Segunda hembra) y 6H (Tercera hembra).</p>	<p><i>Figura 64.</i> Diagrama de cajas para la variación de absorción de TCS en la concentración de 120 $\mu\text{g/L}$ de TCS por los peces de acuerdo al sexo.</p>	<p><i>Figura 65.</i> Diagrama de cajas para la variación de absorción de TCS en la concentración de 190 $\mu\text{g/L}$ de TCS por los peces de acuerdo al sexo.</p>

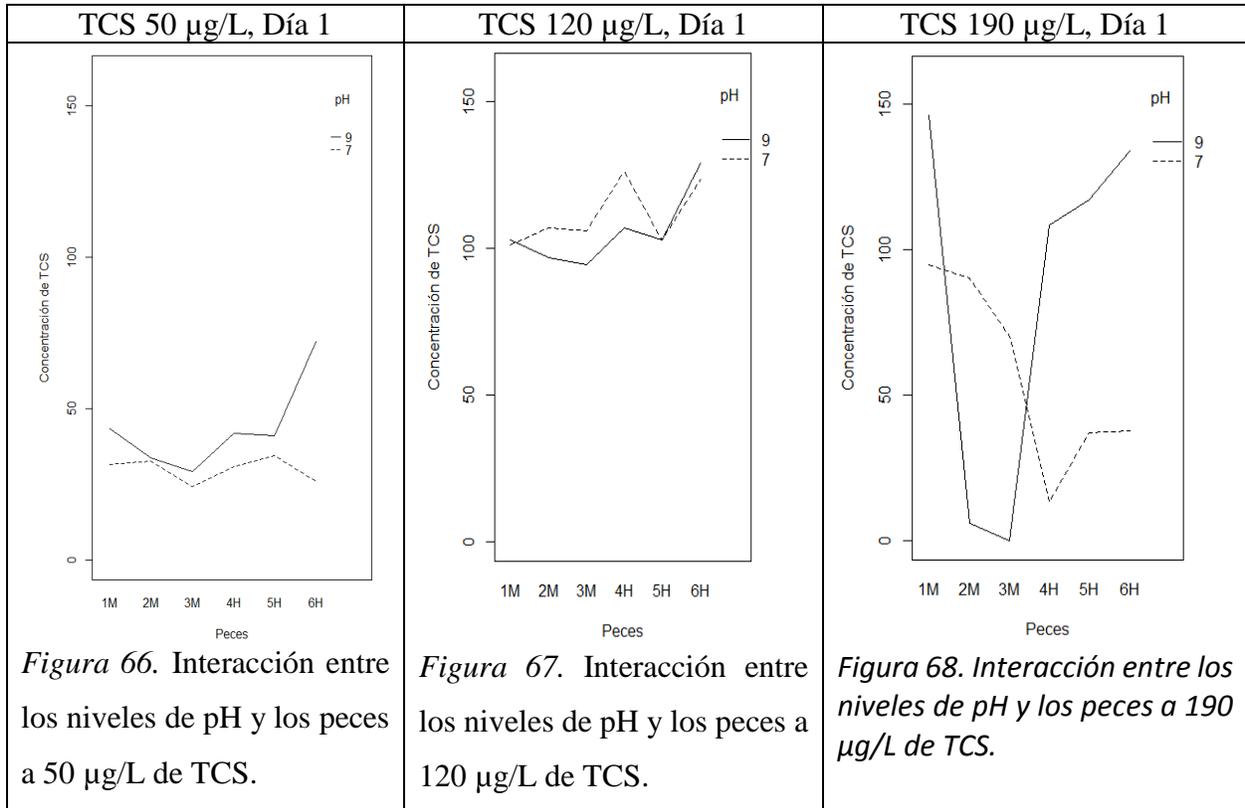
En la figura 66 se puede apreciar que tanto machos como hembras cuando estaban expuestos a 50 $\mu\text{g/L}$, la absorción de TCS fue mayor en los tratamientos a pH 7, a diferencia de los expuestos a pH 9, como se dijo anteriormente esto se debe a que la distribución del TCS en el medio ambiente depende del pH (Sabaliunas, et al., 2003).

Así mismo se puede apreciar que los machos en los tratamientos expuestos en los dos niveles de pH a 50 $\mu\text{g/L}$, absorben más rápido el TCS a diferencia de las hembras que tardan más en el proceso de asimilación en la primera medición. Sin embargo se considera que el TCS genera toxicidad en los peces siendo indiferente del sexo como el *Danio rerio* que fue expuesto en varias

etapas de su ciclo de vida al TCS y en el cual demostraron que cuando estos se expusieron a concentraciones por encima de 0.7 mg l^{-1} , este condujo a efectos teratogénicos, atrasando procesos de desarrollo en el embrión y causando la muerte en 48 horas (Oliveira, Domingues, Grisolia y Soares, 2009).

Por otra parte en los tratamientos 2, 5, 8 y 11 a $120 \text{ }\mu\text{g/L}$ de TCS (Figura 67) se observa un fenómeno contrario al analizado anteriormente, ya que los machos asimilan más rápido el contaminante cuando se encontraban a pH 9 a diferencia de los que se encontraban a pH 7, que tardan más tiempo en hacerlo, sin embargo, para las hembras el comportamiento fue dinámico ya que las primeras hembras expuestas se comportaron como los machos en los dos niveles de pH, pero para las otras hembras el nivel de pH no es significativo ya que en los dos niveles se presenta la misma relación de concentración de TCS.

En la figura 68 se observa que la tendencia en la concentración de $190 \text{ }\mu\text{g/L}$, es que los machos absorben más rápido el TCS a pH 9, al igual que sucede a $120 \text{ }\mu\text{g/L}$. Por otra parte en las hembras es diferente la asimilación de TCS, ya que lo hacen mejor a la concentración de TCS a pH 7 y se favorece a una concentración alta cuando estaban expuestas a pH 9. Además se consideró en los ensayos preliminares que el TCS también puede ser retenido en el alimento por la naturaleza lipofílica de los componentes, sin embargo los peces siempre ingirieron el alimento, por lo tanto es tomado como producto de bioacumulación en los organismos que estén expuestos a éste (Coogan, Edziyie, La Point y Venables, 2007; DeLorenzo, et al., 2008) y por lo tanto la concentración de TCS disminuye a través del tiempo, demostrando efectos adversos en los organismos a nivel reproductivo y de crecimiento.



5.5.2 Análisis de TCS en el día 4 de exposición de los peces al contaminante a 50 µg/L, 120 µg/L y 190 µg/L.

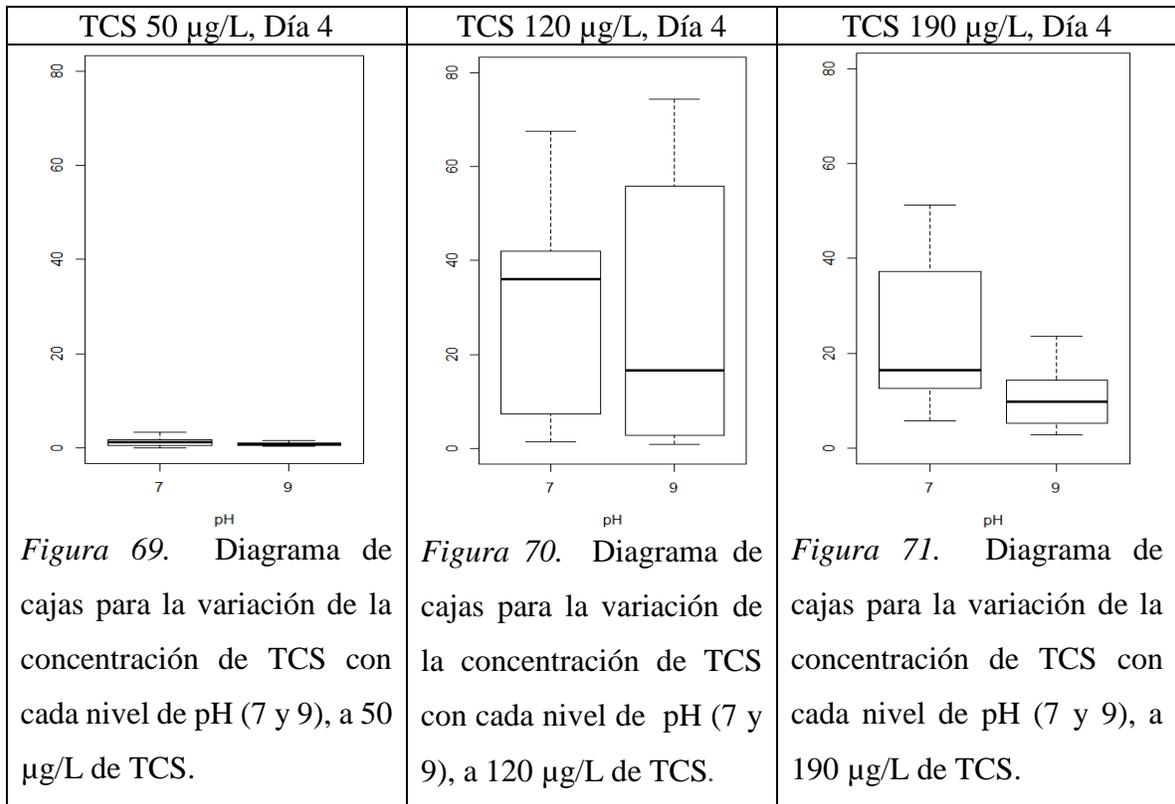
En la figura 69 se muestra el diagrama de cajas para la variación de TCS (a 50 µg/L) a los dos niveles de pH. Se observa que la asimilación de TCS cambio su comportamiento respecto al pH, ya que en la segunda medición se aceleró la absorción del contaminante para los peces que se encontraban expuestos a pH 9, manteniendo niveles de concentración de TCS más bajos que los peces que se encontraban a pH 7, respecto a la concentración inicial. En los tratamientos que se encontraban a pH 9 disminuyeron su concentración en un 99% y 98.7% a pH 7.

La concentración de 120 µg/L, en la segunda medición, se observa en la figura 70, cuyo comportamiento es igual a la primera medición respecto al pH, ya que prevalece la absorción de

TCS en los tratamientos que estaban expuestos a pH 9, ya que la concentración disminuyó 82.36% respecto a la primera medición. En cambio a pH 7 disminuyó la concentración de TCS a 67.6% respecto al primer día de exposición, por lo cual algunos autores reportan concentraciones de triclosán en músculo (Balmer, Poiger, Romanin, Bergqvist, Muller y Buser, 2004), bilis (Adolfsson – Erics, et al., 2002; Houtman, et al., 2004) y plasma de pescado (Valters, et al., 2005), por lo tanto esto podría explicar la reducción de concentración de TCS en agua en comparación con la concentración inicial de 120 µg/L disminuyó 70.84% y 85% a pH 7 y 9, respectivamente.

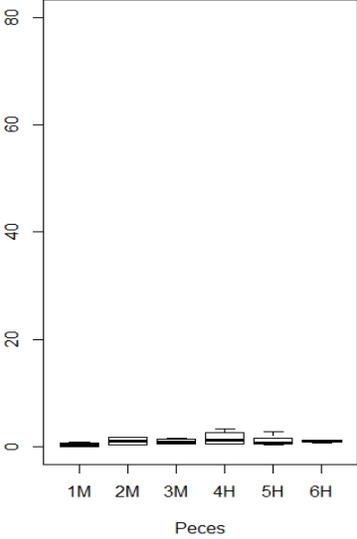
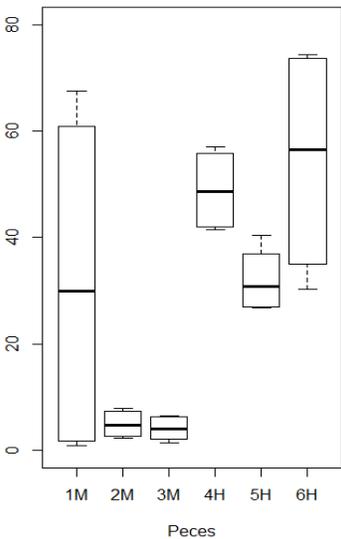
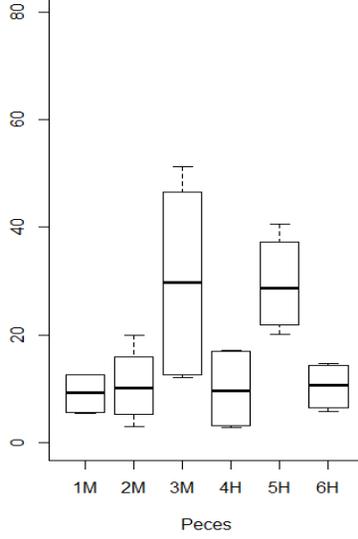
Por último en la figura 71 se observa la variación de TCS a 190 µg/L en el cuarto día de exposición, en la que la dinámica de asimilación del contaminante cambia ya que en este caso los tratamientos expuestos a pH 9 absorben más rápido el contaminante que los que se encontraban a pH 7. Respecto a la medición en el día 1, los tratamientos expuestos a los dos niveles de pH disminuyeron sus concentraciones significativamente, lo que indica que los peces asimilaron el TCS en el transcurso del tiempo de exposición, disminuyendo 94.74% el TCS a pH 9 respecto la concentración inicial de 190 µg/L, y a pH 7 descendió a 91.58%, que reflejan los procesos de disrupción endocrina en los biomarcadores biológicos analizados.

Así mismo los gráficos muestran que donde se mantuvieron las concentraciones más altas de TCS en la segunda medición en el día cuarto de los tratamientos fue en los expuestos a la concentración de 120 µg/L, ya que se encontró 74.29 µg/L de TCS en agua.



En las figuras 72 y 73 se observa que la asimilación de TCS en la segunda medición es favorable en los machos respecto a las hembras, ya que los niveles de concentración en los dos primeros niveles de concentración de TCS para los machos son inferiores a las hembras, y estos resultados son acordes a los obtenidos en la primera medición.

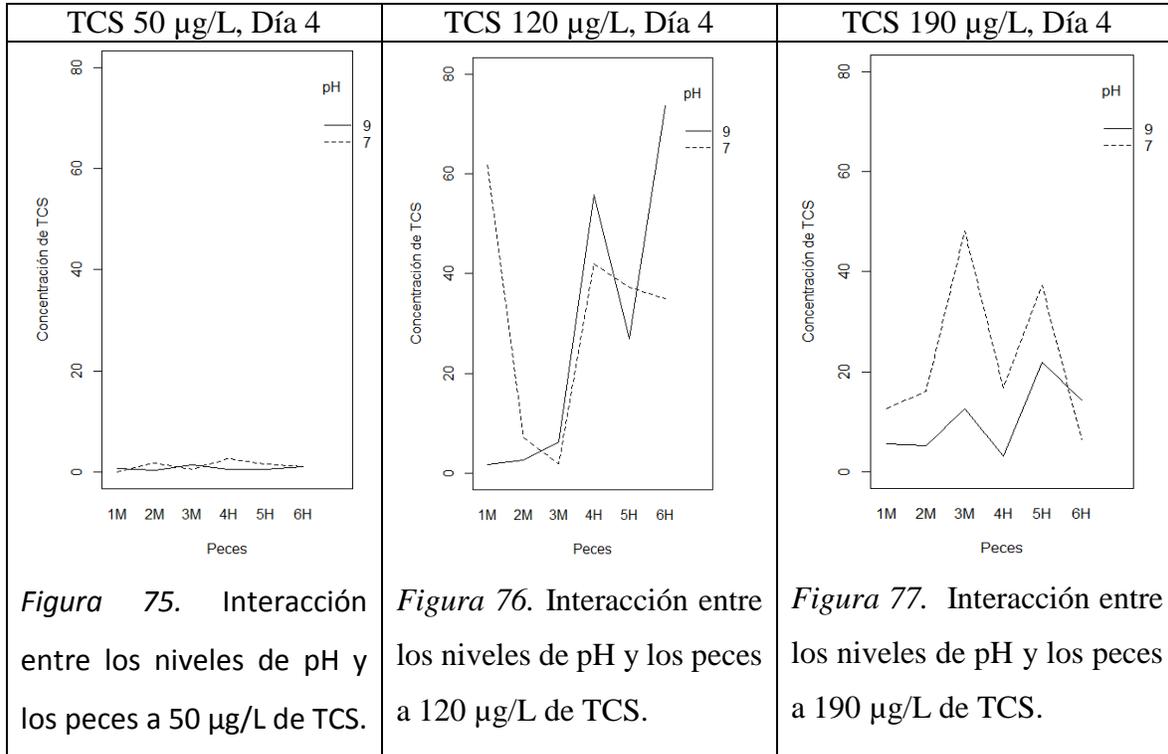
Por el contrario la figura 74 muestra que la diferencia de asimilación del contaminante no es significativa respecto al sexo de los peces, ya que hembras y machos tienen un patrón similar de comportamiento en la concentración de 190 $\mu\text{g/L}$.

TCS 50 $\mu\text{g/L}$, Día 4	TCS 120 $\mu\text{g/L}$, Día 4	TCS 190 $\mu\text{g/L}$, Día 4
 <p data-bbox="201 863 592 1115"><i>Figura 72.</i> Diagrama de cajas para la variación de absorción de TCS por los peces de acuerdo al sexo, 1M (Primer macho).</p>	 <p data-bbox="613 863 995 1115"><i>Figura 73.</i> Diagrama de cajas para la variación de absorción de TCS a 120 $\mu\text{g/L}$ por los peces de acuerdo al sexo.</p>	 <p data-bbox="1015 863 1396 1115"><i>Figura 74.</i> Diagrama de cajas para la variación de absorción de TCS a 190 $\mu\text{g/L}$ por los peces de acuerdo al sexo.</p>

Por otra parte se analizaron los efectos entre las variables de concentración, pH y sexo de los peces a diferentes concentraciones de TCS. Para la primera medición, en la medición del día 4, se puede observar en las figuras 75 y 76 que los machos que estuvieron expuestos a pH 7 tuvieron una menor retención del contaminante en comparación con los que se encontraban a pH 9, lo cual es coherente con el análisis realizado en los diagramas de cajas para el factor pH.

En la figura 77 se observa la interacción entre los factores sexo, pH y concentración de TCS en la segunda medición a una concentración de 190 $\mu\text{g/L}$, observándose que la interacción es positiva para los machos a pH 7 haciendo que su capacidad de retención de TCS en el metabolismo sea inferior que los machos expuestos a pH 9. Por otra parte en las hembras se muestra una

interacción positiva en los dos niveles de pH, sin embargo éstas asimilan mejor el TCS cuando se encontraban expuestas a pH 9.

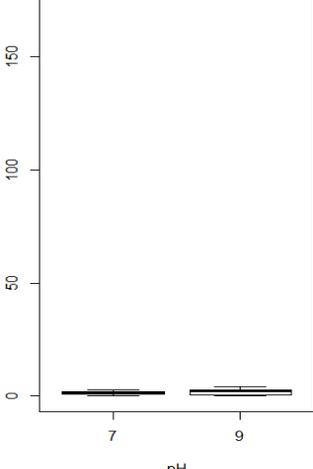
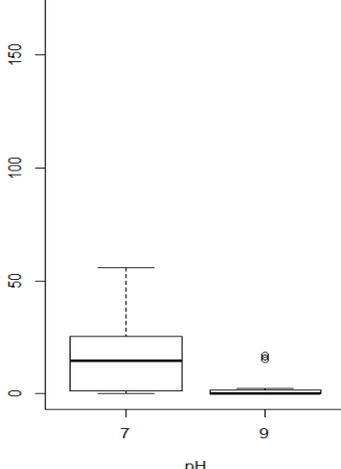
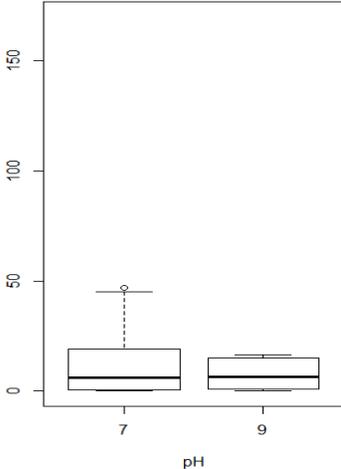


5.5.3 Análisis de TCS en el día 8 de exposición de los peces al contaminante a 50 µg/L, 120 µg/L y 190 µg/L.

En la figura 78 se observa el diagrama de cajas en la última medición, observándose concentraciones más altas en los tratamientos que se encontraban expuestos a pH 9 y niveles más bajos de concentración de TCS en los tratamientos expuestos a pH 7. En la figura 79 se observa que las concentraciones de TCS en agua al final de los tratamientos 2, 5, 8 y 11 a pH 7 son altas respecto a los de pH 9, sin embargo las concentraciones de TCS en el agua se redujeron significativamente en cada tratamiento de tal forma que se evidencia una acumulación de TCS en los peces evaluados, tal y como demuestra en ensayos realizados con caracoles expuestos a

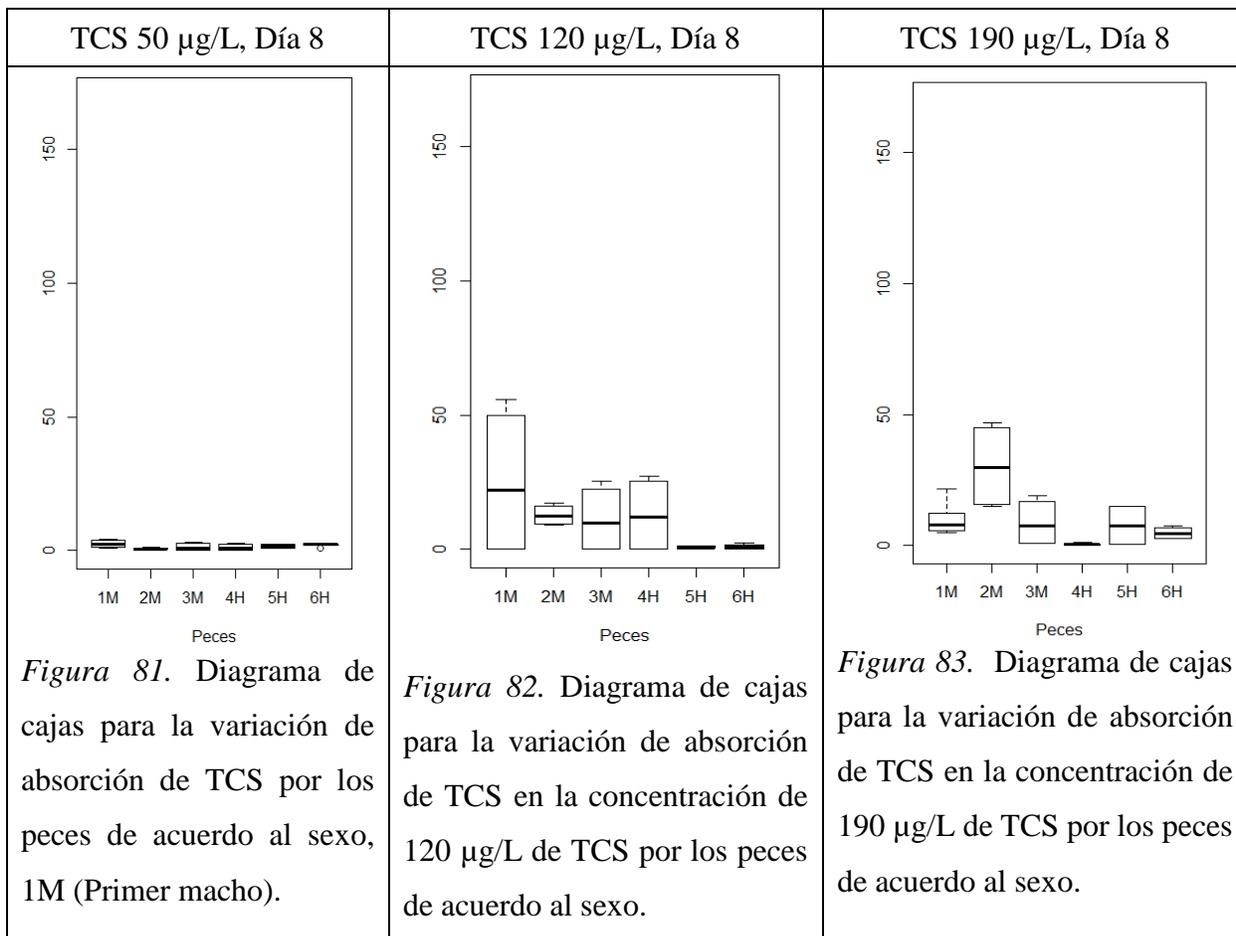
concentraciones de TCS de 100 ng/L comprobándose que la concentración de TCS en estos organismos fue 10 veces mayor (Coogan, et al., 2008).

Por último en los tratamientos 3, 6, 9 y 12 como se observa en la figura 80, la diferencia entre las medias de los niveles de pH no es significativa, y tienen un comportamiento similar.

TCS 50 µg/L, Día 8	TCS 120 µg/L, Día 8	TCS 190 µg/L, Día 8
		
<p><i>Figura 78.</i> Diagrama de cajas para la variación de la concentración de TCS con cada nivel de pH (7 y 9), a 50 µg/L de TCS.</p>	<p><i>Figura 79.</i> Diagrama de cajas para la variación de la concentración de TCS con cada nivel de pH (7 y 9), a 120 µg/L de TCS.</p>	<p><i>Figura 80.</i> Diagrama de cajas para la variación de la concentración de TCS con cada nivel de pH (7 y 9), a 190 µg/L de TCS.</p>

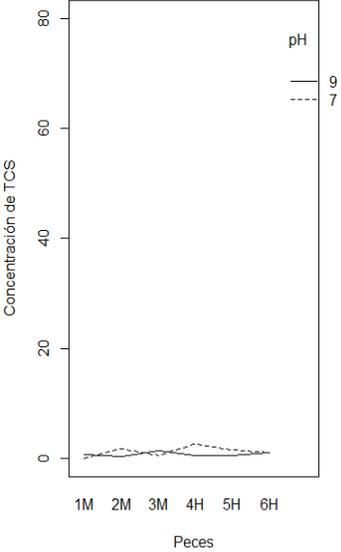
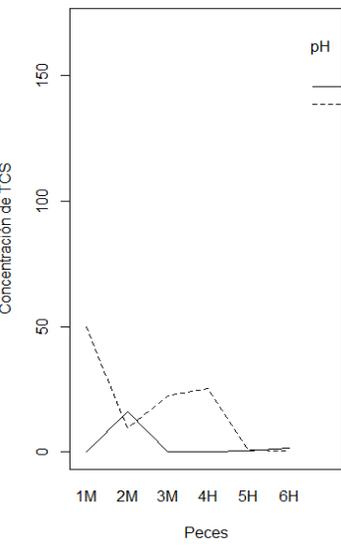
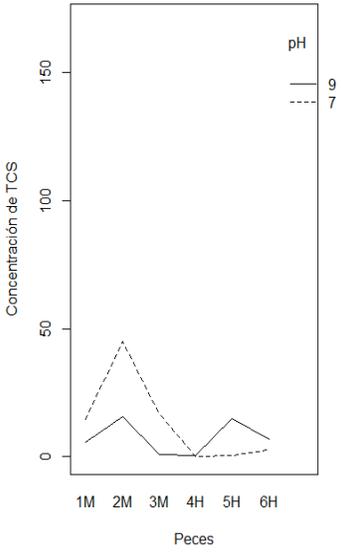
En el análisis factorial de los tratamientos se evidencia en la concentración de 50 µg/L (Figura 81) que no se conserva un patrón similar a las mediciones anteriores en cuanto a la asimilación del contaminante por machos y hembras, por ejemplo, el macho 1 mantuvo la concentración más alta respecto a sus otros referentes, de igual forma la hembra 1 mantuvo una concentración más baja de TCS respecto a las otras hembras analizadas.

Para las figuras 82 y 83, en la medición 3 a 120 y 190 $\mu\text{g/L}$, ninguna manifiesta un patrón de comportamiento similar respecto a las hembras y los machos en contraste con el análisis realizado en las mediciones anteriores, al parecer los peces a medida que pasan los días de exposición al contaminante, el metabolismo se comporta diferente de acuerdo a la incidencia que tenga el contaminante en las funciones vitales de cada uno de los organismos.



En la figura 84 se observa la interacción entre los factores analizados, de tal forma, el primer macho del tratamiento 1 expuesto a pH 7 presentó una concentración más baja en la tercera medición respecto al macho del tratamiento 7 a pH 9, ya que éste tuvo una concentración más alta de TCS en el agua en el octavo día de exposición al contaminante respondiendo a la disminución de la concentración que se observó en la medición del día 4. Sin embargo, el macho 2 expuesto a

pH 9 asimiló la concentración de TCS en mayor medida que el macho que estuvo expuesto a pH 7, y para el tercer macho, a ambos niveles de pH presentó el mismo comportamiento que los primeros machos que se presentan en la gráfica. Para las hembras, en general tuvieron menor asimilación de TCS a pH 9 en el octavo día de exposición, sin embargo, uno de los peces hembra tuvo un comportamiento contrario.

TCS 50 µg/L, Día 8	TCS 120 µg/L, Día 8	TCS 190 µg/L, Día 8
		
<p><i>Figura 84.</i> Interacción entre los niveles de pH y los peces a 50 µg/L de TCS.</p>	<p><i>Figura 85.</i> Interacción entre los niveles de pH y los peces a 120 µg/L de TCS.</p>	<p><i>Figura 86.</i> Interacción entre los niveles de pH y los peces a 190 µg/L de TCS.</p>

En la figura 85 se observa que para las hembras a la concentración de TCS de 120 µg/L, en la medición del día octavo los niveles de TCS en el agua no fueron detectables en el UPLC MS/MS a un nivel de pH 9, pero a pH 7, el agua presentó una concentración detectable de TCS en la última medición. En general, las muestras de agua en la última medición marcaron concentraciones de TCS independiente de los niveles de pH a los que se expusieron.

Las muestras de agua presentaron concentraciones bajas de TCS en las que estaban expuestos los machos a la concentración de 190 µg/L de TCS en la medición del último día de exposición a ambos niveles de pH (Figura 86), sin embargo, para las de agua en las que estaban expuestas las hembras no fueron detectables las concentraciones de TCS a pH 7 pero a pH 9 aún se detectó el TCS.

5.5.4 Análisis estadístico de la variabilidad de TCS en los tratamientos.

Con el fin de evaluar la influencia de los factores y las posibles interacciones entre éstos en el nivel de TCS evaluado para este fin se realizó la tabla el análisis de varianza para analizar la significancia de las fuentes de variación del modelo (tabla 76)

Tabla 75

ANOVA para la variable respuesta nivel de TCS

Fuente de variabilidad	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F_0	valor - p
A: Día	SS_A 13461 6	$a - 1$ 2	MS_A 6730 8	$\frac{MS_A}{MS_E}$ 49228. 1	2 e-16
B: Concentración	SS_B 28005	$b - 1$ 2	MS_B 1400 3	$\frac{MS_B}{MS_E}$ 10241. 4	2 e-16
C: pH	SS_C 1561	$c - 1$ 1	MS_C 1561	$\frac{MS_C}{MS_E}$ 1141.9	2 e-16
AB: Día* Concentración	SS_{AB} 35017	$(a - 1)(b - 1)$ 4	MS_{AB} 8754	$\frac{MS_{AB}}{MS_E}$ 6402.8	2 e-16
AC: Día* pH	SS_{AC} 1273	$(a - 1)(c - 1)$ 2	MS_{AC} 637	$\frac{MS_{AC}}{MS_E}$ 465.7	2 e-16
BC: Concentración * pH	SS_{BC} 403	$(b - 1)(c - 1)$ 2	MS_{BC} 201	$\frac{MS_{BC}}{MS_E}$ 147.3	2 e-16

ABC: Día* Concentración * pH	SS_{ABC}	1014	$(a - 1)(b - 1)(c - 1)$	4	MS_{ABC}	253	MS_{ABC} / MS_E	185.4	2 e-16
Residuales	SS_r	49	$abc(n - 1)$	36	MS_r	1			
Total	SS_T	20193 8	$abcn - 1$	53		9271 8			

De acuerdo al análisis obtenido de la tabla ANOVA se realizó la verificación de hipótesis de la variable motilidad como se muestra en la tabla 77.

Tabla 76

Verificación de hipótesis para motilidad

Factor	Verificación de las hipótesis
A:Día	Para el factor día el $valor - p = 2 e - 16 < 0.05$ por lo que se rechaza H_0 y se acepta H_1 , luego, el efecto del tiempo tiene influencia en la variable de nivel de TCS evaluada en los tratamientos.
B:Concentración (µg/l)	En el factor concentración el $valor - p = 2 e - 16 < 0.05$ por lo que se rechaza H_0 y se acepta H_1 , luego, el efecto de la concentración tiene influencia en la variable de nivel de TCS evaluada en los tratamientos.
C: pH	Tenemos que para el factor concentración el $valor - p = 2 e - 16 < 0.05$ por lo que se rechaza H_0 y se acepta H_1 , luego, el efecto del Ph tiene influencia en la variable de nivel de TCS evaluada en los tratamientos.
Interacción ABC: Día * Concentración* pH	En la interacción entre el factor día, concentración y pH el $valor - p = 2 e - 16 < 0.05$ por lo que se rechaza H_0 y se acepta H_1 , luego, el efecto de la interacción entre día, concentración y pH tiene influencia en la variable nivel de TCS evaluada.
AC: Día* pH	En la interacción evaluada entre el factor día y pH el $valor - p = 2 e - 16 < 0.05$ por lo que se rechaza H_0 y se acepta H_1 , luego, el efecto de la interacción entre día y pH tiene incidencia en la variable nivel de TCS evaluada.
BC: Concentración* pH	Tenemos que para la interacción entre el factor concentración y pH el $valor - p = 2 e - 16 < 0.05$ por lo que se rechaza H_0 y se acepta H_1 , luego, el efecto de la interacción entre

	concentración y pH tiene influencia en la variable nivel de TCS evaluada.
AB: Día* Concentración	Tenemos que para la interacción entre el factor día y concentración el $valor - p = 2 e - 16 < 0.05$ por lo que se rechaza H_0 y se acepta H_1 , luego, el efecto de la interacción entre día y concentración tiene influencia en la variable nivel de TCS evaluada.

5.6 Análisis Vitelogenina en las hembras Tilapia.

Para el análisis de vitelogenina en las hembras Tilapia se utilizó el kit ELISA que permite medir la concentración de Vitelogenina, que fueron expuestas durante una semana a TCS (50 µg/L, 120 µg/L y 190 µg/L) a dos niveles de pH (7 y 9).

Para este fin se realizó una curva con 11 puntos a partir del estándar de vitelogenina de 5 µg VTG/ml, del cual se realizaron diluciones de VTG a niveles de ng/L (Tabla 78).

Tabla 77

Puntos de la curva estándar de VTG

	Concentración de VTG (ng/ml)
1	50
2	25
3	12.5
4	6.25
5	3.13
6	1.56
7	0.78
8	0.39
9	0.20
10	0.10
11	0.05

Para las muestras de óvulos se prepararon dos diluciones 1:50 (se añadió 10 µL de la muestra a 490 µL del buffer) y la última se realizó a 1:5000 (se añadieron 100 µL de la dilución

realizada de 1:50 a 990 μL del buffer). La concentración de vitelogenina estuvo siempre entre los puntos 9 y 11 de la curva planteada, de tal forma se realizó una curva entre el punto 6 y 11.

Para cada uno de los puntos de la curva y para las muestras analizadas se realizó una corrección de los valores de la absorbancia para cada uno de los puntos de la curva y para las muestras analizadas por duplicado (Figura 87).

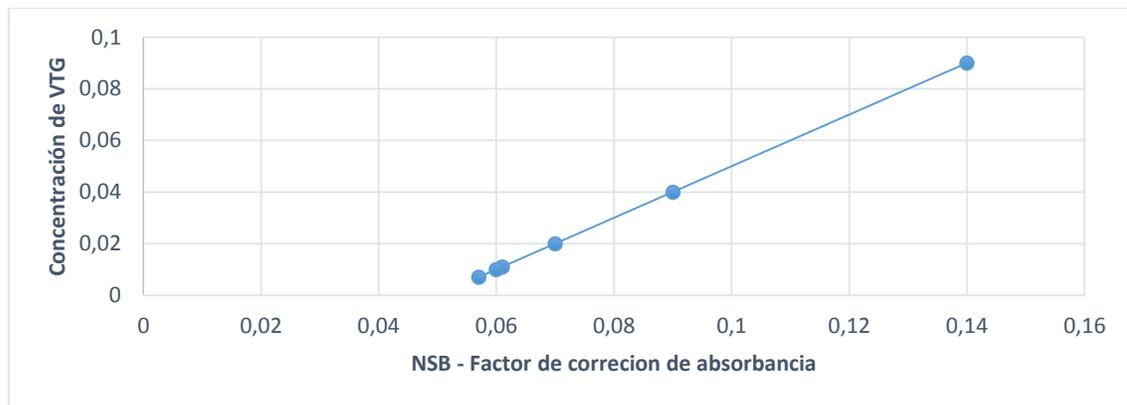
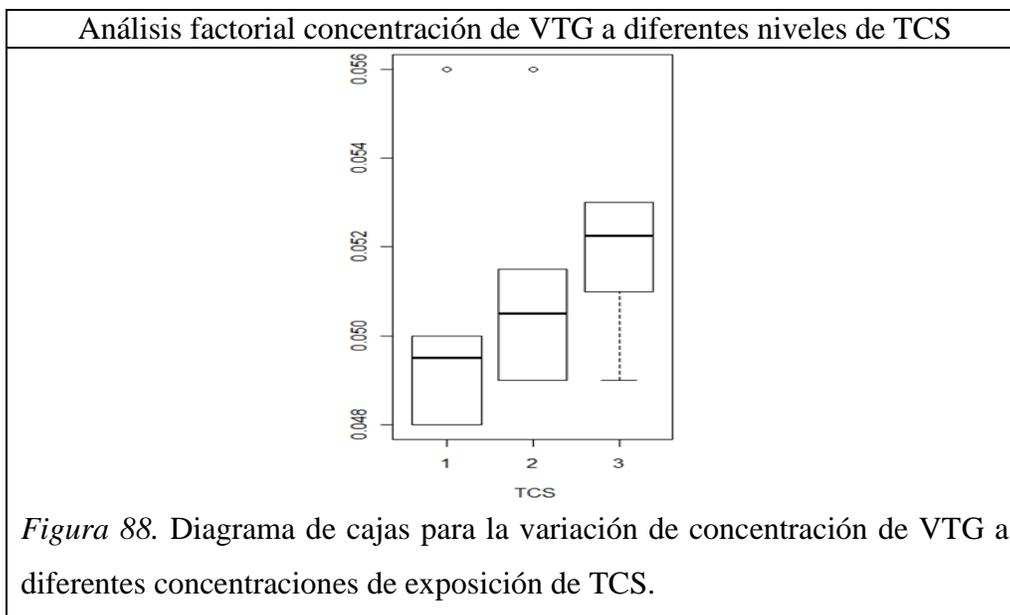


Figura 87. Factor de corrección de absorbancia para la curva del estándar de VTG y las muestras analizadas.

Con el fin de analizar la interacción entre los factores propuestos en el diseño experimental como lo son pH (7 y 9), concentración de TCS (50 $\mu\text{g/L}$, 120 $\mu\text{g/L}$ y 190 $\mu\text{g/L}$) y concentración de Vitelogenina (VTG) se realizó un análisis factorial tanto para los peces hembras blanco como para los peces hembras al primer, cuarto y séptimo día de exposición.

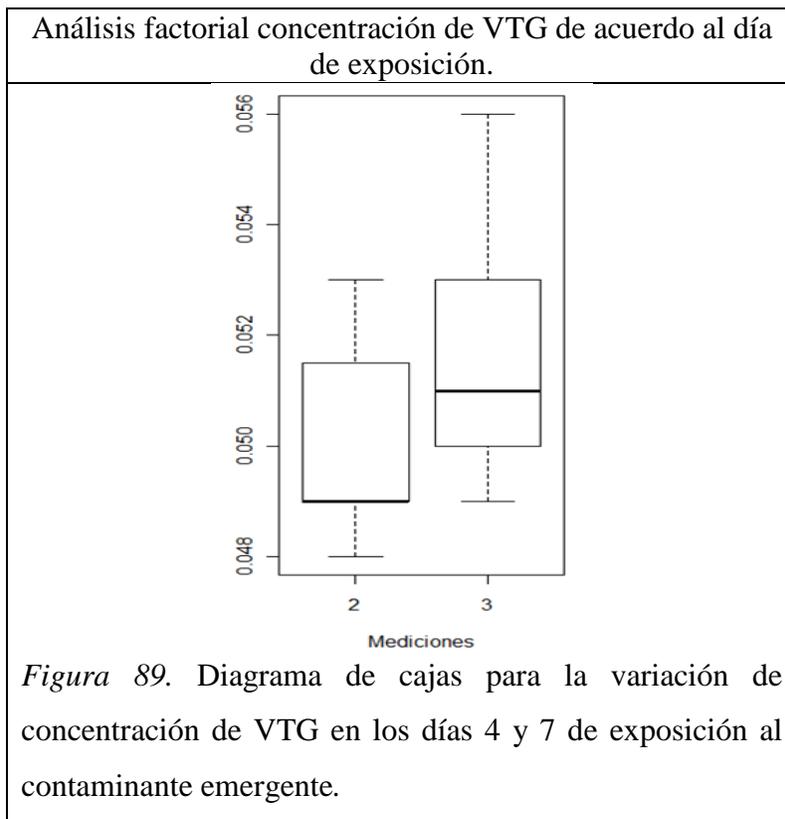
En primer lugar se estudió la influencia de TCS en las hembras para ambos niveles de pH evaluando la concentración de VTG, de esta forma en la figura 88 se observa como en cada uno de los niveles propuestos de TCS varió la concentración de VTG, en consecuencia en el primer nivel (50 $\mu\text{g/L}$ de TCS) la media de concentración de vitelogenina fue 0.05 ng/L de VTG, para el nivel dos (120 $\mu\text{g/L}$ de TCS) aumentó gradualmente a 0.051 ng/L de VTG y para el nivel tres (190 $\mu\text{g/L}$ de TCS) incrementó a 0.052 ng/L de VTG, asimismo en otros resultados se ha demostrado

que cuando los machos de la especie *Oryzias latipes* fueron expuestos a concentraciones de 20 y 100 $\mu\text{g/L}$ durante 21 días la concentración de vitelogenina se incrementó haciendo una función similar al estrógeno en esta especie (Ishibachi, et al., 2004). Al compararse con los peces de la línea base, éstos arrojaron una media de 0.048 ng/L de VTG, y no se reporta diferencia significativa cuando se evaluó la concentración de VTG a peces expuestos a diferentes niveles de pH, ya que los resultados obtenidos son muy similares para los tratamientos propuestos en las hembras. Por lo tanto, se concluye que el aumento de la concentración de VTG es directamente proporcional al aumento de la concentración de TCS en el caso de las hembras, sin embargo, se sugiere evaluar en posteriores estudios éste biomarcador en un tiempo de exposición más largo debido a que el proceso de vitelogénesis en las hembras es más largo que el proceso de espermatogénesis en machos, por ejemplo en otro estudio relocalizado con *Gambusia affinis* expusieron a los individuos a una concentración de TCS de 350 nM el conteo de espermatozoides disminuyó, el hígado creció de tamaño y aumento la síntesis de ARN_m para la síntesis de vitelogenina (Raut, et. al, 2010).



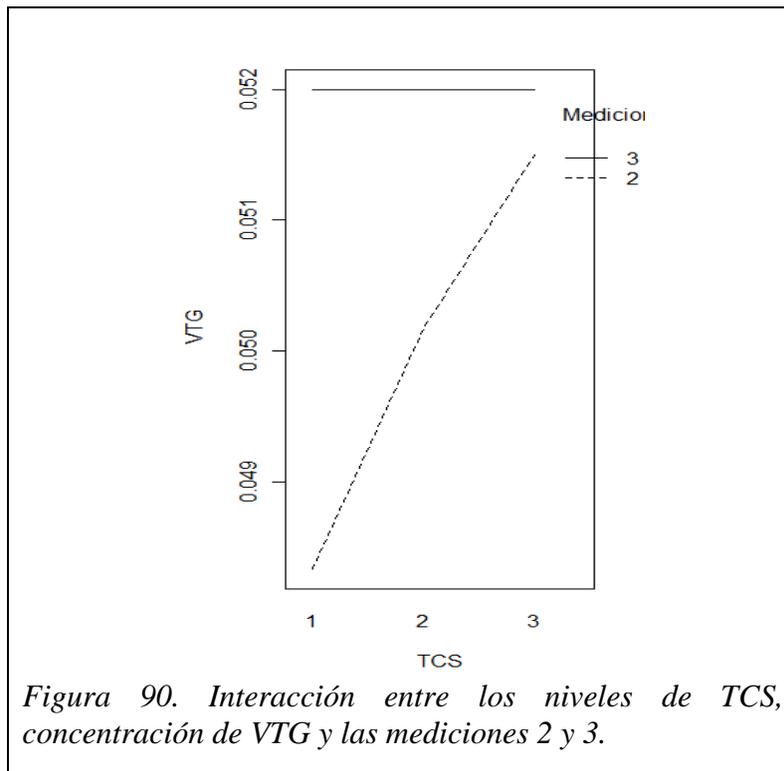
Por otra parte se evaluó como cambió la concentración de vitelogenina cuando se realizaron las mediciones en cada uno de los tratamientos en el cuarto y octavo día de exposición a TCS. En

la figura 89 se observa que para la medición 2 del cuarto día de exposición a los diferentes niveles de TCS es inferior la concentración de VTG a la concentración de TCS para la medición tres cuando los tratamientos estuvieron en el octavo día de exposición, de tal forma el incremento de la concentración de vitelogenina es gradual al tiempo de exposición al contaminante emergente, de igual forma se sugiere evaluar en posteriores estudios la concentración de la proteína en un tiempo más prolongado teniendo en cuenta el proceso de vitelogénesis en las hembras, sin embargo en la evaluación de los efectos del TCS en *Oryzias latipes* durante 21 días no mostro diferencia significativas en el número de huevos producidos y la fertilidad, en los tratamientos de 20 µg/L, 100 µg/L y 200 µg/L (Ishibachi, et al., 2004).



En la figura 90 se muestra el grafico de la interacción entre la concentración de VTG, la concentración de TCS y las mediciones realizadas en las diferentes etapas del tratamiento. Cuando

se realizó la segunda medición al cuarto día de exposición al TCS, la concentración de VTG aumentó gradualmente con el día de exposición como se muestra en la figura 90, y por el contrario, cuando se realizó la tercera medición al octavo día de exposición a TCS en sus diferentes niveles de concentración la concentración de VTG se mantuvo constante, para lo cual se sugiere una fase experimental en éste caso más prolongada con el fin de observar si en el transcurso de los días hay una variabilidad en los resultados proponiendo otras mediciones.



5.6.1 Análisis estadístico de la variable VTG.

Con el fin de evaluar la influencia de los factores y las posibles interacciones entre éstos en la VTG se realizó la tabla el análisis de varianza para analizar la significancia de las fuentes de variación del modelo (Tabla 79).

Tabla 78

ANOVA para la variable respuesta VTG

Fuente de variabilidad	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F_0	valor - p
A: Día	SS_A 81.0	$a - 1$ 2	MS_A 40.52	MS_A / MS_E 0.952	0.396
B: Concentración	SS_B 89.8	$b - 1$ 2	MS_B 44.89	MS_B / MS_E 1.054	0.359
C: pH	SS_C 38.6	$c - 1$ 1	MS_C 38.56	MS_C / MS_E 0.906	0.348
AB: Día* Concentración	SS_{AB} 165.8	$(a - 1)(b - 1)$ 4	MS_{AB} 41.44	MS_{AB} / MS_E 0.973	0.434
AC: Día* pH	SS_{AC} 88.5	$(a - 1)(c - 1)$ 2	MS_{AC} 44.27	MS_{AC} / MS_E 1.093	0.364
BC: Concentración* pH	SS_{BC} 82.7	$(b - 1)(c - 1)$ 2	MS_{BC} 41.35	MS_{BC} / MS_E 0.971	0.388
ABC: Día* Concentración* pH	SS_{ABC} 176.1	$(a - 1)(b - 1)(c - 1)$ 4	MS_{ABC} 44.04	MS_{ABC} / MS_E 1.034	0.403
Residuales	SS_r 1533.1	$abc(n - 1)$ 36	MS_r 42.59		
Total	SS_T 2255	$abcn - 1$ 53			

De acuerdo al análisis obtenido de la tabla ANOVA se realizó la verificación de hipótesis de la variable VTG como se muestra en la tabla 80.

Tabla 79

Verificación de hipótesis para VTG

Factor	Verificación de las hipótesis
A: Día	Para este factor el $valor - p = 0.396 > 0.05$ por lo que se rechaza H_1 y se acepta H_0 , luego el efecto del tiempo no tiene influencia en la variable evaluada de vitelogenina en óvulos.

B: Concentración (µg/l)	Tenemos que para este factor el $valor - p = 0.359 > 0.05$ por lo que se rechaza H_1 y se acepta H_0 , luego el efecto de la concentración no tiene influencia en la variable evaluada de vitelogenina en óvulos.
C: pH	Tenemos que para este factor el $valor - p = 0.348 > 0.05$ por lo que se rechaza H_1 y se acepta H_0 , luego el efecto del pH no tiene influencia en la variable vitelogenina en óvulos.
Interacción ABC: Día * Concentración* pH	Al evaluar esta interacción entre día, concentración y pH el $valor - p = 0.403 > 0.05$ por lo que se rechaza H_1 y se acepta H_0 , luego, el efecto de la interacción evaluada no tiene influencia en la variable evaluada de vitelogenina en óvulos.
AC: Día* pH	Al evaluar esta interacción entre día y pH el $valor - p = 0.364 > 0.05$ por lo que se rechaza H_1 y se acepta H_0 , luego, el efecto de la interacción evaluada no tiene influencia en la variable vitelogenina en óvulos.
BC: Concentración* pH	Tenemos que para este factor el $valor - p = 0.388 > 0.05$ por lo que se rechaza H_1 y se acepta H_0 , luego el efecto de la interacción entre concentración y pH no tiene influencia en la variable vitelogenina en óvulos.
AB: Día* Concentración	Tenemos que para esta interacción de los factores el $valor - p = 0.434 > 0.05$ por lo que se rechaza H_1 y se acepta H_0 , luego el efecto de la interacción entre concentración y tiempo no tiene influencia en la variable vitelogenina en óvulos.

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- Al realizar la evaluación de los gametos de los peces macho de la línea base a los diferentes tratamientos propuestos se evidenció que los peces de la línea base presentan porcentajes de motilidad, vitalidad y morfología acordes a la especie evaluada con porcentajes normales.

- Los peces evaluados durante los tratamientos realizados muestran bioacumulación del contaminante, ya que a través de los tratamientos se observó una disminución significativa del contaminante emergente en el agua y con efectos adversos en la cuantificación de los gametos, así mismo, si los peces con esta acumulación están en la cadena trófica se presenta un proceso de biomagnificación que podría afectar a cualquier organismo que consuma el pez como producto en la cadena alimenticia.

- En la evaluación de espermatozoides en la variable motilidad progresiva se evidenció que el factor tiempo influye en la variable respuesta, a pesar de los niveles de concentración de TCS y niveles de pH propuestos.

- La motilidad no progresiva evaluada en los gametos de machos tilapia influye el tiempo y la variación en los niveles de pH, para lo cual la concentración de TCS no incide en los porcentajes de motilidad no progresiva.

- Para la variable de inmotilidad en los espermatozoides se comprobó que la concentración de TCS incide significativamente en el aumento de células inmóviles teniendo efectos en la posibilidad de fecundación de éstos peces.

- En la evaluación de la vitalidad e integridad de la membrana celular de los espermatozoides se evidenció que los tres factores evaluados: tiempo, pH, y concentración tienen incidencia en el porcentaje de células viables, lo cual incide en el éxito de la reproducción.

- La evaluación morfológica de los espermatozoides expuestos al contaminante muestran aberraciones estructurales superiores al 50% en las muestras analizadas, sin embargo la caracterización espermática impide una correlación directa con la posibilidad de realizar una fertilización debido a las características de las estructuras celulares son heterogéneas en las diferentes células evaluadas.

- Para todos los tratamientos se observa una disminución significativa de células normales, ya que se observa una mayor incidencia en la alteración de la estructura celular a medida que se aumenta la concentración de TCS en cada uno de los tratamientos.

- A medida que se aumenta la concentración de TCS, la concentración de vitelogenina es directamente proporcional a ésta ya que a 50 µg/L de TCS se aprecia que la media de la concentración de vitelogenina fue 0.05 ng/L de VTG, para el nivel 120 µg/L de TCS la concentración aumentó gradualmente a 0.051 ng/L de VTG y a 190 µg/L de TCS fue 0.052 ng/L de VTG. Si se compara con los peces de la línea base, éstos arrojaron una media de 0.048 ng/L de VTG la cual es inferior a los obtenidos a través de las mediciones realizadas.

- La concentración de VTG se incrementó proporcionalmente a medida que estaba expuesta a diferentes concentraciones de TCS y al tiempo de exposición, sin embargo, se sugiere evaluar la concentración de la proteína en un tiempo más prolongado teniendo en cuenta que el proceso de vitelogénesis es más prolongado en las hembras que en los machos.

- La concentración de VTG aumentó proporcionalmente en la segunda medición cuando se evaluó a los peces al cuarto día de exposición al contaminante a medida que la concentración de TCS se fue incrementando.

- La concentración de VTG en los peces se mantuvo constante cuando se realizó la tercera medición en los tratamientos al octavo día de exposición a TCS, por lo cual se sugiere un tiempo de exposición más prolongado con el fin de analizar la variabilidad de VTG respecto al tiempo y los niveles de concentración de TCS propuestos en la fase experimental.

- Al considerarse la tilapia de alto consumo por su contenido nutricional y beneficios al ser humano se deben implementar medidas de regulación en el uso del contaminante emergente TCS en productos de aseo personal que eviten la contaminación frecuente a las fuentes hídricas y por ende evitar efectos de bioacumulación y biomagnificación en la cadena trófica que tengan incidencia en la disrupción endocrina en las matrices acuáticas.

7. REFERENCIAS

Acero, Juan. (2010). Retention of emerging micropollutants from UP water and a municipal secondary effluent by ultrafiltration and nanofiltration. *Chemical Engineering Journal*, 163, 264-272.

Acero, Juan. (2012). Coupling of adsorption, coagulation, and ultrafiltration processes for the removal of emerging contaminants in a secondary effluent. *Chemical Engineering Journal*, 210, 1-8.

Adolfsson-Erici M, Pettersson M, Parkkonen J, Sturve J. (2002). Triclosan, a commonly used bactericide found in human milk and in the aquatic environment in Sweden. *Chemosphere* 46, 1485.

Aranami, K., y Readman, J. W. (2007). Photolytic degradation of triclosan in freshwater and seawater. *Chemosphere*, 66(6). <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.07.010>

Arroyo V., Vergara J. (2010). Efectos de la proporción ovocitos-semen fresco y crioconservado en la reproducción de bocachico (*Prochilodus magdalenae*). *Memoria de título*, Programa de Acuicultura, Departamento de Ciencias Acuícolas, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de Córdoba, Montería, Colombia.

Autoridad Nacional de Acuicultura y pesca. (2015). Evaluación del efecto de cuatro niveles de la hormona 17 α metil testosterona durante la fase de reversión sexual en larvas de tilapia roja *Oreochromis spp* en la estación piscícola del Repelón. <http://www.aunap.gov.co/wp-content/uploads/2016/10/15-INFORME-FINAL-TRES-DIETAS.pdf>

Balmer, M. E., Poiger, T., Droz, C., Romanin, K., Bergqvist, P. A., Muller, M. D. y Buser, H. (2004). Occurrence of methyl triclosan a transformation product of the bactericide triclosan, in fish from various lakes in Switzerland. *Environmental science and technology*, 38, 390-395.

Bhandari R. K., Taniyama S., Kitahashi T., Ando H., Yamauchi K., Zohar Y., Ueda H. y Urano A. (2003). Seasonal changes of responses to gonadotropin-releasing hormone analog in expression of growth hormone/prolactin/somatolactin genes in the pituitary of masu salmon. *General and comparative endocrinology*, 130, 55-63.

Billard, R. (1998). Artificial insemination and gamete management in fish. *Marine Behavior and physiology*, 3-21

Batten, T. F. C., y Ingleton P. M. (Ed.). (1987). *Fundamentals of Comparative Vertebrate Endocrinology: The hypothalamus and the pituitary gland*. New York: Plenum Press, 285-409.

Bearden, H.J. y Funquay J.W. (Ed.). (1982). *Reproducción animal aplicada*. México: Manual Moderno, 358.

Benitez, J. (Ed.).(1992). *Estructura histológica de la gónada de los teleósteos. Temas actuales sobre reproducción de teleósteos*. México: SEPESCA-UAM, 1322.

Bester, K. Triclosan in a sewage treatment process balances and monitoring data. *Water research*, 37, 3891.

Breton, B., Weil C., Jalabert B. y Billard R. (1972). Activité réciproque des facteurs hypothalamiques de Bélier (*Ovis aries*) et des poissons téléostéens sur la sécrétion in vitro des hormones gonadotropes c-HG et LH respectivement par des hypophyses de carpe et de bélier. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, serie III* 274, 2530-2533.

Brodin T., Fick J., Jonsson M. y Klaminder J. (2013). Dilute concentrations of a psychiatric drug alter behavior of fish from natural populations. *Science*, 339, 814-815. 10.1126/science.1226850.

Burgus, R., Butcher M., Ling N., Monahan M., Rivier J., Fellows R., Amoss M., Blackwell R., Vale W., Guillemin R. (1971). Molecular structure of the hypothalamic factor (LRF) of ovine origin monitoring the secretion of pituitary gonadotropic hormone of luteinization (LH). *Comptes Rendus Hebdomadaires Des Seances De l'Academie Des Sciences. Serie D: Sciences Naturelles*, 273, 1611-1613.

Campbell, C. M. y Idler D. R. (1980). Characterization of an estradiol-induced protein from rainbow trout serum as vitellogenin by the composition and radioimmunological crossreactivity to ovarian yolk fractions. *Biology Reproductive*, 22, 605-617.

Carrillo, M., Zanuy S., Prat F., Serrano R. y Bromage N.R. (Ed.). (1993). *Recent Advances in Aquaculture: Environmental induction of spawning in sea bass*. Oxford, 43-54.

Carrillo, M., Zanuy S., Prat F., Cerdá J., Ramos J., Mañanós E. y Bromage N. (Eds.). (1995). *Broodstock Management and Egg and Larval Quality*. Oxford, 138-168.

Carrillo, M., Zanuy S., Molés G., Felip A., Muriach B., Mañanós E., Cerdáreverter J. M., Begtashi I. y Rodríguez L. (2007). *Avanços em Endocrinologia Comparativa Vol.III: Avances en la regulación hormonal de la diferenciación sexual y de la pubertad de la lubina europea*. Portugal: CCMAR- Univ. Algarve, 47-54.

Castillo, L.F. (Ed.). (1994). *Historia genética y cultivo de la tilapia roja*. Cali, Colombia: Editorial Ideal, 330.

Conn, P.M. y CROWLEY W.F. (1994). Gonadotropin-releasing hormone and its analogs. *Annual Review of Medicine*, 45: 391-405.

Coogan, M, A., Edziyie, R. E., La Point, T. W. y Venables B. J. (2007). Algal bioaccumulation of triclocarban, triclosan and methyl-triclosan in a North Texas wastewater treatment plant receiving stream. *Chemosphere* 67, 1911-1918.

Cruz, I., Colmenares, M., Berrueta, L., Gómez, R., Montes, H. y Salmen S. (2010). Evaluation of the quality of the human spermatozoon: comparison between spermatid DNA integrity and semen variables. *Investigación Clínica*, 51, 87-99.

De Rooij, D. G., y Russell, L. D. (2000). All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *Journal of Andrology*, 21(6).

DeLorenzo, M. E., Keller, J. M., Arthur, C. D., Finnegan, M. C., Harper, H. E., Winder, V. L. y Zdankiewicz, D. L. (2008). Toxicity of the antimicrobial compound triclosan and formation of the metabolite methyl - triclosan in estuarine systems. *Environmental of toxicology*, 23, 224-232.

Den Hond, E., Tournaye, H., De Sutter, P., Ombelet, W., Baeyens, W., Covaci, A., ... D'Hooghe, T. (2015). Human exposure to endocrine disrupting chemicals and fertility: A case-control study in male subfertility patients. *Environment International*, 84. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.07.017>

De Vlaming, L. V., Wiley, S. H., Delahanty, G. y Wallace R. A. (1980). Goldfish (*Carassius auratus*) vitellogenin: Induction, isolation, properties and relationship to yolk proteins. (1980). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 67(4), 613–623. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(80\)90422-8](https://doi.org/10.1016/0305-0491(80)90422-8)

Dhillon, G. S., Kaur, S., Pulicharla, R., Brar, S. K., Cledón, M., Verma, M., y Surampalli, R. Y. (2015). Triclosan: Current status, occurrence, environmental risks and bioaccumulation potential. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12(5). <https://doi.org/10.3390/ijerph120505657>

Dickey, J.T., y Swanson P. (2000). Effects of salmon Gonadotropin-Releasing Hormone on follicle stimulating hormone secretion and subunit gene expression in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *General and comparative endocrinology*, 118, 436-449.

Donovan, B.T. y Harris G.W. (1954). Effect of pituitary stalk section lightinduced oestrus in the ferret. *Nature*, 174, 503-504.

FAO. (2016). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2016*. Roma, 224. <http://www.fao.org/3/a-i5555s.pdf>

Flores E., Lobo A., Chelhod M., Rojas L., Salazar L., Albarado L. (2012). Motilidad y morfología espermática, en estudiantes de la Universidad de Oriente. *Revista de obstetricia y ginecología de Venezuela*, 72, 52-7.

Forgacs, A. L., Ding, Q., Jaremba, R. G., Huhtaniemi, I. T., Rahman, N. A., y Zacharewski, T. R. (2012). BLTK1 murine leydig cells: A novel steroidogenic model for evaluating the effects of reproductive and developmental toxicants. *Toxicological Sciences*, 127(2). <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfs121>

Gandini, L., Lombardo, F., Paoli D., Caponecchia, L., Familiari, G., Verlengia, C., Dondero F. y Lenzi, A. (2000). Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. *Human reproduction*, 15(4), 830-839.

Gómez, J. M., Weil C., Ollitrault M., Le Bail P.Y., Breton B. y Le Gac F. (1999). Growth hormone (GH) and gonadotropin subunit gene expression and pituitary and plasma changes during spermatogenesis and oogenesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *General and comparative endocrinology*, 113, 413-428.

Goodbred, S. L., Patiño, R., Torres, L., Echols, K. R., Jenkins, J. A., Rosen, M. R., y Orsak, E. (2015). Are endocrine and reproductive biomarkers altered in contaminant-exposed wild male Largemouth Bass (*Micropterus salmoides*) of Lake Mead, Nevada/Arizona, USA? *General and Comparative Endocrinology*, 219. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2015.02.015>

Habibi, H.R. y Pati D. (1993). Extrapituitary gonadotropin-releasing hormone (GnRH) binding sites in goldfish. *Fish Physiology Biochemistry*, 11, 43-49.

Hale, R. C., Smith, C. L. (1996). A multi - residue approach for trace organic pollutants: application to effluents and associated aquatic sediments and biota from southern Chesapeake Bay drainage basin. *International journal of environmental and analytical chemistry*, 64, 21-33.

Hansch, C. y Dunn W. (1972). Linear relationships between lipophilic character and biological activity of drugs. *Journal of pharmaceutical science*, 61.

Hirsch, R., Ternes, T., Haberer, K., y Kratz, K.-L. (1999). Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *Science of The Total Environment*, 225(1-2), 109-118.

[https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(98\)00337-4](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(98)00337-4)

Honkisz, E., Zieba-Przybylska, D., y Wojtowicz, A. K. (2012). The effect of triclosan on hormone secretion and viability of human choriocarcinoma JEG-3 cells. *Reproductive Toxicology*, 34(3). <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2012.05.094>

Ho, S. (Ed.). (1987). *Endocrinology of vitellogenesis. Hormones and reproduction in fishes, amphibians and reptiles*. New York: Plenum Press, 145169.

Hontela, A., y Habibi, H. R. (2013). *Personal Care Products in the Aquatic Environment: A Case Study on the Effects of Triclosan in Fish. Fish Physiology* (Vol. 33). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398254-4.00008-X>

Hori, S. H., Kodoma, T. y Tanahashi K. (1979). Induction of vitellogenin synthesis in goldfish by massive doses of androgens. *General and Comparative Endocrinology*, 37, 306-320.

Houtman C. J., Van Ostveen A. M., Brouwer A., Lamoree M. H. y Legler, J. *Environmental Science Technology*, 38, 6415.

Ishibashi, H., Matsumura, N., Hirano, M., Matsuoka, M., Shiratsuchi, H. Ishibashi, Y., Ishibashi, Y., Takao, Y. y Arizono K. (2004). Effects of triclosan on the early life stages and reproduction of mekada *Oryzias latipes* and induction of hepatic vitellogenin. *Aquatic toxicology*, 67, 167-179.

Khakoo, Z., Bhatia A., Gedamu L. y Habibi H. R. (1994). Functional specificity for salmon gonadotropin releasing hormone (GnRH) and chicken GnRH-II coupled to the gonadotropin release and subunit messenger ribonucleic acid level in the goldfish pituitary. *Endocrinology*, 134, 838-847.

Instituto Colombiano de desarrollo rural (Incoder). (2006). Guía práctica de piscicultura en Colombia.<file:///C:/Users/SYLVIAM/Desktop/documentos%20marco%20teorico%20tilapia/Guia-Practica-de-Piscicultura-en-Colombia%20tilapia.pdf>

Jalabert, B. (1976). In vitro oocyte and maturation and ovulation in rainbow trout (*Salmo gairdnerii*), Northern Pike (*Esox lucius*), and goldfish (*Crassius auratus*). *Journal of the fisheries research board of Canada*, 33 (4), 974 - 988.

Jamieson, B. G. M. y Leung, L. K. P. (1991). *Fish Evolution and Systematics: Evidence from Spermatozoa. Introduction to fish spermatozoa and the micropyle*. Cambridge: Editorial Cambridge University Press, 319.

Kah, O., Anglade, I., Leprêtre E., Dubourg P. y De Monbrison D. (1993). The reproductive brain in fish. *Fish Physiology and Biochemistry*, 11, 85-98.

Kah, O., Danger J.M., Dubourg P., Pelletier G., Vaudry H. y Calas A. (1989). Characterization, cerebral distribution and gonadotropin-release activity of neuropeptide Y (NPY) in the goldfish. *Fish Physiology and Biochemistry*, 7, 69-76.

Kah, O., Dulka J. G., Dubourg P., Thibault J. y Peter R.E. (1987). Neuroanatomical substrate for the inhibition of gonadotropin secretion in goldfish: existence of a dopaminergic preoptico-hypophyseal pathway. *Neuroendocrinology*, 45, 451-458.

Kah, O., Trudeau V.L., Sloley B.D., Duborg P., Chang J.P., Yu K.L. y Peter R.E. (1992). Involvement of GABA in the neuroendocrine regulation of gonadotrophin release in the goldfish. *Neuroendocrinology*, 55, 396-404.

Kawauchi, H., Suzuki, K., Itoh, H., Swanson, P., Naito, N., Nagahama, Y., Nozaki, M, Nakai, Y. y Itoh, S. (1989). The duality of teleost gonadotropins. *Fish Physiology and Biochemistry*, 7, 29-38.

Kolpin, D. W., Furlong, E. T., Meyer, M. T., Thurman, E. M., Zaugg, S. D., Barber, L. B., y Buxton, H. T. (2002). Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: A national reconnaissance. *Environmental Science and Technology*, 36(6). <https://doi.org/10.1021/es011055j>

Komatsu, M., Matsumotoand, W. y Hayashi S. (1996). Protease activity appealed after trypsin treatment of the purified vitellogenin from Eel *Anguilla japonica*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 113 (3), 561-571.

Kubitza F. (2009). Producción de Tilapias en estanques excavados en tierra; estrategias avanzadas en manejo. *Panorama de acuicultura*. http://www.minagri.gob.ar/site/pesca/acuicultura/01=cultivos/01especies/_archivos/000008Tilapia/100331_Producci%C3%B3n%20de%20tilapia%20en%20estanques%20excavados%20en%20tierra.pdf

Kumar, V., Chakraborty, A., Kural, M. R., y Roy, P. (2009). Alteration of testicular steroidogenesis and histopathology of reproductive system in male rats treated with triclosan. *Reproductive Toxicology*, 27(2). <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2008.12.002>

Kruger, T. F., Menkveld R., Stander FSH, Lombard C. J., Van der Merwe J. P., Van Zyl J. A. y Smith K. (1986). Sperm morphologic features as a pronostic factor in vitro fertilization. *Fertil*

steril, 46, 1118 - 1123

Lahnsteiner, F. (2000). Semen cryopreservation in the Salmonidae and in the Northern pike. *Aquaculture research*, 31, 245-258.

Lan, Z., Kim, T. H., Bi, K. S., Chen, X. H., y Kim, H. S. (2015). Triclosan exhibits a tendency to accumulate in the epididymis and shows sperm toxicity in male sprague-dawley rats. *Environmental Toxicology*, 30(1). <https://doi.org/10.1002/tox.21897>

Lin, D., Li, Y., Zhou, Q., Xu, Y., y Wang, D. (2014). Effect of triclosan on reproduction, DNA damage and heat shock protein gene expression of the earthworm *Eisenia fetida*. *Ecotoxicology*, 23(10). <https://doi.org/10.1007/s10646-014-1320-9>

Marshall, J.C., Shakespear R.A. y Odell W.D. (1976). LHRH-pituitary plasma membrane binding: the presence of specific binding sites in other tissues. *Clinical Endocrinology*, 5, 671-677.

Martínez-Zapata, M., Aristizábal, C., y Peñuela, G. (2013). Photodegradation of the endocrine-disrupting chemicals 4n-nonylphenol and triclosan by simulated solar UV irradiation in aqueous solutions with Fe(III) and in the absence/presence of humic acids. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 251, 41-49. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2012.10.009>

Mattei, X. y Thiom, O.T. (1993). Acrosome-like in the spermatozoa of teleosteos fish. *Journal of zoology*, 71, 883-888.

Mateos, J., Mañanós E., Carrillo M. y Zanuy S. (2002). Regulation of folliclestimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) gene expression by gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and sexual steroids in the Mediterranean sea bass. *Comparative Biochemistry Physiology: B*, 132, 75-86.

Matsubara, T. y Sawano K. (1995). Proteolytic cleavage of vitellogenin and yolk proteins during vitellogenin uptake and oocyte maturation in barfin flounder (*Verasper moseri*). *The Journal of Experimental Zoology*, 272, 34-45.

Matsuo, H., Baba Y., Nair R.M.G., Arimura A. y Schally A.V. (1971). Structure of the porcine LH- and FSH-releasing hormone. I. The proposed amino acid sequence. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 43, 1334-1339.

Menkveld, R., Wong W. Y., Lombard C. J., Wetzels A. M., Thomas C. M., Merkus H. M., y Steegers - Theunissen R. P. (2001). Semen parameters, including WHO and strict criteria morphology, in a fertile and subfertile population: an effort towards standardization of in-vivo

thresholds. *Human reproduction*, 16, 1165-71.

Mezcua, M., Gómez, M. J., Ferrer, I., Agüera A., Hernández M. D. y Fernández - Alba. (2004). Evidence of 2,7/2.8 - dibenzodichloro- p - dioxin as a photodegradation product of triclosan in water and wastewater samples. *Analytica Chimica Acta*, 524, 241-247.

Ministerio de agricultura y desarrollo rural (MADR), Autoridad Nacional de acuicultura y pesca (AUNAP) y Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). (2014). Plan Nacional para el desarrollo de la acuicultura sostenible en Colombia. <http://aunap.gov.co/wp-content/uploads/2016/04/Plan-Nacional-para-el-Desarrollo-de-la-Acuicultura-Sostenible-Colombia.pdf>

Mommsen, T. P. y Walsh P. J. (Ed.). (1988). *Vitellogenesis and oocyte assembly*. Londres: Academic Press Part A, 11, 347-406.

Moore H, M Akhondi. (1996). Fertilizing capacity of rat spermatozoa is correlated with decline in straight line speed measured by continuous computer-aided sperm analysis. *Journal of Andrology* 17, 50-60.

Nagahama, Y. (1990). Endocrine control of oocyte maturation in teleosts. *Progress in Clinical and Biological Research*, 342, 385- 392.

Nakada, N., Tanishima, T., Shinohara, H., Kiri, K., y Takada, H. (2006). Pharmaceutical chemicals and endocrine disrupters in municipal wastewater in Tokyo and their removal during activated sludge treatment. *Water Research*, 40(17). <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.06.039>

Ng, T. B. y Idler D. R. (1983). Yolk formation and differentiation in teleost fishes. *Fish Physiology*, 9, 373-404.

Nóbrega, R. H., Greebe, C. D., van de Kant, H., Bogerd, J., de França, L. R., y Schulz, R. W. (2010). Spermatogonial stem cell niche and spermatogonial stem cell transplantation in zebrafish. *PLoS ONE*, 5(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012808>

Nuñez, J., Bon, E. y Le Menn F. (1996). Vitellogenin receptors during vitellogenesis in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of experimental zoology*, 274, 163170.

Oliveira, R., Domingues, I., Grisolia, C. K. y Soares, A. M. (2009). Effects of triclosan on zebrafish early - life stages and adults. *Environmental science and pollution Research*, 16, 679-688.

Opresko, L., Wiley, H. S. y Wallace R. (1981). Receptor-mediated binding and internalization of vitellogenin by *Xenopus* oocytes. *The Journal of cell biology A*, 91, 218.

Paul, K. B., Hedge, J. M., Bansal, R., Zoeller, R. T., Peter, R., DeVito, M. J., y Crofton, K. M. (2012). Developmental triclosan exposure decreases maternal, fetal, and early neonatal thyroxine: A dynamic and kinetic evaluation of a putative mode-of-action. *Toxicology*, 300(1–2). <https://doi.org/10.1016/j.tox.2012.05.023>

Pomati, F., y Nizzetto, L. (2013). Assessing triclosan-induced ecological and trans-generational effects in natural phytoplankton communities: A trait-based field method. *Ecotoxicology*, 22(5). <https://doi.org/10.1007/s10646-013-1068-7>

Prat, F., Sumpter J. R. y Tyler C. R. (1996). Validation of radioimmunoassays for two salmon gonadotropins (GTH I and GTH II) and their plasma concentrations throughout the reproductive cycle in male and female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biology Reproduction*, 54, 1375-1382.

Rauty, S. A., y Angus, R. A. (2010). Triclosan has endocrine-disrupting effects in male western mosquitofish, *Gambusia affinis*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29(6). <https://doi.org/10.1002/etc.150>

Rey, Graciela. (2012). *Espermatogénesis, ciclo reproductivo anual y parámetros hematológicos de Cichlasoma dimerus (Teleostei, Perciformes). Efecto de la exposición a 4-tert-octilfenol* (tesis de posgrado). Universidad de Buenos Aires.

Riazy, A. y Fremont L. (1988). Serum vitellogenin and yolk proteolipid complex composition in relation to ovarian growth in rainbow trout *Salmo gairdneri*, (RICH). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 89, 525-529.

Rodríguez, N. J., Bon, E. y Le Menn F. (1996). Vitellogenin receptors during vitellogenesis in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of experimental zoology*, 274, 163170

Sabaliunas, D., Webb, S. F., Hauk, A., Jacob, M. y Eckhoff, W. S. (2003). Environmental fate of triclosan in the river Aire basin, UK. *Water research*, 37, 3145-3154.

Schulz, R. W. y T. Miura. (2002). Spermatogenesis and its endocrine regulation. *Fish Physiology and Biochemistry*, 26, 43- 56.

Schultz, M. M., Bartell, S. E., y Schoenfuss, H. L. (2012). Effects of triclosan and triclocarban, two ubiquitous environmental contaminants, on anatomy, physiology, and behavior of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 63(1). <https://doi.org/10.1007/s00244-011-9748-x>

Sherwood, N., Eiden L., Brownstein M., Spiess J., Rivier J., y Vale W. (1983). Characterization of a teleost gonadotropin-releasing hormone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80, 2794-2798.

Specker, J. L. y Sulliang C. V. (1994). Vitellogenesis in fish: status and perspectives. *Perspectives in Comparative Endocrinology*, 304-315.

Swanson, P. (Ed.). (1991). *The Fourth International Symposium on the Reproductive physiology of fish: Salmon gonadotropins: Reconciling old and new ideas*. United Kingdom: Department of animal and plant sciences University of Sheffield, 2-7.

Tabares C. J., Tarazona A., Olivera A. (2005). Fisiología de la activación del espermatozoide en peces de agua dulce. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 18, 149-161.

Trudeau, V. L. (1997). Neuroendocrine regulation of gonadotrophin II release and gonadal growth in the goldfish, *Carassius auratus*. *Reproduction*, 2, 55-68.

Tyler, CH. R. y Sumpter J. P. (1990). The purification and partial characterization of carp, *Cyprinus carpio*, vitellogenin. *Fish Physiology and Biochemistry*, 8, 111-120.

Universidad CES. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia., S., Salas Villalva, J., Reza Gaviria, L., Espinosa Araujo, J., & Atencio-García, V. (2015). *CES medicina veterinaria y zootecnia. CES Medicina Veterinaria y Zootecnia* (Vol. 10). Universidad CES, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Retrieved from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1900-96072015000200004&lng=en&nrm=iso&tlng=es

Universidad de Córdoba (Colombia). Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia., J., Medina-Robles, V., & Cruz-Casallas, P. (2011). *Revista MVZ Córdoba. Revista MVZ Córdoba* (Vol. 16). Universidad de Córdoba. Retrieved from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-02682011000100009&lng=en&nrm=iso&tlng=es

Valters, K., Li, H., Alae, M., D'Sa, I., Marsh, G., Bergman, A. y Letcher, R. J. (2005). Polybrominated diphenyl ethers and hydroxylated and methoxylated brominated and chlorinated analogues in the plasma of fish from the Detroit River. *Environmental Science and technology*, 39, 5612-5619.

Veldhoen, N., Skirrow, R. C., Osachoff, H., Wigmore, H., Clapson, D. J., Gunderson, M. P., ... Helbing, C. C. (2006). The bactericidal agent triclosan modulates thyroid hormone-

associated gene expression and disrupts postembryonic anuran development. *Aquatic Toxicology*, 80(3). <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.08.010>

Verreth, J., Storch, V., y Segner, H. (1987). A comparative study on the nutritional quality of decapsulated *Artemia* cysts, micro-encapsulated eng diets and enriched dry feeds for *Clarias gariepinus* (Burchell) larvae. *Aquaculture*, 63(1–4), 269–282. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(87\)90078-0](https://doi.org/10.1016/0044-8486(87)90078-0)

Waagboe, R. y Sandnes K. (1988). Determination of vitellogenin in serum of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) by high-performance gel permeation chromatography. *Journal of Chromatography*, 427, 138-143.

Wallace, R. A. y Selman K. (1985). Major changes during vitellogenesis and maturation of *Fundulus heteroditus* oocytes. *Developmental Biology*, 110, 492-498.

Wang, L., Asimakopoulos, A. G., y Kannan, K. (2015). Accumulation of 19 environmental phenolic and xenobiotic heterocyclic aromatic compounds in human adipose tissue. *Environment International*, 78, 45–50. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.02.015>

Weber, G.M., Powell J.F.F., Park M., Fischer W.H., Craig A.G., Rivier J.E., Nanakorn U., Parhar I.S., Ngamvongchon S., Grau E.G., y Sherwood N.M. (1997). Evidence that gonadotropin releasing hormone (GnRH) functions as a prolactin releasing factor in a teleost fish (*Oreochromis mossambicus*) and primary structure for three native GnRH molecules. *Journal of Endocrinology*, 155, 121-132.

Yaron, Z., Gur G., Melamed P., Rosenfeld H., Elizur A. y Levavi – Sivan B. (2003). Regulation of fish gonadotropins. *International review of cytology*, 225,131-185.

Yu, K.L., He M.L., Chik C.C., Lin X.W., Chang J.P. y Peter R.E. (1998). mRNA expression of gonadotropin-releasing hormones (GnRHs) and GnRH receptor in goldfish. *General and comparative endocrinology*, 112, 303-311.

Zanuy, S. y Carrillo M. (1987). La reproducción de los teleósteos y su aplicación en acuicultura. *Reproducción en Acuicultura*, 1-56.

Zohar, Y. y Mylonas C.C. (2001). Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. *Aquaculture*, 197, 99-136.