

**EVALUACIÓN IN VITRO DEL EFECTO DEL MERCURIO SOBRE LA
MOVILIDAD Y VELOCIDAD ESPERMÁTICA INDIVIDUAL DE LA BARBILLA
(*Rhamdia sebae* c.f)**

NANCY PATRICIA DELGADO CARATAR

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
PROGRAMA DE INGENIERÍA EN PRODUCCIÓN ACUÍCOLA
PASTO - COLOMBIA
2009**

**EVALUACIÓN IN VITRO DEL EFECTO DEL MERCURIO SOBRE LA
MOVILIDAD Y VELOCIDAD ESPERMÁTICA INDIVIDUAL DE LA BARBILLA
(*Rhamdia sebae* c.f)**

NANCY PATRICIA DELGADO CARATAR

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar el título de
Ingeniero en Producción Acuícola**

**Director.
YOHANA MARÍA VELASCO SANTAMARÍA
MV, MRes, cPhD**

**Codirectores.
VÍCTOR MAURICIO MEDINA ROBLES
MVZ, MSc**

**ARIEL EMIRO GOMEZ CERÓN
Especialista, BIÓLOGO MARINO**

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
PROGRAMA DE INGENIERÍA EN PRODUCCIÓN ACUÍCOLA
PASTO - COLOMBIA
2009**

“Las ideas y conclusiones aportadas en esta tesis de grado son responsabilidad exclusiva de los autores”

Artículo 1º del acuerdo 324 del 11 de octubre de 1966 emanado del Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

Nota de aceptación

YOHANA MARÍA VELASCO SANTAMARÍA
Director de Tesis

VICTOR MAURICIO MEDINA ROBLES
Codirector de Tesis

ARIEL EMIRO GÓMEZ CERÓN
Codirector de Tesis

WILMER RENÉ SANGUINO ORTIZ
Jurado Delegado

BOLÍVAR LAGOS
Jurado

San Juan de Pasto, Junio del 2009

AGRADECIMIENTOS

La autora expresa sus más sinceros agradecimientos a:

Yohana María Velasco Santamaría	M.V, MRes, cPhD. Investigadora Universidad del Sur de Dinamarca, Dinamarca.
Víctor Mauricio Medina Robles	M.V.Z., MSc. Profesor Universidad de los Llanos.
Ariel Emiro Gómez Cerón	Biólogo Marino, Esp. Profesor tiempo ocasional. Universidad de Nariño.
Wilmer Rene Sanguino Ortiz	Ingeniero en Producción Acuícola. Director Departamento de Recursos Hidrobiológicos.
Bolívar Lagos.	Médico Veterinario. Profesor Universidad de Nariño
Dr. Pablo Emilio Cruz Casallas	Director del Instituto de Acuicultura de los Llanos. Profesor titular Universidad de los Llanos.
Dr. Jorge Nelson López Macías	Profesor titular de la Universiada de Nariño.
Marco Antonio Imúez Figueroa.	Asesor Trabajos de grado. Profesor Universidad de Nariño.

Luís Alfonso Solarte Portilla

Zootecnista.
Secretario Académico Facultad de
Ciencias Pecuarias.

Piedad Mejía Santacruz

Secretaria del Departamento de
Recursos Hidrobiológicos.
Universidad de Nariño.

Oscar Mejía Santacruz

Economista.
Auxiliar del centro de Documentación
Especializada del Departamento de
Recursos Hidrobiológicos.

A los Ingenieros Claudia Lorena Rodríguez, Luisa Mercedes Mejía, Nelson Germán Delgado, al Programa de Ingeniería en Producción Acuícola de la Universidad de Nariño; el personal que labora en el Instituto de Acuicultura de los Llanos, a la Universidad de los Llanos y a todas las personas que en una u otra forma apoyaron el desarrollo de esta investigación.

Dedico a:

A Dios por darme el regalo de vivir, darme la oportunidad de crecer, de caer para aprender a levantarme y de caminar por sus sendas para ser bendecido.

A mis padres Luis Guillermo Delgado Sánchez y Teresa de Jesús Caratar por su apoyo, confianza, paciencia y amor.

A mis hermanos por su compañía, paciencia y aliento, a Julián por su amor y confianza, a Claudia y Luisa por su optimismo y amistad incondicional.

A todos los amigos y maestros que permanecen en mi vida y van dejando huella para ayudarme a crecer.

NANCY PATRICIA DELGADO CARATAR

*Bienaventurado el hombre que halla la sabiduría,
y obtiene la inteligencia;
Porque su ganancia es mejor que la ganancia de la plata,
y sus frutos más que el oro fino.
Proverbios 2:13,14*

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	19
1. DEFINICIÓN Y DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA	20
2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	21
3. OBJETIVOS	22
3.1 OBJETIVO GENERAL	22
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
4. MARCO TEÓRICO	23
4.1 GENERALIDADES DE LA <i>Rhamdia</i> .	23
4.1.1 Ubicación taxonómica de la especie.	23
4.1.2 Descripción morfológica.	24
4.1.3 Distribución.	24
4.1.4 Hábitos alimenticios.	25
4.1.5 Calidad del agua para el cultivo de <i>Rhamdia</i> .	26
4.2 ASPECTOS REPRODUCTIVOS EN <i>Rhamdia</i> .	26
4.3 MOVILIDAD ESPERMÁTICA EN PECES.	28
4.4 EFECTOS DE CONTAMINANTES AMBIENTALES SOBRE EL SISTEMA REPRODUCTIVO DE LOS PECES.	30
4.5 CONTAMINACIÓN POR METALES PESADOS.	31
4.5.1 Generalidades del mercurio.	32
4.5.2 Transformación del mercurio en el ambiente.	34
4.5.3 Toxicidad del mercurio en los organismos.	38
4.5.4 El mercurio en la reproducción de las especies.	40
4.5.5 Efectos del mercurio sobre la movilidad espermática.	41
4.6 PRINCIPIOS DE METODOLOGÍA TOXICOLÓGICA EXPERIMENTAL.	43
4.6.1 Biotransformación de los medicamentos y tóxicos.	44
4.6.2 Toxicología de los metales pesados.	44
4.7 DETERMINACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS SEMINALES EN PECES.	45
4.7.1 Obtención del semen.	46
4.7.2 Evaluación del semen.	46
4.7.3 Movilidad espermática.	48
4.7.4 Pruebas de fertilidad.	48
4.8 SISTEMA DE ANÁLISIS ESPERMÁTICO ASISTIDO POR COMPUTADOR (CASA).	49
5. DISEÑO METODOLÓGICO.	51
5.1 LOCALIZACIÓN.	51
5.2 INSTALACIONES, EQUIPOS Y MATERIALES.	51
5.2.1 Equipos y utensilios.	51

5.2.2	Productos químicos.	52
5.3	MATERIAL BIOLÓGICO.	52
5.4	PLAN DE MANEJO.	53
5.4.1	Sala de bioensayos y laboratorio de reproducción y crioconservación.	53
5.4.2	Agua.	53
5.4.3	Acuarios.	53
5.4.4	Peces.	53
5.4.5	Inducción hormonal.	53
5.4.6	Obtención del semen.	53
5.5	EVALUACIÓN DEL SEMEN DE <i>Rhamdia sebae</i> c.f.	54
5.5.1	Observación macroscópica de la muestra seminal.	54
5.5.2	Observación microscópica de la muestra seminal.	54
5.5.3	Movilidad espermática individual.	56
5.6	PREPARACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE CLORURO DE MERCURIO PARA LA ACTIVACIÓN SEMINAL.	56
5.7	ACTIVACION Y DETERMINACION DE LA MOVILIDAD Y VELOCIDAD ESPERMÁTICA.	56
5.8	TRATAMIENTOS	58
5.9	VARIABLES EVALUADAS	58
5.10	DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO	59
5.10.1	Formulacion de hipótesis.	60
6.	PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.	61
6.1	EFECTO DEL MERCURIO SOBRE LA MOVILIDAD ESPERMÁTICA EN <i>Rhamdia sebae</i> c.f.	61
6.1.1	Intervalo uno y tres para la movilidad progresiva rápida lineal (WHOa).	61
6.1.2	Intervalo uno y tres para la movilidad progresiva lenta lineal (WHOb).	63
6.1.3	Intervalo uno y tres para la movilidad circular (WHOc).	64
6.1.4	Intervalo uno y tres para los Amótilos (WHOd).	66
6.2	EFECTO DEL MERCURIO SOBRE LA VELOCIDAD ESPERMÁTICA.	69
6.2.1	Intervalo uno y tres para la velocidad curvilínea (VCL)	69
6.2.2	Intervalo uno y tres para la velocidad en línea recta (VSL)	71
6.2.3	Intervalo uno y tres para el patrón de velocidad angular (VAP)	72
7.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	82
7.1	CONCLUSIONES	82
7.2	RECOMENDACIONES	84
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
	ANEXOS	93

LISTA DE TABLAS.

	Pág.
Tabla 1. Efecto de la inducción hormonal con EHC sobre las características seminales de <i>Rhamdia sebae</i> c.f. Los valores corresponden a la media \pm error estándar de la media (SEM).	28
Tabla 2. Concentraciones recomendadas de sustancias con riesgo tóxico para aguas superficiales.	32
Tabla 3. Estado natural del mercurio y derivados.	33
Tabla 4. Tratamientos distribuidos en siete concentraciones de cloruro de mercurio (HgCl_2) utilizadas para la activación de muestras seminales en la barbilla (<i>Rhamdia sebae</i> c.f)	58
Tabla 5. Cuadro de resultados del efecto del cloruro de mercurio en la movilidad espermática de la barbilla (<i>Rhamdia sebae</i> c.f)	69
Tabla 6. Cuadro de resultados del efecto del cloruro de mercurio en la velocidad espermática de la barbilla (<i>Rhamdia sebae</i> c.f)	74

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Ejemplar macho de barbilla (<i>Rhamdia sebae</i>).	23
Figura 2. Ciclo global del mercurio en el ambiente.	34
Figura 3. Ciclo local del mercurio.	35
Figura 4. Metilación normal en la síntesis de metionina.	36
Figura 5. Metilación “errónea” en la síntesis de metionina.	36
Figura 6. a) medición de la talla de un ejemplar macho de <i>Rhamdia sebae</i> c.f b) Pesaje de un ejemplar macho de <i>Rhamdia sebae</i> c.f.	52
Figura 7. Obtención de semen de <i>Rhamdia sebae</i> c.f por presión abdominal.	54
Figura 8. Activación de las muestras seminales con los tratamientos y el análisis espermático (CASA).	57
Figura 9. Efecto de la adición de diferentes concentraciones de HgCl ₂ sobre la movilidad espermática progresiva rápida Lineal (WHOa) en intervalo uno.	62
Figura 10. Efecto de la adición de diferentes concentraciones de HgCl ₂ sobre la movilidad espermática progresiva rápida lineal (WHOa) en el intervalo tres.	63
Figura 11. Efecto de la adición de diferentes concentraciones de HgCl ₂ sobre la movilidad espermática progresiva lenta lineal (WHO b) en el intervalo uno.	63
Figura 12. Efecto de la adición de diferentes concentraciones de HgCl ₂ sobre la movilidad progresiva lenta lineal (WHO b) en el intervalo tres.	64
Figura 13. Efecto de la adición de diferentes concentraciones de HgCl ₂ sobre la movilidad circular (WHO c) en el intervalo Uno.	65
Figura 14. Efecto de la adición de diferentes concentraciones de HgCl ₂ sobre la movilidad circular (WHO c) en el intervalo tres.	66
Figura 15. Efecto de la adición de diferentes concentraciones de HgCl ₂ sobre el porcentual de estructuras Amótiles (WHO d) en el intervalo uno.	67
Figura 16. Efecto de la adición de diferentes concentraciones de HgCl ₂ sobre el porcentual de estructuras Amótiles (WHO d) en el intervalo tres.	68
Figura 17. Efecto de la adición de diferentes concentraciones de HgCl ₂ sobre la velocidad curvilínea (VCL) en el intervalo Uno.	70

	Pág.
Figura 18. Efecto de la adición de diferentes concentraciones de HgCl_2 sobre la velocidad curvilínea (VCL) en el Intervalo tres	71
Figura 19. Efecto de la adición de diferentes concentraciones de HgCl_2 sobre la velocidad espermática lineal (VSL) en el intervalo uno.	71
Figura 20. Efecto de la adición de diferentes concentraciones de HgCl_2 sobre la velocidad espermática lineal (VSL) en el intervalo tres.	72
Figura 21. Efecto de la adición de diferentes concentraciones de HgCl_2 sobre el patrón de velocidad angular (VAP) en el intervalo uno.	73
Figura 22. Efecto de la adición de diferentes concentraciones de HgCl_2 sobre el patrón de velocidad angular (VAP) en el intervalo tres.	73

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO A. Registro de animales clínicamente sanos utilizados en el estudio.	94
ANEXO B. Parámetros físico químicos del agua utilizada en el Instituto de Acuicultura de los Llanos para el manejo de ejemplares de barbilla (<i>Rhamdia sebae</i>)	95
ANEXO C. Preparación de la dilución de semen (1:3.000) de <i>Rhamdia sebae</i> c.f para la concentración espermática individual de los ejemplares machos utilizados en el estudio.	96
ANEXO D. Procedimiento para la preparación de los tratamientos utilizados en los estudio invitro sobre la movlidad y velocidad espermática individual en <i>Rhamdia sebae</i> .	97
ANEXO E. Datos de la biometría de machos de <i>Rhamdia sebae</i> c.f obtenidos para el estudio y descriptiva.	98
ANEXO F. Tabla general de datos obtenidos del CASA, para la evaluación del cloruro de mercurio en muestras seminales en <i>Rhamdia sebae</i> c.f.	100
ANEXO G. Datos transformados previo a la ANAVA.	109
ANEXO H. Distribución de número de observaciones por variable e intervalo para posterior comparación en los tratamientos.	120
ANEXO I. Análisis de varianza y prueba de Tukey para la movilidad espermática progresiva rápida lineal (WHOa).	122
ANEXO J. Análisis de varianza y prueba de Tukey para la movilidad espermática progresiva lenta lineal (WHOb).	125
ANEXO K. Análisis de varianza y prueba de Tukey para la movilidad espermática circular (WHOc).	128
ANEXO L. Análisis de varianza y prueba de Tukey para amótiles (WHOd).	131
ANEXO M. Análisis de varianza y prueba de Tukey para la velocidad espermática curvilínea (VCL).	134
ANEXO N. Análisis de varianza y prueba de Tukey para la velocidad espermática en línea recta (VSL).	137
ANEXO O. Análisis de varianza y prueba de Tukey para el patrón de velocidad angular (VAP).	140

GLOSARIO

Anfóteros: Son sustancias capaces de mostrar reacciones acidas y básicas o indistintamente.

Bioacumulación: Proceso de acumulación de ciertos productos dentro de los organismos. Hace referencia a la acumulación neta, con el paso del tiempo de metales (u otras sustancias persistentes) en un organismo a partir de fuentes tanto bióticas (otros organismos) como abióticas (suelo, aire y agua).

CASA (computer-assisted sperm analysis system): sistema diseñado para el análisis y observación del comportamiento de las estructuras espermáticas.

Contaminación: Impregnación del aire, el agua o el suelo, con productos que afectan a la salud del hombre, la calidad de vida o el funcionamiento natural de los ecosistemas.

Citocromos: Cada una de las heteroproteínas con un grupo prostético tipo hemo, que son transportadoras de electrones en la cadena respiratoria y otras oxidaciones biológicas.

Deletéreo: mortífero, venenoso.

Disrupción endocrina: Son compuestos que interfieren con el normal funcionamiento de las hormonas esteroideas.

Estructuras Amóviles. Referida a espermatozoides que en el momento de la activación no presentan ningún tipo de movilidad (inmóviles).

Metales pesados: Elementos químicos del grupo de los metales, con densidad superior a $4,5 \text{ g/cm}^3$ y masa atómica alta, como cadmio, cobre, cromo, mercurio, plomo, etc. Como contaminantes son un grupo de sustancias que se metabolizan mal y que presentan toxicidad para los seres vivos, incluido el hombre.

Metilación: es la adición de un grupo metilo (- CH₃) a una molécula.

Metionina: uno de los 20 aminoácidos constituyentes de las proteínas. Forma parte del grupo de aminoácidos con grupos no polares (hidrófobos). Este aminoácido participa como promedio en un 1,7% (en relación con todos los aminoácidos) de la composición de las proteínas. La metionina no puede ser sintetizada por los mamíferos, por lo que figura entre los aminoácidos esenciales. Desempeña un papel especial en la biosíntesis de proteínas.

Movilidad espermática: se define como el porcentaje de células espermáticas móviles a cualquier velocidad.

Movilidad progresiva rápida lineal (WHOa). Variable espermática referida al porcentaje de estructuras que se mueven linealmente, incrementando su movilidad de manera rápida.

Movilidad progresiva lenta lineal (WHOb). Variable espermática referida al porcentaje de estructuras que se mueven linealmente, de manera lenta.

Movilidad circular (WHOc). Variable espermática referida al porcentaje de estructuras que al ser activados se localizan en un solo lugar y dirigen sus movimientos circularmente.

Patrón de velocidad angular (VAP). Es el promedio de la velocidad de la cabeza espermática a través de su trayectoria promedio.

Rhamdia: Pertenece a todo el género de bagres o también llamados peces de cuero, grupo de silúridos que se distribuyen en el centro y sur de América con importancia moderada en pesquerías.

Tóxicos: Es toda sustancia química que administrada a un organismo vivo tiene efectos nocivos.

Velocidad curvilínea (VCL). Es el promedio de la velocidad de la cabeza espermática a través de su trayectoria real.

Velocidad en línea recta (VSL). Es el promedio de la velocidad de la cabeza espermática a través de la línea recta que une la primera posición de la trayectoria con la última

Xenobiótico: El término Xenobiótico (etimológicamente: “ajeno a la vida”) está limitado a compuestos químicos sintetizados por el hombre, constituidos por determinados elementos o grupos estructurales y que fueron detectados con posterioridad en los sistemas naturales. Estos compuestos se caracterizan por atravesar con facilidad las membranas biológicas y son difícilmente excretables. Tienden a acumularse aumentando el riesgo de toxicidad, su eliminación requiere una transformación previa en metabolitos más hidrosolubles y fácilmente excretables.

RESUMEN

Los residuos de metales pesados liberados en los sistemas acuáticos ocasionan contaminación en el medio ambiente los cuales progresivamente se van biocumulando en ecosistemas. El mercurio (Hg) como parte de estos elementos contaminantes, se presenta en diferentes formas orgánicas e inorgánicas que son fácilmente asimilables en el agua y dentro de los organismos acuáticos, magnificándose a medida que la cadena trófica crece. En Colombia muchos de los afluentes de las principales cuencas, ya presentan contaminación con mercurio principalmente cerca de zonas de explotación aurífera, ya que esta tipo de actividad necesita de este metal para la extracción de oro, Uno de los muchos efectos del mercurio esta estrechamente relacionado con la disrupción endocrina, por lo cual el presente estudio fue orientado en determinar la movilidad y velocidad espermática individual del semen de barbilla (*Rhamdia sebae* c.f) expuesto a mercurio bajo condiciones *in vitro*.

El presente estudio se realizó en el Instituto de Acuicultura de los Llanos en el departamento del Meta- Colombia. La barbilla (*Rhamdia sebae* c.f) es una especie endémica de la región de la Orinoquia (Meta). Se utilizaron ocho machos adultos de *Rhamdia sebae* c.f (86,85 ± 4,29 g; 22,32 ± 1,44 cm). En cada una de las muestras seminales como parte de la metodología experimental, se evaluaron las características macroscópicas (volumen, color, viscosidad) y microscópicas del semen (concentración espermática, espermatozoides y movilidad masal). Y para el análisis de las variables respuesta se procedió a la evaluación de movilidad y velocidad espermática utilizando un sistema de análisis espermático asistido (CASA). La movilidad fue activada utilizando concentraciones de 0 (control) 10, 100, 500, 1.000, 10.000 y 100.000 µg.L⁻¹ de cloruro de mercurio (HgCl₂). Se determinó la movilidad progresiva rápida lineal (WHOa), movilidad progresiva lenta lineal (WHOb), movilidad circular (WHOc) y amótilos (WHOd) y variables de velocidad como: velocidad en línea recta (VSL), velocidad curvilínea (VCL) y velocidad angular promedio (VAP).

Los resultados arrojaron que concentraciones de 10.000 y 100.000 µg.L⁻¹ de cloruro de mercurio disminuyen y afectan las variables de movilidad y velocidad espermática, mientras que en concentraciones mas bajas de 10, 100, 500 y 1000 µg.L⁻¹ no existe un efecto significativo sobre las variables de movilidad y velocidad espermática en *Rhamdia sebae* c.f . Se determino que existe un efecto del mercurio sobre la movilidad y velocidad espermática de la barbilla (*Rhamdia sebae* c.f) a medida que las concentraciones aumentan; por lo tanto se puede inferir que bajo estas condiciones el mercurio puede afectar la reproducción de peces en ambientes acuáticos contaminados con este metal.

ABSTRACT

The heavy metals residuals liberated in the aquatic systems cause contamination of the environment due to its constant bioaccumulation in the ecosystems. Mercury (Hg) belongs of these contaminant elements and it is presented in different organic and inorganic forms that are easily assimilate in the water and in the aquatic organisms being the problem magnified as the food chain grows. Some effects of mercury are closely related with the endocrine disruption; therefore, the present study determined the spermatic motility and individual velocity in the barbilla (*Rhamdia sebae* c.f) *in vitro* exposed to mercury.

The present study was carried out in the Institute of Aquaculture of Llanos in Meta-Colombia. The barbilla (*Rhamdia sebae*) it is an endemic of the region of the Orinoquia (Meta). Eight mature males of *Rhamdia sebae* c.f were used ($86,85 \pm 4,29$ g; $22,32 \pm 1,44$ cm). In each seminal samples as part of the experimental methodology, the seminal macroscopic characteristics (volume, colour, microscopic viscosity) and microscopic (spermatic concentration, spermatocrit and gross motility) were evaluated, and for the analysis of the variable answer likewise, the spermatic motility and velocity were evaluated using a Computer Assisted Spermatic Analysis (CASA). The motility was activated using concentrations of 0 (control), 10, 100, 500, 1.000, 10.000 and 100.000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ of chloride mercury (HgCl_2). The lineal fast progressive motility (WHOa), lineal slow progressive motility (WHOb), circular motility (WHOc) and non-motile (WHOd), line straight velocity (VSL), curvilinear velocity (VCL) and velocity angular average (VAP).

The concentrations of 10.000 and 100.000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ of chloride mercury decreased and affected the spermatic motility and velocity variables, while in concentrations below to 10, 100, 500 and 1.000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ a significant effect was not observed in terms of spermatic motility and velocity in *Rhamdia sebae* c.f. This study concluded that mercury affect the spermatic motility and velocity of barbilla (*Rhamdia sebae* c.f) as the concentrations of chloride mercury increase; therefore, with the actual conditions the mercury could affect the fish reproduction in aquatic ecosystems contaminated with this metal.

INTRODUCCIÓN

La contaminación en el medio ambiente es un tema muy pertinente debido a la creciente preocupación por el deterioro ambiental, influyendo en las condiciones de vida tanto en humanos como de animales. Existen una serie de antecedentes en los cuales el hombre ha afectado significativamente a la contaminación del planeta, vertiendo durante muchos años miles de desechos en ambientes naturales, en grandes extensiones de agua y tierra afectando una amplia variedad de especies animales y vegetales.

La contaminación de los sistemas acuáticos por tóxicos de la industria y la agricultura, pueden afectar la vida de los peces y otros animales de una forma directa o indirecta, a través de consumo de dietas a base de vegetación, invertebrados o peces más pequeños. Los cuales pasan a ser parte de la alimentación de mamíferos acuáticos y aves, y finalmente a los humanos. Esto ha sido ampliamente identificado como contaminación a nivel de la cadena trófica debido sustancias bioacumulables. Un grave efecto ambiental se basa en un amplio reconocimiento de la evidencia de baja contaminación lo cual puede disminuir la fecundidad de las poblaciones de peces y eventual extinción.

Este tipo de contaminación puede impactar como vía de acumulación en los órganos reproductivos o sobre los gametos (semen u óvulos) liberados dentro del agua. Por lo tanto la producción de larvas de peces se verá afectada drásticamente.

Teniendo en cuenta lo anterior, se planteó esta investigación con el fin de evaluar el efecto de metales pesados como el mercurio sobre la movilidad y velocidad espermática, siendo estas variables usadas de manera sensible como bioindicadores de contaminación acuática.

Como modelo en la investigación se evaluó el efecto del cloruro de mercurio ($HgCl_2$) sobre la movilidad y velocidad espermática individual en *Rhamdia sebae* c.f, un silúrido nativo de la Orinoquía colombiana. Con esto, se espera un aporte a las nuevas investigaciones e interés en la contaminación por metales pesados y sus impactos sobre la perpetuación de las especies hidrobiológicas.

1. DEFINICIÓN Y DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA

La contaminación de metales pesados en los sistemas acuáticos es uno de los mayores problemas puesto que la toxicidad de estos metales está dada por su persistencia y acumulación en los organismos¹. Dentro de estos, la presencia del mercurio (Hg) en los sistemas acuáticos son los de mayor interés e importancia, y es uno de los metales pesados que más se bioacumula y biomagnifica, a través de todos los niveles de la cadena trófica de los cuerpos de agua².

En Colombia, el problema de la exposición al mercurio en los cuerpos de agua suele tornarse complejo por la falta de conocimiento sobre los riesgos tóxicos y por la ausencia de advertencias sobre sus niveles en los peces colectados, sin que aún no se han especificado normatividades que ejerzan un tipo de control sobre el uso de estos metales y su manejo en cuanto su disposición sin alterar el desarrollo natural del ambiente.

Es por lo anterior, que el presente estudio permitirá de manera preliminar identificar qué tipo de efectos puede un ambiente contaminado con mercurio (Hg) alterar la reproducción de una especie acuática, simulando estas condiciones a nivel de laboratorio. Para este fin, se analizarán diferentes concentraciones de mercurio y su posible efecto sobre la movilidad y velocidad espermática de la barbilla *Rhamdia sebae* c.f.

Se espera que este estudio aporte a una serie de investigaciones sobre la disrupción endocrina y que en futuros estudios puedan surgir posibles alternativas para enfrentar la problemática de la contaminación con metales pesados en los ríos de Colombia y así propender por la perpetuación de las especies acuáticas nativas.

¹ WEIS, J. y WEIS, P. Methylmercury tolerance of Killifish (*Fundulus heteroclitus*) embryos from a Polluted vs. non-polluted environment. In: *Mar boill.* New Jersey Vol. 65, 1981. p.284.

² LINDQVIST, O., JOHNNASSON, K. AASTRUP, M., ANDERSON, A., BRINGMARK, L. Mercury in the Swedish Environment Recent Research on causes consequences and Corrective Methods. In: *Water, Air and Soil Pollution*, New York, Vol.55, 1991. p.155.

2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿Puede el mercurio afectar la movilidad y velocidad espermática en la barbillas (*Rhamdia sebae* c.f)?

3. OBJETIVOS.

3.1 OBJETIVO GENERAL.

Evaluar el efecto *in vitro* del mercurio (Hg) sobre la movilidad y velocidad espermática individual de la barbilla (*Rhamdia sebae* c.f.).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Determinar el efecto de diferentes concentraciones de mercurio (Hg) sobre la movilidad espermática individual de *Rhamdia sebae* c.f.
- Establecer el efecto de diferentes concentraciones de mercurio (Hg) sobre la velocidad espermática individual de semen de *Rhamdia sebae* c.f.

4. MARCO TEÓRICO

4.1. GENERALIDADES DE *Rhamdia*.

4.1.1 Ubicación taxonómica de la especie. Según Silfvergrip³, la clasificación taxonómica es la siguiente:

Phylum	:	Chordata
Subphylum	:	Vertebrata
Serie	:	Pises
Superclase	:	Gnathostoma
Clase	:	Osteichthyes
Sufrac clase	:	Actinopterygii
Infraclase	:	Teleostei
División	:	Euteloostei
Orden	:	Siluriformes
Familia	:	Pimelodidae
Genero	:	<i>Rhamdia</i>
Especie	:	<i>sebae</i> c.f.
Nombre común	:	Barbilla

Figura 1. Ejemplar macho de barbilla (*Rhamdia sebae* c.f)



³ SILFVERGRIP, A. A systematic revision of Neotropical catfish genus *Rhamdia* (Teleostei, Pimelodidae). In: *Swedish Museum of Natural History*, Stockholm, 1996. p.156.

4.1.2 Descripción morfológica. Según Machado⁴ posee un proceso occipital estrecho y corto que no alcanza la placa rostral, siendo la cabeza, a nivel de las aletas pectorales, tan ancha como larga y con el hocico achatado. La aleta adiposa es larga y la aleta dorsal y pectorales presentan espinas débiles y no punzantes.

Una descripción similar es la descrita por Silfvergrip⁵, en la cual mencionan que los *Rhamdia* son muy similares a otros géneros de pequeños bagres (*Pimelodella*, *Pimelodus* y *Pseudopimelodus*) pues todos están provistos de tres pares de barbillones largos y una aleta adiposa también larga.

4.1.3 Distribución. “De acuerdo con Bleeker (1858), el genero *Rhamdia*, es grupo natural de pequeños bagres dulceacuícolas americanos que se distribuyen desde el sur de México hasta el norte de Argentina. El genero contiene unas 60 especies nominales, siendo tan solo unas 11 especies las validas”⁶.

Silfvergrip⁷ en su revisión del genero reconoció a *Rhamdia quelen*, como la especie que habita desde el Pantanal brasilero hasta el sur oriente de los Andes en Colombia y sur de Venezuela (Amazonia). Machado-Allison⁸ reporta la existencia de *R. quelen* en los Llanos venezolanos mientras que Roman⁹ identifica a *R. wagneri* para la misma región.

Según Dahl¹⁰ en Colombia se conoce que habita en las cuencas del río Magdalena y tributarios incluido el río Sinu a *R. wagneri* (lisa, barbudo negro), poco abundante pero de importancia zoogeografía por su presencia en la región dado su origen centroamericano.

El mismo autor menciona que *R. sebae* (lisa, capitán, barbudo negro) es una especie típicamente suramericana, abundante a los largo de los ríos del norte de Colombia en donde alcanza los 35 cm de longitud total y con importancia económica en las pesquerías por su excelente carne.

⁴ MACHADO-ALLISON, A. Los peces de los ríos Caris y Pao. Carabobo, Venezuela: CORPOVENEZUELA, 1987. p.66.

⁵ SILFVERGRIP, A. Op cit. P. 128

⁶ Ibid., p.128.

⁷ SILFVERGRIP, A. Op cit. p. 126.

⁸ MACHADO-ALLISON, A. Op cit. p. 65.

⁹ ROMAN, B. Peces de agua dulce de Venezuela. Caracas, Venezuela. En: *Biosfera*, 1985. p.86.

¹⁰ DAHL, G. Op cit. p. 393.

Ramos¹¹ incluye a la especie como promisoria para la piscicultura de subsistencia, siendo abundante y apetecida por los campesinos andinos de los departamentos de Caldas, Quindío, Risaralda, Antioquia y Valle. Especies como *R. wagneri* y *R. sebae* (capitanejos) son reportadas en el río Catatumbo, con hábitos alimenticios de tipo depredador y con poca importancia económica en este afluentes¹².

Según Arias y Aya¹³ la barbilla *Rhamdia sebae* c.f. es la especie mas conocida de los Llanos Orientales de Colombia, posee un ciclo de vida continuo, es reofílica de ambientes lóticos y de afluentes menores y con hábitos vespertinos, reproduciéndose precozmente al final del primer año de vida.

Los peces del genero *Rhamdia* son peces de cuero, cuya coloración varia de marrón-rojizo a gris, con la parte ventral del cuerpo mas clara. Posee unos barbillones que se localizan junto a la boca, y probablemente, poseen receptores de gusto que ayudan en la localización del alimento y en la percepción de la calidad del agua¹⁴. Observaciones en *Rhamdia quelen* indican que el crecimiento de alevinos en cultivo es rápido, alcanzando en promedio 5 cm de longitud en 30 días¹⁵. La talla máxima calculada en las hembras es de aproximadamente 66,5 centímetros y en los machos de 52,0 centímetros¹⁶

4.1.4 Hábitos alimenticios. En el género *Rhamdia* han sido reportados diversos hábitos alimenticios siendo la mayoría de especies de régimen piscívoro, con algunas especies clasificadas como omnívoras¹⁷. Como otros géneros de bagres, son en general oportunistas prefiriendo presas vivas, convirtiéndolos en buenos candidatos para la pesca deportiva. La ingestión varía según la estación del año,

¹¹ RAMOS, H. Fundamentos de la piscicultura agrícola. Manizales, Colombia: Universidad de Caldas, 1979. p.68.

¹² GALVIS, G.; MOJICA, I y CAMARGO, M. Peces del Catatumbo. Bogotá, Colombia: Asociación Cravo Norte, ECOPETROL, 1997. p.106.

¹³ ARIAS, J. A. y AYA, C. El cultivo del yamú 2ª ed. Villavicencio, Colombia: Universidad de los Llanos, Instituto de Acuicultura de los Llanos, Instituto de Investigaciones de la Orinoquía Colombiana, 2001. p. 10.

¹⁴ BALDISSEROTTO, B. Fisiologia de peixes aplicada a piscicultura. Santa Maria, Brasil: editora Universidade Federal de Santa Maria, 2002. p. 157.

¹⁵ PIAIA, R. y RADUNZ, N. Avaliação de diferentes fuentes protéicas sobre eu desempenho inicial de larvas de jundiá, *Rhamdia quelen*. Em: *Ciência rural*. Brasil, Vol. 27, No. 2, 1997. p. 320.

¹⁶ WEIS, M. Interpretação da idade e calculo de curva de crescimento do jundiá, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimand, 1824), do Banhado de Santa Carina. Curso de Pos-Graduação em Zootecnia. Santa Maria, Brasil: Universidade Federal de Santa Maria, 1980. p. 54.

¹⁷ ROMAN, B. Op cit. p. 89.

siendo la época de lluvias la que más recursos ofrece y por supuesto la estación en donde se ingiere más alimento¹⁸.

4.1.5 Calidad del agua para cultivo. La calidad del agua en piscicultura es muy importante para el crecimiento y el desarrollo de la *Rhamdia*. Cuanto mejor es el control de la calidad del agua, mejor será el rendimiento del crecimiento, para todas las fases de vida de la *Rhamdia* (huevo, larva, alevín y adulto) son necesarios niveles ideales de determinados parámetros¹⁹

4.2 ASPECTOS REPRODUCTIVOS EN *Rhamdia*.

Los estudios sobre el ciclo reproductivo de *R. quelen* y *R. hilarii*, indican que son especies de reproducción precoz, presentándose la primera maduración gonadal al final del primer año de vida, con longitudes de 13,4 y 16,5 cm para hembras y machos respectivamente²⁰. Maduran sus ovarios una vez al año de manera asincrónica por grupos, reproduciéndose a lo largo del ascenso de las aguas en la estación de lluvias de manera parcial²¹. Los machos maduros liberan con facilidad el líquido espermático cuando el abdomen es presionado. Las hembras maduras presentan el orificio genital hiperemico y con dilatación ventral²². Las ovas producidas por las hembras son demersales y no adherentes²³. En *R. quelen* se conoce además que hace pequeñas migraciones reproductivas buscando sitios de aguas limpias, lénticas y con fondo pedregoso²⁴. El periodo reproductivo en los picos de desarrollo gonadal puede variar de un año a otro. En ejemplares de la región de Santa Maria (Brasil), el periodo reproductivo se extiende desde agosto a febrero y los picos de desarrollo gonadal ocurren en los meses de Agosto a Septiembre y de Enero a Febrero²⁵. Con todo esto, Mardini, *et al.*²⁶, encontraron

¹⁸ NARAHARA, M. Estrutura de populacho e reprodução de *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840). (Osteichtyes, Siluriforme, Pimelodidae). São Paulo, Brasil: Instituto de Biociências, Iä Universidad de São Paulo, 1983. p. 135.

¹⁹ BALDISSEROTO, B y FLORES da SILVA, L. Qualidade de água. Em: BALDISSEROTO, B (Editor). Cultivo do jundiá. Santa Maria, Brasil: editora USFM, 2002. p. 73.

²⁰ BALDISSEROTTO, B. Op cit. p. 164.

²¹ NARAHARA, M. Op cit. p. 146.

²² MARDINI, C.; SILVEIRA, M. y BARENHO, D. Técnica de indução da desova em jundiá, *Rhamdia quelen* empregada na estação experimental de piscicultura da Lagoa dos Quadros. Brasil: Documento Ocasional, Vol. 4, 1981. p. 9.

²³ GODINHO, H.; BASILE-MARTINS, M.; FENERICH, N. y NARAHARA, M. Desenvolvimento embrionário e larval de *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840), (Siluriforme, Pimelodidae). Em: *Revista Brasileira de Biologia*, São Paulo, Brasil, Vol. 38, No. 1, 1978. p. 154.

²⁴ GOMES, L.; GOLOMBIESKI, J.; CHIPPARIGOMES, A, y BALDISSEROTTO, B. Biologia do jundiá *Rhamdia quelen* (Pisces, Pimelodidae). Em: *Ciência Rural*, Santa Maria, Brasil, Vol. 30, No. 1, 2000. p. 182.

²⁵ BOSSEMEYER, I. Mudanças morfológicas no ovário de *Rhamdia sapo* (Pimelodidae) relacionadas com o ciclo reprodutivo. Santa Maria, Brasil: Dissertação (Mestrado em Zootecnia), Curso de Pós-Graduação em Zootecnia: Universidad Federal de Santa Maria, 1976.

reproductores en estadio gonadal avanzado de Septiembre a Mayo, en los lagos de Quadros (Brasil). Paula -Souza²⁷, detectaron mayores índices gonadosómicos entre Septiembre y Marzo en ejemplares en Paraná. Gurgel²⁸ destaca que el factor de condición para esta especie es más elevado en periodos de maduración gonadal.

Según Narahara²⁹ las poblaciones naturales de *R. hilarii* contienen hembras y machos en proporciones de 1,5 a 1,0 definiendo cinco estadios de desarrollo gonadal con un índice gonadosómico máximo de 8,8 en hembras y 6,9 en machos y un solo pico reproductivo con varias posturas en un largo periodo de la primavera al verano. De otra parte, Dos-Santos *et al.*³⁰, estudiaron su ciclo de desarrollo ovocitario, encontrando que se trata de un cistovario de maduración asincrónica, en el que reconocieron 10 estadios de maduración de los ovocitos similar a lo encontrado para *R. branneri*³¹.

- **Características seminales.** Cruz-Casallas y Velasco-Santamaría³²., describen algunas características seminales de la barbilla (*Rhamdia sebae* c.f.) observándose aumento significativo en el volumen, concentración espermática y espermatozoides (Tabla 1), posterior a la inducción hormonal (EHC 4,0 mg.kg⁻¹ de peso corporal vía IM).

²⁶ MARDINI, C.; SILVEIRA, M. y BARENHO, D. Op cit. p. 11.

²⁷ PAULA-SOUZA, G. Reprodução de *Rhamdia branneri*, 1911 (Pisces, Siluriforme) e suas relações com fatores abióticos. Curitiba, Brasil. Dissertação (Mestrado em Zoologia), Curso de Pos-Graduação em Zoologia: Universidad federal de Paraná, 1978. p. 55.

²⁸ GURGEL, H. Aspecto do comportamento biológico de *Rhamdia branneri* (Haseman, 1911), (Osteichthyes, Siluriformes, Pimelodidae). Curitiba, Brasil. Dissertação (Mestrado em Zoologia), Curso de Pos-Graduação em Zoologia: Universidad Federal de Paraná, 1979. p. 53.

²⁹ NARAHARA, M. Op cit. p. 147.

³⁰ DOS-SANTOS, H.; LOPES, R. y ZUIM, S. Sobre a reprodução de peixes brasileiros XVI, Estudo morfométrico dos ovócitos de *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840), (Pisces, Pimelodidae). Em: *Ars Veterinária*, São Paulo, Brasil, Vol. 2, No. 1, 1986. p. 16.

³¹ PAULA - SOUZA, G. Op cit. p. 56.

³² CRUZ-CASALLAS, P.E. y VELASCO – SANTAMARIA, Y. M. Determinación de las características seminales y Semínación artificial en peces. En: DAZA, V.; LANDINEZ, M. y ZANABRIA, A. (Editores). Reproducción de peces en el Trópico. Bogota, Colombia: INCODER, Universidad Nacional de Colombia, 2005. p. 184

Tabla 1. Efecto de la inducción hormonal con EHC sobre las características seminales de *Rhamdia sebae* c.f. Los valores corresponden a media \pm error estándar de la media. (SEM).

Variable	<i>Rhamdia sebae</i> c.f	
	Sin EHC	Con EHC
N	13	15
Volumen (mL)	3,2 \pm 0,7 ^a	6.3 \pm 1,0 ^b
Movilidad (%)	89 \pm 3,5 ^a	93 \pm 2,8 ^a
Tiempo de activación (s)	29,1 \pm 0.8 ^a	30,9 \pm 0,8 ^a
Concentración (x 10 ⁶ sptz/ μ L)	64,5 \pm 3,3 ^a	54,2 \pm 3,0 ^b
Espermatocrito (%)	75,5 \pm 3,9 ^a	62,0 \pm 4,3 ^b

Sptz= espermatozoides. ^{ab}. Para la misma especie, entre columnas, medias con sobre índices comunes son estadísticamente iguales. Cruz-Casallas y Velasco Santamaria³³

4.3 MOVILIDAD ESPERMÁTICA EN PECES.

Los peces tienen diversos mecanismos de reproducción. Aunque la heterosexuality es el más común. Los peces que dispersan sus huevos en el agua producen a menudo grandes cantidades de ellos; de igual manera, el semen de los machos debe contener espermatozoides con apta motilidad y abundantes lo suficiente para llegar hasta los óvulos y fecundarlos. Una buena cantidad de espermatozoides se requiere para lograr la unión de los gametos masculino y femenino, dado que en los peces, es común, que los gametos sean depositados en el agua y por tanto este método no asegura que todos los gametos masculinos expulsados fecunden a los óvulos, siendo solo un porcentaje bajo del esperma descargado el que alcanza los gametos femeninos³⁴.

La movilidad espermática de los peces al igual que en la mayoría de organismos vivos, puede definirse en los movimientos realizados por los espermatozoides,

³³ CRUZ-CASALLAS, P.E. y VELASCO – SANTAMARIA, Y. M. Op cit. p.184

³⁴ ANATOMIA Y BIOLOGIA. Reproducción en vertebrados. En: Enciclopedia Estudiantil. Madrid, España: Cultural. S.A, 1999. p. 271.

células sexuales masculinas, que son filamentos microscópicos con una longitud aproximada de cinco centésimas de milímetro, y pueden apreciarse tres partes: la *cabeza*, porción en la que se acumula el material nuclear y es la encargada de fertilizar al ovulo; el *cuerpo*, que funciona como un depósito de energía que será consumida por la *cola*, la tercera de las porciones, que permite al espermatozoide moverse con cierta velocidad y le permite avanzar hacia el ovulo, termina en un flagelo varias veces más largo que el resto del espermatozoide³⁵.

Sailer et al.,³⁶ describe que la reproducción sexual en los organismos es dependiente sobre la producción de una alta calidad espermática. El daño de la estructura espermática puede ser causado por ejemplo por sustancias tóxicas, crioconservación o mutaciones genéticas que pueden hacer que los espermatozoides sean formados con flagelos pequeños, o que la cabeza no tenga una buena orientación de dirección y haga que se mueva en forma circular, afectando la movilidad y en consecuencia la efectividad en la fertilización.

Las observaciones sobre la movilidad espermática han venido siendo ampliamente criticada en la literatura que se ha publicado en el campo de estudio de los peces. Las formas de medición se han dirigido en algunos casos al cálculo de la duración de la movilidad, lo cual es quizás lo más relevante en peces, de quien típicamente el semen puede permanecer moviéndose durante algo más de 4 minutos, en observaciones que se han hecho en peces marinos³⁷. Otros estudios se han centrado sobre la velocidad del movimiento y a esto han incorporado escalas de medición de 1 a 5³⁸. Ambos métodos han sido criticados por ser subjetivos y por la falta de precisión en la cuantificación de las medidas³⁹. Es considerable evitar la subjetividad en la interpretación que se genera al evaluar la velocidad espermática, pues se cree que no puede remitirse el cálculo a una simple observación del semen. La introducción de una escala arbitraria puede diferir en indicar la velocidad ó duración de la movilidad espermática⁴⁰.

³⁵ ANATOMIA Y BIOLOGIA. Espermatozoide. En: Enciclopedia Estudiantil. Madrid, España: Cultural. S.A, 1999. p. 269.

³⁶ SAILER, B.L.; JOST, L.K y EVENSON, D.P. Bull sperm head morphometry related to abnormal chromatin structure and fertility. In: *Cytometry*, Sheffield, U.K., Vol. 24, 1996. p.168.

³⁷ ZILLI, L.; SCHIAVONE, R.; ZONNO, V.; ROSSANO, R.; STURELLI, C. y VILELLA, S. Effect of cryopreservation on sea bass sperm proteins. In: *Biology of reproduction*. New Jersey, Vol. 72, 2005. p. 1264.

³⁸ KHAN, A.T. y WEISS, J.P. Toxic effects of mercury chloride on sperm and egg viability of two populations of mummichogs, *Fundulus heteroclitus*. In: *Environmental Pollution*. New York, Vol. 48, 1987. p. 268

³⁹ KIME, D. y NASH J.P. Gamete viability as an indicator of reproductive endocrine disruption in fish. In: *Science of the Total Environment*. Sheffield, U.K, 1999, Vol. 233.p. 126.

⁴⁰ NICLE, H.E. Sperm motility in the pacific oyster (*Crassostrea gigas*) is affect by nonylphenol. In: *Marine Pollution Bulletin*. Londres, 2005, Vol. 50. p. 1671.

La mayoría de los teleósteos tienen fertilización externa y sus espermatozoides se constituyen en simples células⁴¹. El metabolismo del espermatozoide está restringido a la producción de energía⁴² y el proceso de la regulación de la activación de la movilidad^{43,44,45}. Consecuentemente, el espermatozoide no tiene la capacidad de compensar energía por influencia externa, por lo que pueden reaccionar de una manera sensible a las variables del medio ambiente y especialmente a la de los contaminantes⁴⁶.

4.4 EFECTO DE CONTAMINANTES AMBIENTALES SOBRE EL SISTEMA REPRODUCTIVO DE LOS PECES.

El sistema reproductivo de los peces es blanco ideal de concentraciones subletales de contaminantes. Los diferentes procesos hormonales, fisiológicos y comportamientos que garantizan la reproducción de las especies piscícolas pueden verse afectados individual o colectivamente cuando ciertos contaminantes hacen presencia en los cuerpos de agua y acceden a órganos del sistema reproductivo o aquellos que regulan su fisiología⁴⁷.

Las múltiples manifestaciones o estrategias reproductivas de las más de 22000 especies de peces conocidas dificultan el poder generalizar con respecto a las respuestas del sistema reproductivo frente a la acción de los contaminantes⁴⁸. Además, la mayoría de reportes sobre el tema se han hecho en especies usadas como biomodelos por características especiales o en otras por su importancia económica. El estudio de los efectos de contaminantes presentes en el agua sobre

⁴¹ JAMIESON, B. G. Fish evolution and systematic: evidence from spermatozoa (editor). In: LAHNSTEINER, F.; MANSOUR, N y BERGER, B. The effect of inorganic and organic pollutants on sperm motility of some freshwater teleosts. In: *Journal of fish biology*. Thalheim, Australia. 2004. Vol. 65.p. 1283.

⁴² LAHNSTEINER, F., BERGER, B. y WEISMANN, T. Sperm metabolism of the teleost fishes on *Oncorhynchus mykiss* and *Chalcalburnus chalcoides* and its relation to motility and viability. *Journal of Experimental Zoology*. Thalheim, Australia. 1999. Vol. 284.p. 461.

⁴³ MORISAWA, M. y ISHIDA, K. Short term changes in levels of cyclic-AMP adenylate cyclase and phosphodiesterase during initiation of sperm motility in rainbow trout. *Journal of Experimental Zoology*. Minamata, Japon. 1997. Vol. 242.p.200

⁴⁴ GATTI, J.K; BILLARD, R y CHRISTIN, R. Ionic regulation of the plasma membrane potential of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) spermatozoa : Role in the initiation of sperm motility. In: *Journal of cell physiology*. New York. 1990. Vol. 143. p.550.

⁴⁵ BOITANO, S y OMOTO, C. Membrane hyperpolarization, activates trout sperm without an increase in intracellular pH. In: *Journal of cellular science*. New Jersey, 1991.p.345

⁴⁶ BOITANO, S y OMOTO, C. Trout sperm swimming pattern and role of intracellular Ca⁺⁺. *Cell motility and Cytoskeleton*. New Jersey. Vol. 21, 1992.p. 19.

⁴⁷ GONZALES- MANTILLA, J. Efecto de contaminantes ambientales sobre el sistema reproductivo de los peces. En: DAZA, V.; LANDINEZ, M. y ZANABRIA, A. (Editores). Reproducción de peces en el Trópico. Bogotá, Colombia: INCODER, Universidad Nacional de Colombia, 2005. p. 43

⁴⁸ HEAT, A.G. Reproduction. In: Water pollution and fish physiology. CRC Press, Boca Raton. 1995.

las especies piscícolas es aún muy incipiente en Colombia; si bien se presume sobre la aplicación indiscriminada de varios tipos de tóxicos, no hay un diagnóstico aproximado sobre el efecto, la depuración de los ecosistemas y las consecuencias de las múltiples fuentes de contaminantes sobre las especies nativas.

González⁴⁹ menciona que entre los factores causantes del descenso dramático en la captura de especies nativas (ej. bocachico, bagre, nicuro) se incluyen las fuentes de contaminación química de las aguas. Sin embargo no hay estudios en los que se hayan encontrado causalidad directa de dichos contaminantes con un pobre desempeño reproductivo de las especies o con el descenso en el número de ejemplares. A pesar de la escasa información sobre la cinética y la dinámica de contaminantes acuáticos en los ecosistemas nacionales.

4.5 CONTAMINACIÓN POR METALES PESADOS.

Durante mucho tiempo el hombre ha ido arrojando residuos a las corrientes fluviales, de los cuales proviene gran parte de su agua potable, y al no percibir ninguna alteración manifiesta ha considerado infinita la capacidad de autodepuración de estos medios acuáticos. Los residuos arrojados a los lagos y ríos pasan de forma natural al mar y ahí las corrientes los dispersan y los trasladan a los puntos más lejanos⁵⁰.

Los mares actúan como un sumidero; de forma constante, grandes cantidades de materiales arrastrados desde tierra, se vierten en los océanos. En realidad, los océanos operan como gigantescas plantas de tratamientos de residuos. Algunas de estas sustancias son altamente tóxicas para los seres vivos, en particular los compuestos en los que interviene el cianuro o metales como el mercurio y el plomo⁵¹. En los organismos, las concentraciones de algunas sustancias pueden llegar a alcanzar niveles muy superiores a los detectados en el medio. Moléculas del tipo de algunos insecticidas, metales pesados de número atómico elevado como el mercurio o también algunos isótopos radioactivos no son metabolizables por los seres vivos. Así pasan a formar parte de tejidos u órganos en concentraciones que aumentan al ascender en los niveles tróficos de los ecosistemas. Las cadenas tróficas funcionan como auténticos *amplificadores biológicos*. Cuando la materia orgánica se transfiere de un nivel al siguiente de la cadena, aproximadamente el 90% se consume en la respiración o en la excreción; solo el 10% restante constituye la nueva biomasa que pasa al siguiente nivel⁵². Muchos de los

⁴⁹ GONZALES- MANTILLA, J. Op cit. p. 43

⁵⁰ CONTAMINACIÓN DE LAS AGUAS CONTINENTALES. En: Enciclopedia estudiantil. Madrid, España. Editorial Cultural SA., 1999. p.538

⁵¹ Ibid., p.538

⁵² CONTAMINACIÓN. En: Enciclopedia estudiantil. Madrid, España. Editorial Cultural SA, 1999. p.536

contaminantes son transformados en elementos utilizables por los organismos, dentro del proceso de autodepuración de los cuerpos de agua. Las tasas de aporte de algunos elementos son elocuentes: El mercurio (Hg) llega al océano a un ritmo dos veces y media superior al que sería debido únicamente a factores naturales; el manganeso (Mn) multiplica por cuatro dicho ritmo natural; el cobre (Cu), plomo (Pb) y el zinc (Zn) por doce; y el antimonio (Sb) por treinta y el fósforo (P) por ochenta⁵³

Tabla 2. Concentraciones recomendadas de sustancias con riesgo toxico para aguas superficiales.

Toxico	MCLG ^a	MCL ^b	Concentración máxima recomendada*
Cadmio	-	-	0,025
Cobre	1,3	1,3	0,05
Ciclohexano	-	-	0,001
2,4 - diclorofenol	-	-	0,001
Mercurio	0,002	0,002	0,005
Niquel	-	-	0,01
Nitrito	1,0	1,0	1,5
Plomo	0	0,015	0,03
Zinc	L	-	0,75

^a Concentraciones acordadas por American Water Works Asociation. MCLG= Objetivo máximo de nivel contaminante en mg.L⁻¹

^b Concentraciones acordadas por American Water Works Asociation. MCL= Máximo nivel contaminante en mg.L⁻¹

* Concentraciones acordadas por la WHO en mg-L⁻¹.⁵⁴

L= Listado para regulación.

Calidad y Tratamiento de agua⁵⁵.

⁵³ CONTAMINACIÓN Opc. cit.,. p.539

⁵⁴ LAHNSTEINER, F.; MANSOUR, N. y BERGEL, B. The effect of inorganic and organic pollutants on sperm motility of some freshwater teleost. In: *Journal of Fish Biology*. Thalheim, Austria. Vol. 65, 2004. p. 1293.

⁵⁵ AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCE AND DISEASE REGISTRY. Division of toxicology. Toxicology profile for mercury. In: LETTERMAN, R.D. (EDITOR TECNICO). Calidad y tratamiento de agua. Madrid, Espaa: American Water Works Asociation. Editorial MCGRAW-HILL-INTERAMERICANA DE ESPAÑA. 2002. p. 1231

4.5.1 Generalidades del mercurio. Navarrete⁵⁶ en su descripción menciona que el mercurio se puede encontrar en diversas formas físicas y químicas. Existe en estado elemental (Hg^0) y, además en los estados iónicos Hg^{1+} y Hg^{2+} , en los cuales ha perdido 1 y 2 electrones respectivamente. Como ejemplo de compuestos inorgánicos del mercurio están HgCl y el HgCl_2 , derivados del Hg^{1+} y Hg^{2+} y como ejemplos de compuestos orgánicos, tenemos el CH_3Hg^+ y el CH_3HgCH_3 , que provienen del Hg^{2++} (Tabla 3)

Tabla 3. Estado natural del mercurio y derivados.

DERIVADOS DEL MERCURIO	
Mercurio elemental	(Hg^0)
Compuestos inorgánicos	(Hg^{1+} , Hg^{2+}) Ejemplos: Hg Cl , HgCl_2
Compuestos orgánicos	$\begin{array}{c} \\ (+ \text{Hg} - \text{C} -) \\ \end{array}$ $\begin{array}{c} \qquad \\ (- \text{C} - \text{Hg} - \text{C} -) \\ \qquad \end{array}$

Curso Básico de Toxicología Ambiental⁵⁷

El mismo autor define que el mercurio no es un elemento esencial para la vida; sin embargo, ha estado presente siempre en concentraciones a las que los seres vivos están adaptados. Sus fuentes naturales son el vulcanismo, la desgasificación de la corteza terrestre, la erosión y la disolución de los minerales de las rocas debido a la penetración del agua a través de estas por tiempo muy prolongado.

Las fuentes antropogénicas del mercurio son la minería, el uso industrial y Agrícola. La primera contribuye con el 50% y el resto proviene de actividades industriales (catálisis, procesado en las plantas de cloro-sosa, manufactura de equipo eléctrico, pinturas y fabricación de plaguicidas), agrícolas (aplicación de

⁵⁶ NAVARRETE - FIGUEROA, A. Mercurio y metilmercurio. En: ALBERT, L. (Editor). Curso básico de toxicología ambiental. México, D.F. Editorial LIMUSA-NORIEGA: Centro Panamericano de Ecología Humana; Organización Panamericana de la Salud; Organización Mundial de la Salud. 1990. p. 125.

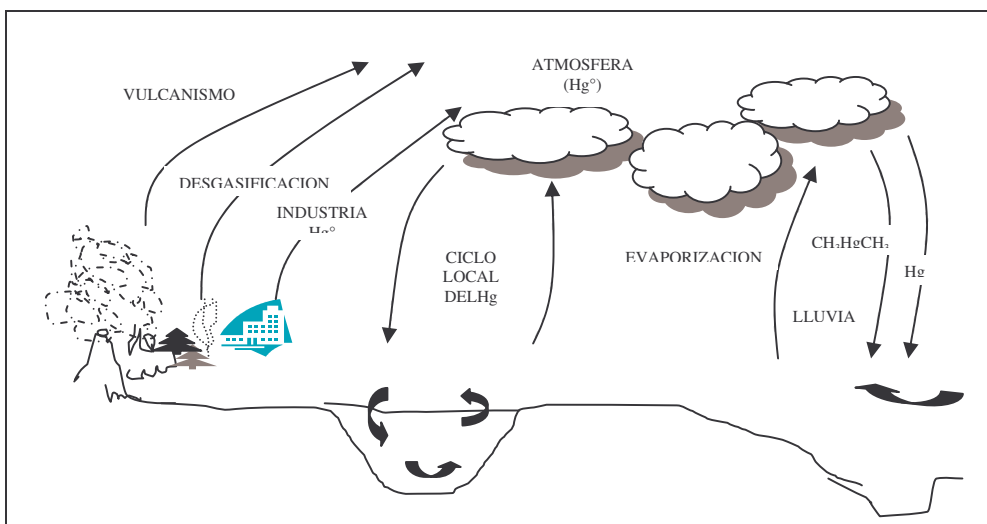
⁵⁷ Ibid p.

fungicidas) y otras fuentes menores (uso en laboratorios químicos, en odontología, uso militar y el empleo de combustibles fósiles)⁵⁸

4.5.2 Transformación del mercurio en el Ambiente. Navarrete ⁵⁹ describe que aunque el mercurio se recicle varias veces, el ambiente es el receptor final. Ahí se mantiene permanentemente, aunque cambien sus formas químicas, ya sean por mecanismos físicos, químicos o biológicos. Por lo anterior, describió para este metal un ciclo global y un ciclo local.

El ciclo global por el mismo autor describe que el mercurio depende de la circulación atmosférica de los vapores de mercurio metálico. Estos vapores circulan a partir de los continentes (desgasificación de la corteza terrestre, etc.) hasta llegar a los océanos, durante el ciclo, los vapores suben y caen por precipitación de la lluvia. La cantidad de mercurio que se encuentra en los océanos es muy grande (en su mayor parte mercurio de origen natural) y el incremento de origen natural y antropogénico que ha ocurrido en los últimos años no es detectable con los métodos actuales (Figura 2)

Figura 2. Ciclo global del mercurio en el ambiente.



Curso Básico de Toxicología Ambiental⁶⁰

⁵⁸ NAVARRETE - FIGUEROA, A Opc cit., p. 125.

⁵⁹ Ibid p. 128-133.

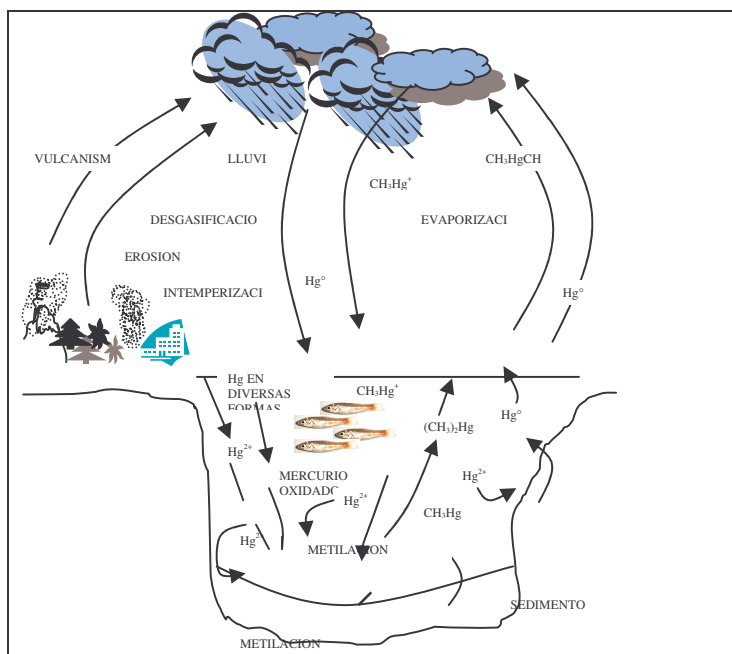
⁶⁰ Ibid p. 128-133

El ciclo local se basa en la circulación hipotética de compuestos de dimetilmercurio. En este el mercurio es liberado en sus distintos estados físicos y químicos principalmente por el ser humano. Una vez en los ecosistemas acuáticos y en presencia de oxígeno casi todas las formas de mercurio metálico, se pueden ionizar, oxidar y transformar en Hg^{2+} . Una vez ionizado, el mercurio forma una gran variedad de compuestos así, el Hg^{2+} se reduce para dar mercurio metálico, reacción que llevan a cabo bacterias del genero *pseudomonas* en un ambiente carente de oxígeno (condiciones anaerobias).

La segunda reacción ocurre en aguas continentales o en litorales y mediante ella se convierte en Hg^{2+} en CH_3Hg^{1+} (metilmercurio) y $CH_3-Hg-CH_3$ (dimetilmercurio) (Figura 3)

En las partículas de sedimento que se encuentran en suspensión en el agua, la metilación del mercurio puede ocurrir por las dos vías. Por la vía anaerobia, se lleva acabo por compuestos derivados de la metilcobalamina que son producidos por bacterias metanogénicas en un ambiente moderadamente reductor. La formación de metilmercurio por esta vía es escasa, ya que también en este medio se forma el sulfuro de mercurio que no queda disponible para la metilación, ya que es insoluble en medios anaerobios pero, en medio aerobios, se combina con el oxígeno y forma sulfatos y sulfitos, dejando en forma soluble al Hg^{2+} (Figura 4)

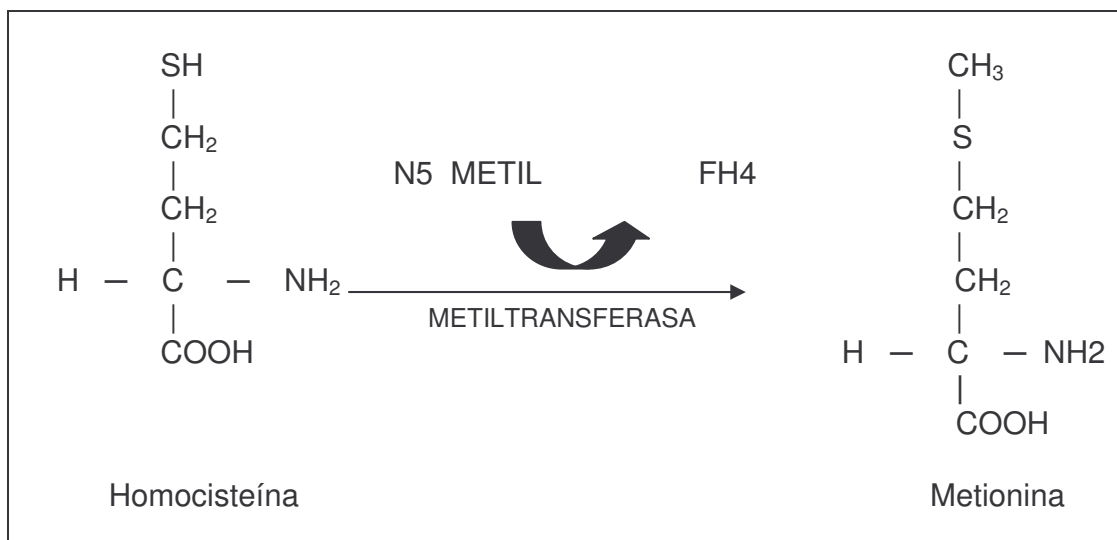
Figura 3. Ciclo local del mercurio.



Curso Básico de Toxicología Ambiental.

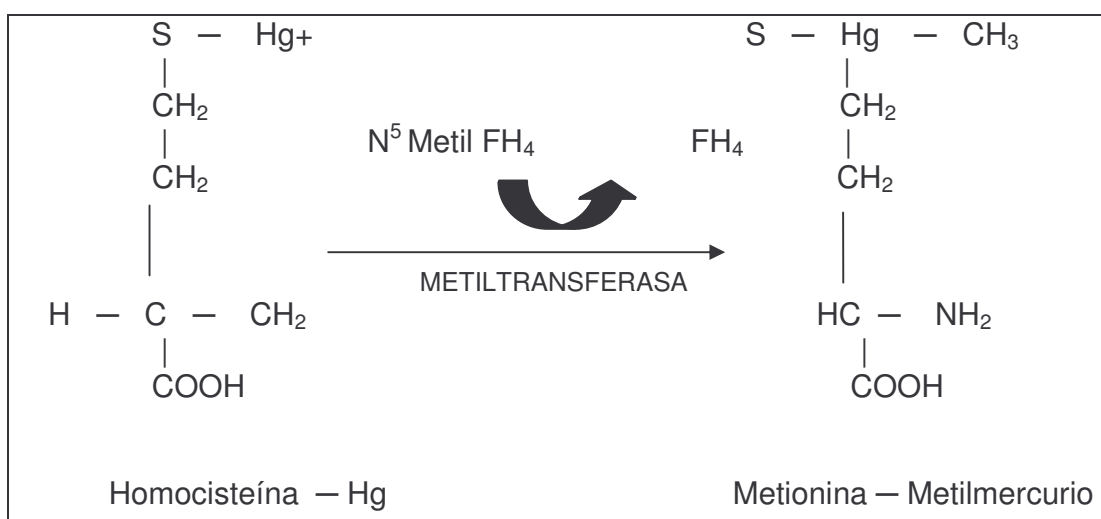
En la vía aeróbica, el mercurio que esta unido a la Homocisteína se metila por los procesos celulares que normalmente dan lugar a la formación de metionina. En este caso, el complejo Homocisteína- Hg se metila “por error”. Esto ocurre en muchos microorganismos y bacterias (Figura 5).

Figura 4. Metilación normal en la síntesis de metionina



Curso Básico Toxicología Ambiental⁶¹

Figura 5. Metilación “errónea” en la síntesis de metionina.



Curso Básico de Toxicología Ambiental⁶²

⁶¹ NAVARRETE - FIGUEROA, A Opc cit., p. 125

Boudene⁶³ afirma que durante los dos últimos decenios se ha observado que la evaluación de la toxicidad del mercurio no puede juzgarse tomando simplemente el mercurio mineral y que debe incluir la transformación relativamente fácil en el medio ambiente, sobre todo en el medio acuático, de una parte no negligible del mercurio mineral, ionizado, en derivados órgano mercuriales y en particular en metilmercurio. Mientras que el mercurio ionizado no es absorbido a nivel del tubo digestivo más que en un 5-15%, en el caso del metil mercurio este porcentaje puede alcanzar el 80-100%.

El mismo autor menciona que en años anteriores se admitía corrientemente que el mercurio no se encontraba en los tejidos de los organismos, pero los trabajos de Stock (1926 y 1940) contribuyeron a ampliar de forma importante el conocimiento sobre la difusión y la toxicidad del mercurio y sus derivados en el medio ambiente. Ya en 1938 publicaba que el mercurio esta bastante ampliamente distribuido en la naturaleza, aunque ha concentraciones bajas, del orden de 0,1 a 0,5 ppm en los suelos, 0,0002 ppm en el agua de lluvia y 0,00003 ppm en el agua de mar.

Phillips y Buhler⁶⁴ mencionan que cuando el metil mercurio esta libre en el agua, atraviesa las membranas biológicas con facilidad, por lo que se incorpora rápidamente a las cadenas tróficas acuáticas. Esta facilidad para atravesar las membranas biológicas, unida a la liposolubilidad y a su afinidad por los grupos sulfhídricos de las proteínas, hace que el metilmercurio sea muy peligroso para todos los seres vivos.

Asi mismo Rodger⁶⁵ menciona que la dieta parece ser la fuente primaria de ingreso de metilmercurio en peces y la eficiencia de asimilación llega a estar entre 65 y 80%. Adicionalmente a esto el mismo autor afirma que entre el 7 y el 12% del metilmercurio que pasa a través de las branquias se considera asimilable por los peces

⁶² NAVARRETE - FIGUEROA, A Opc cit., p. 125

⁶³ BOUDENE, C. L. Toxicidad de los metales. En: DERACHE, J. (Coordinador). Toxicología y seguridad de los alimentos. Barcelona, España. Editorial OMEGA S.A. 1990. p. (Consulta)

⁶⁴ PHILLIPS, G. y BUHLER, D. The relative contribution of Methylmercury from food or water to rainbow trout (*Salmo gairdneri*) in a controlled laboratory environment. In: *Transition ambient fish Society*. Scotland. Vol. 107, 1978. p. 857.

⁶⁵ RODGERS, D. W. You are what you eat and little bit more: bioenergetics – based models of Methylmercury accumulation in fish revisited. En: WATRAS, C y HUCKABEE, J. (Editors). In: *Lewis publications*. Boca Raton, F.A. 430.

4.5.3 Toxicidad del mercurio en los organismos. A causa del aumento de la contaminación del agua, se han encontrado cantidades significativas de mercurio en ciertas especies de peces, creciendo la preocupación por los vertidos incontrolados del metal a las aguas.

El mercurio aparece en el agua principalmente como sal inorgánica y como compuesto orgánico (metil mercurio) en los sedimentos y en el pescado⁶⁶. El mercurio inorgánico se absorbe poco por el tracto gastrointestinal de los adultos, no penetra fácilmente por las células, y, por otra parte, no es tóxico como metil mercurio (el calomelano, cloruro mercurioso, se utilizó en el pasado como laxante). Sin embargo la absorción de mercurio inorgánico puede ser mucho mayor en niños y jóvenes. El órgano de control más sensible del mercurio inorgánico en animales adultos de laboratorio es la inducción de una enfermedad auto inmunitaria del riñón⁶⁷.

Cohn et al.,⁶⁸ afirma que las formas orgánicas como el metil mercurio son fácilmente absorbibles en el tracto gastrointestinal y en el sistema nervioso central (CNS), ocasionando la muerte y/o disfunciones mentales y motores (el mercurio metálico es también neurotóxico pero no han sido hallados niveles significativos en agua).

El mismo autor menciona que el mercurio orgánico también atraviesa fácilmente la barrera placentar del feto. El pescado muy salado y en ocasiones el pescado fresco en una mayoría de casos bioacumulan significativamente mercurio orgánico. El vapor de mercurio y sus sales solubles en agua corroen las membranas del organismo. El envenenamiento progresivo que se da al ingerir durante largos periodos pequeñas cantidades del metal o de sus sales liposolubles en especial el metil mercurio llega a provocar daños irreversibles en el cerebro, hígado y riñón.

⁶⁶ USEPA. Environmental Protection Agency = Agencia de Protección Medioambiental de los E. U. En: LETTERMAR, R. D. (Editor técnico). Calidad y tratamiento del agua. Manual de suministros de agua comunitaria. Madrid, España: American Waters Works Association, Editorial MCGRAW-HILL-INTERAMERICANA DE ESPAÑA. 2002. p. 76.

⁶⁷ AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCE AND DISEASE REGISTRY. Division of Toxicology. Toxicology profile for mercury. En: LETTERMAR, R. D. (Editor técnico). Calidad y tratamiento de agua. Manual de suministros de agua comunitaria. Madrid, España: American Waters Works Association, Editorial MCGRAW-HILL- INTERAMERICANA DE ESPAÑA. 2002. p. 77.

⁶⁸ COHN, P. D; COX, M. y BEGER, P. (Consulta). En: LETTERMAR, R. D. (Editor técnico). Calidad y tratamiento de agua. Manual de suministros de agua comunitaria. Madrid, España: American Waters Works Association, Editorial MCGRAW-HILL- INTERAMERICANA DE ESPAÑA. 2002. p. 77.

El pescado contaminado con metil-mercurio produjo los famosos envenenamientos por mercurio cerca de la bahía de Minamata, en Japón (Enfermedad de Minamata); descubierta en los años cincuenta caracterizados por una gran cantidad de muertes, desórdenes del sistema nervioso central (CNS) y retraso mental. La causa que la produjo fue el consumo de atún y otros peces con contenidos elevados de mercurio procedentes de vertidos industriales de aquella zona costera. Desde entonces, la mayoría de los estudios epidemiológicos sobre hijos de mujeres con un elevado consumo de pescado de agua salada han mostrado casos similares aunque de menores efectos.

Un estudio reciente de la NTP encontró que el mercurio inorgánico produjo un aumento de los tumores del estomago en ratas macho, con evidencia equivocada en ratas hembra y ratones macho, *In Vitro* el mercurio inorgánico e orgánico arrojaron resultados en ensayos de mutagenidad y genotoxicidad⁶⁹. Desde esos hallazgos, la carcinogenicidad del mercurio no ha sido reevaluada por la USEPA pero su significancia ha sido cuestionada por la NTP⁷⁰.

Los límites MCLG (objetivo máximo del nivel contaminante) y MCL (máximo nivel contaminante) para el mercurio inorgánico son $2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ basados en la inducción de enfermedades autoinmunes del riñón⁷¹.

Dentro de los estudios llevados a cabo en Colombia con respecto a la presencia de Hg en las aguas el reporte de la contaminación en el oleoducto Colombia (Vasconia- Coveñas) registra concentraciones bastante elevadas ($0,3 - 3,9 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) en ejemplares muestreados de Doncella (*Ageneiosus caucanus*), blanquillo (*Sorubim lima*), dorada (*Brycon moorei*) y comelón (*Leporinus muyscorum*)⁷² y según ICONTEC (Norma 1443), la concentración máxima permitida de Hg en carne de pescado debe ser menor a $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. La contaminación con mercurio en las aguas de este sector está muy asociada con la utilización del mismo en la extracción del oro.

Otros estudios llevados a cabo por Olivero *et al*⁷³ al evaluar la contaminación de peces con Hg en las zonas del Canal del Dique y las Ciénagas Grande, de Simití y Capote muestran que en el caso de la primera zona geográfica, la concentración

⁶⁹ AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCE AND DISEASE REGISTRY. Op cit. p. 77.

⁷⁰ SHOENY, R. Use of genetic toxicology data in U. S. EPA. Risk assessment: the mercury study report as an example. In: *Environmental health perspective*. New York, Vol. 107. 1996. p. 669. (663-673)

⁷¹ USEPA. Op cit. p. 77.

⁷² MOJICA, J. ; GALVIS, G.; RESTREPO, R. y GIRALDO, R. Evaluación del recurso pesquero en el área de influencia del Oleoducto Colombia. En: memorias Segundo seminario Nacional de Limnología, Medellín, 1994. p. 33.

⁷³ OLIVEIRO, J.; NAVAS, V.; PEREZ, A.; SOLANO, B.; ACOSTA, I.; ARGÜELLO, E. y SALAS, R. Mercury levels in muscle of some fish species from the Dique Channel. In: *Bull Environmental contamination toxicology*. Cartagena, Colombia. Vol. 58, 1997. p. 868. (865-870).

de mercurio en músculo estuvo entre No detectable y $219 \mu\text{g.kg}^{-1}$ de las especies muestreadas.

El mismo autor afirma que este rango de concentraciones esta por debajo de las encontradas en otros lugares como el Rió Tapajós en la región amazónica, en donde las concentraciones están casi diez veces por encima ($690 \mu\text{g.kg}^{-1}$) que la de los peces del Canal del Dique. Sin embargo, en los especímenes muestreados en el Canal del Dique, la arenca (*Tripurtheus magdalenae*) fue la especie con valores de Hg que podría causar mayor riesgo para el consumidor ($150 \pm 36 \mu\text{g.kg}$). Por su parte, la Ciénaga Grande fue la que presento los mayores niveles de Hg en músculo de pescado, aun por encima de los 0,5 ppm establecidos por la OMS.

González- Mantilla⁷⁴ afirma que si bien estas concentraciones determinan máximos permitidos con miras a establecer seguridad para el consumidor, las mismas concentraciones reportadas en los ejemplares mencionados no han sido evaluadas desde el punto de vista del impacto en su función reproductiva.

4.5.4 El mercurio en la reproducción de las especies. Sharara et al.,⁷⁵ afirman que las exposiciones a tóxicos han venido siendo implicadas en causas potenciales de infertilidad y el mercurio es uno de los potenciales tóxicos con característica de disruptor endocrino.

Estudios realizados por Homma et al.,⁷⁶ en animales han demostrado que el mercurio posee efectos adversos sobre la espermatogénesis Sin embargo, datos sobre la relación entre el mercurio y la infertilidad de machos en humanos ha sido contradictoria.

En estudio *in vitro*, hechos por Ernst y Lauritsen⁷⁷ se ha demostrado que el mercurio es capaz de inducir anomalías espermáticas. Otros estudios *in vivo* han correlacionado las concentraciones de mercurio en sangre y en plasma

⁷⁴ GONZALES-MANTILLA, J. F. Efecto de contaminantes ambientales sobre el sistema reproductivo de los peces. En: DAZA, V.; LANDINEZ, M. y ZANABRIA, A. (Editores). Reproducción de peces en el Trópico. Bogota, Colombia: INCODER, Universidad Nacional de Colombia, 2005. p. 44.

⁷⁵ SHARARA, F.; SEIFER, D. y FLAWS, J. Environmental toxicants and female reproduction. In: *Fertility and Sterility*, Japan, Vol. 70, No 4, 1998. p. 617.

⁷⁶ HOMMA-TAKEDA, S.; KUGENUMA, Y.; IWAMURO, T. y SHIMOJO, N. Impairment of spermatogenesis in rats by Methylmercury. Involment of stage and cell-specific. Germ cell Apoptosis. In: *Toxicology*, Ibaraki, Japan, Vol. 169, No.1, 2001. p. 33.

⁷⁷ ERNST, E. y LAURITSEN, J.G. Effect of organic and inorganic mercury on human sperm motility. In: *Pharmacology and Toxicology*, Tokyo, Vol. 68, No. 6, 1991. p. 443.

seminal con parámetros de anormalidad en el semen⁷⁸. Estudios pilotos en Hong Kong, involucraron a 59 hombres de parejas infértiles, estableciéndose que el 35% presentaban concentraciones elevadas de mercurio en sangre y que las concentraciones de plomo (Pb), aluminio (Al), selenio (Se) y cadmio (Cd) eran normales. En hembras, la demostración del efecto del mercurio sobre la fertilidad ha tenido mayor dificultad, siendo los resultados escasos e inconclusos. En roedores, se observó una relación entre las concentraciones de mercurio elevadas en sangre y la reducción de la fertilidad de las hembras⁷⁹.

Investigaciones relacionadas con los efectos de las diversas formas de mercurio presentes en las aguas muestran interesantes hallazgos. En estudios hechos en *Fundulus heteroclitus*, una especie estearina de Norteamérica, el metilmercurio causó una reducida fertilización debido a una activación prematura de la ova que sufre la ruptura de las vesículas corticales y posterior bloqueo al micrópilo. Las formas inorgánicas de mercurio por su parte fueron causantes de un reducido diámetro del micrópilo⁸⁰.

En otra especie, *Clarias sp.*, el mercurio ha sido encontrado como causante de daño de a las células de Leyding así como un descenso marcado de colesterol plasmático. El descenso en los niveles plasmáticos del colesterol puede tener efectos serios en la síntesis de esteroides sexuales. El mecanismo específico para explicar este efecto no se sabe si obedece a una acción directa en las vías metabólicas encargadas de la síntesis de colesterol o por inducción al sistema P450 de citocromos⁸¹.

4.5.5 Efectos del mercurio sobre la movilidad espermática. En algunos estudios en humanos, la exposición de los espermatozoides al mercurio en niveles altos; se observó que granos de mercurio fueron localizados en las membranas de la cabeza y cola lo cual puede sugerir que hay una alta sensibilidad del flagelo⁸². Se observaron resultados semejantes en primates en las piezas del

⁷⁸ CHIA, S.; ONG, C.; LEE, S. y TSAKOK, F. Blood concentration of lead, cadmium, mercury, zinc and copper and human semen parameters. In: *Arch Androgens*, Hong Kong, Vol. 29, No. 2, 1992. p. 79.

⁷⁹ DAVIS, B.; PRICE, H.; O CONNOR, R.; FERNANDO, K., ROWLAND, A. y MORGAN, D. Mercury vapor and female reproductive toxicity. In: *Toxicology Science*, Yokohama, Japan, Vol. 59, No. 2, 2001. p. 295.

⁸⁰ WEIS, P. y WEIS, J. Effects of embryonic pre-exposure to methylmercury and Hg²⁺ on larval tolerance in *Fundulus Heteroclitus*. In: *Bulletin Environmental contamination Toxicology*, Scotland. Vol. 31. 1983. p. 531. (530-534).

⁸¹ HEATH, A. G. Reproduction. In: *Water Pollution and Fish Physiology*. Boca Raton, E.U., 1995. p. 228.

⁸² ERNST, E. y LAURITSEN, J.G. Op cit. p. 442.

espermatozoides después de la exposición del mercurio también fueron descritos en ratas y monos en espermatozoides expuestos a metilmercurio⁸³.

En estudio *in Vitro* la acción fisiológica del mercurio sobre el espermatozoide es controversial.⁸⁴ Observaron una disminución oxidativa del metabolismo en presencia de metilmercurio indicando un efecto adverso sobre la función mitocondrial del semen en ratas, al tiempo Mohamed *et al.*⁸⁵; estableció que el metilmercurio no induce alteraciones en funciones mitocondriales en espermatozoides de primates.

La alta sensibilidad de la movilidad espermática comparada con la capacidad de fertilización puede deberse al impacto del mercurio sobre la producción de energía mitocondrial y en esta se traduce en debilitados movimientos en el flagelo a bajas concentraciones. El flagelo contiene en mayor grado sulfidril (SH), que son enzimas que se involucran con la movilidad espermática por lo que se cree el mercurio tiene una alta afinidad⁸⁶. *In vivo* el mercurio inhabilita la esteroidogénesis y espermatogénesis en *Clarias batrachus*⁸⁷, y aves de corral (*Gallus domesticus*)⁸⁸. La movilidad espermática pudo ser usada como una predicción de la calidad espermática en la fertilidad y tomada como una combinación de factores similares al porcentaje de movilidad espermática, intensidad y duración del movimiento.

Lahnsteiner *et al.*,⁸⁹ indicaron que el porcentaje de movilidad espermática y velocidad reaccionan mas sensiblemente a los contaminantes en el medio ambiente. Generalmente, los cambios dependen del tipo de esperma y de los tóxicos que se examinen, en los cuales se pueden observar ciertos factores como:

1. Disminución del porcentaje de la movilidad en el momento en que la velocidad permanece constante.

⁸³ MOHAMED, M.K.; LEE, W.I.; MOTTET, N.K. y BURBACHER, T.M. Laser light-scattering study of the toxic effects of Methylmercury on sperm motility. In: *Journal of Andrology*. Tokyo, Vol. 7, 1986. p. 13.

⁸⁴ RAO, M.V. Toxic effects of Methylmercury on spermatozoa *in vitro*. In: *Experiential*, New Jersey, Vol. 45, 1989. p. 986.

⁸⁵ MOHAMED, M.K.; EVANS, T.C.; MOTTET, N.K. y BURBACHER, T.M. Effect of Methylmercury on sperm oxygen consumption. In: *Acta Pharmacologica et Toxicologica*, Budapest, Hungry, Vol. 58, 1986. p. 228

⁸⁶ HUGES, W.L. A physiochemical rationale for the biological activity of mercury and its compounds. In: *Annals of the New York Academy of Sciences*. New York, Vol. 65, 1957. p. 457.

⁸⁷ KIRUBAGARAN, R. y JOY, K.P. Toxic effects of mercury on testicular activity in the freshwater teleost (*Clarias batrachus*). In: *Journal of fish Biology*. Sheffield, U.K., Vol. 41, 1992. p. 310.

⁸⁸ MARETTA, M; MARETTOVA, E. SKROVANET, P. y LEDEC, M. Effect of mercury on the seminiferous epithelium of the fowl testis. In: *Acta Veterinaria Hungarica*, Budapest, Hungry, Vol. 43, 1995. p. 159.

⁸⁹ LAHNSTEINER, F.; MANSOUR, N. y BERGEL, B. The effect of inorganic and organic pollutants on sperm motility of some freshwater teleost. In: *Journal of Fish Biology*. Thalheim, Austria. Vol. 65, 2004. p. 1286

2. Disminución del porcentaje de movilidad y la velocidad.
3. Incremento en la velocidad en el momento en el que el porcentaje de la movilidad permanece constante.
4. Incremento en la velocidad cuando el porcentaje de movilidad decrece.
5. Alta variabilidad en los variables de movilidad y velocidad que en los controles.

4.6 PRINCIPIOS DE METODOLOGIA TOXICOLOGICA EXPERIMENTAL.

Están basados en la premisa de que todos los efectos de las sustancias químicas en los tejidos vivos son el resultado de una reacción con o interacción entre cualquier entidad química dada y algún componente del sistema biológico vivo. El resultado de esta reacción se manifiesta como un efecto en una función y en muchos casos en la estructura del sistema biológico. El efecto en la función puede ir no necesariamente acompañado por un cambio detectable en la estructura del sistema biológico es decir, puede ser solo una lesión bioquímica. Este efecto puede ser reversible a falta de una exposición continuada a la sustancia química, o bien puede ocasionar la muerte de la célula⁹⁰.

Loomis⁹¹ define también, que como toda ciencia, la toxicología a desarrollado una metodología para detectar las alteraciones inducidas por sustancias químicas en la función y la estructura de los sistemas vivos, para investigar muchos de los factores que determinan la forma en que las sustancias químicas acceden a las células biológicas, para establecer los parámetros de las condiciones en las que varias sustancias químicas producen o no efectos biológicos y para definir los mecanismos por los cuales las sustancias químicas interaccionan con los diversos componentes de los sistemas vivos para producir directa o indirectamente efectos tóxicos.

El mismo autor describe que como resultado del desarrollo de esta metodología toxicológica, han llegado a ser evidentes ciertos principios generales. Estos principios se aplican a muchos, o quizás a todos, los procedimientos de ensayo toxicológico. Son los siguientes:

1. Para que un agente químico produzca un efecto biológico, debe entrar en contacto inmediato con las células en consideración.
2. Para cada sustancia química existe una cantidad por debajo de la cual no produce efecto detectable en un sistema biológico, y una cantidad por la cual

⁹⁰ LOOMIS, T. Fundamentos de Toxicología. Zaragoza, España. Editorial ACRIBIA. p. 183.

⁹¹ Ibid. Opc cit, p. 184

produce un efecto significativo en todos los sistemas biológicos. Entre estos sistemas se encuentra el intervalo de cantidades en el que toda sustancia química ocasionara un efecto significativo en algunos tipos de sistemas biológicos.

3. Las células que tienen funciones parecidas y vías metabólicas similares en varias especies por lo general se verán afectadas de forma parecida por una entidad química dada.
4. Pequeños cambios en la estructura de un agente químico pueden influir en gran manera en su acción biológica.

El mismo autor afirma que la descripción de la relación directa entre la concentración de una sustancia química y cualquier respuesta dada es cierta para todos los compuestos que normalmente no están presentes en el sistema biológico (compuestos frecuentemente llamados “xenobióticos” termino derivado de la palabra “xeno”, que significa extraño o ajeno), este concepto no se mantiene en el caso de compuestos normalmente presentes en el sistema biológico (es decir, compuestos endógenos normales).

4.6.1 Biotransformación de los medicamentos y tóxicos. Muchas sustancias extrañas al organismo son transformadas químicamente en el hasta el punto en que haya mecanismos adecuados para su transformación. Para distinguir los cambios químicos de sustancias afines al organismo (metabolismo), se utiliza el concepto de *biotransformación* para señalar los cambios químicos sufridos por los compuestos extraños a él. La biotransformación puede, pero no tiene forzosamente que conducir a la inactivación (detoxificación) de agentes químicos. Por otra parte, las sustancias inactivas pueden pasar a una forma farmacológicamente activa por biotransformación (toxicidad). Junto a procesos hidrolíticos juegan también un papel ciertas reacciones, en las cuales la primitiva molécula se ve agrandada por inactivación biológica. La mayoría de las reacciones de biotransformación conocidas hasta ahora son catalizadas por enzimas del retículo endoplasmático (microsomas). Otras reacciones son determinadas por enzimas disueltas en el citoplasma o en los líquidos titulares⁹².

4.6.2. Toxicología de los metales pesados. Los iones de metales pesados reaccionan con las proteínas. Como las proteínas se consideran electroquímicamente como compuestos anfóteros, pueden reaccionar tanto como aniones como cationes. Muchas sales de metales pesados a concentraciones adecuadas precipitan las proteínas. Los metales pesados pueden reaccionar también con grupos SH- de las proteínas. Como los grupos SH- en las enzimas

⁹² FRIMMER, M. Farmacología y Toxicología veterinaria. Zaragoza, España. Editorial ACRIBIA, 1973. p. 34.

tienen frecuentemente carácter funcional, los metales pesados pueden inhibir a una serie de enzimas⁹³.

4.7 DETERMINACION DE LAS CARACTERISTICAS SEMINALES EN PECES.

Para Cruz-Casallas y Velasco-Santamaria⁹⁴ la evaluación de la calidad seminal ha sido objeto de numerosos estudios y comprende las siguientes etapas:

- a) Obtención de la muestra de semen
- b) Determinación de las características macroscópicas
- c) Evaluación de las características microscópicas.
- d) Pruebas bioquímicas.
- e) Pruebas de fertilidad.

Tanto las variables evaluadas como los procedimientos utilizados para determinar la calidad seminal en los peces, han sido adaptados de aquellos empleados en animales de granja como bovinos, ovinos y equinos.

“En términos generales, la calidad seminal es determinada calculando el porcentajes de espermatozoides móviles, la concentración espermática por unidad de volumen, la tasa de fertilización de los oocitos viables o midiendo algunos parámetros del metabolismo celular”⁹⁵. Sin embargo, en los peces, aun no han sido establecidos parámetros que permitan clasificar el potencial reproductivo de un individuo en particular, debido principalmente a que las características seminales difieren considerablemente entre las especies; luego la información disponible constituye apenas una referencia de las características seminales consideradas propias de las especies⁹⁶.

Finalmente, es necesario tener en cuenta que el espermatozoide de la mayoría de los teleósteos difiere del de los mamíferos en cuatro aspectos importantes:

- Es inmóvil al momento de la eyaculación
- La movilidad es adquirida únicamente después de entrar en contacto con el agua

⁹³ FRIMMER, M. Op cit p. 265

⁹⁴ CRUZ-CASALLAS, Pablo Emilio y VELASCO – SANTAMARIA, Yohana Maria. Op cit. p. 176.

⁹⁵ HONEYFIELD, D. C. y KRISSE, W. F. Measurement of milt quality and factors affecting viability of fish spermatozoa. In: TIERSCH, T. R. y MAZIK, P. M. (Editors). Cryopreservation in Aquatic Species: World Aquaculture Society. Baton Rouge, Louisiana. 2000. p. 50.

⁹⁶ CRUZ-CASALLAS, P.E. y VELASCO – SANTAMARIA, Y. M. Op cit. p. 176

- Los espermatozoides permanecen móviles por un corto periodo de tiempo, raras veces superior a 50 s

Los espermatozoides carecen de acrosoma⁹⁷.

4.7.1 Obtención del semen. El semen puede obtenerse de animales que han alcanzado la madurez gonadal espontáneamente o de ejemplares cuya espermiación ha sido inducida hormonalmente. En yamú (*B. amazonicus*) y cachama blanca (*P. brachypomus*), una dosis de 4,0 mg.kg⁻¹ de peso corporal de extracto de hipófisis de carpa (EHC), administrada vía intramuscular 18 a 24 h antes de la extracción del semen, ha mostrado ser efectiva para inducir la espermiación en estas especies⁹⁸. Es necesario, anotar que el tratamiento hormonal puede modificar algunas de las características del semen, tales como el volumen y la concentración espermática.

En la mayoría de los peces la recolección del semen es un procedimiento sencillo, ya que una simple presión sobre la cavidad abdominal (estrujamiento) puede hacer fluir el semen a través de la papila urogenital. En animales criados en cautiverio y sometidos a frecuente manipulación, el semen puede extraerse sin tranquilizante o sedante. Sin embargo, en individuos procedentes del ambiente o sometidos a poco manejo es aconsejable un sedante leve, inducido por inmersión en una solución anestésica, como por ejemplo 300 ppm de 2 - fenoxietanol (0,3 mL. L⁻¹ de agua). Una vez el animal haya perdido el eje de nado se retira inmediatamente de la solución anestésica y se seca cuidadosamente, con especial énfasis en las aletas y abdomen para evitar la contaminación con agua durante la obtención del semen, ya que esta activa la movilidad espermática.

4.7.2 Evaluación del semen. Comprende tanto la determinación de características macroscópicas, observables a simple vista, como la medición de variables que requieren la ayuda de instrumentos como el microscopio óptico (características microscópicas).

- **Características macroscópicas.** Inmediatamente después de recolectada la muestra deben registrarse las siguientes variables:

a) Volumen. Se mide directamente dentro del recipiente de recolección, por lo cual se recomienda siempre utilizar un tubo aforado para recibir el semen. Esta característica se expresa en mL y su valor puede utilizarse posteriormente para

⁹⁷ KIME, D. E.; VAN LOOK, K. J. W.; MCALLISTER, B. G.; HUYSKENS, G.; RURANGWA, E. y OLLEVIER, F. Computer-assisted sperm analysis CASA as tool for monitoring sperm quality in fish. In: *Comparative Biochemistry and Physiology*. Seffield, U. K.. Vol. 130. 2001. p. 427. .

⁹⁸ CRUZ-CASALLAS, P. E.; PARDO-CARRASCO, S. P.; ARIAS-CASTELLANOS, J. A.; LOMBO-CASTELLANOS, P. E.; LOMBO-RODRIGUEZ, D. A. y PARDO-MARIÑO, J. E. Cryopreservation of yamú *Brycon siebenthalae* milt. In: *World Aquaculture Society*. Villavicencio, Colombia. Vol. 35, No. 4, 2004, p. 532

calcular el número total de espermatozoides presentes en la muestra, así como la cantidad de espermatozoides obtenidos por kilogramo de reproductor.

b) Color. Esta característica sirve como referencia indirecta de la concentración espermática. Normalmente el semen debe presentar una coloración blanco marfil, cuya intensidad guarda relación directa con el número de espermatozoides por unidad de volumen. Sin embargo, la coloración del semen permite conocer principalmente la presencia de contaminantes tales como materia fecal, bilis o sangre, los cuales afectan negativamente la calidad espermática.

c) Viscosidad. En una medida subjetiva de la consistencia o densidad del material seminal, basada en el aspecto visual que presenta la muestra y que puede ir desde líquido hasta viscoso⁹⁹. Se califica en una escala de 0 a 4, siendo 0 el menor grado de viscosidad.

- **Características microscópicas.** Deben determinarse dentro de la media hora siguiente a su recolección, ya que como se menciona anteriormente, a medida que pasa el tiempo su calidad disminuye considerablemente, especialmente la movilidad.

a) Concentración espermática. Consiste en el número de células espermática por unidad de volumen y se expresa en millones de espermatozoides por microlitro o por mililitro. Para su determinación se utiliza el método del hemocitómetro para cualquier cámara contadora de partículas como de Neubauer, la cual ha sido empleada con éxito en muchas especies de animales domésticos¹⁰⁰ y en varias especies.

El método consiste en diluir la muestra de semen empleando pipetas de precisión (micropipetas), para luego colocar una gota en la cámara Neubauer y hacer el recuento individual de los espermatozoides localizados en cinco (0,2 mm²) de los 25 subcuadros del cuadro central (1,0 mm²), el cual es utilizado tradicionalmente en hematología para el recuento de glóbulos rojos. Se recomienda realizar el conteo en las dos cuadrículas de la cámara y utilizar el promedio para los cálculos posteriores. Como diluyente puede utilizarse solución salina fisiológica (0,9 % NaCl) o cualquier otro medio isosmótico con el plasma seminal, que conserve la integridad de las células¹⁰¹.

⁹⁹ SUQUET, M. ; OMNES, M. H.; NORMANT, Y.; FAUVEL, C. Assessment of sperm concentration and motility in turbot (*Scophthalmus maximus*). In: *Aquaculture*, New Jersey. Vol. 101. 1992. p. 1779.

¹⁰⁰ SORENSEN, A. Reproducción Animal, Principios y Prácticas. México, D.F. Editorial McGraw-Hill.

¹⁰¹ CRUZ-CASALLAS, P.E. y VELASCO – SANTAMARIA, Y. M. Op cit p. 176

Antes de contar las células, la cámara debe mantenerse en una atmósfera húmeda durante al menos 10 minutos, para permitir que los espermatozoides se ubiquen por decantación en un mismo plano focal del microscopio.

4.7.3 Movilidad espermática. Durante la reproducción natural, en las especies con fecundación externa, la movilidad es inducida por el simple contacto del medio acuoso. Por lo tanto, para evaluar la movilidad espermática es necesario adicionar a la muestra de semen agua o una solución hiposmótica que active el movimiento de los espermatozoides.

Inicialmente puede estimarse el porcentaje de movilidad global o en masa, el cual consiste en observar una gota de semen inmediatamente después de adicionarle agua u otra solución activadora, la cual debe tener una osmolaridad inferior a la del plasma seminal, como por ejemplo bicarbonato de sodio (NaHCO_3) al 1% en proporción 1:10 a 1:100 (semen: solución activadora). La solución de NaHCO_3 es especialmente útil para activar la movilidad espermática de semen crioconservado¹⁰².

La muestra diluida debe observarse con objetivo de bajo aumento (máximo de 10X) y la movilidad masal se califica subjetivamente con base en la amplitud de las ondas o remolinos que desplieguen las células en movimiento. Su valor puede expresarse directamente en porcentaje o en una escala de 1 a 4, donde 1 \approx 0 – 25 % ; 2 \approx 25 – 50% ; 3 \approx 50 – 75% y 4 \approx 75 – 100% de espermatozoides móviles¹⁰³.

4.7.4 Pruebas de fertilidad. Deben seleccionarse hembras sexualmente maduras, que presenten oocitos con predominancia de sus núcleos o vesículas germinativas en posición excéntrica¹⁰⁴. En la mayoría de las especies tropicales de agua dulce, la ovulación puede inducirse hormonalmente con EHC, administrado según los protocolos establecidos para cada especie. Después de la ovulación, los oocitos son extraídos por estrujamiento y recibidos en un recipiente limpio y completamente seco, para evitar que la humedad ocasione su hidratación prematura. Posteriormente se prepara baches de oocitos (de 2 – 4 g cada uno) para ser sembrados con el material que se requiere evaluar. Los oocitos pierden fertilidad poco tiempo después de ovulados (30 min). El volumen de solución activadora a ser adicionado, dependerá de la cantidad de oocitos utilizada, pero debe mantenerse una proporción 1:3 (oocitos : solución activadora)¹⁰⁵

¹⁰² CRUZ-CASALLAS, P. E.; PARDO-CARRASCO, S. P.; ARIAS-CASTELLANOS, J. A.; LOMBO-CASTELLANOS, P. E.; LOMBO-RODRIGUEZ, D. A. y PARDO-MARIÑO, J. E. Op cit p. 533

¹⁰³ SUQUET, M. ; OMNES, M. H.; NORMANT, Y.; FAUVEL, C. Assessment of sperm concentration and motility in turbot (*Scophthalmus maximus*). In: *Aquaculture*, New Jersey. Vol. 101. 1992. p. 179

¹⁰⁴ BRUZCA, E. The in vivo method of estimating the stages of maturation in carp (*Cyprinus carpio*). In: *Acta Hydrobiology*. Massachusset. Vol. 20, 1979. p. 426. (423-433).

¹⁰⁵ CRUZ-CASALLAS, P.E. y VELASCO – SANTAMARIA, Y. M. Op cit. p. 191

Los mismos autores mencionan que debido a que muchos factores influyen sobre la fertilidad, es necesario realizar varias observaciones o repeticiones, empleando, diferentes incubadoras experimentales simultáneamente, cuyo diseño y construcción deben corresponder con las utilizadas en la producción comercial de alevinos. La medición de la fertilidad debe efectuarse después de seis y ocho horas de incubación, temperatura ambiente 27 °C, para Yamú y cachama blanca. El resultado se expresa en porcentaje, el cual se determina a partir del cálculo de la proporción de óvulos fertilizados sobre el total de oocitos observados de muestras tomadas aleatoriamente de cada una de las incubadoras utilizadas.

4.8 SISTEMA DE ANÁLISIS DE MOVILIDAD ESPERMÁTICA ASISTIDO POR COMPUTADOR (CASA).

Un análisis más detallado implica evaluar la movilidad individual, la cual requiere un sistema asistido por computador (Computer – Assisted Sperm Analysis, CASA), cuya técnica ya ha sido válida en varias especies de peces¹⁰⁶,

Los componentes principales de este sistema están integrados básicamente por un microscopio equipado con objetivos y condensador de contraste de fase, cámara contadora de partículas, cámara digital, ordenador y el software correspondiente.

Este software provee, de una manera rápida la medición cuantitativa de los efectos del medio ambiente contaminado sobre la calidad espermática de los peces. Este sistema mide básicamente ciertas variables implicadas con importancia en la reproducción de las especies como la movilidad y la velocidad, de los cuales derivan otros factores.

Dentro de las variables de movilidad medidas en porcentaje se tiene:

- **Movilidad progresiva rápida lineal (WHOa).** Porcentaje de estructuras que se mueven linealmente, incrementando su movilidad de manera rápida.
- **Movilidad progresiva lenta lineal (WHOb).** Porcentaje de estructuras que se mueven linealmente, pero de manera más pasiva que otros
- **Movilidad circular (WHOc).** Porcentaje de estructuras que al ser activados se localizan en un solo lugar y dirigen sus movimientos circularmente.
- **Amóviles (WHOd).** Porcentaje de estructuras que en el momento de la activación no presentan ningún tipo de movilidad (inmóviles).

¹⁰⁶ RAVINDER, K.; NASARUDDIN, K. ; MAJUMDAR, K. C. y SHIVAJI, S. Computerized analysis of motility, motility patterns and motility parameters of spermatozoa of carp following short-term storage of semen. In: *Journal of fish Biology*. Thalheim, Austria. Vol. 50, 1997. p. 1320. (1309-1328).

Dentro de las variables de velocidad medidas en $\mu\text{m}\cdot\text{seg}^{-1}$:

- **Velocidad curvilínea (VCL).** La suma del incremento de las distancias en las que se mueve cada estructura a lo largo del patrón de muestra dividido por el total del tiempo del recorrido.
- **Velocidad en línea recta (VSL).** La distancia en línea recta desde el punto de salida y el final del recorrido; dividido por el tiempo de recorrido.
- **Patrón de velocidad angular (VAP).** Un derivado del patrón, basado en un número promedio de puntos y dividido entre el tiempo total de recorrido.

De las células con movimiento, el programa también puede medir:

- **ALH.** Amplitud lateral del desplazamiento de la cabeza en $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$.
- **LIN.** Linealidad del movimiento.
- **WOB.** Grado de oscilación.

Varios estudios han utilizado la movilidad espermática como un sistema sensible y como un bioindicador de contaminación acuática con gran éxito. El programa CASA (computer-assisted sperm motility analysis system) ha permitido evaluar el efecto de la contaminación sobre la movilidad espermática de manera objetiva¹⁰⁷, siendo esto de gran importancia dada que la contaminación de las aguas puede actuar sobre los gametos liberados afectando la reproducción de los peces.

¹⁰⁷ KIME, D.E.; EBRAHIMI, M.; NYSTEN, K.; ROELANTS, I.; RURANGWA, E.; MOORE, H.D. y OLLEVIER, F. Use of computer-assisted sperm analysis (CASA) for monitoring the effects of pollution on sperm quality of fish, application to effects of heavy metals. In: *Aquatic Toxicology*, Sheffield, U.K., Vol. 36, 1996. p. 235.

5. DISEÑO METODOLÓGICO.

5.1 LOCALIZACIÓN.

El trabajo se realizó en el Laboratorio de Reproducción y Crioconservación del Instituto de Acuicultura de la Universidad de los Llanos (IALL), localizado en la ciudad de Villavicencio, departamento del Meta, ubicado en la región centro-oriental (Orinoquía) de Colombia entre los 1°39' y 4°53' de latitud norte y los 71°05' y 74°58' de longitudinal oeste de Greenwich. El clima esta caracterizado por una temperatura entre los 20,2 y 34,4 °C (media de 24 °C), humedad relativa del 83%, velocidad del viento 1,6 m/seg, brillo solar de 1.200 horas/año y precipitación pluvial de 5,062 mm anuales¹⁰⁸.

5.2 INSTALACIONES, EQUIPOS Y MATERIALES.

Las instalaciones que se utilizaron hacen parte de la infraestructura del IALL que cuenta con los implementos necesarios para llevar a cabo proyectos de investigación en la rama de reproducción de especies nativas y ornamentales, así mismo en nutrición de especies ícticas. Algunos laboratorios y oficinas cuentan con aire acondicionado, a excepción de la del laboratorio de bioensayos y salas alevinaje y de ornamentales, exposición de fotoperiodo luz/día. Temperatura promedio de 25 °C.

5.2.1 Equipos y utensilios. Los equipos utilizados son:

- Balanza digital de 0,1 g.
- Balanza analítica de 0,01 g.
- Computador con instalación del software CASA.
- Cámara Makler.
- Microscopio Nikon.
- Centrifuga E.B.A 12.

En los utensilios que se usaron:

- Vidriería y material plástico: Erlenmeyer, recipientes ámbar, vidrios de reloj, microcapilares, tubos de ensayos, tubos Eppendorf, jeringas (1 ml), baldes y cubetas plásticas, nasas.

¹⁰⁸ INSTITUTO DE HIDROLOGIA, METEOROLOGIA Y ESTUDIOS AMBIENTALES (IDEAM). Localización geográfica Instituto de Acuicultura de los Llano (IALL). Bogotá: IDEAM. (Consultado, 18 de mayo de 2006). Disponible en Internet, URL: www.ideam.gov.com.

- Hormona extracto pituitario de carpa (EPC), hielo.

5.2.2 Productos químicos. Los productos químicos utilizados fueron:

- Cloruro de mercurio (Quecksilver (II) – Chlorid. Zur – Analyse. Sublimat HgCl₂ E, MERCK Darmstadt. 250 g).
- Solución salina fisiológica (0,9 % NaCl).
- Agua destilada estéril.

5.3 MATERIAL BIOLÓGICO.

Todos los animales fueron obtenidos de estanques en tierra pertenecientes al IALL. Los animales fueron capturados con chinchorro en los estanques. Luego se procedió a seleccionar los machos de acuerdo a sus características externas de madurez y con presencia de semen a la espermiación. El número total de animales que se muestrearon para la selección fueron de 23 machos de los cuales se emplearon ocho machos adultos de *Rhamdia sebae*, clínicamente sanos (sin presencia de alteraciones macroscópicas evidentes en la piel ojos y branquias, nado en eje vertical, mantención del eje de ando y respuesta ante el estímulo de los reflejos, ANEXO A) con un peso promedio de 86.85 g y con una talla promedio de 22,32 cm (figura 6). Después de la selección se mantuvieron en tanques de 500 litros de capacidad para luego ser trasladados al laboratorio de bioensayos.

Figura 6. a) Medición de la talla de un ejemplar macho de *Rhamdia sebae* c.f. b) pesaje de ejemplar macho de *Rhamdia sebae* c.f



5.4 PLAN DE MANEJO

5.4.1 Sala de Bioensayos y laboratorio de Reproducción y Crioconservación.

Para la realización de cada uno de los ensayos, se verificó, que se contara con todos los elementos y equipos necesarios, acuarios, líneas de energía y aire, para evitar contratiempos durante los ensayos.

5.4.2 Agua. En todas las pruebas realizadas, se utilizó agua natural de pozo, extraída y conducida a los laboratorios de bioensayos, reproducción y crio conservación, sala de alevinaje, sala de ornamentales y demás estancias del Instituto. Presenta una temperatura promedio de 25 °C. Esta agua es debidamente aireada con un blower, generando un contenido mínimo promedio de oxígeno 4,0 mg.L⁻¹ demás parámetros físico químicos se observan en el ANEXO B.

5.4.3 Acuarios. Para la preparación de los acuarios (capacidad de 45 litros) fueron lavados y seguidamente desinfectados con formol al 46 % por dos horas, con esto se puede garantizar una mayor eliminación de agentes patógenos y residuos de anteriores ensayos que afecten a los animales y por tanto a los resultados del ensayo. Una vez esto se procedió a enjuagar con abundante agua, para eliminar los residuos del formol y por ultimo llenarlos con agua.

5.4.4 Peces. Cada uno de los ejemplares de *Rhamdia sebae* c.f , seleccionados para los ensayos, fueron mantenidos bajo condiciones de laboratorio tres días antes de las pruebas, colocados individualmente en cada uno de los acuarios y alimentados dos veces al día.

5.4.5 Inducción hormonal. Para obtener un buen volumen seminal, los ejemplares fueron estimulados hormonalmente con extracto de hipófisis de carpa (EHC), aplicada en dosis única de 4,0 mg.kg⁻¹ de peso vivo. En los cálculos correspondientes los animales fueron pesados en una balanza digital y de igual modo fue determinada la talla estándar utilizando un ictiometro. Para lo anterior los peces fueron sometidos a anestesia por frío (c.a. 8° C); técnica utilizada por Ashley¹⁰⁹ en la cual menciona que el objetivo de la sedación con hielo es disminuir el metabolismo y por tanto facilitar la manipulación; y en este caso, debido al corto periodo de manipulación y los posibles efectos del anestésico sobre las características espermáticas, se decidió sedar los peces de este modo. Luego de realizar los cálculos de la dosis, se procedió a pesar la hormona en una balanza analítica y luego disolver su contenido en suero fisiológico, haciendo maceración sobre la base de un vidrio reloj, hasta lograr una solución totalmente homogénea y obteniendo un volumen aproximado de 1.0 mL, los cuales fueron aplicados en la base posterior de aleta caudal vía intramuscular, este procedimiento se repitió en cada uno de los animales.

¹⁰⁹ ASHLEY, P. J. Fish welfare: Current issues in aquaculture. In: *Applied Animal Behaviour Science*, Vol.104 (3-4), 2007. p.122.

5.4.6 Obtención del semen. Las muestras seminales se obtuvieron post inducción hormonal (18-22 horas de aplicada la hormona). Los peces fueron anestesiados nuevamente en hielo para reducir movimientos bruscos en el momento de la extracción del semen. Previo a la extracción, el poro urogenital fue secado con un paño absorbente para evitar el contacto del semen con el agua. En cada uno de los machos se realizó una leve presión abdominal, para eliminar orina o materia fecal que pudiera contaminar la muestra, posteriormente el semen fue recogido en un tubo eppendorf aforado, obteniendo un volumen aproximado de 1 mL, por cada macho de *Rhamdia* (Figura 7).

Figura 7. Obtención de semen de *Rhamdia sebae* c.f por medio de presión abdominal



5.5 EVALUACIÓN DEL SEMEN.

Para este fin se determinaron las características macroscópicas y microscópicas de la muestras seminales en la barbilla (*Rhamdia sebae* c.f) en cada uno de los experimentos.

5.5.1 Observación macroscópica de la muestra seminal.

- **Volumen.** Se utilizó un tubo eppendorf aforado, en donde se colocó la muestra seminal individual de los machos evaluados (1 mL).

- **Color.** Se observó que cada una de las muestras seminales presentara color blanco-marfil, evitando la presencia de coloración rosada debido a que es indicativo de contaminación del semen con sangre u otra sustancia.
- **Viscosidad.** Se seleccionaron aquellas muestras que presentaron una viscosidad buena, basándose en la característica de que el semen se deslice lentamente por el tubo de recolección.

5.5.2 Observación microscópica de la muestra seminal. Estas observaciones se hicieron bajo observación del microscopio.

- **Concentración espermática.** Se realizó una dilución de 1:3000 con solución salina fisiológica (ANEXO C). Una muestra de la dilución se depositó en la cámara de *Neubauer* y se inició el conteo de los espermatozoides bajo el microscopio (40x), obteniendo el número de espermatozoides por mL de semen. Una vez realizado el conteo, la concentración espermática es calculada aplicando la siguiente fórmula:

$$CE = n / (A \times P \times D)$$

Donde, CE = concentración espermática (numero de espermatozoides. μL^{-1}).

n = número promedio de espermatozoides contados en los cinco subcuadros de las dos cuadrículas.

A = área de la cámara de Neubauer contada (generalmente 0,2 mm²).

P = profundidad de la cámara (0,1 mm).

D = dilución del semen (1/ 3000 para *Rhamdia sebae* c.f)

- **Espermatocrito.** Para determinar la proporción de empaquetamiento celular, se calculó el espermatocrito, para lo cual se llenaron microcapilares con semen y se sometieron a centrifugación a 14000 gravedades (12000 r.p.m.) durante 15 minutos. Luego se promedió los datos de los microcapilares y se obtuvo finalmente la proporción (%) de empaquetamiento celular en cada una de las muestras seminales.

- **Movilidad masal.** Se tomaron dos muestra de 0,5 μL de semen de una misma muestra seminal y se depositaron en una lamina excavada (1,0- 1,2 mm de

profundidad) para realizar dos observaciones. Primero se observó al microscopio el borde de la gota seminal, para constatar que la muestra no se halla activado accidentalmente, una vez se comprobó la amotilidad de las muestras, se adicionó 190 μL de agua destilada y se midió el tiempo de activación hasta que las ondas de movimiento cesaron. Estas observaciones se hicieron en cada una de las muestras seminales obtenidas de los machos en cada experimento, expresando la motilidad en términos de porcentaje.

5.5.3 Movilidad espermática individual. Esta fue determinada mediante el análisis espermático asistido por computador (CASA), en la fase de experimentación con las concentraciones de cloruro de mercurio y el semen de *Rhamdia sebae* c.f . Para este fin alícuotas de semen fueron dispuestas en la cámara de Makler y se adicionaron 75 μL de cada una de las concentraciones a evaluar.

5.6 PREPARACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE CLORURO DE MERCURIO PARA LA ACTIVACIÓN DE LA MOVILIDAD ESPERMÁTICA.

Las soluciones de mercurio a utilizar de 10, 100, 500, 1.000, 10.000 y 100.000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ fueron basadas en concentraciones nominales de otros experimentos ya realizados en otras especies; de esta manera se establecieron dosis definitivas. Se utilizó cloruro de mercurio (HgCl_2), este fue pesado en una balanza analítica, la cual fue disuelta en agua destilada y mezclada vigorosamente hasta garantizar completa homogenización del compuesto con el fin de preparar una solución stock. Los cálculos se encuentran detallados en el ANEXO D.

5.7 ACTIVACION Y DETERMINACION DE LA MOVILIDAD Y VELOCIDAD ESPERMATICA.

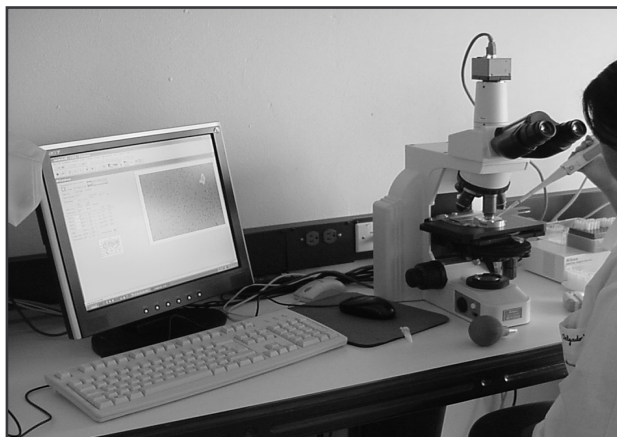
Para el análisis de las muestras seminales en el CASA, se colocaron individualmente alícuotas de 0,5 μL de semen en una cámara de Makler (Sefi-Medical Instruments Ltd, Israel) previamente ubicada en un microscopio óptico (Nikon Eclipse, E-400, Japón) adaptado con una cámara de video. La muestra seminal fue activada con 75 μL de cada una de las concentraciones de HgCl_2 (10, 100, 500, 1.000, 10.000 y 100.000 $\mu\text{g.L}^{-1}$) y la movilidad individual fue registrada en video para posterior análisis en el CASA. En todos las replicas realizadas fue tomado en cuenta un control inicial y un final (sin la presencia de HgCl_2), con el objetivo de observar alguna disminución de la movilidad espermática durante el periodo de aplicación de los diferentes tratamientos. El análisis de cada una de las

muestras en el CASA fue realizado a través de tres intervalos de 10 s cada uno (5-15, 15-25, 25-35 segundos), según lo recomendado por Kime *et al.*¹¹⁰ y Cruz-Casallas¹¹¹ (Figura 8)

El tiempo de exposición del semen al cloruro de mercurio se mantuvo durante un periodo inferior a 60 segundos, ya que el criterio fue el cese de la movilidad espermática.

Con el fin de observar las diferencias entre el tiempo de inicio y el tiempo de finalización de la movilidad, solo se tuvieron en cuenta los intervalos 1 y 3 (tiempo transcurrido entre los 5-15 y 25-35 s después de la activación). Pues se consideran intervalos determinantes en el experimento.

Figura 8. Activación de las muestras seminales con los tratamientos con el análisis espermático asistido por computador (CASA)



¹¹⁰ KIME, D.; VAN LOCK, J.; McALLISTER, G. y OLLEVIER, F. Computer-assisted sperm analysis (CASA) as tool for monitoring sperm quality in fish. In: *Comparative Biochemistry and Physiology*, Sheffield, U.K., Vol. 130, 2001. p. 431.

¹¹¹ CRUZ-CASALLAS, P.E. Técnicas de laboratorios para la evaluación de la calidad seminal en peces. En: *Revista Orinoquía*, Villavicencio, Colombia, Vol. 5, No. 1, 2001. p. 159.

5.8 TRATAMIENTOS. Los tratamientos a evaluar se pueden observar en la tabla 4

Tabla 4. Tratamientos distribuidos en siete concentraciones de cloruro de mercurio (HgCl_2) utilizadas para la activación de las muestras seminales en la barquilla (*Rhamdia sebae* c.f.).

Tratamiento	Concentraciones de Cloruro de mercurio (HgCl_2)
T0	Control (CI - CF)*
T1	10**
T2	100**
T3	500**
T4	1.000**
T5	10.000**
T6	100.000**

* Activación de las muestras seminales en ausencia de cloruro de mercurio; evaluadas al inicio y final de cada uno de los experimentos (CI=control inicial; CF=control final.)

** Activación de las muestras seminales en presencia de cloruro de mercurio expresadas en $\mu\text{g.L}^{-1}$

5.9 VARIABLES EVALUADAS.

La movilidad y velocidad espermática individual en cada una de las muestras seminales sometidas a los tratamientos anteriormente establecidos, fue evaluada por medio del programa asistido por computador para análisis espermático (CASA, MedeaLab, versión 5,1, Alemania).

VARIABLES de movilidad expresadas en porcentaje (%) correspondieron a:

- **Movilidad progresiva rápida lineal (WHOa).** Porcentaje de estructuras que se mueven linealmente, incrementando su movilidad de manera rápida.
- **Movilidad progresiva lenta lineal (WHOb).** Porcentaje de estructuras que se mueven linealmente, de manera lenta.
- **Movilidad circular (WHOc).** Porcentaje de estructuras que al ser activados se localizan en un solo lugar y dirigen sus movimientos circularmente.
- **Amóviles (WHOd).** Porcentaje de estructuras que en el momento de la activación no presentan ningún tipo de movilidad (inmóviles).

Dentro de las variables de velocidad medidas en $\mu\text{m}\cdot\text{seg}^{-1}$:

- **Velocidad curvilínea (VCL).** La suma del incremento de las distancias en las que se mueve cada estructura a lo largo del patrón de muestra dividido por el total del tiempo del recorrido.
- **Velocidad en línea recta (VSL).** La distancia en línea recta desde el punto de salida y el final del recorrido; dividido por el tiempo de recorrido.
- **Patrón de velocidad angular (VAP).** Un derivado del patrón, basado en un número promedio de puntos y dividido entre el tiempo total de recorrido.

5.10 DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Para esto se aplicó un diseño experimental completamente aleatorizado, con efecto fijo y balanceado, con siete tratamientos y ocho replicas ($r=8$). Las replicas correspondieron a los ocho machos de *Rhamdia sebae* c.f de los cuales se obtuvieron muestras seminales individuales que fueron expuestas a cada uno de los tratamientos.

Todos los datos obtenidos fueron expresados como media \pm error estándar de la media (SEM). Los datos fueron sometidos a análisis de homogeneidad de varianza y test de normalidad por medio del test de Bartlett y Kolmogorov-Smirnov, respectivamente. Las variables expresadas en porcentaje fueron transformadas en Arcoseno previo al ANAVA. El efecto de las diferentes concentraciones de HgCl_2 sobre la movilidad y velocidad espermática fueron analizados a través de un análisis de varianza (ANAVA convencional) y posterior análisis de comparación múltiple con la prueba de Tukey. En todos los casos, fue utilizado un valor de $p < 0,05$, como criterio estadístico para revelar diferencias significativas.

5.10.1 Formulación de hipótesis. Se plantearon las siguientes hipótesis para este trabajo.

- **Hipótesis nula:** el efecto de los tratamientos, es igual para cada una de las variables de movilidad y velocidad espermática individual en *Rhamdia sebae* c.f.

$$H_0: \mu_i = \mu_j; i \neq j; i, j = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$$

- **Hipótesis alterna:** al menos unos de los tratamientos tiene efectos diferentes sobre las variables de movilidad y velocidad espermática individual en *Rhamdia sebae* c.f.

$$H_a: \mu_i \neq \mu_j; i \neq j; i, j = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7$$

6. PRESENTACION Y DISCUSION DE RESULTADOS

Anterior a la evaluación de las muestras seminales para la exposición de cloruro de mercurio, como parte de la metodología de estudio, cada muestra seminal fue evaluada de manera macroscópica y microscópica, además se recogieron los datos de la biometría (datos descriptivos) de cada uno de los machos del estudio (ANEXO E).

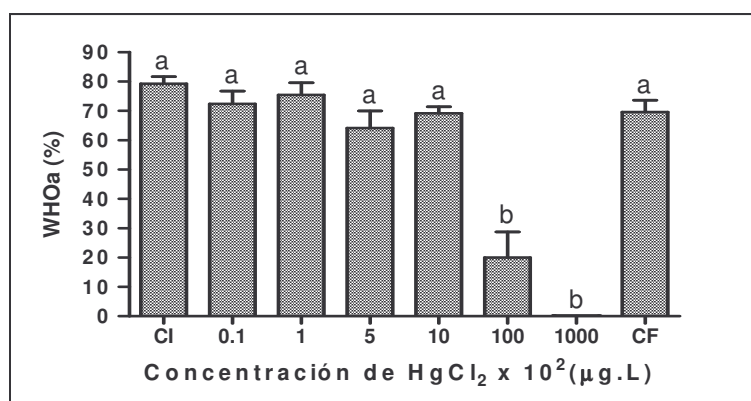
Los datos arrojados por el CASA se observan en el ANEXO F, los cuales se transformaron previos a la ANAVA (ANEXO G). Para este estudio se evaluaron dos tiempos durante los experimentos, estos dos tiempos denominados intervalos uno y tres (5-15, y 25-35 segundos), fueron medidos por el sistema computarizado de análisis espermático (CASA). Para la observación de las diferencias significativas de cada tratamiento se distribuyeron en número de observaciones del 1 al 24, no se tuvieron en cuenta los tratamientos del intervalo dos (15-25 segundos), debido a que el criterio de evaluación tiene importancia en el inicio y cese de la movilidad espermática y simplifica el análisis de cada una de las variables evaluadas; obsérvese en el ANEXO H.

6.1 EFECTO DEL MERCURIO SOBRE LA MOVILIDAD ESPERMATICA.

La exposición del cloruro de mercurio (HgCl_2) como metal pesado demostró ciertos efectos en la movilidad espermática, manifestada en la disminución de esta movilidad en concentraciones de 10.000 y 100.000 $\mu\text{g/L}$ de cloruro de mercurio. A continuación se muestran las observaciones de cada una de las variables evaluadas para la movilidad espermática en la barbilla (*Rhamdia sebae* c.f)

6.1.1 Intervalo uno y tres para Movilidad progresiva rápida lineal WHOa. Para esta movilidad se observa que los datos obtenidos en el primer intervalo (Fig.9) muestran diferencias entre los tratamientos (ANEXO I). los controles y las concentraciones de 10, 100, 500 y 1.000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de cloruro de mercurio, presentan medias mayores en comparación con las concentraciones de 10.000 y 100.000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ en las cuales la movilidad progresiva lineal disminuyó drásticamente presentando valores significativamente menores con respecto a las medias de los otros tratamientos.

Fig. 9. Efecto de la adición de diferentes concentraciones de HgCl_2 , sobre la movilidad espermática progresiva rápida lineal (WHOa) en el intervalo 1. CI=control inicial; CF=control final.

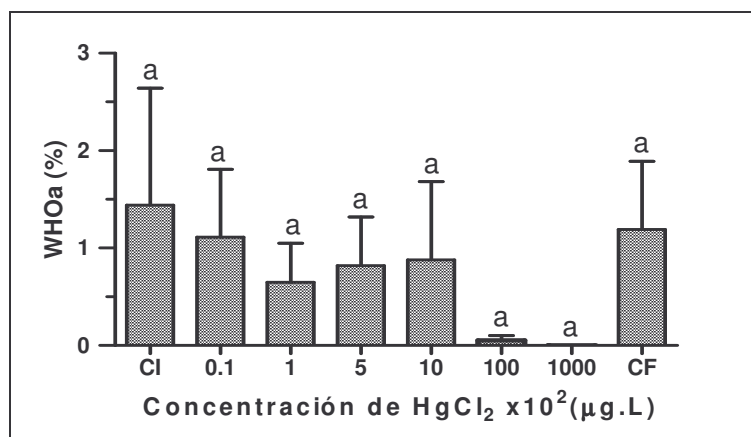


En la Figura 10, se observa que para el tercer intervalo (ANEXO I), la movilidad progresiva rápida lineal (WHOa) disminuye para todas las concentraciones, en consecuencia no muestra ningún efecto al final del intervalo; estos valores representan las medias de menor valor para todos los tratamientos.

En general esta disminución de la movilidad para WHOa en el tercer intervalo se debe a que la reducción de la movilidad en condiciones normales baja progresivamente transcurridos los 25 segundos hasta llegar a cero. Estos valores arrojados significa que en presencia o en ausencia de sustancias tóxicas la movilidad progresiva rápida lineal tiende a disminuir (*in vitro*), cerca de los 25 o más segundos después de la activación, lo que concuerda con lo reportado por Kime et al.,¹¹² donde menciona que los espermatozoides de los peces permanecen móviles por un corto periodo de tiempo, raras veces superior a 50 segundos.

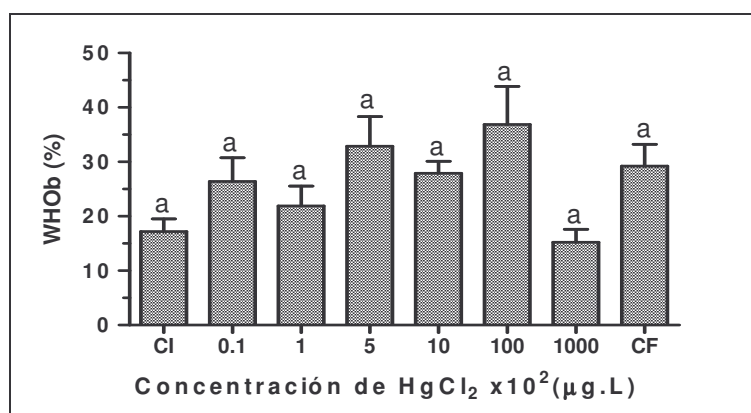
¹¹² KIME, D. E.; VAN LOOK, K. J. W. MCLLISTER, B. G.; HUYSKENS, G.; RURANGWA, E. y OLLEVIER, F. Opc. Cit. p. 420.

Fig. 10. Efecto de la adición de diferentes concentraciones de HgCl_2 , sobre la movilidad espermática progresiva rápida (WHOa) en el intervalo 3. CI=control inicial; CF=control final.



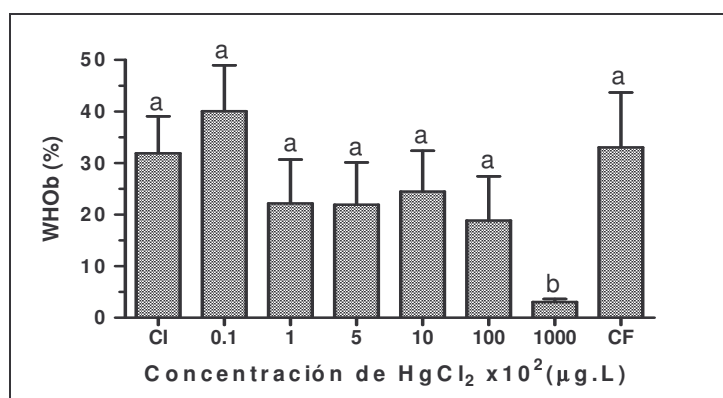
6.1.2 Intervalo uno y tres para Movilidad progresiva lenta lineal (WHO_b). El primer intervalo de la figura 11 no se observa ninguna diferencia entre los tratamientos para WHO_b (ANEXO J). En esta fase del movimiento, un porcentaje de las células espermáticas presentan una tendencia más lenta en comparación a la variable de WHO_a, lo cual indica que existen medias similares entre los tratamientos para esta variable de movilidad espermática.

Fig. 11. Efecto de la adición de diferentes concentraciones de HgCl_2 , sobre la movilidad espermática progresiva lenta lineal (WHO_b) en el intervalo 1. CI=control inicial; CF=control final.



En la Figura 12 se observa que un porcentaje de las estructuras para el tercer intervalo, continua disminuyendo su movilidad, aunque para la concentración de 100.000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de HgCl_2 ocurre un efecto significativo presentando la menor media en comparación con los otros tratamientos (ANEXO J). Es deducible este comportamiento al presentarse en el tercer intervalo, ya que este mide los segundos cercanos al cese de la movilidad, y que esta variable de movilidad mide el porcentaje de células con movimiento lento lo cual acentuaría aun mas el efecto de la concentración de 100.000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de HgCl_2 sobre la variable de movilidad progresiva lenta lineal.

Fig. 12. Efecto de la adición de diferentes concentraciones de HgCl_2 , sobre la movilidad espermática progresiva lenta lineal (WHOb) en el intervalo 3. CI=control inicial; CF=control final.

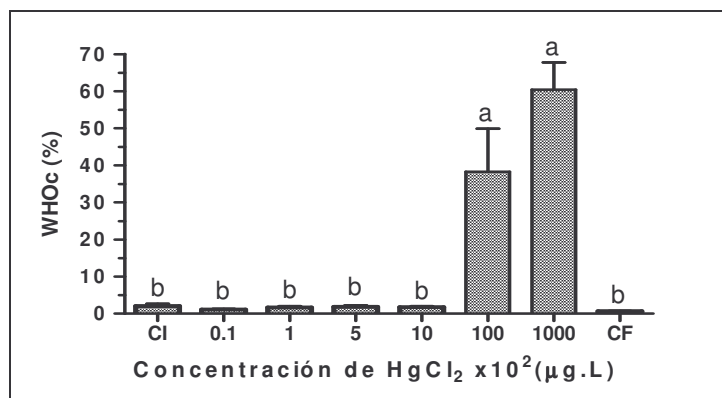


6.1.3 Intervalo uno y tres para movilidad circular (WHOc). En el primer intervalo en la figura 13 se observa que para las concentraciones 10.000 y 100.000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de HgCl_2 (ANEXO K), se observa un efecto significativo con respecto al resto de concentraciones de 10, 100, 500 y 1.000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de cloruro de mercurio y controles. Al contrario de los resultados arrojados por las anteriores variables de movilidad, en este primer intervalo observamos que ahora son estas concentraciones más altas quienes presentan las medias de mayor valor, lo cual indica que posiblemente las concentraciones de 10.000 y 100.000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de HgCl_2 aumenten la cantidad de células con movimiento circular; y en si el cloruro de mercurio actuó sobre estas células alterando su movimiento, lo cual sería perjudicial para el proceso de fertilización en *Rhamdia sebae* c.f; y en concordancia con Kime y Nash¹¹³ con respecto a esta variable, reportan que

¹¹³ KIME, D. E. y NASH, J. P. Opc. cit. p. 125

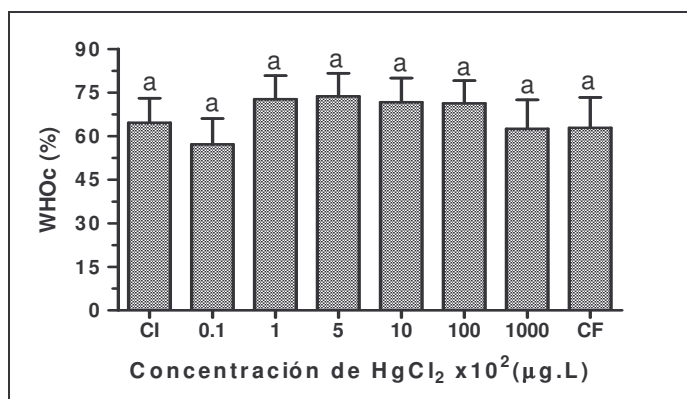
estos movimientos circulares de los espermatozoides afectaran el éxito en la fertilización, y por ende la viabilidad de los gametos cuando los peces han sido expuestos a disrupción endocrina.

Fig. 13. Efecto de la adición de diferentes concentraciones de HgCl_2 , sobre la movilidad circular (WHOc) en el intervalo 1. CI=control inicial; CF=control final.



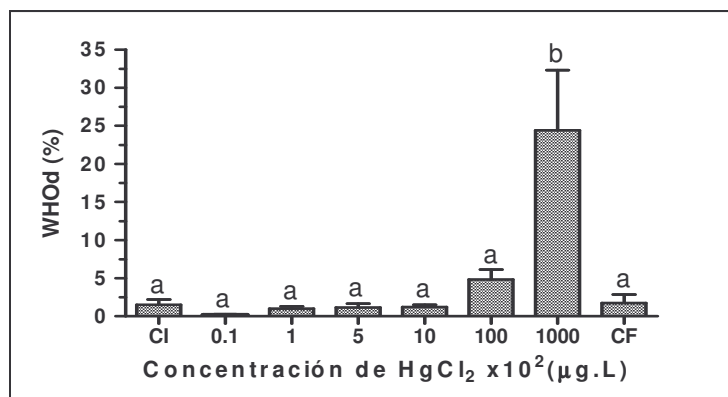
Aunque los porcentajes de movilidad circular para el tercer intervalo son mayores que en el primero, en la figura 14, no se observa ninguna diferencia entre las concentraciones y los controles (ANEXO K), esto puede deberse a que la movilidad disminuye con el tiempo y que el aumento de los porcentajes de estructuras con movimiento circular, ha sido progresivo acercándose al cese de la movilidad, es por eso, es que estas células en la población espermática no alcanzan el éxito en la fertilización y más aun en presencia de un toxico como el mercurio en el medio.

Fig. 14. Efecto de la adición de diferentes concentraciones de HgCl_2 , sobre la movilidad circular (WHOc) en el intervalo tres. CI=control inicial; CF=control final.



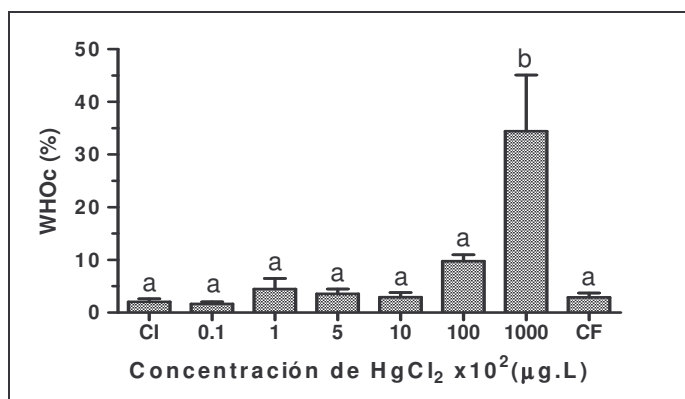
6.1.4 Intervalo uno y tres para estructuras amótiles (WHOd). Las estructuras amótiles están dadas por el porcentaje de células espermáticas que en el momento de la activación no presentan ningún tipo de movilidad. Para el primer intervalo (Fig. 15), las concentraciones de 10, 100, 500, 1.000, 10.000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de HgCl_2 y los controles no mostraron ningún efecto significativo entre ellos; pero si de estos en comparación con la concentración de 100.000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de HgCl_2 ya que esta presentó la mayor media de todos los tratamientos estudiados (ANEXO L). Además es evidente que al aumentar las concentraciones de mercurio no solo se reduce el movimiento sino además por lo observado, se presumiría en este caso, que, a partir de concentraciones de 100.000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de HgCl_2 puede inhibir el movimiento de la célula como consecuencia de la alteración de la integridad y viabilidad de la estructura espermática.

Fig. 15. Efecto de la adición de diferentes concentraciones de HgCl_2 , sobre el porcentual de estructuras amótilas (WHOd) en el intervalo 1. CI=control inicial; CF=control final.



En la Figura 16, se observa que en el tercer intervalo sigue manifestándose el efecto del cloruro de mercurio para la variable WHOd en el tratamiento de exposición de $100.000 \mu\text{g.L}^{-1}$ de HgCl_2 presentando de igual manera la mayor media para esta concentración (ANEXO L). La razón por el cual este efecto permanece de manera similar en ambos intervalos, dado el caso se presume, que desde el inicio de la activación de las muestras seminales con esta concentración inhibió de manera inmediata el movimiento de los espermatozoides que debido a su alta concentración de cloruro de mercurio haya producido la muerte instantánea de los mismos, y que al final de la movilidad después de la activación, muestra el efecto de este toxico sobre las células espermáticas que, en el inicio perdieron la movilidad y las que durante el transcurso y al final fueron afectando su movimiento como resultado a esta exposición.

Fig. 16. Efecto de la adición de diferentes concentraciones de HgCl_2 , sobre el porcentual de estructuras amóviles (WHOd) en el intervalo 3. CI=control inicial; CF=control final.



Como es evidente en la Tabla 5, se observa que todas las variables de movilidad espermática evaluadas en semen de *Rhamdia sebae* c.f, fueron afectadas por los tratamientos de 10.000 y 100.000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de cloruro de mercurio, lo cual indica que estas concentraciones, las más altas del estudio, actúan disminuyendo su movilidad o en algunos casos inhibiendo la actividad de las mismas. Es por esto que ocurre un efecto significativo con concentraciones altas de mercurio, las cuales pueden alterar los diferentes movimientos de los espermatozoides y que estos a su vez modifiquen la viabilidad de los mismos para los procesos de fertilización y que con base en los estudios realizados por Van Look and Kime¹¹⁴ en donde reportan que espermatozoides de *Carassius auratus* expuestos a 0.001 mg.L^{-1} of HgCl_2 presentan un acortamiento del flagelo; así mismo, reportan incremento del área de la cabeza como consecuencia de la disrupción de la membrana y por tanto alteración osmótica, lo cual se presumiría sería el mismo proceso que afectaría las variables de movilidad en este estudio.

¹¹⁴ VAN LOOK, K.J.W., KIME, D.E. Automated sperm morphology analysis in fishes: the effect of mercury on goldfish sperm. In: *Journal of Fish Biology* 63, 2003 1025-1033

Tabla 5. Cuadro de resultados del efecto del cloruro de mercurio en la movilidad espermática de la barbilla (*Rhamdia sebae* c.f).

Variable	Intervalo	Concentración de cloruro de mercurio ($\mu\text{g.L}^{-1}$)							
		CI	10	100	500	1.000	10.000	100.000	CF
WHOa	Uno*	-	-	-	-	-	efecto	efecto	-
	Tres*	-	-	-	-	-	-	-	-
WHOb	Uno*	-	-	-	-	-	-	-	-
	Tres*	-	-	-	-	-	-	efecto	-
WHOc	Uno*	-	-	-	-	-	efecto	efecto	-
	Tres*	-	-	-	-	-	-	-	-
WHOd	Uno*	-	-	-	-	-	-	efecto	-
	Tres*	-	-	-	-	-	-	efecto	-

CI = Control inicial; CF= Control final.

* Tiempo de inicio de la activación (5-15 segundos).

* Tiempo cercano a la finalización de la movilidad (25-35 segundos)

6.2 EFECTO DEL MERCURIO SOBRE LA VELOCIDAD ESPERMÁTICA.

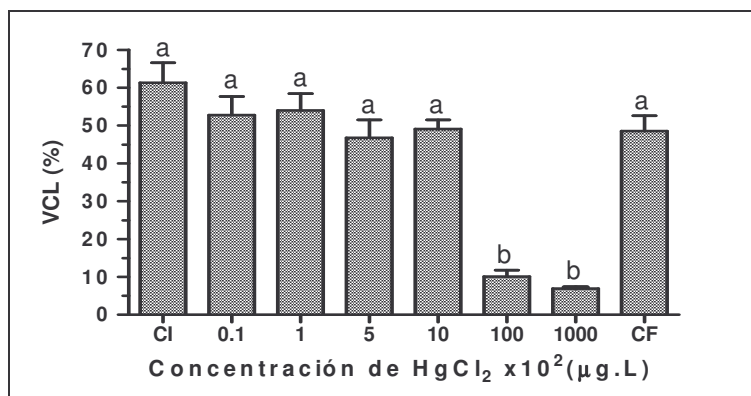
La exposición del cloruro de mercurio (HgCl_2) como metal pesado demostró ciertos efectos en la velocidad espermática, manifestada en la disminución de la velocidad espermática en concentraciones de 10.000 y 100.000 $\mu\text{g/L}$ de cloruro de mercurio.

En la velocidad espermática, el sistema de análisis espermático asistido por computador (CASA), evaluó dos intervalos de tiempo, los cuales se analizarán el primer intervalo (inicio de la activación) y tercer intervalo (final de la activación)

6.2.1 Intervalo uno y tres para Velocidad curvilínea (VCL). En la figura 17, en el primer intervalo se observa diferencias para las concentraciones de 10.000 y 100.000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de HgCl_2 ; las cuales obtuvieron las menores medias de todos los tratamientos para esta variable de velocidad espermática (ANEXO M); lo que indica que a mayores concentraciones de mercurio, disminuye drásticamente la velocidad; a diferencia de las concentraciones más bajas y controles, cuyas velocidades no fueron afectadas significativamente; razón que se le atribuiría a este efecto la disminución de la velocidad y se relacionaría estrechamente con la reducción de la movilidad espermática observada en estas concentraciones lo cual

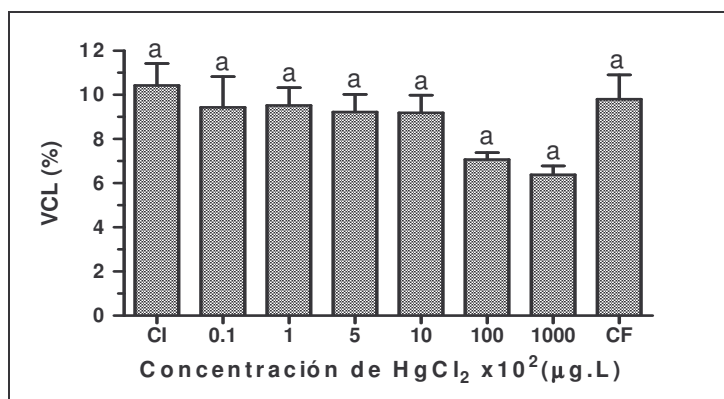
indicaría un efecto negativo en el proceso de fertilización, provocando una alteración en la reproducción de esta especie.

Fig. 17. Efecto de la adición de diferentes concentraciones de HgCl_2 , sobre la velocidad curvilínea (VCL) en el intervalo 1. CI=control inicial; CF=control final.



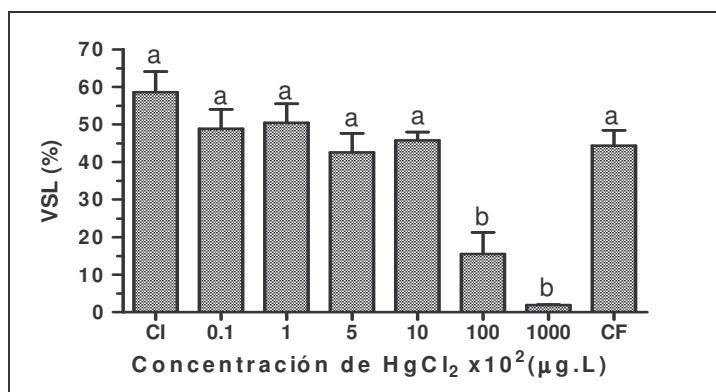
Para el intervalo tres (fig. 18), no se observa ninguna diferencia entre los tratamientos, (ANEXO M) pero se presenta una disminución en la velocidad característicos de las células espermáticas acercándose al cese de la movilidad muy semejante a lo que ocurre con las variables de la movilidad espermática; los valores de las medias de los tratamientos en este intervalo de la velocidad curvilínea no muestran efectos significativos para esta variable.

Fig. 18. Efecto de la adición de diferentes concentraciones de HgCl_2 , sobre la velocidad curvilínea (VCL) en el intervalo 3. CI=control inicial; CF=control final.



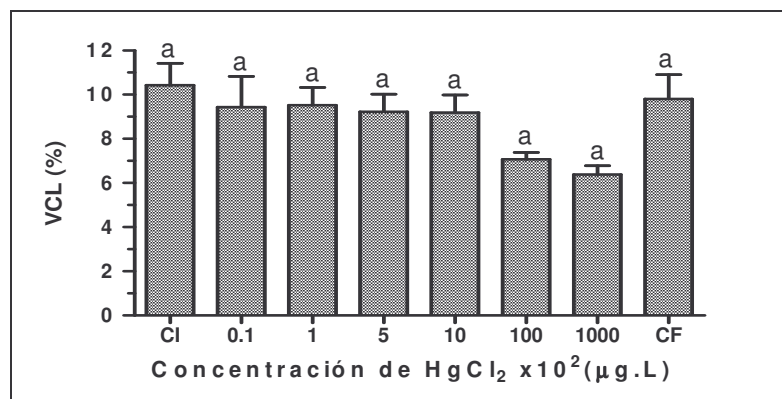
6.2.2 Intervalo uno y tres para velocidad en línea recta (VSL). Para el primer intervalo (Figura 19), los datos muestran una diferencia significativa entre los tratamientos, reduciendo drásticamente la velocidad en las concentraciones de 10.000 y 100.000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de cloruro de mercurio (HgCl_2), presentando estas concentraciones la menores medias de los tratamientos (ANEXO N) y se presume que sean el resultado de los sucedido con relación a la disminución de la movilidad y por lo tanto influya igualmente en el proceso de fertilización. No ocurre ningún efecto en las muestras expuestas a las concentraciones más bajas y los controles.

Fig. 19. Efecto de la adición de diferentes concentraciones de HgCl_2 , sobre la velocidad en línea recta (VSL) en el intervalo 1. CI=control inicial; CF=control final.



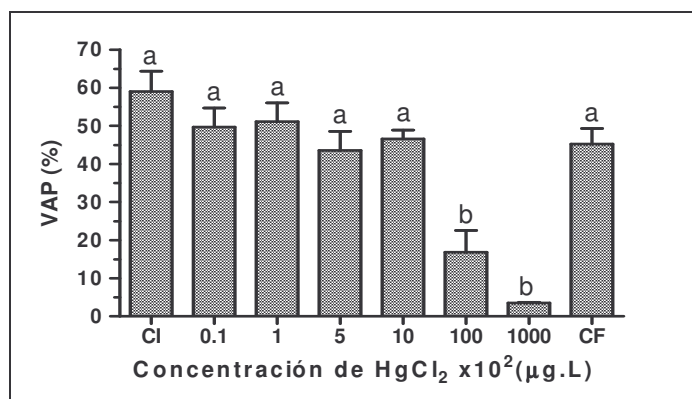
En tercer intervalo (Figura 20) no se observan ninguna diferencia entre los tratamientos (ANEXO N), hay una disminución en la velocidad, que normalmente ocurre cuando la activación de los espermatozoides se acerca al cese de la activación.

Fig. 20. Efecto de la adición de diferentes concentraciones de HgCl_2 , sobre la velocidad en línea recta (VSL) en el intervalo 3. CI=control inicial; CF=control final.



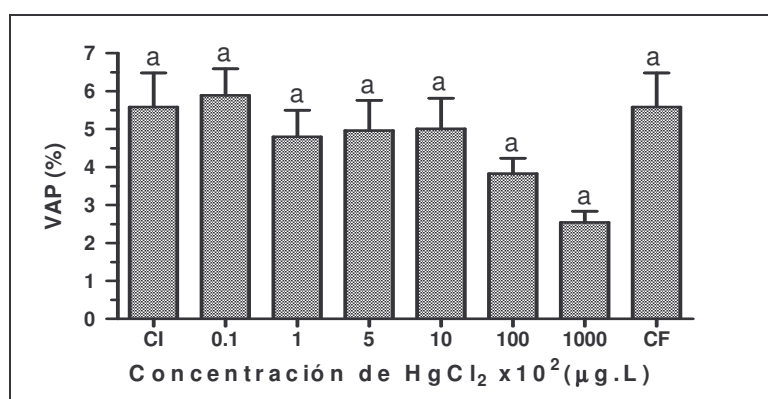
6.2.3 Intervalo uno y tres para Patrón de velocidad angular (VAP). El patrón de velocidad angular mide el promedio de velocidades de todas las estructuras espermáticas analizadas; en la figura 21, se observa una disminución significativa en la velocidad promedio para las concentraciones de 10,000 y 100,000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de HgCl_2 , se observa que estas presentan las menores medias, pero sin mostrar efectos en las concentraciones de 10, 100, 500 y 1,000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de HgCl_2 y los controles (ANEXO O). Lo anterior indica que a mayores concentraciones el efecto del cloruro de mercurio afecta significativamente la velocidad (curvilínea y línea recta) de los espermatozoides y que en concentraciones más bajas no habrá una disminución o puede presentarse de manera leve.

Fig. 21. Efecto de la adición de diferentes concentraciones de HgCl_2 , sobre el patrón de velocidad angular (VAP) en el intervalo 1. CI=control inicial; CF=control final.



Para el tercer intervalo en la figura 22 no se observa ningún efecto sobre la velocidad, no existe diferencia entre las medias de los tratamientos (ANEXO O); no obstante la disminución de la velocidad promedio es evidente para todos los tratamientos al llegar al cese de la activación espermática.

Fig. 22. Efecto de la adición de diferentes concentraciones de HgCl_2 , sobre el patrón de velocidad angular (VAP) en el intervalo 3. CI=control inicial; CF=control final.



La lectura del CASA demostró que las variables de velocidad espermática presentaron efectos significativos con respecto a los tratamientos de 10.000 y 100.000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de cloruro de mercurio en el primer intervalo de la activación y ningún efecto en el momento cercano al termino de la activación (tercer intervalo) y que las concentraciones menores no afectaron las variables de velocidad en este estudio (Tabla 6).

Tabla 6. Cuadro de resultados del efecto del cloruro de mercurio en la velocidad espermática en la barbilla (*Rhamdia sebae* c.f).

Variable	Intervalo	Concentración de cloruro de mercurio ($\mu\text{g.L}^{-1}$)							
		CI	10	100	500	1.000	10.000	100.000	CF
VCL	Uno*	-	-	-	-	-	efecto	efecto	-
	Tres*	-	-	-	-	-	-	-	-
VSL	Uno*	-	-	-	-	-	efecto	efecto	-
	Tres*	-	-	-	-	-	-	-	-
VAP	Uno*	-	-	-	-	-	efecto	efecto	-
	Tres*	-	-	-	-	-	-	-	-

CI = Control inicial; CF= control final.

* Tiempo de inicio de la activación (5-15 segundos).

* Tiempo cercano a la finalización de la movilidad (25-35 segundos)

Ante los resultados de este estudio se debe tener en cuenta la problemática ambiental en Colombia y el mundo en cuanto la contaminación con metales pesados y la preocupación que se debe dar ante los efectos nocivos sobre la biodiversidad íctica del país. El mercurio viene siendo uno de los contaminantes más tóxicos en los cuerpos de agua, dada que su introducción en el medio se origina por la actividad minera del país (extracción de oro). Este metal se sedimenta en los substratos, las bacterias asimilan el mercurio, lo transforman en metilmercurio, y así comienza su ascenso y biocumulación atreves de toda la cadena alimenticia llegando a los grandes peces carnívoros, quienes presentan los más altos niveles de concentración de mercurio. Mancera y Álvarez¹¹⁵ mencionan que los peces tienen la capacidad de almacenar en su organismo una concentración mayor de estos compuestos en comparación con la presente en el medio, por lo que son un indicador importante de la contaminación. Según la

¹¹⁵ MANCERA-RODRIGUEZ N. J. y ÁLVAREZ-LEÓN R. Estado del conocimiento de las concentraciones de mercurio y otros metales pesados en peces dulceacuícolas de Colombia. En: *Acta Biológica Colombiana*, Vol. 11, No. 1, 2006. p. 3

Organización Mundial de la Salud (WHO)¹¹⁶ los límites aceptados internacionalmente son de 0,5 µg/g de mercurio para consumo de peces, aunque estas pueden variar según los países como son:

0,5 ug/g (peso fresco), en los continentes Norte y Sudamericanos.

1,0 ug/g en Francia para las especies carnívoras.

En Estados Unidos, el Safety Limit (límite de seguridad) fue reducido a 0,3 ug/g en enero de 2001.¹¹⁷

Olivero *et al.*,¹¹⁸ en sus estudios encontraron al comparar la acumulación de mercurio en especies como *Prochilodus magdalenae*, *Triporthus magdalenae*, *Rhamdia sebae* y *Pseudoplatystoma fasciatum*, capturados en el Canal del Dique, (Magdalena-Colombia) observaron que la mayor concentración de mercurio total, la presenta la arenca *T. magdalenae* especie con hábitos detritívoros-zooplancónicos, por lo que la alta concentración puede deberse al transporte de este metal en los sedimentos que llegan al Canal del Dique y que constituyen su alimento.

Cala¹¹⁹, utilizando tejido muscular de hembras sexualmente maduras y de ocho especies diferentes, procedentes del bajo y medio río Magdalena y alto río Meta, evaluó el contenido de mercurio, cuyo valor varió entre 0,02 y 0,43 mg/kg de peso húmedo, lo cual demuestra la contaminación de todas las especies evaluadas. Este estudio estableció que la especie con mayor concentración de mercurio en sus tejidos fue *Pseudoplatystoma fasciatum* con valores de 0,22 mg/kg de Hg en la zona de Barrancabermeja en el río Magdalena y de 0,43 mg/kg de Hg en la zona de Puerto López en el río Meta. La concentración de metales pesados en peces de agua dulce es conocida de mejor manera en la cuenca del río Magdalena, especialmente en la región de la Mojana y en las ciénagas del sur del departamento de Bolívar donde se han estudiado los niveles de contaminación por mercurio y otros metales producida por el desarrollo de múltiples actividades industriales.

¹¹⁶ Environmental Health Criteria (WHO);101 (IPCS). Methylmercury. In: World Health Organization. Geneva (Italy); 1991.

¹¹⁷ Contaminación por mercurio. Revista Mundo Científico, Nº 242, Barcelona (España) 2003.

¹¹⁸ OLIVERO J, NAVAS V, PÉREZ A, SOLANO B, ACOSTA I, ARGÜELLO E, SALAS R. Mercury Levels in Muscle of Some Fish Species From the Dique Channel. In: Bull. Environmental Contamination Toxicology. Vol.58. p. 868.

¹¹⁹ CALA P. Occurrence of Mercury in Some Commercial Fish Species From the Magdalena and Meta Rivers in Colombia. Dahlia. In: Revista Asociación Colombiana de Ictiología. Vol.4, 2001. p.17.

En cuanto a las especies nativas colombianas y tomando como referencia resultados de estudios anteriores realizados por los autores ya citados, la mayoría de especies que ya presentan contaminación con mercurio viene a ser peces de importancia comercial y que llegan a ser parte de la actividad económica de la mayoría de familias rivereñas de zonas cercanas a las minas de oro o incluso alejadas de ellas cuyos sedimentos contaminados con mercurio han sido arrastrados hasta zonas en donde no existe ninguna explotación aurífera. Es bajo esta apreciación, que en este estudio se utilizó ejemplares de barbilla (*Rhamdia sebae* c.f), especie que se caracteriza por presentar una actividad de pesca moderada, además, es una especie endémica de la región de la Orinoquia Colombiana, y cuya característica principal está dada, a que es uno de los silúridos más pequeños que alcanza rápidamente la madurez sexual y produce semen sin inducción hormonal; además existen antecedentes en los estudios de Oliveiro *et al.*,¹²⁰ que en zonas como el alto río Meta, demostraron que esta especie registro rangos de concentración de de 9-102 $\mu\text{g.Kg}^{-1}$ de mercurio en su musculatura, aun bajas para el límite internacional para el consumo, pero que son preocupantes por la presencia ya existente del mercurio en esta especie.

Este estudio fue orientado al análisis mediante un sistema in vitro del efecto de mercurio sobre la movilidad y velocidad espermática en la especie *Rhamdia sebae*, con el fin de orientar a un estimativo, de cómo este toxico puede afectar el nivel reproductivo de esta especie y en el caso tal, se presentara contaminación con concentraciones similares a los tratamientos utilizados en esta investigación o incluso superar los rangos de contaminación con mercurio. Es preciso tener en cuenta que para observar el modo de los efectos de esta metal pesado, se deben tomar dos apreciaciones de medios de contaminación como pueden ser: que el pez migre hacia cuerpos de agua para su reproducción en medios acuáticos contaminados y por lo tanto los gametos sean expuestos directamente con el metal pesado; y que también, puede ocurrir, que dado el vertimiento directo o incluso el arrastre de sedimentos contaminados con mercurio expongan permanentemente a la especie a la contaminación y que el metal asimilado en el organismo del pez actué sobre su fisiología reproductiva o formación de gametos.

Tanto la movilidad como la velocidad espermática en la barbilla (*Rhamdia sebae* c.f) tuvieron una disminución significativa en sus variables en el momento de la activación con las concentraciones de 10.000 y 100.000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de HgCl_2 , aunque el efecto se presentó de manera más drástica en el momento de activar la muestra seminal con soluciones de 100.000 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Con esto se afirma, que en concentraciones altas de cloruro de mercurio se presenta un efecto deletéreo de la movilidad y velocidad espermática. En contraste a las concentraciones de 10, 100,

¹²⁰ OLIVERO J, NAVAS V, PÉREZ A, SOLANO B, ACOSTA I, ARGÜELLO E, SALAS R. M. Opc.Cit. p. 868.

500 y 1.000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de HgCl_2 la movilidad y velocidad espermática no se afectó significativamente en *Rhamdia sebae* c.f.

En cuanto a la movilidad en los controles esta termina justo después de los 40 segundos, aunque con el análisis del CASA se observa una disminución en el movimiento, igual al de las concentraciones 10, 100, 500 y 1,000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de HgCl_2 que empieza a disminuir a los 9 -10 segundos de la activación, mientras que ocurre todo lo contrario en las concentraciones de 10,000 y 100,000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ en donde se observa que la movilidad es mínima o casi nula respectivamente en el momento de la activación. En estudios realizados por Lahnsteiner et al.,¹²¹ identificaron que en *Clarias gariepinus* a concentraciones de 25 y 300 mg.L^{-1} de cloruro de mercurio, disminuye significativamente la movilidad y velocidad espermática. De igual forma ocurrió en *Salmo trutta fario* en concentraciones de 0,5 mg.L^{-1} en el cual decreció considerablemente la movilidad espermática, aunque no se encontraron efectos en la velocidad. Los mismos autores encontraron que en *Leuciscus cephalus* a 50 mg.L^{-1} , disminuye la movilidad y velocidad espermática, presentando similares efectos en *Lota lota*, a concentraciones de 5 mg.L^{-1} de cloruro de mercurio. Van look y Kime¹²², en sus estudios encontraron que a concentraciones entre 1,0 y 100 mg.L^{-1} de HgCl_2 la movilidad espermática disminuye en *Carassius auratus*. Los resultados obtenidos en *Rhamdia sebae* c.f, sugieren que los rangos en los cuales se observan mayores efectos del mercurio son las concentraciones de 10 mg.L^{-1} y 100 mg.L^{-1} o incluso superiores a estos.

La diferencia en las cuales se presenta una disminución en la movilidad y la velocidad en concentraciones distintas va depender de la especie, incluso dependerá del tipo de resistencia que están tengan ante los tóxicos, pues es posible que ocurra una modificación de su comportamiento fisiológico y reproductivo en un medio contaminado.

Paralelamente la diferencia del grado de concentración en las que el tóxico tenga efecto sobre la movilidad y velocidad espermática, no dependerá en que los peces provengan de hábitat contaminados, seguirá dependiendo de la especie estudiada y de su resistencia ante la tóxicos.

¹²¹ LAHNSTEINER, F.; MANSOUR N. y BERGER, B. Opc. Cit. p. 1286

¹²² VAN LOOK, K.J y KIME, D.F. Automated sperm morphology analysis in fishes: the effect of mercury on goldfish sperm. In: Journal of fish Biology. Sheffield, U.K., Vol 63, 2003. p.1026.

Los hallazgos de Lahnsteiner et al.,¹²³ en su evaluación del efecto de contaminantes inorgánicos como cadmio, cobre, mercurio, plomo, zinc y nitritos además de contaminantes orgánicos como ciclohexano y 2,4- diclorofenol en el semen de especies como *Leusciscus cephalus*, *Lota lota*, *Claria gariepinus* y *Salmo trutta fario*; observó que el incremento en la velocidad espermática en bajas concentraciones de tóxicos es típico para los espermatozoides de *Salmo trutta fario* y de *L. cephalus* y que en especies como *C. gariepinus* este efecto solo se observó cuando el semen se activó con ciclohexano, y en *Lota lota* esto nunca ocurrió con ninguna concentración. Igualmente este incremento en la velocidad fue confirmado por Warnecke¹²⁴ quien afirmó que este efecto es causado por la contaminación ambiental.

A diferencia de lo confirmado por estos autores, en este estudio no se observó ningún incremento en las variables de velocidad, lo cual puede especificarse en la reacción del metabolismo de los espermatozoides de *Rhamdia sebae* c.f., ante el cloruro de mercurio; pero a diferencia, se encontró una disminución de la movilidad y velocidad espermática, sugiriendo que el mercurio puede tener un efecto directo en el metabolismo energético del espermatozoide, ocasionando la muerte de la célula. En concordancia, Gatti et al.,¹²⁵ concluyen que la velocidad espermática depende de la intensidad de pulsaciones del flagelo, los cuales dependen de la disponibilidad del ATP, por eso cuando se presentan altas velocidades de los espermatozoides, es probable que sea inducida por hiperactivación del metabolismo del espermatozoide. Los mismos autores mencionan que la activación de la movilidad espermática y la regulación es un proceso complejo y que otras variables como el potencial de membrana puede ejercer un papel importante en el proceso, con lo cual finalmente describen que los químicos utilizados pueden alterar la configuración de las proteínas del flagelo, pudiendo ser una de las razones por las que la movilidad y la velocidad espermática disminuyen. Entonces, según lo confirmado por Billard y Cosson¹²⁶ es muy posible que el cloruro de mercurio, pueda actuar a nivel celular o entrar en interacción como sal de mercurio, traspasar la membrana, y actuar sobre las fuentes principales de energía del espermatozoide.

¹²³ LAHNSTEINER, F.; MANSOUR N. y BERGER, B. Opc. Cit. p. 1290

¹²⁴ WARNECKE, D. Motility, ATP content, and membrana integrity of fresh and cryopreserved spermatozoa of carp (*Cyprinus carpio* L.) and starlet (*Acipenser ruthenus* L.) as endpoints for the evaluation of aquatic environmental chemical. development of innovate ecotoxicological evaluation methods as fertility tests and alternative procedures to animal testing. Ph Dissertation, Free University of Berlin. 2003.

¹²⁵ GATTI, J. K; BILLARD, R. y CHRISTIN, R. Opc. Cit. 551.

¹²⁶ BILLARD, R. y COSSON, M.P. Some problems related to the assessment of sperm motility in fresh water fish. In: *Journal of Experimental Zoology*. New Jersey, Vol 261, 1992. p. 128

Es importante tener en cuenta que normalmente los espermatozoides de peces cuando son liberados al agua cuentan con un breve periodo de activación (limitado a pocos segundos en varias especies) expresada en movilidad y velocidad de desplazamiento progresivo para lograr la fertilización. Al contrario de lo que sucede en mamíferos, los espermatozoides de teleósteos no poseen acrosoma, ya que entran a través de un orificio de la ova del llamado micrópilo. Al ser liberadas las ovas en el agua, éstas se hidratan y cierran su micrópilo, por lo cual los espermatozoides liberados durante la espermiación deben activarse y moverse en el agua para lograr la fertilización antes de este periodo. Es posible que estos mecanismos se hayan dado evolutivamente debido al corto periodo de competencia para la fertilización, de allí la importancia de comprender los procesos fisiológicos de la activación del espermatozoide en los peces. Mecanismos de capacitación, inhibición y activación de la movilidad y el balance iónico también juega un papel en la adquisición de la capacidad para la activación de la movilidad y está relacionado con los cambios en las concentraciones extracelulares de potasio (K) ⁺, sodio (Na) ⁺, bicarbonato HCO₃, y/o iones hidrógeno. De lo anterior se observa que estos mecanismos aún se encuentran lejos de ser dilucidados completamente y se destaca la necesidad de investigación con el fin de poder tomar estas células espermáticas como modelos de células inducibles por factores fisicoquímicos. Los espermatozoides de los peces son inmóviles en el testículo, y en muchas especies también en el plasma seminal. Los espermatozoides adquieren progresivamente el potencial de movilidad a través de su pasaje por el conducto espermático, permaneciendo inmóviles hasta ser liberados al medio acuoso donde diferentes factores interactúan para desencadenar una respuesta que produce la activación de la movilidad. Los espermatozoides de los peces al ser liberados al medio ambiente acuoso, deben responder a condiciones fisicoquímicas como: cambios en la presión osmótica, balance iónico y pH. De lo anterior se deduce que bajo condiciones de contaminación con tóxicos en los cuerpos de agua y en los organismos de los peces la disrupción endocrina puede generar graves problemas en los procesos de fertilización.

En el presente estudio la duración de la movilidad espermática en *Rhamdia sebae* c.f se determinó en un tiempo superior a los 30 segundos en los tratamiento control y con concentraciones menores a los 1.000 µg.L⁻¹ de cloruro de mercurio; mientras que disminuyó drásticamente el tiempo de movilidad cuando el semen fue expuesto a las concentraciones de 10.000 y 100.000 µg.L⁻¹ de cloruro de mercurio, esto se debe a que la influencia de los contaminantes sobre la movilidad espermática, fue claramente detectada en la fase inicial de la movilidad después de la activación, en el primer intervalo medido; sin embargo el tiempo de la movilidad está determinado por el tipo de especie y resistencia que esta tenga a

los diferentes tipos de contaminantes. Rurangwa¹²⁷ confirma que en la población de esperma de los peces, la duración de la movilidad de las células es específica y algunos espermatozoides pueden ser muy resistentes y se mueven por un largo tiempo y otros por corto tiempo, además la medida del periodo de movilidad total provee información importante, pero al tiempo no provee una estimación verdadera para toda la población espermática.

La disminución de la movilidad y velocidad espermática, pueden influir enormemente en el proceso de fertilización. McIntyre¹²⁸ menciona en sus estudios realizados en *Salmo gairdneri* que el bajo porcentaje de huevos fertilizados se debió a que en concentraciones de 1,0 mg.L⁻¹ de Hg, disminuye significativamente la viabilidad del semen. Esto puede relacionarse con los datos obtenidos en el presente estudio, que pueden indicar que en la barbilla (*Rhamdia sebae* c.f), las concentraciones de 10.000 y 100.000 µg.L⁻¹ de cloruro de mercurio pueden disminuir la viabilidad espermática y por lo tanto influir enormemente en el proceso de fertilización.

Dentro de la población espermática y como se analizó con cada una de las variables de movilidad y velocidad individual de la barbilla, se puede decir que el tipo de movilidad y velocidad que tiene mayor influencia posiblemente sobre la fertilización son las estructuras espermáticas con movilidad progresiva rápida lineal y velocidad en línea recta, pues a simple vista serían células efectivas en lograr la fertilización, y es importante mencionar que dentro de esta población existen otras estructuras que presenten comportamiento de las demás variables de movilidad y velocidad analizadas en este estudio. Y en cuanto a la acción tóxica del mercurio se puede observar claramente que concentraciones de 10.000 y 100.000 µg.L⁻¹ cloruro de mercurio, no solo actúa severamente sobre las variables que como se menciono alterarían el proceso de fertilización, sino también, sobre las demás variables evaluadas; por lo tanto idealmente se debería garantizar que los peces no sean expuestos a cloruro de mercurio, pero si llegado el caso se presenta exposición, se puede inferir que concentraciones inferiores a 10 µg.L no serían tan deletéreas; no obstante, se debe tomar esta apreciación con precaución ya que en el proceso de fertilización están involucradas muchas variables que se pueden afectar por la exposición al mercurio.

¹²⁷ RURANGWA, E.; ROELANDS, I.; HUYNKENS, G.; EBRAHIMI, M.; KIME, D.E; y OLLEVIER, F. The minimum effective spermatozoa: egg ratio for artificial insemination and effects of mercury on sperm motility fertilization ability in *Clarias gariepinis*. In: *Journal Fish Biology*. Sheffield, U. K, Vol 53, 1998. p. 408.

¹²⁸ MCINTYRE, J.D. Toxicity of methylmercury for steelhead trout sperm. In: *Bull Environmental Contamination Toxicology*. New Jersey, Vol 9, 1973. p. 98-99.

En cuanto a las concentraciones de mercurio en aguas de Colombia, Ospina y Peña¹²⁹ encontraron en la bahía de Buenaventura en análisis hechos en aguas superficiales cuyos resultados mostraron concentraciones de mercurio entre 0.001 y 0.018 mg.L⁻¹, mientras que en estudios hechos en la región de la Mojana Ramos et al.,¹³⁰ encontraron concentraciones en rangos de 0.5–50 µg.L⁻¹ de mercurio en sus aguas; aunque estas concentraciones según lo observado en este estudio, no podrían causar un efecto significativo debido a que se trata de concentraciones muy bajas; no se puede obviar el hecho, de que cómo se dijo, el mercurio ya en su estado orgánico como metilmercurio puede aumentar por medio de la bioacumulación y la acumulación en el medio acuático y además acompañado del poco control estricto en las descargas de este metal a los ríos, puede aumentar la contaminación y por tanto aumentar las concentraciones de mercurio del agua llegando a rangos más altos que como se observó en este estudio pueden afectar la movilidad y velocidad espermática de *Rhamdia sebae* y posiblemente de cualquier otra especie.

Es importante prestar más atención a la contaminación de los cuerpos de agua con este metal, pues podría afectar severamente los procesos de fertilización de especies nativas y posiblemente reducir las poblaciones naturales, afectando no solo la actividad económica pesquera, sino también de convertirse en un riesgo para la salud de personas que consumen estas especies; además se debe mirar objetivamente la problemática ambiental de Colombia, pues este tipo de estudios solo brindan un pequeño aporte estimativo del problema que verdaderamente puede estar afectando a peces como la barbilla y demás especies nativas colombianas.

¹²⁹ OSPINA A. N. y PEÑA E. J. Uso de las algas bénticas como indicadores de contaminación por metales pesados en la Bahía de Buenaventura – Pacífico Colombiano. En: memorias Conferencia Internacional Usos Múltiples del Agua: Para la vida y el desarrollo sostenibles. Universidad del Valle, Santiago de Cali, 2002.p. 39

¹³⁰ RAMOS, C. X.; ESTÉVEZ S. y GIRALDO E. Nivel de contaminación por metilmercurio en la región de la Mojana. Universidad de los Andes. Bogotá, Colombia. 2000. p. 5

7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

7.1 CONCLUSIONES

- En las muestras seminales obtenidas de machos de *Rhamdia sebae* c.f, evaluadas *in vitro*, se observó que las concentraciones bajas de 10. 100. 500 y 1.000 $\mu\text{g. L}^{-1}$ de cloruro de mercurio, disminuyen minimamente la movilidad y velocidad espermática sin afectar aparentemente su calidad.
- En concentraciones altas de 10.000 y 100.000 $\mu\text{g. L}^{-1}$ de cloruro de mercurio causa un efecto significativo, reduciendo o inhibiendo la movilidad y velocidad de los espermatozoides.
- Las variables de movilidad espermática más afectadas por las concentraciones más altas de los tratamientos del estudio fueron la movilidad progresiva rápida lineal (WHOa) y la movilidad circular (WHOc).
- Las variables de velocidad espermáticas más afectadas por las concentraciones de 10.000 y 100.000 $\mu\text{g. L}^{-1}$ de cloruro de mercurio fueron la velocidad curvilínea (VCL), la velocidad en línea recta (VSL) y el patrón de velocidad angular (VAP)
- El mercurio al presentar efectos sobre la movilidad y velocidad espermática en la barquilla cuando esta se encuentre expuesta continuamente en medios acuáticos contaminados puede incidir sobre el proceso de fertilización y afectar la producción de alevinos en poblaciones naturales.
- La utilización de sistemas de análisis espermático asistido por computador (CASA) es una herramienta que facilita el estudio de la calidad espermática en peces y que permite el acompañamiento de los estudios toxicológicos y de sus efectos sobre la reproducción en organismos hidrobiológicos.
- El estudio de la contaminación ambiental, contribuye a una línea de análisis en investigaciones y de impacto, pues con esto se observa de una manera más

clara el efecto que puede ocurrir cuando un recurso es influenciado por un tipo de alteración ajena al medio natural y como va a repercutir en los organismos vivos.

- La contaminación de las fuentes hídricas se ha convertido en un campo amplio de estudio, pues ha generado un gran interés para los investigadores, ya que los organismos hidrobiológicos actúan como indicadores naturales cuyos efectos son observables en el comportamiento de sus poblaciones.

7.2 RECOMENDACIONES

- Es aconsejable realizar estudios con otros tipos de xenobióticos evaluando la posible existencia de efectos sobre la calidad seminal en *Rhamdia sebae* c.f.
- Se recomienda la utilización de la barbilla (*Rhamdia sebae* c.f), como una especie nativa de importancia comercial, como un excelente modelo para futuras investigaciones; pues con este tipo de trabajos, se retoma aun más el interés en su biología, hábitat y comportamiento reproductivo, además de que esta es una de las especies más promisorias para acuicultura en Colombia.
- Extender los estudios con semen de *Rhamdia sebae*, contaminado con mercurio sobre las fases comprendidas en la fertilización, incubación y larvicultura de la especie y el efecto que podría tener sobre estos procesos.
- Es preciso continuar con este tipo de investigaciones en otras especies nativas para observar su comportamiento reproductivo frente a casos de contaminación con metales pesados y como estos pueden incidir las poblaciones naturales y si existe el riesgo de que estas especies disminuyan en los cuerpos de agua.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

- AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCE AND DISEASE REGISTRY, Division of Toxicology. Toxicology profile for mercury. In: LETTERMAR, R. D. (Editor técnico). Calidad y tratamiento de agua. Manual de suministros de agua comunitaria. Madrid, España: American Waters Works Asociation, Editorial MCGRAW-HILL-INTERAMERICANA DE ESPAÑA. 2002. p. 1231.
- ANATOMIA Y BIOLOGIA. Reproducción en vertebrados. En: Enciclopedia Estudiantil. Madrid, España: Cultural. S.A, 1999. p. 1472.
- ANATOMIA Y BIOLOGIA. Espermatozoide. En: Enciclopedia Estudiantil. Madrid, España: Cultural. S.A, 1999. p. 1472.
- ARIAS, J. A. y AYA, C. El cultivo del yamú 2ª ed. Villavicencio, Colombia: Universidad de los Llanos, Instituto de Acuicultura de los Llanos, Instituto de Investigaciones de la Orinoquía Colombiana, 2001. p. 27.
- ASHLEY, P. J. Fish welfare: Current issues in aquaculture. In: *Applied Animal Behaviour Science*, Vol.104 (3-4), 2007. p.199-235
- BALDISSEROTTO, B. Fisiologia de peixes aplicada a piscicultura. Santa Maria, Brasil: editora Universidad Federal de Santa Maria, 2002. p. 211.
- BALDISSEROTO, B y FLORES da SILVA, L. Qualidade de água. Em: BALDISSEROTO, B (Editor). Cultivo do jundiá. Santa Maria, Brasil: editora USFM, 2002. p. 220.
- BILLARD, R. y COSSON, M.P. Some problems related to the assessment of sperm motility in fresh water fish. In: *Journal of Experimental Zoology*. New Jersey, Vol 261, 1992. p. 122-131.
- BOUDENE, C. L. Toxicidad de los metales. En: DERACHE, J. (Coordinador). Toxicología y seguridad de los alimentos. Barcelona, España. Editorial OMEGA S.A. 1990. p. (Consulta).
- BOITANO, S y OMOTO, C. Membrane hyperpolarization, activates trout sperm without an increase in intracellular pH. In: *Journal of Cellular Science*. New Jersey, 1991.p. 343-349
- BOITANO, S y OMOTO,C. Trout sperm swimming pattern and role of intracellular Ca⁺⁺. *Cell motility and Cytoskeleton*. New Jersey. Vol. 21, 1992. p. 74-82.

- BOSSEMEYER, I. Mudanças morfológicas no ovário de *Rhamdia sapo* (Pimelodidae) relacionadas com o ciclo reprodutivo. Santa Maria, Brasil: Dissertação (Mestrado em Zootecnia), Curso de Pos-Graduação em Zootecnia: Universidad Federal de Santa Maria, 1976.
- BRUZCA, E. The in vivo method of estimating the stages of maturation in carp (*Cyprinus carpio*). In: *Acta Hydrobiology*. Massachusset. Vol. 20, 1979. p. 423-433.
- CALA P. Occurrence of Mercury in Some Commercial Fish Species From the Magdalena and Meta Rivers in Colombia. Dahlia. In: Revista Asociación Colombiana de Ictiología. Vol.4, 2001. p.15-19.
- CHIA, S.; ONG, C.; LEE, S. y TSAKOK, F. Blood concentration of lead, cadmium, mercury, zinc and copper and human semen parameters. In: *Arch Androgens*, Hong Kong, Vol. 29, No. 2, 1992. p. 177- 183.
- COHN, P.. D; COX, M. y BEGER, P. (Consulta). En: LETTERMAR, R. D. (Editor técnico). Calidad y tratamiento de agua. Manual de suministros de agua comunitaria. Madrid, España: American Waters Works Asociation, Editorial MCGRAW-HILL- INTERAMERICANA DE ESPAÑA. 2002. p. 1231.
- CONTAMINACIÓN DE LAS AGUAS CONTINENTALES. En: Enciclopedia estudiantil. Madrid, España. Editorial Cultural SA, 1999. p.1472.
- CONTAMINACIÓN. En: Enciclopedia estudiantil. Madrid, España. Editorial Cultural SA, 1999. p. 1472.
- CRUZ-CASALLAS, P. E.; PARDO-CARRASCO, S. P.; ARIAS-CASTELLANOS, J. A.; LOMBO-CASTELLANOS, P. E.; LOMBO-RODRIGUEZ, D. A. y PARDO-MARIÑO, J. E. Cryopreservation of yamú *Brycon siebenthalae* milt. In: *World Aquaculture Society*. Villavicencio, Colombia. Vol. 35, No. 4, 2004, p. 529-535.
- CRUZ-CASALLAS, P.E. y VELASCO – SANTAMARIA, Y. M. Determinación de las características seminales y Semínación artificial en peces. En: DAZA, V.; LANDINEZ, M. y ZANABRIA, A. (Editores). Reproducción de peces en el Trópico. Bogota, Colombia: INCODER, Universidad Nacional de Colombia, 2005. p. 246.
- CRUZ-CASALLAS, P.E. Técnicas de laboratorios para la evaluación de la calidad seminal en peces. En: Revista Orinoquía, Villavicencio, Colombia, Vol. 5, No. 1, 2001. p. 155-163.
- DAHL, G. Los peces del Norte de Colombia. Bogotá, Colombia: INDERENA, 1971. p. 391.

DAVIS, B.; PRICE, H.; O CONNOR, R.; FERNANDO, K., ROWLAND, A. y MORGAN, D. Mercury vapor and female reproductive toxicity. In: *Toxicology Science*, Yokohama, Japan, Vol. 59, No. 2, 2001. p. 291-296.

DOS-SANTOS, H.; LOPES, R. y ZUIM, S. Sobre a reprodução de peixes brasileiros XVI, Estudo morfométrico dos ovócitos de *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840), (Pisces, Pimelodidae). Em: *Ars Veterinária*, São Paulo, Brasil, Vol. 2, No. 1, 1986. p. 13-94.

ERNST, E. y LAURITSEN, J.G. Effect of organic and inorganic mercury on human sperm motility. In: *Pharmacology and Toxicology*, Tokyo, Vol. 68, No. 6, 1991. p. 440-444.

FRIMMER, M. Farmacología y Toxicología veterinaria. Zaragoza, España. Editorial ACRIBIA, 1973. p. 341. (Consulta)

GALVIS, G.; MOJICA, I y CAMARGO, M. Peces del Catatumbo. Bogotá, Colombia: Asociación Cravo Norte, ECOPETROL, 1997. p. 118.

GATTI, J.K; BILLARD, R y CHRISTIN, R. Ionic regulation of the plasma membrane potential of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) spermatozoa : Role in the initiation of sperm motility. In: *Journal of cell physiology*. New York. 1990. Vol. 143. p. 546-554.

GODINHO, H.; BASILE-MARTINS, M.; FENERICH, N. y NARAHARA, M. Desenvolvimento embrionário e larval de *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840), (Siluriforme, Pimelodidae). Em: *Revista Brasileira de Biologia*, São Paulo, Brasil, Vol. 38, No. 1, 1978. p. 151-156

GOMES, L.; GOLOMBIESKI, J.; CHIPPARIGOMES, A, y BALDISSEROTTO, B. Biología do jundiá *Rhamdia quelen* (Pisces, Pimelodidae). Em: *Ciência Rural*, Santa Maria, Brasil, Vol. 30, No. 1, 2000. p. 179-185.

GONZALES- MANTILLA, J. Efecto de contaminantes ambientales sobre el sistema reproductivo de los peces. En: DAZA, V.; LANDINEZ, M. y ZANABRIA, A. (Editores). Reproducción de peces en el Trópico. Bogota, Colombia: INCODER, Universidad Nacional de Colombia, 2005. p. 246

GURGEL, H. Aspecto do comportamento biológico de *Rhamdia branneri* (Haseman, 1911), (Osteichthyes, Siluriformes, Pimelodidae). Curitiba, Brasil. Dissertação (Mestrado em Zoologia), Curso de Pos-Graduação em Zoologia: Universidad Federal de Paraná, 1979. p. 53.

HEATH, A. G. Reproduction. In: *Water Pollution and Fish Physiology*. Boca Raton, E.U., 1995. p. 228.

HOMMA-TAKEDA, S.; KUGENUMA, Y.; IWAMURO, T. y SHIMOJO, N. Impairment of spermatogenesis in rats by Methylmercury. Involvement of stage and cell-specific. Germ cell Apoptosis. In: *Toxicology*, Ibaraki, Japan, Vol. 169, No.1, 2001. p. 25-35.

HONEYFIELD, D. C. y KRISE, W. F. Measurement of milt quality and factors affecting viability of fish spermatozoa. In: TIERSCH, T. R. y MAZIK, P. M. (Editors). *Cryopreservation in Aquatic Species*: World Aquaculture Society. Baton Rouge, Louisiana. 2000. p. 49-50.

HUGES, W.L. A physiochemical rationale for the biological activity of mercury and its compounds. In: *Annals of the New York Academy of Sciences*. New York, Vol. 65, 1957. p. 454-460.

INSTITUTO DE HIDROLOGIA, METEOROLOGIA Y ESTUDIOS AMBIENTALES (IDEAM). Localización geográfica Instituto de Acuicultura de los Llanos (IALL). Bogotá: IDEAM. (Consultado, 18 de mayo de 2006). Disponible en Internet, URL: www.ideam.gov.com.

JAMIESON, B, G. Fish evolution and systematic: evidence from spermatozoa (editor). In: LAHNSTEINER, F; MANSOUR, N y BERGER, B. The effect of inorganic and organic pollutants on sperm motility of some freshwater teleosts. In: *Journal of fish biology*. Thalheim, Australia. 2004. Vol. 65.p. 1283-1297

KHAN, A.T. y WEISS, J.P. Toxic effects of mercury chloride on sperm and egg viability of two populations of mummichogs, *Fundulus heteroclitus*. In: *Environmental Pollution*. New York, Vol. 48, 1987. p. 263-273

KIME, D.E.; EBRAHIMI, M.; NYSTEN, K.; ROELANTS, I.; RURANGWA, E.; MOORE, H.D. y OLLEVIER, F. Use of computer-assisted sperm analysis (CASA) for monitoring the effects of pollution on sperm quality of fish, application to effects of heavy metals. In: *Aquatic Toxicology*, Sheffield, U.K., Vol. 36, 1996. p. 223-237.

KIME, D. y NASH J.P. Gamete viability as an indicator of reproductive endocrine disruption in fish. In: *Science of the Total Environment*. Sheffield, U.K, 1999, Vol. 233.p. 123-129.

KIME, D. E.; VAN LOOK, K. J .W.; MCALLISTER, B. G.; HUYSKENS, G.; RURANGWA, E. y OLLEVIER, F. Computer-assisted sperm analysis CASA as tool for monitoring sperm quality in fish. In: *Comparative Biochemistry and Physiology*. Seffield, U.K. Vol. 130. 2001. p. 425-433.

KIRUBAGARAN, R. y JOY, K.P. Toxic effects of mercury on testicular activity in the freshwater teleost (*Clarias batrachus*). In: *Journal of fish Biology*. Sheffield, U.K., Vol. 41, 1992. p. 305-315.

LAHNSTEINER, F., BERGER, B. y WEISMANN, T. Sperm metabolism of the teleost fishes on *Oncorhynchus mykiss* and *Chalcalburnus chalcoides* and its relation to motility and viability. *Journal of Experimental Zoology*. Thalheim, Austria. 1999. Vol. 284.p. 454-465.

LAHNSTEINER, F.; MANSOUR, N. y BERGEL, B. The effect of inorganic and organic pollutants on sperm motility of some freshwater teleost. In: *Journal of Fish Biology*. Thalheim, Austria. Vol. 65, 2004. p. 1283-1297.

LINDQVIST, O., JOHNNASSON, K. AASTRUP, M., ANDERSON, A., BRINGMARK, L. Mercury in the Swedish Environment Recent Research on causes consequences and Corrective Methods. In: *Water, Air and Soil Pollution*, New York, Vol.55, 1991. p.155.

LOOMIS, T. Fundamentos de Toxicología. Zaragoza, España. Editorial ACRIBIA. p. 274

MACHADO-ALLISON, A. Los peces de los ríos Caris y Pao. Carabobo, Venezuela: CORPOVENEZUELA, 1987. p.66.

MANCERA-RODRIGUEZ N. J. y ÁLVAREZ-LEÓN R. Estado del conocimiento de las concentraciones de mercurio y otros metales pesados en peces dulceacuícolas de Colombia. En: *Acta Biológica Colombiana*, Vol. 11, No. 1, 2006. p. 3-23.

MARDINI, C.; SILVEIRA, M. y BARENHO, D. Técnica de indução da desova em jundiá, *Rhamdia quelen* empregada na estação experimental de piscicultura da Lagoa dos Quadros. Brasil: Documento Ocasional, Vol. 4, 1981. p. 9.

MARETTA, M; MARETTOVA, E. SKROVANET, P. y LEDEC, M. Effect of mercury on the seminiferous epithelium of the fowl testis. In: *Acta Veterinaria Hungarica*, Budapest, Hungry, Vol. 43, 1995. p. 153-161.

MCINTYRE, J.D. Toxicity of methylmercury for steelhead trout sperm. In: *Bull Environmental Contamination Toxicology*. New Jersey, Vol 9, 1973. p. 98-99.

MOHAMED, M.K.; LEE, W.I.; MOTTET, N.K. y BURBACHER, T.M. Laser light-scattering study of the toxic effects of Methylmercury on sperm motility. In: *Journal of Andrology*. Tokyo, Vol. 7, 1986. p. 11-15.

MOHAMED, M.K.; EVANS, T.C.; MOTTET, N.K. y BURBACHER, T.M. Effect of Methylmercury on sperm oxygen consumption. In: *Acta Pharmacologica et Toxicologica*, Budapest, Hungary, Vol. 58, 1986. p. 219-224.

MOJICA, J. ; GALVIS, G.; RESTREPO, R. y GIRALDO, R. Evaluación del recurso pesquero en el área de influencia del Oleoducto Colombia. En: Memorias Segundo seminario Nacional de Limnología, Medellín, 1994. p. 19-32.

MORISAWA, M. y ISHIDA, K. Short term changes in levels of cyclic-AMP adenylate cyclase and phosphodiesterase during initiation of sperm motility in rainbow trout. *Journal of Experimental Zoology*. Minamata, Japon. 1997. Vol. 242. p.200.

NARAHARA, M. Estrutura de populacho e reprodução de *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840). (Osteichthyes, Siluriforme, Pimelodidae). São Paulo, Brasil: Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 1983. p. 226.

NAVARRETE - FIGUEROA, A. Mercurio y metilmercurio. En: ALBERT, L. (Editor). Curso básico de toxicología ambiental. México, D.F. Editorial LIMUSA-NORIEGA: Centro Panamericano de Ecología Humana; Organización Panamericana de la Salud; Organización Mundial de la Salud. 1990. p. 311p.totales.

NICLE, H.E. Sperm motility in the pacific oyster (*Crassostrea gigas*) is affect by nonylphenol. In: *Marine Pollution Bulletin*. Londres, 2005, Vol. 50. p. 1668-1674.

OLIVEIRO, J.; NAVAS, V.; PEREZ, A.; SOLANO, B.; ACOSTA, I.; ARGÜELLO, E. y SALAS, R. Mercury levels in muscle of some fish species from the Dique Channel. In: *Bull Environmental Contamination Toxicology*. Cartagena, Colombia. Vol. 58, 1997. p. 865-870.

OSPINA A. N. y PEÑA E. J. Uso de las algas bénticas como indicadores de contaminación por metales pesados en la Bahía de Buenaventura – Pacifico Colombiano. En: memorias Conferencia Internacional Usos Múltiples del Agua: Para la vida y el desarrollo sostenible. Universidad del Valle, Santiago de Cali, 2002.p. 39-43

PAULA-SOUZA, G. Reprodução de *Rhamdia branneri*, 1911 (Pisces, Siluriforme) e suas relações com fatores abióticos. Curitiba, Brasil. Dissertação (Mestrado em Zoologia), Curso de Pos-Graduação em Zoologia: Universidad Federal de Paraná, 1978. p. 66.

PHILLIPS, G. y BUHLER, D. The relative contribution of Methylmercury from food or water to rainbow trout (*Salmo gairdneri*) in a controlled laboratory environment. In: *Transition ambient fish Society*. Scotland. Vol. 107, 1978. p. 853-861.

- PIAIA, R. y RADUNZ, N. Avaliação de diferentes fuentes protéicas sobre eu desempenho inicial de larvas de jundiá, *Rhamdia quelen*. Em: *Ciência rural*. Brasil, Vol. 27, No. 2, 1997. p. 319-323
- RAMOS, H. Fundamentos de la piscicultura agrícola. Manizales, Colombia: Universidad de Caldas, 1979. p.74.
- RAMOS, C. X.; ESTÉVEZ S. y GIRALDO E. Nivel de contaminación por metilmercurio en la región de la Mojana. Universidad de los Andes. Bogotá, Colombia. 2000. p. 1-6.
- RAO, M.V. Toxic effects of Methylmercury on spermatozoa *in vitro*. In: *Experiential*, New Jersey, Vol. 45, 1989. p. 985-987
- RAVINDER, K.; NASARUDDIN, K. ; MAJUMDAR, K. C. y SHIVAJI, S. Computerized analysis of motility, motility patterns and motility parameters of spermatozoa of carp following short-term storage of semen. In: *Journal of fish Biology*. Thalheim, Austria. Vol. 50, 1997. p. 1309-1328.
- RODGERS, D. W. You are what you eat and little bit more: bioenergetics – based models of Methylmercury accumulation in fish revisited. En: WATRAS, C y HUCKABEE, J. (Editors). In: *Lewis publications*. Boca Ratón, F.A. 430.
- ROMAN, B. Peces de agua dulce de Venezuela. Caracas, Venezuela. En: *Biosfera*, 1985. p. 191.
- RURANGWA, E.; ROELANDS, I.; HUYNKENS, G.; EBRAHIMI, M.; KIME, D.E; y OLLEVIER, F. The minimum effective spermatozoa: egg ratio for artificial insemination and effects of mercury on sperm motility fertilization ability in *Clarias gariepinis*. In: *Journal Fish Biology*. Sheffield, U. K, Vol 53, 1998. p. 402 - 411.
- SAILER, B.L.; JOST, L.K y EVENSON, D.P. Bull sperm head morphometry related to abnormal chromatin structure and fertility. In: *Cytometry*, Sheffield, U.K., Vol. 24, 1996. p. 167-163.
- SHARARA, F.; SEIFER, D. y FLAWS, J. Environmental toxicants and female reproduction. In: *Fertility and Sterility*, Japan, Vol. 70, No 4, 1998. p. 614-621
- SHOENY, R. Use of genetic toxicology data in U. S. EPA. Risk assessment: the mercury study report as an example. In: *Environmental health perspective*. New York, Vol. 107. 1996. p. 663-673
- SILFVERGRIP, A. A systematic revision of Neotropical catfish genus *Rhamdia* (Teleostei, Pimelodidae). In: *Swedish Museum of Natural History*, Stockholm, 1996. p.127.

SORENSEN, A. Reproducción Animal, Principios y Prácticas. Mexico, D.F. Editorial McGraw-Hill.

SUQUET, M. ; OMNES, M. H.; NORMANT, Y.; FAUVEL, C. Assessment of sperm concentration and motility in turbot (*Scophthalmus maximus*). In: *Aquaculture*, New Jersey. Vol. 101. 1992. p. 177-185.

USEPA. Environmental Protection Agency = Agencia de Protección Medioambiental de los E. U. En: LETTERMAR, R. D. (Editor técnico). Calidad y tratamiento del agua. Manual de suministros de agua comunitaria. Madrid, España: American Waters Works Asociation, Editorial MCGRAW-HILL-INTERAMERICANA DE ESPAÑA. 2002. p. 1231.

VAN LOOK, K.J y KIME, D.F. Automated sperm morphology análisis in fishes: the effect of mercury on goldfish sperm. In: *Journal of fish Biology*. Sheffield, U.K., Vol 63, 2003. p.1020-1033.

WARNECKE, D. Motility, ATP content, and membrana integrity of fresh and cryopreserved spermatozoa of carp (*Cyprinus carpio* L.) and starlet (*Acipenser ruthenus* L.) as endpoints for the evaluation of aquatic environmental chemical. development of innovate ecotoxicological evaluation methods as fertility tests and alternative procedures to animal testing. Ph Dissertation, Free University of Berlin. 2003.

WEIS, M. Interpretação da idade e calculo de curva de crescimento do jundiá, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimand, 1824), do Banhado de Santa Carina. Curso de Pos-Graduação em Zootecnia. Santa Maria, Brasil: Universidad Federal de Santa Maria, 1980. p. 54.

WEIS, J. y WEIS, P. Methylmercury tolerans of Killifish (*Fundulus heteroclitus*) embryos from a Polluted vs. non-polluted environment.. In: *Mar boil*. New Jersey Vol. 65, 1981. p. 283-284

WEIS, P. y WEIS, J. Effects of embryonic pre-exposure to methylmercury and Hg²⁺ on larval tolerance in *Fundulus Hetericlitus*. In: *Bulletin Environmental contamination Toxicology*, Scotland. Vol. 31. 1983. p. 530-534.

ZILLI, L.; SCHIAVONE, R.; ZONNO, V.; ROSSANO, R.; STURELLI, C. y VILELLA, S. Effect of cryopreservacion on sea bass sperm proteins. In: *Biology of reproduction*. New Jersey, Vol. 72, 2005. p. 1262-1267.

ANEXOS

ANEXO A. Parámetros de registro de animales clínicamente sanos utilizados en el estudio.

CARACTERISTICAS DE PEZ SANO	MARCACION MACHOS (evaluación con mercurio)							
	Sin marca	Negro	Rojo	Sin marca	Verde	Rojo	Azul	SM
Alteraciones macroscópicas: piel, ojos, branquias.	ninguna	ninguna	ninguna	ninguna	ninguna	ninguna	ninguna	ninguna
Nado en eje vertical	evidente	evidente	evidente	evidente	evidente	evidente	evidente	evidente
Mantenimiento del eje de ando	evidente	evidente	evidente	evidente	evidente	evidente	evidente	evidente
Respuesta ante el estímulo de los reflejos	inmediata	inmediata	inmediata	inmediata	inmediata	inmediata	inmediata	inmediata

ANEXO B. Parámetro físico químicos del agua utilizada en el Instituto de Acuicultura de los Llanos para el manejo de ejemplares de barbilla (*Rhamdia sebae* c.f).

PARÁMETRO	CANTIDAD (media± SEM)
Temperatura	25.7± 0.1
Conductividad (µs.cm)	33.3 ±5.8
Salinidad (ppm)	0.014 ± 0.003
Sólidos disueltos totales TDS (mg.L)	0.019 ± 0.003
Oxígeno disuelto (mg.L)	0.019 ± 0.003

ANEXO C. Preparación de la dilución de semen (1:3000) de *Rhamdia sebae* c.f para obtención de la concentración espermática individual de los ejemplares machos utilizados en el estudio.

Para esto fue necesaria la utilización de solución salina (0,9 % NaCl) o también llamado suero fisiológico (este es un medio isosmotico que permite conservar la integridad de las células espermáticas) y para la medición de los volúmenes se utilizaron micropipetas o también llamadas pipetas de precisión.

El primer paso fue obtener, la muestra seminal individual con un volumen aproximado de 1 ml en un tubo eppendorf aforado, siguiendo las recomendaciones para evitar que la muestra seminal se contamine, la misma muestra posteriormente se activara con los tratamientos del experimento en el CASA. Una vez que se obtuvo la muestra seminal se llevo a cabo el siguiente procedimiento:

1. Con las micropipetas se tomaron 950 μL de solución salina que se depositan en otro tubo eppendorf esterilizado y allí se adiciono 50 μL de semen, se procedió a tapar el tubo, de manera que la muestra no se riegue al momento de voltear el tubo repetidamente para su homogenización, este procedimiento se debe hacer suavemente para evitar la destrucción de las células lo cual dificultaría su conteo en la cámara de Neubauer. Una vez mezclada la muestra se obtuvo una proporción de 1:20.

$$950 \mu\text{L S.S} + 50 \mu\text{L de semen} = \text{dilución } 1:20$$

2. Se toma un tubo eppendorf esterilizado en el cual se deposita 980 μL de solución salina, a la cual se adiciona 20 μL de la dilución 1:20 preparada anteriormente se homogeniza obteniendo una proporción de 1:50.

$$980 \mu\text{L S.S} + 20 \mu\text{L (1:20)} = \text{dilución } 1:50$$

3. En un tubo eppendorf esterilizado se depositan 100 μL de solución salina y se adiciona 200 μL de la dilución 1:50, se mezcla y obteniendo así una proporción 1:3.

$$100 \mu\text{L S.S} + 200 \mu\text{L (1:50)} = 1:3$$

$$\text{Finalmente: } \frac{1}{20} * \frac{1}{50} * \frac{1}{3} = \frac{1}{3000} = 1:3000$$

ANEXO D. Procedimiento para la preparación de los tratamientos utilizados en el estudio in vitro sobre la movilidad y velocidad espermática individual en *Rhamdia sebae* c.f.

Solución stock (SS): 1.000.000 µg.L (se preparó con 10 mg de Mercurio reactivo diluido en 10 mL de agua destilada estéril).

Posteriormente a la preparación de la solución stock se prepararon soluciones de 100.000, 10.000, 1.000, 500, 100 y 10 µg.L, así:

- 100.000 µg.L: 1 mL de SS + 9 mL agua destilada (AD)
- 10.000 µg.L: 0.1 mL de SS + 9.9 mL AD
- 1.000 µg.L: 0.1 mL de la solución de 100.000 µg.L + 9.9 mL AD
- 500 µg.L: 50 µL de la solución de 100.000 µg.L + 9.95 mL de AD
- 100 µg.L: 0.1 mL de la solución de 10.000 µg.L + 9.9 mL de AD
- 10 µg.L: 10 µL de la solución de 10.000 µg.L + 9.99 mL de AD
- Control: AD.

ANEXO E. Datos de la biometría y observación de las muestras seminales de machos de *Rhamdia sebae* c.f obtenidos para el estudio y su descriptiva.

Macho	Peso (g)	Longitud Total (cm)	Volumen seminal (mL)	Conteo espermático (Sptz X 10⁶ / uL)	Movilidad (%)	Espermatocrito (%)	Tiempo de activación (s)
Sin marca negro	83,5	22	1,9	42,150	90	57,37	33
Rojo	89,2	22,8	0,3	42,150	90	55,57	35
Sin marca verde	74,3	20,7	1	32,500	90	41,6	30
rojo	75,6	21	0,3	44,500	90	63,6	32
azul	88,6	23,1	0,8	33,850	90	50	32
SM	90,1	23	0,9	46,333	90	48,62	48
	112,9	25	0,6	27,910	90	44,42	30
	80,6	21	1,2	28,493	90	42	35

Col. title	Peso	LT	Sptz / ul	Mot %	Spto %	T.
A.						
Mean	86.85	22.325	37.235	90	50.3975	34.375
Standard deviation (SD)	12.143	1.449	7.379	0.000	7.898	5.829
Sample size (N)	8	8	8	8	8	8
Std. error of mean(SEM)	4.293	0.5123	2.609	0.000	2.792	2.061
Lower 95% conf. limit	76.697	21.114	31.066	90.000	43.794	29.501
Upper 95% conf. limit	97.003	23.536	43.406	90.000	57.001	39.249
Minimum	74.300	20.700	27.910	90.000	41.600	30.000
Median (50th percentile)	86.050	22.400	38.000	90.000	49.310	32.500
Maximum	112.90	25.000	46.333	90.000	63.600	48.000
Normality test KS	0.2695	0.1947	0.2473	0.1504	0.3323	
Normality test P value	0,0901	>0.10	>0.10		>0.10	0,0096
Passed normality test?	Yes	Yes	Yes	Yes	No	

ANEXO F. Tabla general de datos obtenidos del CASA, para la evaluación de cloruro de Mercurio en muestras seminales en *Rhamdia sebae* c.f

Macho	Tto	Inter	WHOa	WHOb	WHOc	WHOd	VCL	VSL	VAP	WOB	ALH	TRATA
SM	0-0	1	71,29	21,45	5,68	1,58	51,09	47,78	48,45	0,88	1,06	1
SM	0-0	2	21,25	57,49	18,47	2,79	19,13	15,03	16,2	0,74	0,67	2
SM	0-0	3	0	19,11	76,43	4,46	8,48	2,08	4,15	0,48	0,48	3
SM	10	1	46,15	51,71	2,14	0	32,76	28,8	30,04	0,86	0,86	4
SM	10	2	7,48	75,85	15,99	0,68	13,91	9,63	10,6	0,7	0,62	5
SM	10	3	0	53,49	46,51	0	0,34	3,87	5,04	0,6	0,52	6
SM	100	1	74,59	22,95	2,46	0	46,35	43,46	43,54	0,9	1,04	7
SM	100	2	11,76	66,25	20,74	1,24	16,46	10,96	12,31	0,68	0,66	8
SM	100	3	0	10,23	86,93	2,84	7,95	1,5	3,79	0,48	0,47	9
SM	500	1	41,44	50	4,05	4,5	29,57	24,75	26,01	0,8	0,83	10
SM	500	2	4,03	58,05	32,21	5,7	12,08	6,83	8,27	0,61	0,56	11
SM	500	3	0	4,62	88,21	7,18	6,93	1,93	3,48	0,5	0,42	12
SM	1000	1	65,71	27,67	3,17	3,46	50,07	47,64	48,22	0,89	1,04	13
SM	1000	2	10,38	65,03	18,58	6,01	14,21	9,99	11,2	0,69	0,6	14
SM	1000	3	0	30,83	61,65	7,52	7,73	3,06	4,38	0,55	0,48	15
SM	10000	1	39,38	54,15	4	2,46	29,32	25,37	26,35	0,82	0,81	16
SM	10000	2	1,93	41,55	52,17	4,35	10,14	4,75	6,56	0,59	0,52	17
SM	10000	3	0	1,42	89,36	9,22	6,67	0,89	3,09	0,47	0,41	18

SM	100000	1											19
SM	100000	2											20
SM	100000	3											21
SM	0-1	1	74,47	24,11	0,71	0,71	44,4	41,68	41,89	0,9	0,99		22
SM	0-1	2	12,16	65,88	20,61	1,35	16,62	11,68	13,05	0,71	0,65		23
SM	0-1	3	0	6,08	90,54	3,38	7,87	1,66	3,73	0,48	0,47		24
Ne	0-0	1	84,14	8,28	1,38	6,21	94,17	92,27	92,23	0,91	1,52		1
Ne	0-0	2	64,5	30,18	1,78	3,55	40,11	36,92	37,58	0,86	0,94		2
Ne	0-0	3	9,82	72,32	13,39	4,46	17,15	10,61	11,81	0,62	0,67		3
Ne	10	1	75	23,08	1,92	0	49,5	44,46	45,55	0,89	1,09		4
Ne	10	2	32,24	67,43	0,33	0	27,33	22,65	23,15	0,81	0,82		5
Ne	10	3	2,17	72,45	24,77	0,62	14,1	7,08	8,38	0,57	0,64		6
Ne	100	1	82,63	17,37	0	0	67,45	62,65	63,93	0,92	1,28		7
Ne	100	2	43,25	54,27	1,65	0,83	31,61	28,47	28,62	0,85	0,84		8
Ne	100	3	2,59	71,55	25,43	0,43	13,65	8,19	9,41	0,64	0,62		9
Ne	500	1	80,63	17,8	1,04	0,52	64,77	59,86	61,4	0,91	1,24		10
Ne	500	2	40,87	56,13	1,63	1,36	30,08	26,77	27,11	0,84	0,82		11
Ne	500	3	3,14	62,75	34,12	0	13,52	7,52	8,85	0,6	0,62		12
Ne	1000	1	76,88	20,43	1,62	1,08	64,36	58,96	61	0,9	1,25		13
Ne	1000	2	45,66	51,45	1,45	1,45	31,51	29,01	29,27	0,86	0,82		14
Ne	1000	3	6,67	66,27	26,67	0,39	14,53	9,08	10,23	0,64	0,63		15

Ne	10000	1	32,33	63,91	3,76	0	28,56	21,65	24,46	0,8	0,86	16
Ne	10000	2	14,2	73,62	10,72	1,45	17,45	13,95	14,66	0,77	0,64	17
Ne	10000	3	0,4	40,48	55,56	3,57	9,38	4,56	5,81	0,59	0,52	18
Ne	100000	1										19
Ne	100000	2										20
Ne	100000	3										21
Ne	0-1	1	68,55	30,65	0	8,81	47,94	41,75	43,55	0,86	1,1	22
Ne	0-1	2	35,4	62,2	0,69	1,72	28,16	23,44	24	0,79	0,83	23
Ne	0-1	3	3,72	76,47	18,89	0,93	15,69	8,52	9,7	0,58	0,68	24
Ro	0-0	1	82,61	14,38	1,33	1,67	65,21	62,62	62,96	0,93	1,21	1
Ro	0-0	2	18,22	67,61	12,55	1,62	19,27	15,47	16,32	0,76	0,68	2
Ro	0-0	3	0	8,59	88,28	3,13	7,57	1,2	3,51	0,46	0,45	3
Ro	10	1	82,41	14,81	1,85	0,93	74,84	70,75	71,15	0,9	1,38	4
Ro	10	2										5
Ro	10	3	0,48	70,53	27,54	1,45	11,16	6,28	7,5	0,65	1,58	6
Ro	100	1	83,13	13,8	1,53	1,53	60	58,51	58,95	0,94	1,13	7
Ro	100	2	17,04	72,2	8,07	2,69	19,46	15,79	16,4	0,77	0,7	8
Ro	100	3	0	19,78	75,82	4,4	8,77	1,98	4,16	0,46	0,5	9
Ro	500	1	74,6	23,15	0,96	1,29	55,45	52,39	52,65	0,9	1,12	10
Ro	500	2	21,46	66,28	9,2	3,07	20,47	16,2	17,11	0,75	0,71	11
Ro	500	3	0	13,89	82,64	3,47	8,85	2,17	4,27	0,47	0,5	12

Ro	1000	1	74,65	23,96	0,7	0,69	48,88	44,39	45,52	0,89	1,1	13
Ro	1000	2	17,03	76,03	6,62	0,32	20,14	15,72	16,62	0,76	0,72	14
Ro	1000	3	0	27,23	70,68	2,09	9	2,68	4,51	0,5	0,51	15
Ro	10000	1	66,87	25,7	0,93	6,5	51,27	49,68	50,07	0,89	0,99	16
Ro	10000	2	18,55	56,56	19,46	5,43	17,69	14,29	15,13	0,73	0,63	17
Ro	10000	3	0	7,48	80,37	12,15	6,85	1,09	3,22	0,45	0,42	18
Ro	100000	1	0	14,07	81,91	4,02	7,22	2,3	3,91	0,54	0,43	19
Ro	100000	2	0	5,43	86,96	7,61	7,63	1,38	3,16	0,48	0,41	20
Ro	100000	3	0	5,11	89,2	5,68	6,98	1,93	3,47	0,5	0,43	21
Ro	0-1	1										22
Ro	0-1	2										23
Ro	0-1	3										24
SM	0-0	1	86,92	11,72	1,36	0	63,24	62,23	62,81	0,98	1,14	1
SM	0-0	2	30,28	62,15	7,57	0	23,15	20,18	20,99	0,83	0,71	2
SM	0-0	3	0	25,23	74,77	0	8,5	2,51	4,5	0,51	0,49	3
SM	10	1	84,88	14,15	0,98	0	57,91	53,44	55,08	0,93	1,15	4
SM	10	2	40,47	54,84	4,69	0	28,67	26,13	26,6	0,87	0,78	5
SM	10	3	6,25	53,52	39,84	0,39	12,94	7,77	9,12	0,63	0,59	6
SM	100	1	89,94	9,47	0,59	0	66,1	66,11	65,19	0,97	1,19	7
SM	100	2	34,38	58,33	7,29	0	26,58	23,47	24,07	0,83	0,77	8
SM	100	3	2,68	44,97	51,68	0,67	11,09	4,85	6,85	0,57	0,56	9

SM	500	1	81,51	17,36	0,76	0,38	61,35	57,47	59,1	0,93	1,18	10
SM	500	2	44,57	48,09	5,87	1,47	28,25	25,79	26,22	0,86	0,76	11
SM	500	3	3,49	55,02	41,05	0,44	12,23	6,72	8,39	0,63	0,58	12
SM	1000	1	76,05	21,56	2,4	0	46,59	43	44,18	0,92	1,02	13
SM	1000	2	26,33	68,93	4,73	0	22,8	19,79	20,36	0,83	0,72	14
SM	1000	3	0,44	44,25	54,87	0,44	10,36	4,98	6,56	0,59	0,54	15
SM	10000	1	0	21,82	75,15	3,03	7,86	2,82	4,54	0,56	0,46	16
SM	10000	2	0	70,59	24,84	4,58	8,46	5,27	6,01	0,69	0,53	17
SM	10000	3	0	69,87	23,72	6,41	8,09	4,67	5,5	0,67	0,51	18
SM	100000	1										19
SM	100000	2										20
SM	100000	3										21
SM	0-1	1	83,62	16,38	0	0	69,17	65,15	66,23	0,93	1,32	22
SM	0-1	2	50	48,24	1,76	0	31,64	29,37	29,55	0,88	0,83	23
SM	0-1	3	4,63	54,05	40,15	1,16	12,16	7,29	8,6	0,64	0,58	24
Ve	0-0	1	79,35	20	0,65	0	51,28	48,69	48,9	0,93	1,07	1
Ve	0-0	2	19,53	70,12	9,47	0,89	20,74	15,78	16,61	0,73	0,72	2
Ve	0-0	3	0	31,56	67,11	1,33	10,74	3,22	5,04	0,46	0,56	3
Ve	10	1	71,92	27,44	0,63	0	51,82	49,63	49,62	0,92	1,08	4
Ve	10	2	12,88	74,24	12,5	0,38	18,3	13,06	13,95	0,7	0,68	5
Ve	10	3	0	11,97	84,51	3,52	9,2	1,86	3,95	0,43	0,52	6

Ve	100	1	85,91	10,65	1,03	2,41	68,47	66,53	66,97	0,94	1,22	7
Ve	100	2	31,92	59,62	6,1	2,35	24,07	20,48	21,19	0,8	0,73	8
Ve	100	3	0	18,28	78,49	3,23	11,59	11,88	4,49	0,45	0,56	9
Ve	500	1	55,1	42,86	1,02	1,02	37,52	30,82	32,55	0,81	0,97	10
Ve	500	2	8,59	72,7	18,4	0,31	16,69	10,9	12,06	0,66	0,67	11
Ve	500	3	0	13,7	82,19	4,11	8,18	1,91	3,88	0,46	0,47	12
Ve	1000	1	65,31	30,2	2,45	2,04	45,28	42,38	42,68	0,89	1	13
Ve	1000	2	12,25	76,49	10,6	0,66	18,38	13,84	14,59	0,72	0,68	14
Ve	1000	3	0	14,77	81,25	3,98	8,83	1,93	4,04	0,45	0,5	15
Ve	10000	1	0	9,22	78,72	12,06	6,61	1,68	3,28	0,5	0,4	16
Ve	10000	2	0	2,27	83,33	14,39	5,99	1,04	2,78	0,45	0,36	17
Ve	10000	3	0	2,21	83,09	14,71	6,09	1,35	2,92	0,48	0,38	18
Ve	100000	1	0	20,96	69,43	9,61	7,02	2,12	3,94	0,55	0,43	19
Ve	100000	2	0	6,64	73,46	19,91	5,79	1,55	3,01	0,5	0,36	20
Ve	100000	3	0	3,8	76,63	19,57	6,12	1,01	2,79	0,46	0,37	21
Ve	0-1	1	70,73	27,64	0,81	0,81	43,01	39,49	39,91	0,9	1,02	22
Ve	0-1	2	14,5	73,96	11,24	0,3	18,57	13,47	14,35	0,71	0,7	23
Ve	0-1	3	0	18,65	78,24	3,11	8,91	2,28	4,24	0,47	0,5	24
ro	0-0	1	70,13	23,81	3,9	2,16	50,26	46,54	47,16	8,87	1,08	1
	0-0	2	18,53	69,11	10,04	2,32	20,2	15,32	16,13	0,71	0,7	2
	0-0	3	0	20,81	77,18	2,01	9,83	2,23	4,34	0,44	0,53	3

ro	10	1	73,9	26,1	0	0	51,34	49,08	48,68	0,91	1,08	4
	10	2	8,08	73,59	16,9	0,7	16,87	11,36	12,35	0,67	0,68	5
	10	3	0	13,11	85,79	1,09	9,77	1,77	3,97	0,41	0,54	6
ro	100	1	65,75	29,79	2,4	2,05	41,15	32,78	35	0,79	1,07	7
	100	2	5,81	67,05	25,58	1,55	17,83	8,11	10,51	0,54	0,73	8
	100	3	0	2,01	79,19	18,79	6,51	0,85	2,61	0,4	0,38	9
ro	500	1	60,07	38,49	1,08	0,36	41,76	37,87	38,12	0,86	1	10
	500	2	3,07	64,85	31,74	0,34	14,92	7,78	9,3	0,58	0,66	11
	500	3	0	4,94	90,74	4,32	8,11	1,14	3,33	0,42	0,47	12
ro	1000	1	66,77	30,99	1,28	0,96	46,53	44,09	44,44	0,9	0,99	13
	1000	2	10,53	64,91	21,64	2,92	15,23	10,53	11,71	0,68	0,62	14
	1000	3	0	5,81	88,37	5,81	7,43	1,04	3,38	0,46	0,45	15
ro	10000	1	0	23,33	68	8,67	6,85	2,9	4,25	0,6	0,44	16
	10000	2	0	23,84	64,9	11,26	6,65	2,96	3,98	0,57	0,44	17
	10000	3	0	8,39	79,02	12,59	6,42	2,33	3,5	0,53	0,41	18
ro	100000	1	0	11,8	39,89	48,31	5,39	1,58	2,67	0,44	0,3	19
	100000	2	0	0	35,48	64,52	4,7	0,57	1,65	0,31	0,26	20
	100000	3	0	0,88	30,97	68,14	4,88	0,43	1,58	0,28	0,26	21
ro	0-1	1	69,87	28,03	0,84	1,26	45,61	44,05	43,83	0,91	0,98	22
	0-1	2	2,52	64,71	31,93	0,84	12,63	6,57	8,31	0,59	0,59	23
	0-1	3	0	0	93,24	6,76	6,78	1,31	3,16	0,46	0,42	24

SM	0-0	1	86,49	11,58	1,93	0	65,7	63,16	62,88	0,92	1,26	1
	0-0	2	30,74	66,02	3,24	0	27,27	22,14	22,93	0,76	0,81	2
	0-0	3	1,76	51,18	47,06	0	12,2	4,54	6,65	0,51	0,59	3
SM	10	1	62,77	36,17	1,06	0	36,88	30,09	32,03	0,84	0,99	4
	10	2	9,79	73,08	16,78	0,35	18,34	11,34	12,86	0,64	0,7	5
	10	3	0	21,9	74,79	3,31	9,13	2,62	4,53	0,48	0,5	6
SM	100	1	60,63	35,54	2,79	1,05	41,24	36,64	37,79	0,86	0,97	7
	100	2	12,1	62,63	24,2	1,07	16,35	11,56	12,83	0,69	0,64	8
	100	3	0	5,37	91,95	2,68	8,3	1,19	3,56	0,43	0,47	9
SM	500	1	41,61	54,74	3,65	0	31,59	24,87	27,08	0,81	0,89	10
	500	2	10,03	65,52	21,94	2,51	15,97	10,67	12,15	0,68	0,64	11
	500	3	0	12,87	80,2	6,93	7,95	1,81	3,76	0,46	0,47	12
SM	1000	1	57,14	40,86	1,14	0,86	40,55	37,65	38,48	0,89	0,93	13
	1000	2	8,91	78,22	11,88	0,99	14,72	10,45	11,63	0,73	0,63	14
	1000	3	0	6,03	92,24	1,72	7,5	2,02	3,72	0,52	0,97	15
SM	10000	1	21,26	38,54	37,21	2,99	18,96	14,96	16,11	0,69	0,63	16
	10000	2	2,47	12,96	79,01	5,56	8	2,84	4,63	0,52	0,44	17
	10000	3	0	2,11	89,44	8,45	6,1	0,88	2,9	0,48	0,38	18
SM	100000	1	0	20,69	48,28	31,03	6,78	2,04	3,62	0,5	0,38	19
	100000	2	0	10,63	55,26	34,21	6,15	1,24	2,84	0,42	0,35	20
	100000	3	0	2,86	51,43	45,71	6,15	0,9	2,47	0,4	0,33	21

SM	0-1	1	71,88	26,56	1,04	0,52	54,5	49,08	50,86	0,88	1,14	22
	0-1	2	26,25	63,44	9,69	0,63	21,13	16,44	17,53	0,74	0,71	23
	0-1	3	0	25,58	70,35	4,07	8,85	2,45	4,47	0,49	0,49	24
sm	0-0	1	72,89	26,37	0,37	0,37	49,15	45,54	46,52	0,92	1,07	1
	0-0	2	19,82	70,12	10,06	0	20,45	16,35	17,18	0,76	0,71	2
	0-0	3	0	26,26	72,63	1,12	8,92	2,61	4,64	0,5	0,5	3
sm	10	1	81,4	17,61	0,33	0,66	67,18	64,44	65,34	0,94	1,21	4
	10	2	30,64	57,87	10,21	1,28	24,32	20,71	21,73	0,78	0,73	5
	10	3	0	23,58	73,58	2,83	8,85	2,41	4,66	0,51	0,5	6
sm	100	1	60,63	35,54	2,79	1,05	41,24	36,64	37,79	0,86	0,97	7
	100	2	12,1	62,63	24,2	1,07	16,35	11,56	12,83	0,69	0,64	8
	100	3	0	5,37	91,95	2,68	8,3	1,19	3,56	0,43	0,47	9
sm	500	1	77,65	18,91	2,29	1,15	52,24	52,25	51,58	0,94	1,01	10
	500	2	11,68	60,41	24,87	3,05	15,5	11,11	12,45	0,7	0,62	11
	500	3	0	7,69	90,11	2,2	8,01	1,6	3,73	0,47	0,48	12
sm	1000	1	70,13	27,67	1,57	0,63	50,22	47,97	48,21	0,91	1,03	13
	1000	2	13,78	60,44	24,89	0,89	15,6	11,64	12,86	0,72	0,61	14
	1000	3	0	0,77	97,69	1,54	8,1	0,94	3,33	0,42	0,46	15
sm	10000	1	0	58,43	38,58	3	8,12	4,65	5,51	0,68	0,5	16
	10000	2	0	4,15	86,53	9,33	6,31	1,53	3,13	0,51	0,39	17
	10000	3	0	18,89	70,05	11,06	7,04	2,36	3,76	0,53	0,43	18

sm	100000	1	0	8,55	62,39	29,06	8,06	1,44	3,36	0,4	0,43	19
	100000	2	0	3,7	62,96	33,33	8,49	0,82	2,75	0,32	0,41	20
	100000	3	0	2,68	64,29	33,04	7,83	0,61	2,41	0,31	0,41	21
sm	0-1	1	47,62	51,19	1,19	0	34,75	29,19	30,44	0,83	0,93	22
	0-1	2	7,24	78,97	13,79	0	14,22	10	10,97	0,71	0,63	23
	0-1	3	0	50,76	48,22	1,02	8,35	4,18	5,18	0,62	0,53	24

ANEXO G. Datos transformados previo a la ANAVA.

Macho	Tto	Inter	WHOa	WHOb	WHOc	WHOd	VCL	VSL	VAP	WOB	ALH	TRATA
SM	0-0	1	71,29	21,45	5,68	1,58	51,09	47,78	48,45	0,88	1,06	1
SM	0-0	2	21,25	57,49	18,47	2,79	19,13	15,03	16,2	0,74	0,67	2
SM	0-0	3	0	19,11	76,43	4,46	8,48	2,08	4,15	0,48	0,48	3
SM	10	1	46,15	51,71	2,14	0	32,76	28,8	30,04	0,86	0,86	4
SM	10	2	7,48	75,85	15,99	0,68	13,91	9,63	10,6	0,7	0,62	5
SM	10	3	0	53,49	46,51	0	0,34	3,87	5,04	0,6	0,52	6
SM	100	1	74,59	22,95	2,46	0	46,35	43,46	43,54	0,9	1,04	7
SM	100	2	11,76	66,25	20,74	1,24	16,46	10,96	12,31	0,68	0,66	8
SM	100	3	0	10,23	86,93	2,84	7,95	1,5	3,79	0,48	0,47	9

SM	500	1	41,44	50	4,05	4,5	29,57	24,75	26,01	0,8	0,83	10
SM	500	2	4,03	58,05	32,21	5,7	12,08	6,83	8,27	0,61	0,56	11
SM	500	3	0	4,62	88,21	7,18	6,93	1,93	3,48	0,5	0,42	12
SM	1000	1	65,71	27,67	3,17	3,46	50,07	47,64	48,22	0,89	1,04	13
SM	1000	2	10,38	65,03	18,58	6,01	14,21	9,99	11,2	0,69	0,6	14
SM	1000	3	0	30,83	61,65	7,52	7,73	3,06	4,38	0,55	0,48	15
SM	10000	1	39,38	54,15	4	2,46	29,32	25,37	26,35	0,82	0,81	16
SM	10000	2	1,93	41,55	52,17	4,35	10,14	4,75	6,56	0,59	0,52	17
SM	10000	3	0	1,42	89,36	9,22	6,67	0,89	3,09	0,47	0,41	18
SM	0-1	1	74,47	24,11	0,71	0,71	44,4	41,68	41,89	0,9	0,99	22
SM	0-1	2	12,16	65,88	20,61	1,35	16,62	11,68	13,05	0,71	0,65	23
SM	0-1	3	0	6,08	90,54	3,38	7,87	1,66	3,73	0,48	0,47	24
Ne	0-0	1	84,14	8,28	1,38	6,21	94,17	92,27	92,23	0,91	1,52	1
Ne	0-0	2	64,5	30,18	1,78	3,55	40,11	36,92	37,58	0,86	0,94	2
Ne	0-0	3	9,82	72,32	13,39	4,46	17,15	10,61	11,81	0,62	0,67	3
Ne	10	1	75	23,08	1,92	0	49,5	44,46	45,55	0,89	1,09	4
Ne	10	2	32,24	67,43	0,33	0	27,33	22,65	23,15	0,81	0,82	5
Ne	10	3	2,17	72,45	24,77	0,62	14,1	7,08	8,38	0,57	0,64	6
Ne	100	1	82,63	17,37	0	0	67,45	62,65	63,93	0,92	1,28	7
Ne	100	2	43,25	54,27	1,65	0,83	31,61	28,47	28,62	0,85	0,84	8
Ne	100	3	2,59	71,55	25,43	0,43	13,65	8,19	9,41	0,64	0,62	9

Ne	500	1	80,63	17,8	1,04	0,52	64,77	59,86	61,4	0,91	1,24	10
Ne	500	2	40,87	56,13	1,63	1,36	30,08	26,77	27,11	0,84	0,82	11
Ne	500	3	3,14	62,75	34,12	0	13,52	7,52	8,85	0,6	0,62	12
Ne	1000	1	76,88	20,43	1,62	1,08	64,36	58,96	61	0,9	1,25	13
Ne	1000	2	45,66	51,45	1,45	1,45	31,51	29,01	29,27	0,86	0,82	14
Ne	1000	3	6,67	66,27	26,67	0,39	14,53	9,08	10,23	0,64	0,63	15
Ne	10000	1	32,33	63,91	3,76	0	28,56	21,65	24,46	0,8	0,86	16
Ne	10000	2	14,2	73,62	10,72	1,45	17,45	13,95	14,66	0,77	0,64	17
Ne	10000	3	0,4	40,48	55,56	3,57	9,38	4,56	5,81	0,59	0,52	18
Ne	0-1	1	68,55	30,65	0	8,81	47,94	41,75	43,55	0,86	1,1	22
Ne	0-1	2	35,4	62,2	0,69	1,72	28,16	23,44	24	0,79	0,83	23
Ne	0-1	3	3,72	76,47	18,89	0,93	15,69	8,52	9,7	0,58	0,68	24
Ro	0-0	1	82,61	14,38	1,33	1,67	65,21	62,62	62,96	0,93	1,21	1
Ro	0-0	2	18,22	67,61	12,55	1,62	19,27	15,47	16,32	0,76	0,68	2
Ro	0-0	3	0	8,59	88,28	3,13	7,57	1,2	3,51	0,46	0,45	3
Ro	10	1	82,41	14,81	1,85	0,93	74,84	70,75	71,15	0,9	1,38	4
Ro	10	3	0,48	70,53	27,54	1,45	11,16	6,28	7,5	0,65	1,58	6
Ro	100	1	83,13	13,8	1,53	1,53	60	58,51	58,95	0,94	1,13	7
Ro	100	2	17,04	72,2	8,07	2,69	19,46	15,79	16,4	0,77	0,7	8
Ro	100	3	0	19,78	75,82	4,4	8,77	1,98	4,16	0,46	0,5	9
Ro	500	1	74,6	23,15	0,96	1,29	55,45	52,39	52,65	0,9	1,12	10

Ro	500	2	21,46	66,28	9,2	3,07	20,47	16,2	17,11	0,75	0,71	11
Ro	500	3	0	13,89	82,64	3,47	8,85	2,17	4,27	0,47	0,5	12
Ro	1000	1	74,65	23,96	0,7	0,69	48,88	44,39	45,52	0,89	1,1	13
Ro	1000	2	17,03	76,03	6,62	0,32	20,14	15,72	16,62	0,76	0,72	14
Ro	1000	3	0	27,23	70,68	2,09	9	2,68	4,51	0,5	0,51	15
Ro	10000	1	66,87	25,7	0,93	6,5	51,27	49,68	50,07	0,89	0,99	16
Ro	10000	2	18,55	56,56	19,46	5,43	17,69	14,29	15,13	0,73	0,63	17
Ro	10000	3	0	7,48	80,37	12,15	6,85	1,09	3,22	0,45	0,42	18
Ro	100000	1	0	14,07	81,91	4,02	7,22	2,3	3,91	0,54	0,43	19
Ro	100000	2	0	5,43	86,96	7,61	7,63	1,38	3,16	0,48	0,41	20
Ro	100000	3	0	5,11	89,2	5,68	6,98	1,93	3,47	0,5	0,43	21
SM	0-0	1	86,92	11,72	1,36	0	63,24	62,23	62,81	0,98	1,14	1
SM	0-0	2	30,28	62,15	7,57	0	23,15	20,18	20,99	0,83	0,71	2
SM	0-0	3	0	25,23	74,77	0	8,5	2,51	4,5	0,51	0,49	3
SM	10	1	84,88	14,15	0,98	0	57,91	53,44	55,08	0,93	1,15	4
SM	10	2	40,47	54,84	4,69	0	28,67	26,13	26,6	0,87	0,78	5
SM	10	3	6,25	53,52	39,84	0,39	12,94	7,77	9,12	0,63	0,59	6
SM	100	1	89,94	9,47	0,59	0	66,1	66,11	65,19	0,97	1,19	7
SM	100	2	34,38	58,33	7,29	0	26,58	23,47	24,07	0,83	0,77	8
SM	100	3	2,68	44,97	51,68	0,67	11,09	4,85	6,85	0,57	0,56	9
SM	500	1	81,51	17,36	0,76	0,38	61,35	57,47	59,1	0,93	1,18	10

SM	500	2	44,57	48,09	5,87	1,47	28,25	25,79	26,22	0,86	0,76	11
SM	500	3	3,49	55,02	41,05	0,44	12,23	6,72	8,39	0,63	0,58	12
SM	1000	1	76,05	21,56	2,4	0	46,59	43	44,18	0,92	1,02	13
SM	1000	2	26,33	68,93	4,73	0	22,8	19,79	20,36	0,83	0,72	14
SM	1000	3	0,44	44,25	54,87	0,44	10,36	4,98	6,56	0,59	0,54	15
SM	10000	1	0	21,82	75,15	3,03	7,86	2,82	4,54	0,56	0,46	16
SM	10000	2	0	70,59	24,84	4,58	8,46	5,27	6,01	0,69	0,53	17
SM	10000	3	0	69,87	23,72	6,41	8,09	4,67	5,5	0,67	0,51	18
SM	0-1	1	83,62	16,38	0	0	69,17	65,15	66,23	0,93	1,32	22
SM	0-1	2	50	48,24	1,76	0	31,64	29,37	29,55	0,88	0,83	23
SM	0-1	3	4,63	54,05	40,15	1,16	12,16	7,29	8,6	0,64	0,58	24
Ve	0-0	1	79,35	20	0,65	0	51,28	48,69	48,9	0,93	1,07	1
Ve	0-0	2	19,53	70,12	9,47	0,89	20,74	15,78	16,61	0,73	0,72	2
Ve	0-0	3	0	31,56	67,11	1,33	10,74	3,22	5,04	0,46	0,56	3
Ve	10	1	71,92	27,44	0,63	0	51,82	49,63	49,62	0,92	1,08	4
Ve	10	2	12,88	74,24	12,5	0,38	18,3	13,06	13,95	0,7	0,68	5
Ve	10	3	0	11,97	84,51	3,52	9,2	1,86	3,95	0,43	0,52	6
Ve	100	1	85,91	10,65	1,03	2,41	68,47	66,53	66,97	0,94	1,22	7
Ve	100	2	31,92	59,62	6,1	2,35	24,07	20,48	21,19	0,8	0,73	8
Ve	100	3	0	18,28	78,49	3,23	11,59	11,88	4,49	0,45	0,56	9
Ve	500	1	55,1	42,86	1,02	1,02	37,52	30,82	32,55	0,81	0,97	10

Ve	500	2	8,59	72,7	18,4	0,31	16,69	10,9	12,06	0,66	0,67	11
Ve	500	3	0	13,7	82,19	4,11	8,18	1,91	3,88	0,46	0,47	12
Ve	1000	1	65,31	30,2	2,45	2,04	45,28	42,38	42,68	0,89	1	13
Ve	1000	2	12,25	76,49	10,6	0,66	18,38	13,84	14,59	0,72	0,68	14
Ve	1000	3	0	14,77	81,25	3,98	8,83	1,93	4,04	0,45	0,5	15
Ve	10000	1	0	9,22	78,72	12,06	6,61	1,68	3,28	0,5	0,4	16
Ve	10000	2	0	2,27	83,33	14,39	5,99	1,04	2,78	0,45	0,36	17
Ve	10000	3	0	2,21	83,09	14,71	6,09	1,35	2,92	0,48	0,38	18
Ve	100000	1	0	20,96	69,43	9,61	7,02	2,12	3,94	0,55	0,43	19
Ve	100000	2	0	6,64	73,46	19,91	5,79	1,55	3,01	0,5	0,36	20
Ve	100000	3	0	3,8	76,63	19,57	6,12	1,01	2,79	0,46	0,37	21
Ve	0-1	1	70,73	27,64	0,81	0,81	43,01	39,49	39,91	0,9	1,02	22
Ve	0-1	2	14,5	73,96	11,24	0,3	18,57	13,47	14,35	0,71	0,7	23
Ve	0-1	3	0	18,65	78,24	3,11	8,91	2,28	4,24	0,47	0,5	24
ro	0-0	1	70,13	23,81	3,9	2,16	50,26	46,54	47,16	8,87	1,08	1
	0-0	2	18,53	69,11	10,04	2,32	20,2	15,32	16,13	0,71	0,7	2
	0-0	3	0	20,81	77,18	2,01	9,83	2,23	4,34	0,44	0,53	3
ro	10	1	73,9	26,1	0	0	51,34	49,08	48,68	0,91	1,08	4
	10	2	8,08	73,59	16,9	0,7	16,87	11,36	12,35	0,67	0,68	5
	10	3	0	13,11	85,79	1,09	9,77	1,77	3,97	0,41	0,54	6
ro	100	1	65,75	29,79	2,4	2,05	41,15	32,78	35	0,79	1,07	7

	100	2	5,81	67,05	25,58	1,55	17,83	8,11	10,51	0,54	0,73	8
	100	3	0	2,01	79,19	18,79	6,51	0,85	2,61	0,4	0,38	9
ro	500	1	60,07	38,49	1,08	0,36	41,76	37,87	38,12	0,86	1	10
	500	2	3,07	64,85	31,74	0,34	14,92	7,78	9,3	0,58	0,66	11
	500	3	0	4,94	90,74	4,32	8,11	1,14	3,33	0,42	0,47	12
ro	1000	1	66,77	30,99	1,28	0,96	46,53	44,09	44,44	0,9	0,99	13
	1000	2	10,53	64,91	21,64	2,92	15,23	10,53	11,71	0,68	0,62	14
	1000	3	0	5,81	88,37	5,81	7,43	1,04	3,38	0,46	0,45	15
ro	10000	1	0	23,33	68	8,67	6,85	2,9	4,25	0,6	0,44	16
	10000	2	0	23,84	64,9	11,26	6,65	2,96	3,98	0,57	0,44	17
	10000	3	0	8,39	79,02	12,59	6,42	2,33	3,5	0,53	0,41	18
ro	100000	1	0	11,8	39,89	48,31	5,39	1,58	2,67	0,44	0,3	19
	100000	2	0	0	35,48	64,52	4,7	0,57	1,65	0,31	0,26	20
	100000	3	0	0,88	30,97	68,14	4,88	0,43	1,58	0,28	0,26	21
ro	0-1	1	69,87	28,03	0,84	1,26	45,61	44,05	43,83	0,91	0,98	22
	0-1	2	2,52	64,71	31,93	0,84	12,63	6,57	8,31	0,59	0,59	23
	0-1	3	0	0	93,24	6,76	6,78	1,31	3,16	0,46	0,42	24
SM	0-0	1	86,49	11,58	1,93	0	65,7	63,16	62,88	0,92	1,26	1
	0-0	2	30,74	66,02	3,24	0	27,27	22,14	22,93	0,76	0,81	2
	0-0	3	1,76	51,18	47,06	0	12,2	4,54	6,65	0,51	0,59	3
SM	10	1	62,77	36,17	1,06	0	36,88	30,09	32,03	0,84	0,99	4

	10	2	9,79	73,08	16,78	0,35	18,34	11,34	12,86	0,64	0,7	5
	10	3	0	21,9	74,79	3,31	9,13	2,62	4,53	0,48	0,5	6
SM	100	1	60,63	35,54	2,79	1,05	41,24	36,64	37,79	0,86	0,97	7
	100	2	12,1	62,63	24,2	1,07	16,35	11,56	12,83	0,69	0,64	8
	100	3	0	5,37	91,95	2,68	8,3	1,19	3,56	0,43	0,47	9
SM	500	1	41,61	54,74	3,65	0	31,59	24,87	27,08	0,81	0,89	10
	500	2	10,03	65,52	21,94	2,51	15,97	10,67	12,15	0,68	0,64	11
	500	3	0	12,87	80,2	6,93	7,95	1,81	3,76	0,46	0,47	12
SM	1000	1	57,14	40,86	1,14	0,86	40,55	37,65	38,48	0,89	0,93	13
	1000	2	8,91	78,22	11,88	0,99	14,72	10,45	11,63	0,73	0,63	14
	1000	3	0	6,03	92,24	1,72	7,5	2,02	3,72	0,52	0,97	15
SM	10000	1	21,26	38,54	37,21	2,99	18,96	14,96	16,11	0,69	0,63	16
	10000	2	2,47	12,96	79,01	5,56	8	2,84	4,63	0,52	0,44	17
	10000	3	0	2,11	89,44	8,45	6,1	0,88	2,9	0,48	0,38	18
SM	100000	1	0	20,69	48,28	31,03	6,78	2,04	3,62	0,5	0,38	19
	100000	2	0	10,63	55,26	34,21	6,15	1,24	2,84	0,42	0,35	20
	100000	3	0	2,86	51,43	45,71	6,15	0,9	2,47	0,4	0,33	21
SM	0-1	1	71,88	26,56	1,04	0,52	54,5	49,08	50,86	0,88	1,14	22
	0-1	2	26,25	63,44	9,69	0,63	21,13	16,44	17,53	0,74	0,71	23
	0-1	3	0	25,58	70,35	4,07	8,85	2,45	4,47	0,49	0,49	24
sm	0-0	1	72,89	26,37	0,37	0,37	49,15	45,54	46,52	0,92	1,07	1

	0-0	2	19,82	70,12	10,06	0	20,45	16,35	17,18	0,76	0,71	2
	0-0	3	0	26,26	72,63	1,12	8,92	2,61	4,64	0,5	0,5	3
sm	10	1	81,4	17,61	0,33	0,66	67,18	64,44	65,34	0,94	1,21	4
	10	2	30,64	57,87	10,21	1,28	24,32	20,71	21,73	0,78	0,73	5
	10	3	0	23,58	73,58	2,83	8,85	2,41	4,66	0,51	0,5	6
sm	100	1	60,63	35,54	2,79	1,05	41,24	36,64	37,79	0,86	0,97	7
	100	2	12,1	62,63	24,2	1,07	16,35	11,56	12,83	0,69	0,64	8
	100	3	0	5,37	91,95	2,68	8,3	1,19	3,56	0,43	0,47	9
sm	500	1	77,65	18,91	2,29	1,15	52,24	52,25	51,58	0,94	1,01	10
	500	2	11,68	60,41	24,87	3,05	15,5	11,11	12,45	0,7	0,62	11
	500	3	0	7,69	90,11	2,2	8,01	1,6	3,73	0,47	0,48	12
sm	1000	1	70,13	27,67	1,57	0,63	50,22	47,97	48,21	0,91	1,03	13
	1000	2	13,78	60,44	24,89	0,89	15,6	11,64	12,86	0,72	0,61	14
	1000	3	0	0,77	97,69	1,54	8,1	0,94	3,33	0,42	0,46	15
sm	10000	1	0	58,43	38,58	3	8,12	4,65	5,51	0,68	0,5	16
	10000	2	0	4,15	86,53	9,33	6,31	1,53	3,13	0,51	0,39	17
	10000	3	0	18,89	70,05	11,06	7,04	2,36	3,76	0,53	0,43	18
sm	100000	1	0	8,55	62,39	29,06	8,06	1,44	3,36	0,4	0,43	19
	100000	2	0	3,7	62,96	33,33	8,49	0,82	2,75	0,32	0,41	20
	100000	3	0	2,68	64,29	33,04	7,83	0,61	2,41	0,31	0,41	21
sm	0-1	1	47,62	51,19	1,19	0	34,75	29,19	30,44	0,83	0,93	22

0-1	2	7,24	78,97	13,79	0	14,22	10	10,97	0,71	0,63	23
0-1	3	0	50,76	48,22	1,02	8,35	4,18	5,18	0,62	0,53	24

ANEXO H. Distribución de número de observaciones por variable e intervalo para posterior comparación entre los tratamientos.

Obs	Tto	Inter	WHOa	WHOb	WHOc	WHOd	VCL	VSL	VAP
1	0-0*	1	71.29	21.45	5.68	1.58	51.09	47.78	48.45
2	0-0*	2	21.25	57.49	18.47	2.79	19.13	15.03	16.20
3	0-0*	3	0.00	19.11	76.43	4.46	8.48	2.08	4.15
4	10	1	46.15	51.71	2.14	0.00	32.76	28.80	30.04
5	10	2	7.48	75.85	15.99	0.68	13.91	9.63	10.60
6	10	3	0.00	53.49	46.51	0.00	0.34	3.87	5.04
7	100	1	74.59	22.95	2.46	0.00	46.35	43.46	43.54
8	100	2	11.76	66.25	20.74	1.24	16.46	10.96	12.31
9	100	3	0.00	10.23	86.93	2.84	7.95	1.50	3.79
10	500	1	41.44	50.00	4.05	4.50	29.57	24.75	26.01
11	500	2	4.03	58.05	32.21	5.70	12.08	6.83	8.27
12	500	3	0.00	4.62	88.21	7.18	6.93	1.93	3.48
13	1000	1	65.71	27.67	3.17	3.46	50.07	47.64	48.22
14	1000	2	10.38	65.03	18.58	6.01	14.21	9.99	11.20
15	1000	3	0.00	30.83	61.65	7.52	7.73	3.06	4.38
16	10000	1	39.38	54.15	4.00	2.46	29.32	25.37	26.35
17	10000	2	1.93	41.55	52.17	4.35	10.14	4.75	6.56
18	10000	3	0.00	1.42	89.36	9.22	6.67	0.89	3.09
19	0-1**	1	74.47	24.11	0.71	0.71	44.40	41.68	41.89
20	0-1**	2	12.16	65.88	20.61	1.35	16.62	11.68	13.05
21	0-1**	3	0.00	6.08	90.54	3.38	7.87	1.66	3.73
22	0-0***	1	84.14	8.28	1.38	6.21	94.17	92.27	92.23
23	0-0***	2	64.50	30.18	1.78	3.55	40.11	36.92	37.58
24	0-0***	3	9.82	72.32	13.39	4.46	17.15	10.61	11.81

*control inicial; intervalo uno, dos y tres respectivamente.

**Concentración de 100.000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de cloruro de mercurio (HgCl_2); intervalo uno, dos y tres respectivamente.

***Control final; intervalo uno, dos y tres respectivamente.

ANEXO I. Análisis de varianza y prueba de Tukey para la movilidad progresiva rápida lineal (WHOa).

The GLM Procedure

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for WHOa

NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	155
Error Mean Square	123.5409
Critical Value of Studentized Range	5.23849
Minimum Significant Difference	21.579
Harmonic Mean of Cell Sizes	7.280607

NOTE: Cell sizes are not equal.

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	TRATA
A	79.228	8	1
A			
A	75.401	8	7
A			
A	72.304	8	4
A			
A	69.534	7	22
A			
A	69.080	8	13
A			
A	64.076	8	10
B	27.859	8	2
B			
C B	21.153	7	23
C B			
C B	21.045	8	8
C B			
C B	20.226	7	5
C B			
C B	19.980	8	16
C B			
C B	18.109	8	14
C B			
C B	18.038	8	11
C			
C	4.644	8	17
C			
C	1.448	8	3
C			
C	1.193	7	24

The SAS System

The GLM Procedure

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for WHOa

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	TRATA
C			
C	1.113	8	6
C			
C	0.889	8	15
C			
C	0.829	8	12
C			
C	0.659	8	9
C			
C	0.050	8	18
C			

839

C	0.000	5	21
C			
C	0.000	5	19
C			
C	0.000	5	20

The SAS System

08:46 Friday, August 25, 2000

ANEXO J. Análisis de varianza y prueba de Tukey para la movilidad progresiva lenta lineal (WHOb).

The GLM Procedure

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for WHOb

NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	155
Error Mean Square	289.4271
Critical Value of Studentized Range	5.23849
Minimum Significant Difference	33.029
Harmonic Mean of Cell Sizes	7.280607

NOTE: Cell sizes are not equal.

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping		Mean	N	TRATA
	A	68.129	7	5
	A			
	A	67.688	8	14
	A			
B	A	65.343	7	23
B	A			
B	A	62.873	8	8
B	A			
B	A	61.600	8	2
B	D			
B	A	61.504	8	11
B	D			
B	A	40.069	8	6
E	B			
E	D			
E	A			
E	B	36.888	8	16
E	D			
E	A			
E	B	35.693	8	17
E	D			
E	A			
E	B	33.084	7	24
E	D			
E	A			
E	B	32.914	8	10
E	D			
E	A			
E	B	31.883	8	3
E	D			
E	A			
E	B	29.223	7	22
E	D			
E	A			
E	B	27.918	8	13
E	D			
E	A			
E	B	26.384	8	4
E	D			
E	A			
E	B	24.495	8	15
E	D			

The SAS System

08:46 Friday, August 25, 2000

840

The GLM Procedure

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for WHOb

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping		Mean	N	TRATA
E	G			
E	F			
E	G	22.195	8	9
E	F			
E	G	21.935	8	12
E	F			

E	G	F	21.889	8	7
E	G	F			
E	G	F	18.856	8	18
E	G	F			
E	G	F	17.199	8	1
E	G	F			
E	G	F	15.214	5	19
	G	F			
	G	F	5.280	5	20
	G				
	G		3.066	5	21

The SAS System 08:46 Friday, August 25, 2000 841
The GLM Procedure

ANEXO K. Análisis de varianza y prueba de Tukey para la movilidad circular (WHOC).

The GLM Procedure

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for WHOC

NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	155
Error Mean Square	321.9834
Critical Value of Studentized Range	5.23849
Minimum Significant Difference	34.837
Harmonic Mean of Cell Sizes	7.280607

NOTE: Cell sizes are not equal.

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	TRATA
A	73.658	8	12
A			
B A	72.680	8	9
B A			
B A	71.678	8	15
B A			
B A	71.326	8	18
B A			
B A	64.606	8	3
B A			
B A	62.824	5	20
B A			
B A	62.804	7	24
B A			
B A	62.504	5	21
B A			
B A	60.380	5	19
B A			
B A	57.166	8	6
B A			
B A C	52.620	8	17
B C			
B D C	38.294	8	16
D C			
E D C	18.233	8	11
E D			
E D	14.729	8	8
E D			
E D	12.816	7	23
E D			
E D	12.549	8	14

The SAS System

08:46 Friday, August 25, 2000

842

The GLM Procedure

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for WHOC

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	TRATA
E D			
E D	11.057	7	5
E D			
E D	9.148	8	2
E			
E	2.075	8	1

E			
E	1.856	8	10
E			
E	1.791	8	13
E			
E	1.699	8	7
E			
E	1.114	8	4
E			
E	0.656	7	22
	The SAS System		08:46 Friday,

ANEXO L. Análisis de varianza y prueba de Tukey para amótiles (WHOd).

The GLM Procedure

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for WHOd

NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	155
Error Mean Square	40.73576
Critical Value of Studentized Range	5.23849
Minimum Significant Difference	12.391
Harmonic Mean of Cell Sizes	7.280607

NOTE: Cell sizes are not equal.

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	TRATA
A	34.428	5	21
A			
A	31.916	5	20
A			
A	24.406	5	19
B	9.770	8	18
B			
B	7.044	8	17
B			
B	4.839	8	16
B			
B	4.465	8	9
B			
B	3.581	8	12
B			
B	2.936	8	15
B			
B	2.919	7	24
B			
B	2.226	8	11
B			
B	2.064	8	3
B			
B	1.730	7	22
B			
B	1.655	8	14
B			
B	1.651	8	6
B			
B	1.499	8	1

The SAS System

08:46 Friday, August 25, 2000

844

The GLM Procedure

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for WHOd

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	TRATA
B			
B	1.396	8	2
B			
B	1.350	8	8
B			
B	1.215	8	13
B			
B	1.153	8	10
B			
B	1.011	8	7
B			
B	0.691	7	23
B			

B	0.484	7	5
B			
B	0.199	8	4
The SAS System		08:46 Friday, August 25, 2000 845	

ANEXO M. Análisis de varianza y prueba de Tukey para la velocidad curvilínea (VCL).

The GLM Procedure

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for VCL

NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	155
Error Mean Square	66.91918
Critical Value of Studentized Range	5.23849
Minimum Significant Difference	15.882
Harmonic Mean of Cell Sizes	7.280607

NOTE: Cell sizes are not equal.
Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	TRATA
A	61.263	8	1
A			
A	54.000	8	7
A			
A	52.779	8	4
A			
A	49.060	8	13
A			
A	48.483	7	22
A			
A	46.781	8	10
B	23.790	8	2
B			
C B	21.106	7	5
C B			
C B	21.089	8	8
C B			
C B	20.424	7	23
C B			
C B	19.694	8	16
C B			
C B	19.245	8	11
C B			
C B	19.074	8	14
C B			
C B	10.424	8	3
C B			
C B	10.086	8	17
C B			
C B	9.801	7	24

The SAS System

08:46 Friday, August 25, 2000

846

The GLM Procedure

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for VCL
Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	TRATA
C B			
C B	9.520	8	9
C B			
C B	9.436	8	6
C B			
C B	9.223	8	12
C B			
C B	9.185	8	15

C			
C	7.080	8	18
C			
C	6.894	5	19
C			
C	6.552	5	20
C			
C	6.392	5	21
C	The SAS System		08:46 Friday, August 25, 2000 847

ANEXO N. Análisis de varianza y prueba de Tukey para la velocidad en línea recta (VSL).

The GLM Procedure

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for VSL

NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	155
Error Mean Square	76.23628
Critical Value of Studentized Range	5.23849
Minimum Significant Difference	16.951
Harmonic Mean of Cell Sizes	7.280607

NOTE: Cell sizes are not equal.

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	TRATA
A	58.604	8	1
A			
A	50.415	8	7
A			
A	48.836	8	4
A			
A	45.760	8	13
A			
A	44.341	7	22
A			
A	42.535	8	10
B	19.649	8	2
B			
C	16.411	7	5
C			
C	16.300	8	8
C			
C	15.853	7	23
C			
C	15.464	8	16
C			
C	15.121	8	14
C			
C	14.506	8	11
C			
C	5.829	8	17
C			
C	4.208	8	6
C			
C	3.956	7	24

The SAS System

08:46 Friday, August 25, 2000

848

The GLM Procedure

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for VSL

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	TRATA
C			
C	3.954	8	9
C			
C	3.625	8	3
C			
C	3.216	8	15
C			
C	3.100	8	12

C			
C	2.266	8	18
C			
C	1.896	5	19
C			
C	1.112	5	20
C			
C	0.976	5	21
The SAS System		08:46 Friday, August 25, 2000 849	

ANEXO O. Análisis de varianza y prueba de Tukey para el patrón de velocidad angular (VAP).

The GLM Procedure
Tukey's Studentized Range (HSD) Test for VAP

NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	155
Error Mean Square	71.8159
Critical Value of Studentized Range	5.23849
Minimum Significant Difference	16.453
Harmonic Mean of Cell Sizes	7.280607

NOTE: Cell sizes are not equal.
Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	TRATA	
A	58.989	8	1	
A				
A	51.145	8	7	
A				
A	49.686	8	4	
A				
A	46.591	8	13	
A				
A	45.244	7	22	
A				
A	43.561	8	10	
B				
B	20.493	8	2	
C				
C	B	17.345	8	8
C	B			
C	B	17.320	7	5
C	B			
C	B	16.823	7	23
C	B			
C	B	16.821	8	16
C	B			
C	B	16.030	8	14
C	B			
C	B	15.584	8	11
C	B			
C	B	7.110	8	17
C	B			
C	B	5.894	8	6
C	B			
C	B	5.583	7	24

The SAS System

08:46 Friday, August 25, 2000

850

The GLM Procedure
Tukey's Studentized Range (HSD) Test for VAP

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	TRATA	
C				
C	B	5.580	8	3
C	B			
C	B	5.019	8	15
C	B			
C	B	4.961	8	12
C	B			
C	B	4.804	8	9

C			
C	3.838	8	18
C			
C	3.500	5	19
C			
C	2.682	5	20
C			
C	2.544	5	21
The SAS System		08:46	Friday, August 25, 2000 851