

GENOTOXICIDAD DEL CLORURO DE MERCURIO EN DOS ESPECIES ÍCTICAS (*Prochilodus magdalenae* Y *Oreochromis* sp.)

GENOTOXICITY OF MERCURIC CHLORIDE IN TWO ICTIC SPECIES (*Prochilodus magdalenae* AND *Oreochromis* sp.)

Mercedes Peñaloza¹, Mauricio Camargo² y Jaime Palacio³

Resumen

El ensayo de micronúcleos (MN) en células sanguíneas de peces ha mostrado ser una técnica útil para evaluar genotoxicidad *in vivo* y para biomonitorizar *in situ* la calidad de aguas en ecosistemas continentales.

Mediante el test de MN se evaluó la genotoxicidad del cloruro de mercurio (HgCl₂) bajo condiciones controladas, y en dos especies ícticas, una nativa y otra introducida a Colombia, *Prochilodus magdalenae* (bocachico) y *Oreochromis* sp. (tilapia), respectivamente.

Tres lotes de veinte ejemplares de cada especie se expusieron a tres concentraciones subletales de HgCl₂ (0.001, 0.003, 0.027 mg/l) durante siete días, acompañados de un lote control no expuesto. Diariamente se reemplazó el agua y se reajustó la concentración de la sal mercurial. Se tomaron muestras de ambas branquias en dos especímenes de cada lote y en ellas se cuantificó el promedio de MN/1.000 eritrocitos.

Los resultados mostraron un claro efecto de dosis y al tiempo de exposición ($p < 0.05$ a $p < 0.0001$). Además, indicaron que la especie nativa (bocachico) es más sensible que la foránea (tilapia) a este genotóxico. Por consiguiente, se recomienda el uso del bocachico como especie centinela potencial para el biomonitoreo genotóxico de contaminantes ambientales acuáticos, en particular para cuencas en donde habita esta especie o donde predomina este tipo de contaminación.

Palabras clave: genotoxicidad, xenobiótico, micronúcleos, alteraciones cromosómicas, especie nativa, *Prochilodus*.

Abstract

The micronucleus (MN) genetic test in fish blood cells has been used as a reliable technique, for the *in vivo* evaluation of genotoxicity and *in situ* biomonitoring of water quality in continental ecosystems.

This research was conducted with the purpose to evaluate the usefulness of a native and an introduced ictic specie to Colombia (*Prochilodus magdalenae* and *Oreochromis* sp, respectively), to evaluate genotoxicity of a common water pollutant (mercury chloride) under controlled conditions.

Three lots of fish, each containing twenty individuals were exposed to sublethal concentrations of HgCl₂ (0.001, 0.003, 0.027 mg/l). A fourth lot of untreated individuals was included as control.

Cytogenetic slides were prepared each day from both gills from two individuals and the average number of MN/1.000 erythrocytes was recorded. Results indicate a clear dosage and exposure time effect ($p < 0.05$ to $p < 0.0001$). Furthermore, the results evidenced that the native specie (bocachico), is more sensitive to HgCl₂ genotoxicity than tilapia (*Oreochromis* sp.). Therefore, we recommend the use of bocachico as a potential sentinel specie for the biomonitoring of water contaminants, particularly in hydrographic valleys predominantly inhabited by this specie and/or polluted by this common water contaminant.

Key words: genotoxicity, xenobiotics, micronucleus, chromosomal alterations, native specie, *Prochilodus*.

Recibido: abril de 2003; aprobado para publicación: junio de 2003.

¹ Estudiante de posgrado, Instituto de Biología, Universidad de Antioquia, apartado 1226, Medellín. E-mail: mpsilva@matematicas.udea.edu.co.

² Profesor, Instituto de Biología, Universidad de Antioquia, apartado 1226, Medellín. E-mail: mcamargo@epm.net.co.

³ Profesor, Facultad de Ingeniería, Universidad de Antioquia, apartado 1226, Medellín. E-mail: japalaci@jaibana.udea.edu.co.

INTRODUCCIÓN

El mercurio es un elemento tóxico que puede ser liberado a la atmósfera de manera natural por degradaciones en la corteza terrestre y en los océanos (Leyva y Luszczewski, 1998). En sus diversas formas inorgánicas y orgánicas es usado por el hombre en la manufactura de equipos eléctricos y de medición, pinturas, pesticidas, drogas y minería (amalgamamiento del oro), con el agravante de que sus residuos o productos lixiviados son arrojados a las aguas naturales (Bilinski *et al.*, 1999; Claxton, 1998; Ferrão *et al.*, 2001; Lu y Jaffe, 2000; Odeigah y Osanyinpeju, 1995; Panda *et al.*, 1992; Sánchez *et al.*, 1998). En Colombia esta práctica es común.

El mercurio tiene la capacidad de acumularse a lo largo de la cadena alimentaria en los tejidos animales expuestos a este metal, especialmente en peces (Cossa, 1995; Leyva y Luszczewski, 1998; Stary *et al.*, 1980; Waalkes *et al.*, 2000). Así, la alimentación se constituye en una de las formas de exposición indirecta más frecuentes del hombre a este xenobiótico (Al-Sabti y Metcalfe, 1995; Mitchelmore y Chipman, 1998). Los efectos genotóxicos reportados del mercurio son contradictorios, ya que no induce mutación en bacterias pero ejerce efectos aneugénicos y clastogénicos en eucariotas, tales como incremento de aneuploidías y del número de micronúcleos tanto *in vitro* (células CHO) como *in vivo* (en peces) (Aardema *et al.*, 1998; Al-Sabti, 1994, 1995; De Flora *et al.*, 1994; Léonard *et al.*, 1983; Minissi *et al.*, 1996; Nepomuceno *et al.*, 1997; Southworth *et al.*, 1995). Los compuestos mercuriales inorgánicos también inducen la formación de especies reactivas de oxígeno y reducen la glutatión en células de mamíferos, lo cual disminuye la capacidad de detoxificación de este metal y se aumenta la frecuencia de mutaciones (De Flora *et al.*, 1994; MacGregor *et al.*, 2000; Ogura *et al.*, 1996). En trabajadores expuestos a diversas formas orgánicas e inorgánicas de mercurio, se ha reportado aumento significativo de intercambio de cromátidas hermanas (ICH) (Franchi *et al.*, 1994). Sin embargo, hay otros reportes de resultados negativos en relación con la geno-

toxicidad, en los que no se observó incremento de alteraciones cromosómicas ni micronúcleos (Franchi *et al.*, 1994; Panda *et al.*, 1992; Poongothai *et al.*, 1996; Sánchez-Galán *et al.*, 1998). Pero en otro estudio llevado a cabo en India, también con personas que consumieron pescado contaminado, se observó lo contrario (Al-Sabti, 1995; Lee *et al.*, 1997; Zhou y Wong, 2000).

Los peces pueden servir como organismos “centinela” para indicar la exposición potencial de la población humana a contaminantes químicos en el agua, como el mercurio (Al-Sabti *et al.*, 1994; Belpaeme *et al.*, 1996; Dashwood y Bailey, 1998; Ferrão *et al.*, 2001; Godet, 1996; Southworth *et al.*, 1995). La ventaja de utilizar los peces como sistema modelo es que pueden ser usados en el laboratorio y responden a xenobióticos de manera similar a los vertebrados superiores (Al-Sabti y Metcalfe, 1995; Belpaeme *et al.*, 1998; Pandrangi *et al.*, 1995). Pero debido a que los peces tienen gran número de cromosomas y éstos son pequeños e irregulares, no es fácil detectar en ellos alteraciones cromosómicas mitóticas; por tanto, para detectar clastogenicidad *in vivo*, la literatura científica recomienda emplear el test de micronúcleos (Al-Sabti y Metcalfe, 1995; Berces *et al.*, 1993; Garriott *et al.*, 2002).

Las diferencias interespecíficas respecto a la genotoxicidad del mercurio y a la frecuencia de micronúcleos en peces, puede deberse a que hay variaciones en cuanto al metabolismo de xenobióticos, reparación del DNA y proliferación celular en el órgano blanco (Al-Sabti y Metcalfe, 1995; Kirkland y Müller, 2000; Panda *et al.*, 1989). Por tanto, para utilizar peces en biomonitorio ambiental es necesario desarrollar investigaciones tendientes a caracterizar la sensibilidad de diversas especies de peces expuestos a xenobióticos, en relación con la frecuencia de micronúcleos y en relación con la ictiofauna nativa o más frecuente en los ecosistemas acuáticos examinados (Al-Sabti, 1994; Brown, *et al.*, 1994; Hayashi *et al.*, 1998; Koppe y Torres, 2000).

La presente investigación se diseñó con el propósito de evaluar el potencial genotóxico *in vivo*

del cloruro de mercurio (HgCl_2), empleando el test de micronúcleos en eritrocitos nucleados de dos especies ícticas (bocachico *Prochilodus magdalenae*, y tilapia roja *Oreochromis* sp.). Se emplearon células CHO como prueba control in vitro.

METODOLOGÍA

Obtención y aclimatación de peces. Las especies utilizadas fueron alevinos de bocachico y tilapia roja, obtenidos de la estación piscícola de la Universidad de Antioquia (San José del Nus, Antioquia). Durante el periodo de aclimatación de dos semanas, los peces de cada especie se mantuvieron en acuarios de 200 l con control diario de intensidad lumínica, temperatura, O_2 disuelto, pH y dureza total del agua. Cada especie se mantuvo en acuarios independientes.

Prueba de micronúcleos (MN) en peces. Los peces fueron desmedulados mecánicamente y las muestras de sangre se obtuvieron de branquias para hacer extendidos sanguíneos en portaobjetos (duplicados) que luego se tiñeron con Giemsa al 5% por seis minutos (Al-Sabti y Metcalfe, 1995). La frecuencia de micronúcleos se determinó con base en 1.000 células por cada tejido del pez.

Tratamiento de peces con cloruro de mercurio (HgCl_2). Los tratamientos de cada grupo de diez individuos de cada especie se realizaron en acuarios independientes de 40 l, con 0.001, 0.003 y 0.027 mg/l de cloruro de mercurio (HgCl_2) durante siete días. Estas dosis se determinaron a partir de estudios previos de toxicidad (APHA, 1989). Para mantener constante la concentración de la sal de mercurio, cada día se hizo recambio del agua y se ajustó la dosis en los grupos correspondientes. Cada tratamiento se hizo por duplicado. El grupo control contó con la misma cantidad de individuos.

Cultivo de células CHO. Las células CHO fueron cultivadas en medio Ham's F-12 suplementado con glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicilina, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de estreptomycin y 10% de suero bo-

vino fetal. Los cultivos fueron mantenidos en crecimiento exponencial, a 37°C en atmósfera húmeda con CO_2 al 5%.

Prueba de alteraciones cromosómicas con células CHO. Los extendidos cromosómicos se obtuvieron a partir de cultivos exponenciales subconfluentes (por duplicado) pretratados con colchicina (0.4 mg/ml) durante cuatro horas, y coloración directa con Giemsa al 4% durante cinco minutos. La estabilidad cromosómica se evaluó en 50 mitosis contando el número de cromosomas por célula. La clastogenicidad se evaluó en 100 mitosis, clasificando las alteraciones en quiebres cromatídicos, quiebres cromosómicos, cromosomas dicéntricos, anillos y figuras multirradiadas (ICPEM, 1988).

Los cultivos celulares fueron tratados con dosis de 1, 5 y 10 μM equivalente a 0.27, 1.35 y 2.7 mg/l de HgCl_2 durante 24, 48 y 72 horas.

Análisis estadístico. Cada uno de los tratamientos se sometió a una prueba de chi cuadrado para hallar la significancia de la diferencia entre las medias de cada dosis y respecto a la media del grupo control.

RESULTADOS

Clastogénesis in vivo con cloruro de mercurio (HgCl_2). En la tabla 1 se observan las frecuencias de micronúcleos inducidos por HgCl_2 en eritrocitos de sangre branquial de bocachico y tilapia roja en función de la dosis y el tiempo de exposición. En ambas especies es claro el efecto de dosis del HgCl_2 a concentraciones de 0.001, 0.003 y 0.027 mg/l. En bocachico, la concentración menor incrementa los MN hasta cinco veces en relación con el control a los siete días. En función del tiempo, también se observa un incremento de MN con cada una de las concentraciones. Con la dosis de 0.001 mg/l, el aumento de MN empieza al sexto día con una diferencia significativa de $p < 0.05$, y con las otras dosis al tercer día con una diferencia significativa de $p < 0.01$, con respecto al control.

En tilapia roja se observa que a las concentraciones de 0.001 y 0.003 mg/l, el incremento máximo en la frecuencia de MN fue de tres veces con relación al control, y con la concentración de 0.027 mg/l el incremento fue de cuatro. En relación con el tiempo de recuperación de células dañadas, las dosis de 0.001 y 0.003 mg/l incrementan el número de MN al segundo día de tratamiento con respecto al control ($p < 0.05$). Con la dosis mayor (0.027 mg/l) se observa el máximo incremento en la frecuencia de MN hasta el día cuarto de tratamiento y luego empieza a disminuir hasta tres veces en relación con el control. Con las otras dos dosis, el incremento de MN en función del tiempo no sobrepasa 2.5 veces el del control.

En ambas especies se observa que el incremento de MN inducido por las dosis más bajas tiende a mantenerse o aumentar, mientras que con la dosis más alta aumenta en bocachico y disminuye en tilapia con el tiempo (tabla 1).

Clastogénesis in vitro (células CHO) con HgCl₂.

En la tabla 2 se muestran las frecuencias de alteraciones cromosómicas inducidas por HgCl₂ (1-10 mM, equivalentes a 0.27-2.7 mg/l) en células CHO. Las alteraciones cromosómicas (AC) encontradas fueron quiebres cromatídicos y cromosómicos que se incrementan a medida que

aumenta la dosis de HgCl₂, lo que evidencia el efecto de dosis respuesta (figura 1A). De otro lado, en relación con el tiempo de exposición al HgCl₂ (24, 48 y 72 horas), el comportamiento fue similar. Los índices mitóticos también evidenciaron disminución en relación con el tiempo de exposición (figura 1B).

DISCUSIÓN

El HgCl₂ indujo MN en ambas especies, en todas las concentraciones ensayadas y en los diferentes tiempos examinados. Se encontró relación directa con el tiempo de exposición, así: en bocachico, hasta el día 7, y en tilapia hasta el día 4, seguido de una moderada disminución. Incluso con la dosis mínima (0.001 mg/l) el incremento de MN fue cinco y tres veces mayor en bocachico y tilapia, respectivamente, en relación con el control. Este hallazgo se podría explicar como un efecto de la exposición crónica y constante durante siete días, que generaría acumulación de daño incluso a bajas dosis, debido posiblemente a un desequilibrio en los mecanismos de detoxificación al genotóxico, que impide que el organismo lo elimine sustancialmente, generando de esta manera una dosis dañina acumulada. Esta observación de acumulación de daño por exposición *in vivo* a pequeñas dosis de un mutágeno es muy interesante, teniendo en cuenta que el

Tabla 1. Promedios de frecuencias de MN/1.000 eritrocitos de sangre branquial de bocachico y tilapia roja después de diferentes tiempos de exposición a HgCl₂

Tiempo en días durante el tratamiento								
Especie	Dosis (mg/l)	1	2	3	4	5	6	7
X ± DS								
Bocachico	0	3.1 ± 0	3.1 ± 0	3.1 ± 0	3.1 ± 0	3.1 ± 0	3.1 ± 0	3.1 ± 0
	0.001	4.5 ± 0.7	4.5 ± 0.7	5.0 ± 0	4.5 ± 0.7	6.0 ± 1.4*	11.0 ± 0**	15.0 ± 0****
	0.003	5.0 ± 2.8	7.5 ± 2.1*	10.0 ± 0**	10.5 ± 2.1**	10.0 ± 1.4**	13.0 ± 0***	18.5 ± 2.1****
	0.027	7.5 ± 0.7*	7.5 ± 2.1*	11.0 ± 1.4**	11.0 ± 2.8**	15.5 ± 0.7****	16.0 ± 1.4****	17.5 ± 0.7****
Tilapia	0	5.0 ± 1.4	5.0 ± 1.4	5.0 ± 1.4	5.0 ± 1.4	5.0 ± 1.4	5.0 ± 1.4	5.0 ± 1.4
	0.001	5.0 ± 1.4	9.5 ± 0.7*	9.0 ± 1.4	10.0 ± 0*	8.0 ± 1.4	10.0 ± 0*	12.0 ± 2.8*
	0.003	6.5 ± 0.7	12.5 ± 0.7*	13.0 ± 1.4*	12.5 ± 0.7*	10.5 ± 3.5*	11.5 ± 2.1*	13.0 ± 7*
	0.027	7.0 ± 1.4	16.0 ± 2.8**	17.0 ± 4.2**	20.0 ± 1.4***	15.5 ± 3.5**	15.5 ± 4.9**	13.0 ± 1.4*

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$

Tabla 2. Porcentajes promedios de frecuencias de alteraciones cromosómicas (AC/100 mitosis) inducidos en células CHO por exposición a HgCl₂

Horas de tratamiento			
Dosis de HgCl ₂ (mg/l)	24	48	72
	X ± DS		
0	0.2 ± 0	0.2 ± 0	0.2 ± 0.5
0.27	2.5 ± 0*	2.0 ± 0*	3.0 ± 0.5*
1.35	3.0 ± 1.41*	2.0 ± 1.41*	2.5 ± 0.7*
2.7	4.0 ± 1.41*	5.0 ± 1.41*	3.5 ± 2.12*

* p < 0.001

hombre está expuesto continuamente a pequeñas dosis de mutágenos ambientales (aire, agua, alimentos, etc.) y en los sitios de trabajo (exposición ocupacional).

De otro lado, los hallazgos indican que el bocachico es más sensible que la tilapia a esta sal de mercurio, lo cual podría basarse en varios mecanismos. El bocachico es una especie nativa no manipulada genéticamente, mientras que la tilapia es un híbrido manipulado. Esto podría generar diferencias en los mecanismos de detoxificación y reparación a los efectos genotóxicos de metales pesados. También pueden existir diferencias en los mecanismos de segregación mitótica, al parecer relacionados con la afinidad de compuestos mercuriales a los grupos sulfhidrilos presentes en proteínas de uso mitótico (Bolognesi *et al.*, 1999; Bucio *et al.*, 1999; Fenech, 1993; Krishna y Hayashi, 2000; Léonard *et al.*, 1983; Scarfi *et al.*, 1993).

Aunque los ensayos *in vivo* con tilapia y bocachico no permiten diferenciar si el HgCl₂ es clastógeno, anéugeno o ambos, los experimentos adicionales con células CHO indican claramente que es clastogénico ya que mostró efecto de dosis a diferentes concentraciones y tiempos de exposición. Además, estos hallazgos están apoyados por otros reportes (Belpaeme *et al.*, 1996; Ben-Ozer *et al.*, 2000; Bolognesi *et al.*, 1999; De Flora *et al.*, 1994; Kersten *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 1997; Madle *et al.*, 2000; Marzin, 1997; Migliore *et al.*, 1996; Miller *et al.*, 1997). Finalmente, y aunque aún no son claras las bases moleculares de la genotoxicidad mercurial a nivel cromosómico (clastogénico) o a nivel de nucleótidos del DNA (Ben-Ozer *et al.*, 2000; Schurz *et al.*, 2000; Waalkes *et al.*, 2000;), y teniendo en cuenta las diferencias en sensibilidad al HgCl₂ observadas entre estas dos especies, se puede recomendar la utilización del bocachico como especie centinela para el biomonitoreo de aguas contaminadas con este metal pesado, y en las hidrocuencas en donde habita esta especie nativa colombiana.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue financiada con fondos de la Universidad de Antioquia (CODI) adjudicados a los grupos de Genética de Poblaciones y Mutación y Carcinogénesis, y Gestión y Modelamiento Ambiental, coordinados en su orden por los profesores Mauricio Camargo y Jaime Palacio, que fueron asesores del proyecto.

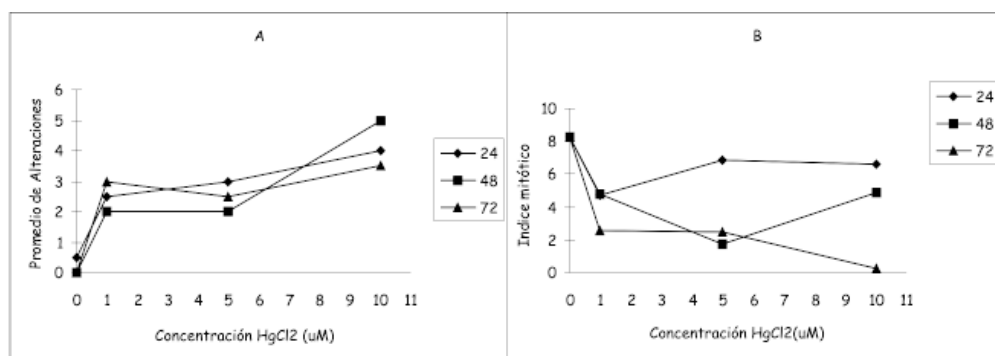


Figura 1. Alteraciones cromosómicas (1A) e índices mitóticos (1B) en cultivos *in vitro* de células CHO expuestas a tres concentraciones de HgCl₂ (1 uM, 5 uM, 10 uM) y tratados durante 24 \blacklozenge 48 \blacksquare y 72 \blacktriangle horas. Se representa la media de dos experimentos independientes

REFERENCIAS

- Aardema MJ, Albertini S, Arni P, Henderson LM, Kirsch-Volders M, Mackay JM, Sarrif AM, Stringer DA, Taalman RD.** 1998. Aneuploidy: a report of an ECETOC task force. *Mutat Res* 410:3-79.
- Al-Sabti K.** 1994. Micronuclei induced by selenium, mercury, methylmercury and their mixtures in binucleated blocked fish erythrocyte cells. *Mutat Res* 320:157-163.
- Al-Sabti K.** 1995. An *in vitro* binucleated blocked hepatic cell technique for genotoxicity testing in fish. *Mutat Res* 335:109-120.
- Al-Sabti K, Franko M, Andrijanic B, Knez S, Stegnar P.** 1994. Chromium-induced micronuclei in fish. *J Appl Toxicol* 14:33-36.
- Al-Sabti K, Metcalfe CD.** 1995. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutat Res* 343:121-135.
- APHA, AWWA, WPCFN.** 1989. Standard methods for the examination of water and wastewater. 17th ed., American Public Health Association, American Water Works Association, Water Pollution Control Federation, Washington DC.
- Belpaeme K, Delbeke K, Zhu L, Kirsch-Volders M.** 1996. Cytogenetic studies of PC B77 on brown trout (*Salmo trutta fario*) using the micronucleus test and the alkaline comet assay. *Mutag* 11:485-492.
- Belpaeme K, Delbeke K, Zhu L, Kirsch-Volders M.** 1998. Development and validation of the *in vivo* alkaline comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish. *Mutat Res* 415:167-184.
- Ben-Ozer EY, Rosenspire AJ, McCabe MJ, Worth RG, Kindzelskii AL, Warra NS, Petty HR.** 2000. Mercury chloride damages cellular DNA by a non-apoptotic mechanisms. *Mutat Res* 470:19-27.
- Berces J, Otos M, Szirmai S, Crane-Ureana C, Koteles GJ.** 1993. Using the micronucleus assay to detect genotoxic effects of metal ions. *Environ Health Perspect* 101, suppl 3:11-13.
- Bilinski H, Kwokal Z, Plavsic M, Wrischer M, Branica M.** 1999. Mercury distribution in the water column of the stratified Krka river estuary (Croatia) importance of natural organic matter and of strong winds. *Water Res* 37:2.001-2.010.
- Bolognesi C, Landini E, Roggieri P, Fabbri R, Viarengo A.** 1999. Genotoxicity biomarkers in the assessment of heavy metal effects in mussels: experimental studies. *Environ Mol Mutagen* 33:287-292.
- Brown V, Shurben D, Miller W, Crane M.** 1994. Cadmium toxicity to rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* Walbaum and brown trout *Salmo trutta* L. over extended exposure periods. *Ecotoxicol Environ Saf* 29:38-46.
- Bucio L, García C, Souza V, Hernández E, González C, Betancourt M, Gutiérrez M.** 1999. Uptake, cellular distribution and DNA damage produced by mercuric chloride in a human fetal hepatic cell line. *Mutat Res* 423:65-72.
- Claxton LD.** 1998. Genotoxicity of industrial wastes and effluents. *Mutat Res* 410:237-243.
- Cossa D.** 1995. ¿Cuánto mercurio ingerimos a diario? *Mundo Científico* 222:84-89.
- Dashwood R, Bailey G.** 1998. Use of fish and fish transgenics in laboratory and field genotoxicology studies. *Mutat Res* 399:123-124.
- De Flora S, Bennicelli C, Bagnasco M.** 1994. Genotoxicity of mercury compounds. A review. *Mutat Res* 317:57-79.
- Fenech M.** 1993. The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutat Res* 285:35-44.
- Ferrão VM, Bresolin S, Cassia de Melo A, Horn R, Guidobono R, Fernandes IC, Degrazia M.** 2001. Genotoxicity assessment in aquatic environments under the influence of heavy metals and organic contaminants. *Mutat Res* 490:141-158.
- Franchi E, Loprieno G, Ballardini M, Petrozzi L, Migliore L.** 1994. Cytogenetic monitoring of fisherman with environmental mercury exposure. *Mutat Res* 320:23-29.
- Garriott ML, Phelps JB, Hoffman WP.** 2002. A protocol for the *in vitro* micronucleus test. Contribution to the development of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 16 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity. *Genet Toxicol Environ Mutag* 517:123-134.
- Godet F.** 1996. The genotoxicity of iron chromium in electroplating effluents. *Mutat Res* 370:19-28.
- Hayashi M, Ueda T, Uyeno K, Wada K, Kinase N, Saotome K, Tanaka N, Takai A, Sasaki YF, Asano N, Sofuni T, Ojima Y.** 1998. Development of genotoxicity assay systems that use aquatic organisms. *Mutat Res* 399:125-133.
- ICPEMC.** 1998. International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens. Publication No. 14. (Carrano AV & Natarajan AT). *Mutat Res* 204:379-406.
- Kersten B, Zhang K, Brendler-Schwaab SY, Kasper P, Müller L.** 1999. The application of the micronucleus test in Chinese hamster V79 cells to detect drug-induced photogenotoxicity. *Mutat Res* 445:55-71.
- Kirkland D, Müller L.** 2000. Interpretation of the biological relevance of genotoxicity test results: the importance of thresholds. *Mutat Res* 464:137-147.
- Koppe C, Torres CM.** 2000. Variability in micronucleus induction with different mutagens applied to several species of fish. *Genet Mol Biol* Vol. 23, N° 1.
- Krishna G, Hayashi M.** 2000. *In vivo* rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutat Res* 455:155-166.
- Lee CH, Lin RH, Liu S, Lin-Shiau SY.** 1997. Distinct genotoxicity of phenylmercury acetate in human lymphocytes as compared with other mercury compounds. *Mutat Res* 392:269-276.
- Léonard A, Jacquet P, Lauwerys RR.** 1983. Mutagenicity and teratogenicity of mercury compounds. *Mutat Res* 114:1-18.
- Leyva R, Luszczewski A.** 1998. El mercurio en el medio ambiente. *Ingeniería Química* 30(344):179-183.
- Lu X, Jaffe R.** 2000. Interaction between Hg (II) and natural dissolved organic matter: a fluorescence spectroscopy based study. *Water Res* 35:1.793-1.803.
- MacGregor J, Casciano D, Müller L.** 2000. Strategies and testing methods for identifying mutagenic risks. *Mutat Res* 455:3-20.
- Madle S, Hude W, Broschinski L, Jänig G.** 2000. Threshold effects in genetic toxicity: perspective of chemicals regulation in Germany. *Mutat Res* 464:117-121.

- Marzin D.** 1997. The position of the *in vitro* micronucleus test within the battery of screening for genotoxic potential determination and the regulatory guidelines. *Mutat Res* 392:175-181.
- Migliore L, Cocchi L, Scarpato R.** 1996. Detection of the centromere in micronuclei by fluorescence *in situ* hybridization: its application to the human lymphocyte micronucleus assay after treatment with four suspected aneugens. *Mutagenesis* 11:285-290.
- Miller B, Albertini S, Locher F, Thybaud V, Lorge E.** 1997. Comparative evaluation of the *in vitro* micronucleus test and the *in vitro* chromosome aberration test: industrial experience. *Mutat Res* 392:45-59.
- Minissi S, Ciccotti E, Rizzoni M.** 1996. Micronucleus test in erythrocytes of *Barbus plebejus* (Teleostei, Pisces) from two natural environments: a bioassay for the *in situ* detection of mutagens in freshwater. *Mutat Res* 367:245-251.
- Mitchelmore CL, Chipman JK.** 1998. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. *Mutat Res* 399:138-147.
- Nepomuceno JC, Ferrari I, Spano MA, Centeno AJ.** 1997. Detection of micronuclei in peripheral erythrocytes of *Cyprinus carpio* exposed to metallic mercury. *Environ Mol Mutagen* 30:293-297.
- Odeigah PG, Osanyinpeju AO.** 1995. Genotoxic effect of two industrial effluents and ethyl methane sulfonate in *Clarias lazera*. *Food Chem Toxicol* 33:501-505.
- Ogura H, Takeuchi T, Morimoto K.** 1996. A comparison of the 8-hydroxydeoxyguanosine, chromosome aberrations and micronucleus techniques for the assessment of the genotoxicity of mercury compounds in human blood lymphocytes. *Mutat Res* 340:175-182.
- Panda KK, Lenka M, Panda BB.** 1989. Allium micronucleus (MNC) assay to assess bioavailability, bioconcentration and genotoxicity of mercury from solid waste deposits of a chloralkali plant, and antagonism of L-cysteine. *Sci Total Environ* 79:25-36.
- Panda KK, Lenka M, Panda BB.** 1992. Monitoring and assessment of mercury pollution in the vicinity of a chloralkali plant. III. Concentration and genotoxicity of mercury in the industrial effluent and contaminated water of Rushikul-ya estuary, India. *Mutat Res* 280:149-160.
- Pandurangi R, Petras M, Ralph S, Vrzoc M.** 1995. Alkaline single cell gel (comet) assay and genotoxicity monitoring using *bullheads* and *carp*. *Environ Mol Mutagen* 26:345-356.
- Poongothai K, Shayin S, Usharani MV.** 1996. Induction of micronuclei in fish by polluted water and heavy metals. *Cytobios* 86:7-22.
- Sánchez-Galán S, Linde AR, Izquierdo JL, García-Vásquez E.** 1998. Micronuclei and fluctuating asymmetry in brown trout (*Salmo trutta*): complementary methods to biomonitor freshwater ecosystems. *Mutat Res* 412:219-225.
- Scarfi MR, Lioi MB, Di Berardino D, Zeni O, Coviello AM, Matassino D.** 1993. Measurement of micronuclei by cytokinesis-block method in bovine lymphocytes. *Mutat Res* 289:291-295.
- Schurz F, Sabater M, Fink J.** 2000. Mutagenicity of mercury chloride and mechanisms of cellular defence: the role of metal-binding proteins. *Mutagenesis* 15:525-530.
- Southworth GR, Turner RR, Peterson MJ, Bogle MA.** 1995. Form of mercury in stream fish exposed the high concentrations of dissolved inorganic mercury. *Chemosphere* 30:779-787.
- Stary J, Kratzer K, Havlik B, Prasilova J, Hanusova J.** 1980. The cumulation of methylmercury in fish (*Poecilia reticulata*). *Int J Environ Anal Chem* 8:189-195.
- Waalkes M, Fox D, States J, Patierno S, McCabe M.** 2000. Metals and disorders of cell accumulation: modulation of apoptosis and cell proliferation. *Toxic Sci* 56:255-261.
- Zhou Y, Wong M.** 2000. Mercury accumulation in freshwater fish with emphasis on the dietary influence. *Water Res* 34: 4.234-4.242.

