

UNIVERSITAS —SCIENTIARUM—

Volumen 3 N° 1-2, julio - diciembre 1996

REVISTA DE LA FACULTAD
DE CIENCIAS



PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

DESCRIPCIÓN DE LAS ALTERACIONES DE EMBRIONES DE *Hyla labialis* EXPUESTOS A Hg^{2+} , Cl^- Y NO_3^- (1)

FERNANDO CORTÉS QUINTERO Y BERTHA DE DULCE

Pontificia Universidad Javeriana. Departamento de Biología. Cra. 7ª N° 43-82. A.A. 56710. Santa Fe de Bogotá, D.C., Colombia-Suramérica.

Resumen

Fueron expuestos embriones de *Hyla labialis* a 1.23, 1.47, 2.47, 2.95, 3.7, 4.43, 4.94 y 5.91 ppm de Hg^{2+} ; 0.26, 0.52, 0.78 y 1.04 ppm de Cl^- y 0.38, 0.76, 1.14 y 1.53 ppm de NO_3^- , por separado, a partir de blástula media y tardía, durante 12 días de exposición continua. Se registraron mayores valores de mortalidad para los individuos expuestos al NO_3^- ; mayor número de alteraciones para los expuestos al Hg^{2+} y menor número de alteraciones y mortalidad para los expuestos al Cl^- . Las alteraciones reportadas en los embriones fueron: pigmentación alterada (disminución), irregularidades, hemorragias, convulsiones, escoliosis, branquias atrofiadas, edemas, invaginación en las aletas, cola delgada y anormalidades. Para las diferentes concentraciones de Hg^{2+} , Cl^- y NO_3^- , la mayoría de las alteraciones presentaron valores calculados de t de Student mayores al valor crítico, confirmándose que las variables empleadas durante este estudio estuvieron correlacionadas.

Abstract

Hyla labialis embryo were exposed to 1.23, 1.47, 2.47, 2.95, 3.7, 4.43, 4.94, and 5.91 ppm Hg^{2+} ; 0.26, 0.52, 0.78 and 1.04 ppm Cl^- and 0.38, 0.76, 1.14 and 1.53 ppm NO_3^- ; separated starting of the middle and belated blastula, during 12 days of continuous exposition. Employ mayor values of mortality were registered for individuals exposed to NO_3^- ; mayor number of alterations for the exposed to the Hg^{2+} and minor number to alterations and mortality for the exposed to Cl^- . The reported alterations in the embryo were : changed pigmentation (decrease), irregularities, bleedings, convulsions, escoliosis, atrophy gills, edema, edemi in the wings, thin tail and anomalies. For the different concentrations of Hg^{2+} , Cl^- and NO_3^- ; the majority of the alterations present calculated values from t of Student larger than the critic value, corroborating this way that the used variables during this study were correlated.

Palabras clave: Blástula, alteración, dosis, edema.

INTRODUCCIÓN

El mercurio provoca mortalidad y serias alteraciones a las poblaciones humanas y animales expuestas. En las investigaciones de Fiskesjo (1970), se observaron en leucocitos humanos tratados *in vitro* poliploidias y aneuploidias, por los efectos del mercurio. En los trabajos de Skerfving, *et al.* (1974), fueron observadas aberraciones cromosómicas como rompimientos, hondonadas y cambios, en linfocitos humanos tratados *in vitro*, expuestos a metilmercurio.

Reyes (1977) por su parte, en distintas comunidades de peces de la bahía de Cartagena, Colombia, encontraron por la exposición al mercurio una disminución de sus coloraciones características, además, convulsiones y hemorragias, en las seis áreas de la bahía donde registró un rango de 0.04 ppm-1.94 ppm de mercurio.

Cheng, *et al.* (1979), observaron por causa de la acción mercurial cambios en las cromátides hermanas en células sanguíneas humanas. Sumiet, *et al.* (1984) en glóbulos rojos humanos al contacto directo con el mercurio observaron un estancamiento del flujo circulatorio por causa de una producción aumentada de ácido láctico y de metabolitos ácidos como los hidrogeniones, la histamina, los iones de potasio, los polipéptidos y los nucleótidos de adenina. Monsalve y Chiappe (1987) registraron concentraciones mercuriales en muestras de cabello y sangre arterial periférica humanas concentraciones mercuriales entre 0.0024 ppm - 0.066 ppm y 0.0136 ppm - 0.0973 ppm, respectivamente, donde se encontraron en los cromosomas aberraciones como rompimientos, intercambios y condensaciones prematuras.

Nicotera (1993) consideró que las alteraciones mercuriales contra el sistema nervioso central y periférico, están asociadas con una falla total de las unidades motoras rápidas, donde la capacidad del nervio motor para sintetizar y liberar el enzima acetil colina estearasa está limitada. Ariza (1994) ha

señalado que el mercurio fuera de causar daños a los microtúbulos celulares, puede influenciar en una deficiencia severa en la producción de la alfa MSH (Hormona Estimulante de Melanocitos). Nishisake (1994) en células tubulares de ratón observó por influencia del mercurio lesión tóxica. Dicho daño indujo a hipoxia celular y después sobrevino nefrosis nefrotóxica, donde aconteció muerte de células tubulares, en los segmentos proximales de la nefrona. Con base en las investigaciones anteriores se evaluó la capacidad teratogénica de Hg^{2+} , NO_3^- y Cl^- para comparar la toxicidad de estos iones en embriones de *Hyla labialis*, y estimar el riesgo que representan para la poblaciones expuestas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se recolectaron los ovocitos de *Hyla labialis* directamente del bebedero El indio, ubicado a 2.900 msnm, en la región de Guatavita, Cundinamarca (Figura 1).

Una vez en el laboratorio se separaron los ovocitos fertilizados de los no fertilizados y los necróticos. A su vez, a los fertilizados se comenzó a observar su desarrollo embrionario normal hasta el estadio de blástula media y tardía.

A partir de dicho estadio fueron expuestos durante 12 días consecutivos los embriones de *Hyla labialis*, a las concentraciones, por separado de 1.23, 1.47, 2.47, 2.95, 3.7, 4.43, 4.94 y 5.91 ppm de Hg^{2+} ; 0.26, 0.52, 0.78 y 1.04 ppm de Cl^- y 0.38, 0.76, 1.14 y 1.53 ppm de NO_3^- . Las anteriores dosis fueron preparadas a partir de soluciones Stock, de acuerdo a las recomendaciones dadas por la OPS (1976) y la OMS (1976, 1991).

Para estas dosis, en solución Holtfreter Standard se trabajaron 80 embriones de *Hyla labialis* por disolución y 80 de ellos como muestra patrón. Los embriones con alteraciones fueron fijados en solución Ancel Vitembarger, para las respectivas fotos empleando una cámara Cannon modelo AEI, con un fuelle adaptado a una lente macro-105.

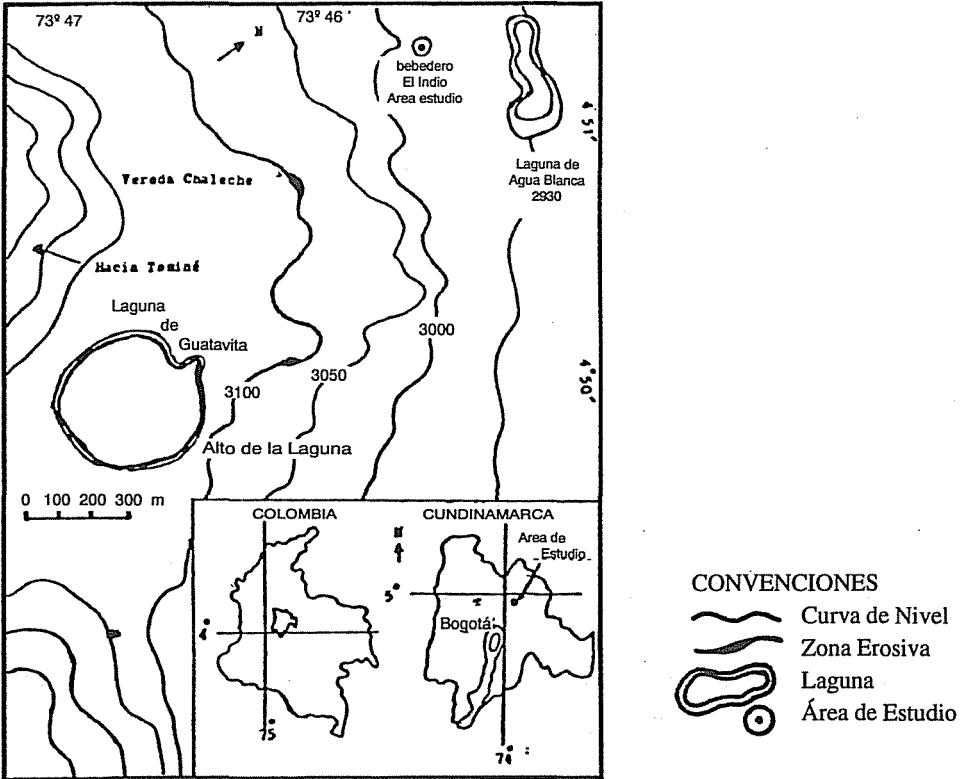


FIGURA 1 Ubicación geográfica del bebedero El Indio, región de Guatavita, Sabana de Bogotá, Cundinamarca, Colombia, según plancha 209-IV-C3. I.G.A.C., escala 1:10.000.

Para comprobar experimentalmente la dependencia entre las variables, incremento de las concentraciones y las alteraciones en los embriones tratados, se aplicó el estadístico *t* de Student.

RESULTADOS

Mortalidad y alteraciones

Los embriones de *Hyla labialis* expuestos al NO_3^- , presentaron mayores registros de mortalidad que los embriones expuestos a Hg^{2+} y Cl^- (Figuras 2 y 3). La mortalidad se observó hasta el estadio 24 de opérculo completo, al 12 día de exposición continua.

Durante las concentraciones en estudio los embriones de *Hyla labialis* registraron un

total de 15, 14 y 11 alteraciones a la exposición continua al Hg^{2+} , NO_3^- y Cl^- , respectivamente, a partir de los estadios de blástula media y tardía hasta el estadio 24 de opérculo completo. Estas alteraciones fueron: pigmentación alterada (disminución), irregularidades, hemorragias, convulsiones, escoliosis, branquias atrofiadas, edemas, invaginación en las aletas, cola delgada y anomalías (Tablas 1 a 4 y Figuras 4 a 7).

Porcentajes totales

Los embriones de *Hyla labialis* expuestos al Cl^- , presentaron valores de porcentajes totales altos en piel irregular, escoliosis, branquias atrofiadas y convulsiones, y valores en cola irregular, edema dorsal, edema cefálico y hemorragias (Tabla 1).

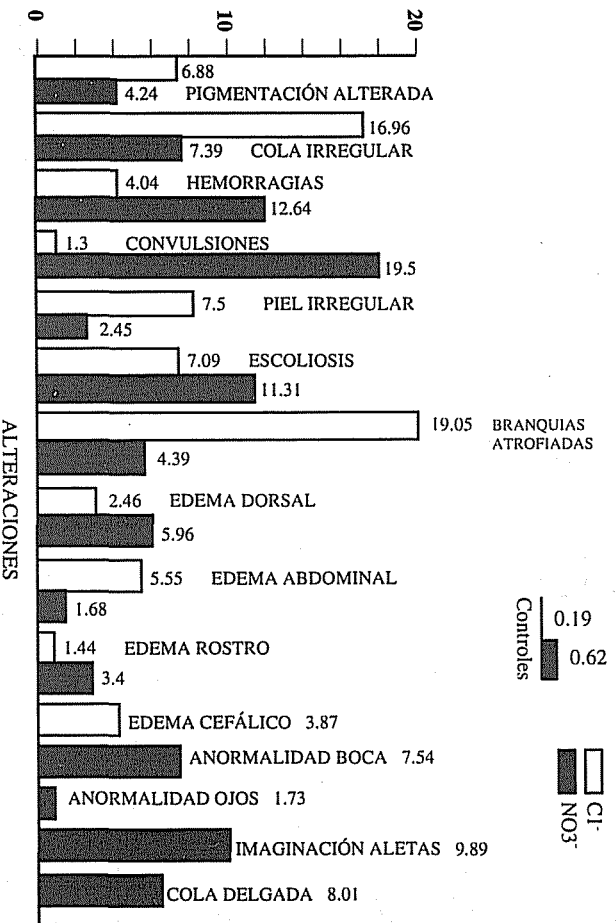


FIGURA 2
Valores respectivos de 1 Student para las alteraciones en embriones de *Hyla labialis*, para Cl⁻ y NO₃⁻.

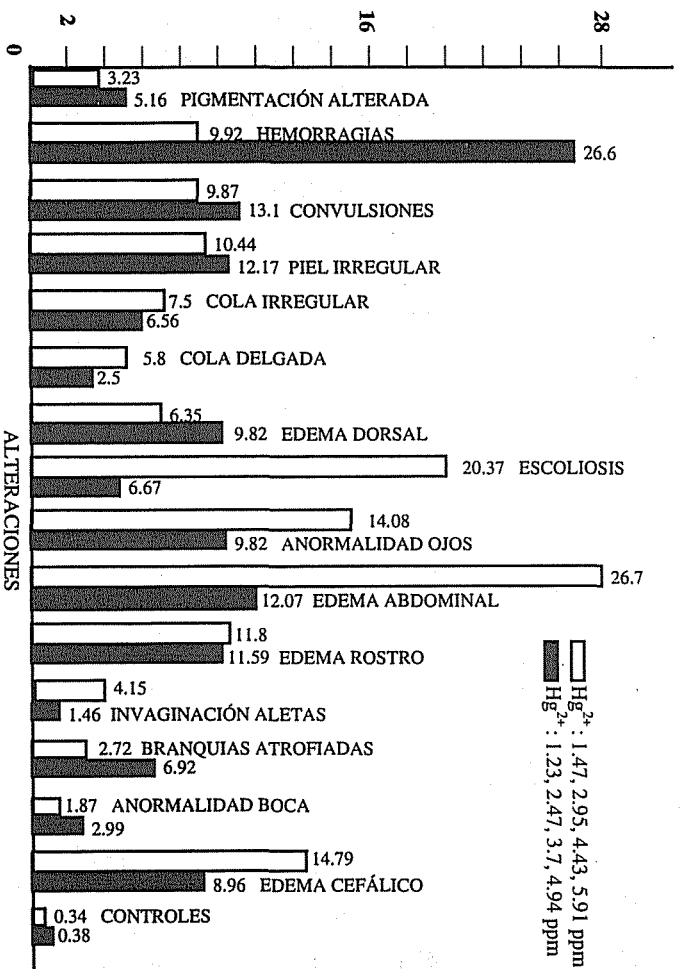


FIGURA 3
Valores respectivos de 1 Student para las alteraciones en embriones de *Hyla labialis*, para Hg²⁺.

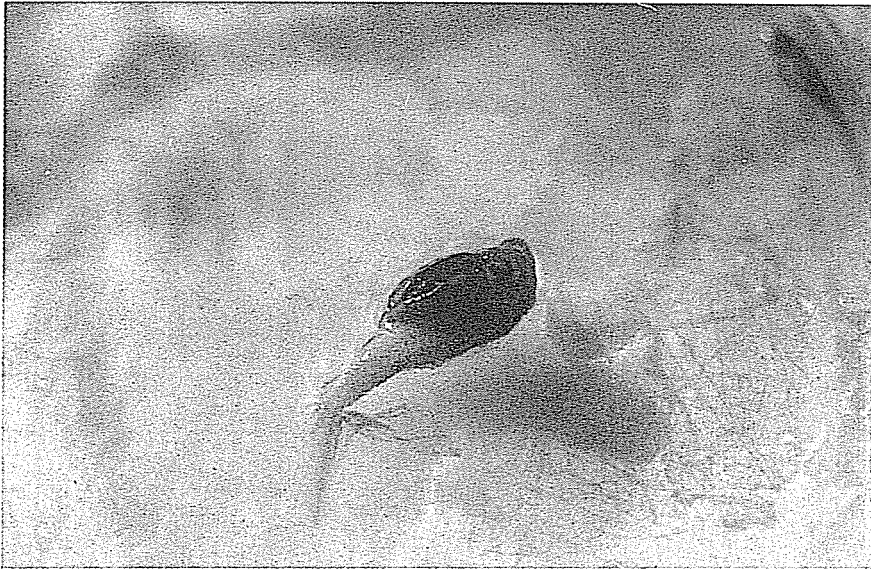


FIGURA 4 Alteración de los embriones de *Hyla labialis*, por diferentes concentraciones de NO_3^- Y Hg^{2+} . 24 estadío, 1.6x. Escoliosis, anomalía en boca y en ojos, irregularidad en piel, 1.53 ppm de NO_3^- .

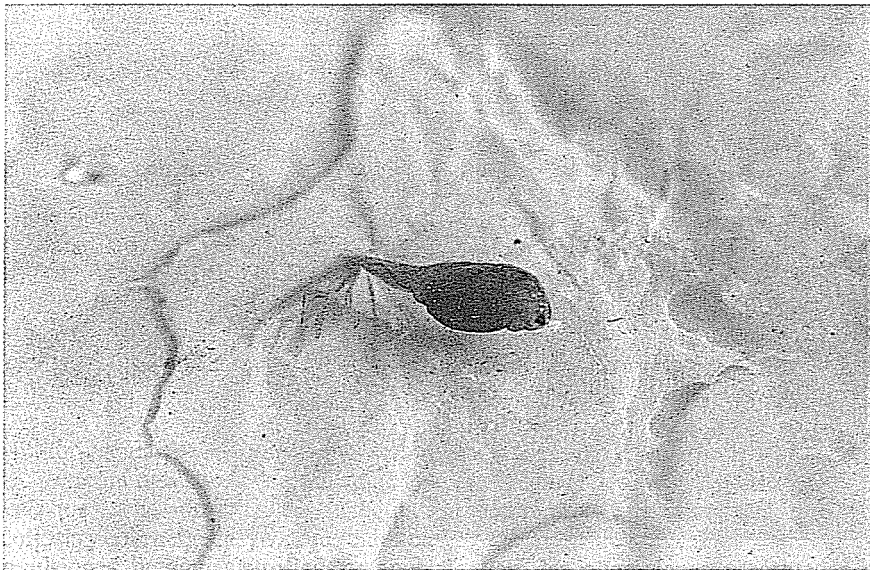


FIGURA 5 Alteración de los embriones de *Hyla labialis*, por diferentes concentraciones de NO_3^- Y Hg^{2+} . 24 estadío, 1.6x. Irregularidad en piel y en cola, hemorragias hacia la región abdominal y anomalía en ojos y en boca, 4.43 ppm de Hg^{2+} .



FIGURA 6 Alteración de los embriones de *H. labialis*, por diferentes concentraciones de NO_3^- Y Hg^{2+} . 24 estadio, 1.6x. Hemorragia severa hacia la zona anterior y cola irregular, 1.14 ppm de NO_3^- .

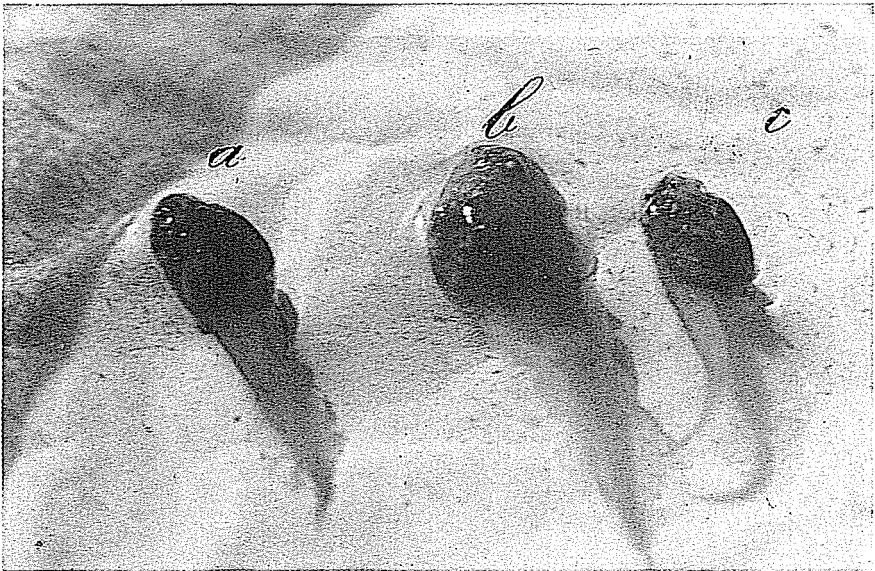


FIGURA 7 Alteración de los embriones de *H. labialis*, por diferentes concentraciones de NO_3^- Y Hg^{2+} . 24 estadio, 1.6x. a. Hemorragias e invaginación en las aletas, 5.91 ppm de Hg^{2+} . b. Invaginación en las aletas, anomalía en ojos y hemorragias a nivel abdominal 4.43 ppm de Hg^{2+} c. Cola delgada y curva, y hemorragias a nivel abdominal, 3.7 ppm Hg^{2+} .

TABLA 1 Porcentajes totales, índices de correlación (r) y de determinación (r^2), y estadístico t Student de acuerdo a las alteraciones presentadas en los embriones de *Hyla labialis* expuestos a 0.26, 0.52, 0.78 y 1.04 ppm de Cl^-

Nº	Alteración	Porcentaje Total	r	r^2	t
1	Pigmentación alterada	11.25	0.979526	0.959471	6.8809439
2	Cola irregular	7.50	0.996545	0.993100	16.966308
3	Hemorragias	3.75	0.943879	0.890900	4.0412800
4	Convulsiones	16.25	0.701024	0.491430	1.3901844
5	Piel irregular	65.00	0.982707	0.965714	7.5055020
6	Escoliosis	37.00	0.980723	0.961810	7.0971900
7	Branquias atrofiadas	25.75	0.997256	0.994520	19.051596
8	Edema dorsal	7.50	0.867721	0.752900	2.4686450
9	Edema abdominal	10.50	0.969080	0.939130	5.5548760
10	Edema rostro	9.50	0.715540	0.151200	1.4485680
11	Edema Cefálico	6.75	0.939335	0.882352	3.8729410

Los embriones de *Hyla labialis* expuestos al NO_3^- , presentaron valores de porcentajes totales altos en piel irregular, escoliosis, cola delgada, hemorragias, branquias atrofiadas y edema dorsal, y valores bajos en convulsiones y anomalía en los ojos (Tabla 2).

Los embriones de *Hyla labialis* expuestos al Hg^{2+} , presentaron valores de porcentaje totales altos en hemorragias, piel irregular, escoliosis y cola delgada, y valores bajos en convulsiones, branquias atrofiadas y anomalía en la boca (Tablas 3 y 4).

Coefficiente de correlación r

Para las concentraciones de Hg^{2+} , Cl^- y NO_3^- , los coeficientes de correlación dieron valores

diferentes a cero para todas las alteraciones en los embriones de *Hyla labialis*, por lo que se demostró que existió una correlación entre cada una de las alteraciones y las concentraciones trabajadas. Los valores de correlación para Hg^{2+} , Cl^- y NO_3^- , dieron una correlaciones altas al estar dentro del rango de 0.70 a 0.99 (Tablas 1 a 4).

Estadístico t de Student

Para las alteraciones presentadas en los embriones de *Hyla labialis* expuestos al Hg^{2+} , Cl^- y NO_3^- , se encontró que la gran mayoría de las alteraciones registraron valores calculados de t mayores al valor crítico de t ($t_{0.1} = 2.9200$, con $gl = 2$), por lo que

TABLA 2 Porcentajes totales, índices de correlación (r) y de determinación (r^2), y estadístico t Student de acuerdo a las alteraciones presentadas en los embriones de *Hyla labialis* expuestos a 0.38, 0.76, 1.14 y 1.53 ppm de NO_3^-

Nº	Alteración	Porcentaje Total (%)	r	r^2	t
1	Pigmentación alterada	18.00	0.948683	0.900000	4.242639
2	Cola irregular	17.75	0.982210	0.964740	7.397384
3	Hemorragias	45.50	0.993807	0.987654	12.64893
4	Convulsiones	8.75	0.997256	0.994520	19.05159
5	Piel irregular	57.75	0.864690	0.747690	2.434490
6	Escoliosis	56.00	0.992277	0.984615	11.31355
7	Branquias atrofiadas	38.50	0.952028	0.906350	4.399576
8	Edema dorsal	24.75	0.973030	0.946790	5.965469
9	Edema abdominal	20.25	0.766190	0.587060	1.686190
10	Edema rostro	19.75	0.923379	0.852630	3.401365
11	Anormalidad en la boca	14.50	0.982870	0.966030	7.541596
12	Anormalidad en los ojos	2.50	0.774590	0.600000	1.732035
13	Invaginación en las aletas	15.00	0.989949	0.980000	9.899400
14	Cola delgada	47.25	0.984779	0.969790	8.012618

se confirmó que se presentó una gran correlación de las variables, excepto para las alteraciones de branquias atrofiadas y anomalía en la boca, para Hg^{2+} (a las concentraciones de 1.47, 2.95, 4.43 y 5.91 ppm); cola delgada e invaginación en las aletas, para Hg^{2+} (a las concentraciones de 1.23, 2.47, 3.7 y 4.94 ppm); convulsiones, edema dorsal y edema en el rostro, para Cl^- , y piel irregular, anomalía en los ojos y edema abdominal, para NO_3^- (Tablas 1 a 4 y Figuras. 2 a 3).

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

Para las diferentes concentraciones de Hg^{2+} , Cl^- y NO_3^- empleadas en este estudio, la gran mayoría de las alteraciones registradas en los embriones de *Hyla labialis*, al presentar una alta correlación de los valores t de Student, pueden servir como indicadores para la predicción, prevención y control de los posibles peligros tóxicos de estos iones en el medio ambiente.

A estas dosis subletales, aunque la acción de cada uno de los iones indicados fue diferente, presentaron los embriones de *Hyla labialis* alteraciones como pigmentación alterada (disminución), convulsiones, hemorragias, irregularidades, escoliosis, edemas, branquias atrofiadas, cola delgada, invaginación en las aletas y anomalías.

Al respecto, las alteraciones en el síntoma de la pigmentación, por la exposición a

estos iones, se presentaron en diferentes áreas, en especial hacia la cola una despigmentación total, en los embriones. En algunos de ellos esta alteración, les dio una apariencia traslúcida. Aunque durante este estudio no se realizó ni se observó el efecto a nivel celular de los iones, coherentemente a las investigaciones de Ariza (1994) y Low (1995), pudo acontecer una deficiencia de melanocitos en alto grado, por un descenso en la producción de la alfa MSH

TABLA 3 Porcentajes totales, índices de correlación (r) y de determinación (r^2), y estadístico t Studet de acuerdo a las alteraciones presentadas en los embriones de *Hyla labialis* expuestos a 1.47, 2.95, 4.43 y 5.91 ppm de Hg^{2+} .

Nº	Alteración	Porcentaje Total (%)	r	r^2	t
1	Pigmentación alterna	15.50	0.91648	0.839935	3.239000
2	Hemorragia	40.75	0.99000	0.980100	9.924000
3	Convulsiones	6.00	0.98990	0.979900	9.874100
4	Piel irregular	33.25	0.99096	0.982000	10.44600
5	Cola irregular	16.50	0.98270	0.965690	7.502790
6	Cola delgada	28.00	0.97162	0.944045	5.808540
7	Edema dorsal	23.00	0.97610	0.952771	6.351850
8	Escoliosis	31.50	0.99760	0.995205	20.37400
9	Anormalidad en los ojos	10.75	0.99500	0.990025	14.08860
10	Edema abdominal	14.25	0.99860	0.997201	26.69340
11	Edema rostro	22.75	0.99251	0.985850	11.80840
12	Invaginación en las aletas	5.25	0.94661	0.896070	4.152500
13	Branquias atrofiadas	8.50	0.88761	0.787851	2.725160
14	Anormalidad en la boca	12.00	0.79810	0.636960	1.873240
15	Edema cefálico	15.25	0.99545	0.990940	14.79020

(Hormona Estimulante de Melanocitos). Además, el movimiento de la melanina se efectúa por microtúbulos; al afectarse dicha estructura celular, de acuerdo a los autores, por la acción de los iones, la distribución de la melanina también; entonces, lo que aconteció fue un trasporte de estos gránulos no hacia la periferia celular sino al interior, aclarando así el color de la piel de los embriones de *Hyla labialis*.

Las convulsiones presentadas en los embriones de *Hyla labialis*, se caracterizaron por agitaciones alternadas de contracción y estiramiento de los músculos; esta alteración, según las observaciones de Nicotera (1993), hacen suponer, al no efectuarse durante el estudio con los embriones una investigación a nivel sensorial neuronal, una fatiga de las unidades motoras rápidas, en la que la capacidad del nervio motor para

TABLA 4 Porcentajes totales, índices de correlación(r) y de determinación (r^2) y estadístico t Student de acuerdo a las alteraciones presentadas en los embriones de *Hyla labialis* expuetos a 1.23, 2.47, 3.7 y 4.94 ppm de Hg²⁺.

Nº	Alteración	Porcentaje Total (%)	r	r ²	t
1	Pigmentación alterada	13.00	0.964500	0.930260	5.165000
2	Hemorragias	33.00	0.998600	0.997200	26.68800
3	Convulsiones	8.25	0.994300	0.988630	13.18600
4	Piel irregular	28.25	0.917800	0.842350	12.17250
5	Cola irregular	14.50	0.97780	0.956092	6.599400
6	Cola delgada	30.00	0.87066	0.758048	2.503200
7	Edema dorsal	14.50	0.98980	0.979704	9.825550
8	Escoliosis	25.75	0.97827	0.957012	6.672660
9	Anormalidad en los ojos	11.25	0.98980	0.979704	9.825550
10	Edema abdominal	11.75	0.98799	0.986606	12.072600
11	Edema rostro	18.25	0.99265	0.985354	11.59980
12	Invaginación en las aletas	7.25	0.71830	0.515954	1.460060
13	Branquias atrofiadas	7.00	0.97980	0.960008	6.928800
14	Anormalidad en la boca	10.50	0.982880	0.784436	2.993900
15	Edema cefálico	13.00	0.987790	0.975729	8.966760

sintetizar y liberar el enzima acetil colina estearasa pudo haber estado limitada.

Las hemorragias se presentaron más severas en los embriones de *Hyla labialis* expuestos al NO_3^- , en diferentes áreas principalmente hacia la parte anterior, de la cual no se podían observar, por la alteración, las estructuras de los ojos y la boca. Al no efectuar ensayos a nivel celular posiblemente similar a las investigaciones de Kate (1977) y Sumie, Hisao y Masao (1984) se produjo en los renacuajos un estancamiento del flujo sanguíneo por la influencia de los iones que generaron, en caso de intoxicación prolongada, destrucción de los glóbulos rojos, con liberación de hemoglobina en el plasma sanguíneo.

La alteración de la escoliosis, al no realizarse y observarse durante la investigación proprotocolo a nivel fisiológico, pudo presentarse en los embriones de *Hyla labialis*, de acuerdo a Joachim (1979), un ablandamiento y doblamiento de los huesos largos, con líneas de fractura a lo largo de las arterias llamadas nutricias, al bajar los niveles de calcio y potasio, provocando por ende una desviación lateral de la columna.

Las irregularidades en los renacuajos estudiados se presentaron en todas las concentraciones subletales de Hg^{2+} , Cl^- y NO_3^- . Cada uno de los iones produjo daños, visto a nivel macroscópico a los embriones; tal vez, al no realizarse en el estudio un análisis a nivel celular, pero coherentemente a las observaciones de Nishisaka (1994), aconteció un daño irreversible a nivel de membrana, por causa de una entrada forzada de los iones mencionados, cambiando drásticamente el potencial eléctrico de dicha capa celular selectiva.

Los diferentes edemas presentados en los embriones de *Hyla labialis*, fueron más notorios a los expuestos a las diferentes concentraciones de Hg^{2+} . Los anteriores iones como el Cl^- y el NO_3^- , provocaron en los renacuajos daños internos irreparables, induciendo el inicio de anomalías, in-

dependientemente en las áreas de los ojos, boca, cola, aletas y branquias, de las cuales se mostraron, en algunos de los embriones, menos ramificadas y desarrolladas que las del control.

La variabilidad de los iones estudiados se presentó en cada uno de los estadios embrionarios y en cada dosis empleada. El efecto acumulativo de las alteraciones generó un menor desarrollo embrionario a lo normal.

La gran sensibilidad de los embriones se expresó ante estos iones, en la mortalidad y en las alteraciones fácilmente observables, durante los 13 días de exposición continuada.

CONCLUSIONES

Las dosis suministradas a las diferentes concentraciones de Hg^{2+} , Cl^- y NO_3^- , causan efectos tóxicos reversibles e irreversibles a los embriones de *Hyla labialis*.

El NO_3^- , causa mayor mortalidad en los embriones expuestos, que a la acción tóxica de Cl^- y Hg^{2+} .

El Hg^{2+} , provoca mayor número de alteraciones en los embriones expuestos, que al Cl^- y NO_3^- .

Durante el estudio se presenta una correlación positiva directa de la relación dosis-respuesta.

RECOMENDACIONES

Realizar estudios de toxicidad con los iones estudiados en la etapa metamórfica de *Hyla labialis*.

Investigar los efectos del Hg^{2+} , Cl^- y NO_3^- a nivel histológico, celular, molecular y fisiológico, en el desarrollo embrionario como metamórfico en individuos *Hyla labialis*, *H. crepitans* e *H. pearsei*.

AGRADECIMIENTOS

El autor expresa su agradecimiento a los doctores Dilia Dallos Boada, M.S., Rubén Darío Torrenegra y Nubia Perdomo de Parra, M.S., investigadores de la Pontificia Universidad Javeriana, por sus orientaciones decisivas en el desarrollo del trabajo. A la CAR, por su apoyo logístico, y al personal de los laboratorios de la Pontificia Universidad Javeriana y Jorge Tadeo Lozano, por su colaboración en el manejo apropiado de las disoluciones.

REFERENCIAS

- ARIZA, M.E. 1994. *Mutagenic effect of mercury II in eukaryotic cell*. *Vivo*. 8(4):559-63.
- CHENG, W.; MULVIHILL, J.J.; GREENE, M.H.; PICKLE, L.W.; TSAI, S. Y WHANG-PENG. 1979. *Sister chromatid exchanges and chromosomes in chronic myelogenous leukaemia and cancer families*. *Int. J. Cancer*. 23:8.
- FISKESJO, G. 1970. *The effect of two organic mercury compounds on human leukocytes in vitro*. *Hereditas*, 64:142-164.
- JOACHIM, H. 1979. *Determinación de los niveles de plomo y mercurio en alimentos conservados*. Bogotá, D.E. Pág. 69.
- KATE, S. 1977. *Handbook of emergency toxicology*. Tercera edición. Thomas, Publi, Springfield: 303-11, 283-92.
- Low, K.W. 1995. *Effects of mercuric chloride on chemili-mininescent reponse of phagocytes and tissue lysozyme activity in tilapia oreochromis aureis*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 54(2):302-8.
- MONSALVE, M.V. Y CHIAPPE, R. 1987. *Genetic effect of methylmercury in human chromosomes: I. A Cytogenetic study of people exposed through eating contaminated fish*. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 10: 367-76.
- NICOTERA, P. 1993. *Molecular mechanism of metal neurotoxicity*. *J. Trace. Elem. Electrolytes Health Dis.* 7(4): 254-6.
- NISHISAKA, N. 1994. *Sensitivity of immature regenerating proximal tubular cells in rabbit kidney to mercuric-chloride a light and electron microscopic analysis*. *Nippon Jinzo Gakkai Shi*. 36(4): 298-306.
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. 1976. *Riesgos del ambiente humano para la salud*. Publicación Científica, 329, Washington Págs. 21, 47, 66-7, 159-60.
- _____. 1991. *Inorganic mercury*, Genova, Italy, Pág. 168.
- ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. O.P.S. 1976. *Criterios de la salud ambiental del mercurio*. Washington, Publicación Científica, 362, Pág. 148.
- REYES, J.C. 1977. *El mercurio en el medio ambiente*. Grupo ecológico de la Universidad del Tolima, Ibagué, Tolima. Pág. 52.
- SKERFVING, S.; HANSSON, K.; MANGS, C.; LINDSEN, J. Y RYMAN, N. 1974. *Methylmercury induced chromosome damage in man*. *Environ Res*, 7: 83-98.
- SUMIE, Y.; HISAO, T. Y MASAO, N. 1984. *Exposure of Japanese dental worker to mercury*. *Bulletin of Tokyo Dental College*. Tokio, Japan, 23(1): 15-24.