

## Genotoxicidad de cloruro de mercurio (II) en alevines de *Oreochromis niloticus* (Pisces, Cichlidae) expuestos a diferentes temperaturas

Mercury Chloride (II) genotoxicity in *Oreochromis niloticus* (Pisces, Cichlidae) fingerlings exposed to different temperatures

Juan Carlos Francia-Quiroz<sup>1\*</sup>, Claudia F. Contreras-Luya<sup>1</sup>,  
Valeria Fernández-Celedonio<sup>1</sup>

### RESUMEN

El cloruro de mercurio ( $\text{HgCl}_2$ ) es un compuesto neurotóxico, nefrotóxico y genotóxico, que se encuentra en ambientes acuáticos por actividades antropogénicas y cuyo efecto puede alterarse por variaciones en la temperatura (por ejemplo: calentamiento global). El presente trabajo tuvo como objetivo determinar la concentración letal media ( $\text{CL}_{50}$ ) para  $\text{HgCl}_2$  y su efecto genotóxico, con relación al aumento de temperatura para alevines de *Oreochromis niloticus*. Los resultados de  $\text{CL}_{50}$  para  $\text{HgCl}_2$  durante los tiempos de exposición (48, 72 y 96 h) y temperaturas (28 y 32 °C) mostraron que la  $\text{CL}_{50-96\text{h}}$  se incrementó de 0.39 mg L<sup>-1</sup> para 28 °C a 0.66 mg L<sup>-1</sup> para 32 °C. Para la evaluación subletal se establecieron concentraciones a partir de la  $\text{CL}_{50-96\text{h}}$  de  $\text{HgCl}_2$  para 28 y 32 °C, evaluando la genotoxicidad por 30 días a través del ensayo de anomalías nucleares (AN) y micronúcleos (MN). Se observó mayor frecuencia de AN y MN a 0.07 mg L<sup>-1</sup> de  $\text{HgCl}_2$  para 32 °C. Se concluye que la  $\text{CL}_{50}$  y genotoxicidad (AN y MN) para  $\text{HgCl}_2$  se incrementa al aumentar la temperatura de 28 a 32 °C.

**Palabras clave:** tilapia, concentración letal media, ensayo crónico, micronúcleos, anomalías nucleares

<sup>1</sup> Carrera de Biología Marina, Facultad de Ciencias Veterinarias y Biológicas, Universidad Científica del Sur, Lima, Perú

\* E-mail: [jfrancia@cientifica.edu.pe](mailto:jfrancia@cientifica.edu.pe)

Recibido: 2 de agosto de 2022

Aceptado para publicación: 20 de marzo de 2023

Publicado: 28 de abril de 2023

©Los autores. Este artículo es publicado por la Rev Inv Vet Perú de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional (CC BY 4.0) [<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.es>] que permite el uso, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citada de su fuente original

## ABSTRACT

Mercury chloride ( $\text{HgCl}_2$ ) is a neurotoxic, nephrotoxic, and genotoxic compound found in aquatic environments due to anthropogenic activities and whose effect can be altered by variations in temperature (for example: global warming). The aim of this work was to determine the mean lethal concentration ( $\text{LC}_{50}$ ) for  $\text{HgCl}_2$  and its genotoxic effect, in relation to the increase in temperature for *Oreochromis niloticus* fingerlings. The  $\text{LC}_{50}$  results for  $\text{HgCl}_2$  during the exposure times (48, 72, and 96 h) and temperatures (28 and 32 °C) showed that the  $\text{LC}_{50-96\text{h}}$  increased from 0.39 mg  $\text{L}^{-1}$  for 28 °C to 0.66 mg  $\text{L}^{-1}$  for 32 °C. For sublethal evaluation,  $\text{HgCl}_2$  concentrations from  $\text{LC}_{50-96\text{h}}$  were established for 28 and 32 °C, evaluating genotoxicity for 30 days through the nuclear abnormalities (AN) and micronucleus (MN) assay. A higher frequency of AN and MN was observed at 0.07 mg  $\text{L}^{-1}$  of  $\text{HgCl}_2$  for 32 °C. It is concluded that the  $\text{LC}_{50}$  and genotoxicity (AN and MN) for  $\text{HgCl}_2$  increase with increasing temperature from 28 to 32 °C.

**Key words:** tilapia, mean lethal concentration, chronic assay, micronuclei, nuclear abnormalities

## INTRODUCCIÓN

El mercurio (Hg) es un metal que se encuentra en la naturaleza, y que en elevadas concentraciones puede causar daño a nivel fisiológico y genético en organismos expuestos (Oze *et al.*, 2006; Raissy, 2013). Este metal en su forma inorgánica se puede encontrar como cloruro de mercurio ( $\text{HgCl}_2$ ) debido a la presencia de actividades antropogénicas como minería y agricultura (Gómez *et al.*, 2001; Weinberg, 2007).

$\text{HgCl}_2$  es un agente genotóxico que puede causar fracturas cromosómicas o disfunción del huso mitótico, generando anomalías nucleares (AN) y micronúcleos (MN) (Nirchio *et al.*, 2019). Peñaloza *et al.* (2003) expusieron a peces *Prochilodus magdalenae* y *Oreochromis* sp a tres concentraciones de  $\text{HgCl}_2$  (0.001, 0.003 y 0.027 mg  $\text{L}^{-1}$ ) durante 7 días encontrando daños en el ADN de los especímenes. Por otro lado, el efecto del mercurio también podría alterarse por acción de factores fisicoquímicos en los ecosistemas acuáticos, un ejemplo de esta variación sería el ocasionado por la acidifica-

ción de los cuerpos de agua y el cambio climático (De la Vega, 2018). Tsai *et al.* (1975), trabajando con las especies *Pimephales promelas* y *Notropis atherinoides* bajo condiciones de laboratorio, demostraron que el  $\text{HgCl}_2$  al ser disuelto en un pH alcalino (7.5-9.0) redujo su transferencia del agua hacia los peces, pero se incrementó en ambientes acuáticos de pH ácido (4.0-6.5). Así mismo, Ávila y Loor (2018) evaluaron la concentración de Hg en músculo, hígado y branquias de *Oreochromis niloticus* encontrando niveles mayores de Hg en el mes de octubre (24-28 °C, 0.36 ppm de Hg) y menores en el mes de agosto (21-26 °C, 0.28 ppm de Hg), lo cual se relaciona con el aumento de temperatura.

En los últimos años se vienen registrando incrementos de temperatura a nivel global, causado por la generación de gases de efecto invernadero, lo puede afectar los ecosistemas de agua dulce al cambiar la cantidad, calidad y tiempo de suministro de agua (García-Estrada, 2001; Bates *et al.*, 2008). El Perú está considerado entre los tres países de Latinoamérica más afectados por el cambio climático, provocando deshielos, he-

ladas, deforestación, oleadas de calor y cambios en sistemas de agua, como el incremento de temperatura de 2 a 3 °C en la cuenca del río Amazonas (Vargas, 2009; Pajares, 2014).

La variación de temperatura puede llegar a alterar el metabolismo y comportamiento de los animales acuáticos, como es el caso de *O. niloticus*, que, al percibir temperaturas altas, sobrepasando su temperatura óptima (28-31 °C), tiende a acelerar su apetito, tasa metabólica y consumo de oxígeno (Tsang y Quintanilla, 2008). Del mismo modo, juveniles de *Colossoma macropomum* expuestos a 35 °C, mostraron alteraciones histológicas, como eritrocitos con morfología anormal, hepatocitos con núcleos picnóticos y reducción del espacio de la cápsula de Bowman en los glomérulos (Rojas *et al.*, 2013). Igualmente, ejemplares de *Poecilia reticulata* sometidos a cambios repentinos de temperatura (de 28 a 34 °C, 28 a 36 °C, y 28 a 38 °C) revelaron un porcentaje elevado de MN de 1.81 y 1.91% a 34 y 36 °C, respectivamente, mientras que a 38 °C se inhibió la proliferación celular (Tapia, 2017).

El efecto tóxico de los metales puede ser influenciado por la temperatura, como se demostró en el trabajo de Salazar *et al.* (2009), donde juveniles de *C. macropomum* fueron expuestos a 0.5 mg L<sup>-1</sup> de cadmio (Cd) a 25 y 30 °C, provocando un incremento de linfocitos (74.3 a 79.4%) y una disminución de eosinófilos (1.44 a 1.12%), respuesta observada generalmente ante una infección. Del mismo modo, se sabe que la temperatura puede modificar la velocidad de absorción y acción de productos químicos y contaminantes ambientales en los organismos acuáticos, como metales, contaminantes orgánicos persistentes - COP, hidrocarburos aromáticos policíclicos - HAP y plaguicidas (Noyes *et al.*, 2009; Holmstrup *et al.*, 2010). Por ejemplo, en la especie amazónica *Lepomis cyanellus* (Nervárez-Rodríguez *et al.*, 2013), se reportó altas concentraciones de Hg en

músculos durante los meses de verano (0.098 mg kg<sup>-1</sup>) a diferencia de los meses de invierno (0.034 mg kg<sup>-1</sup>), debido a la biodisponibilidad del metal por el aumento de temperatura.

Por lo tanto, el presente estudio tuvo como objetivo determinar la CL<sub>50</sub> para HgCl<sub>2</sub> y su efecto genotóxico (AN y MN) frente al incremento de temperatura (28 y 32 °C) en alevines de *O. niloticus*, con la finalidad de demostrar la influencia de la temperatura en el daño producido por metales en ambientes acuáticos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio siguió los lineamientos del Reglamento del Comité Institucional de Ética en Investigación con Animales y Biodiversidad (2017), según Capítulo 2, Artículo 5, de la Universidad Científica del Sur.

### Material Biológico

Se utilizaron alevines de *O. niloticus* (n = 500) con peso de 0.46 ± 0.09 g y longitud total de 31.9 ± 1.7 mm (media ± DE), procedentes del Centro de Investigación Piscícola de la Facultad de Pesquería de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM). Los alevinos fueron transportados al laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Científica del Sur, Lima, Perú.

Los peces fueron aclimatados por 15 días a dos temperaturas (28 y 32 °C) en unidades experimentales de 45 L, con una biomasa total de 116.78 g y densidad de cultivo 1.46 g L<sup>-1</sup>. Como dieta se suministró Tilapia - 40 (Aquatech) (proteína: 40%, grasa: 5%, fibra: 4%, ceniza: 12% y humedad: 12%), con una tasa de alimentación al 10%, y frecuencia alimentaria de cinco veces al día.

## Cloruro de Mercurio (II) - HgCl<sub>2</sub>

Se empleó cloruro de mercurio II (JT Baker®, HgCl<sub>2</sub>, PM: 271.492 g mol<sup>-1</sup>), con una pureza del 99.5%, a partir del cual se preparó una solución inicial al disolver 1 g de HgCl<sub>2</sub> en 1 L de agua destilada.

### Ensayos de Toxicidad

#### Determinación de CL<sub>50</sub> de HgCl<sub>2</sub>

Los alevines (n = 120) se distribuyeron en 20 acuarios de 2 L c/u a una densidad de 1.84 g L<sup>-1</sup>. Los individuos fueron expuestos a una concentración control (sin HgCl<sub>2</sub>) y diferentes concentraciones de HgCl<sub>2</sub> (0.13, 0.25, 0.38, 0.50 mg L<sup>-1</sup>) a temperaturas de 28 y 32 °C, con dos réplicas por tratamiento. Se evaluó la mortalidad a las 48, 72 y 96 h (Naranjo-Gómez *et al.*, 2014).

#### Ensayo subletal de HgCl<sub>2</sub>

Se emplearon alevinos (n = 240) distribuidos aleatoriamente en 40 unidades experimentales con capacidad de 2 L c/u, a una densidad de 1.47 g L<sup>-1</sup>. Los especímenes fueron expuestos a una concentración control (sin HgCl<sub>2</sub>) y dos concentraciones de HgCl<sub>2</sub> (0.04 y 0.07 mg L<sup>-1</sup>) con nueve réplicas establecidas a partir de la determinación de CL<sub>50-96h</sub> de HgCl<sub>2</sub> y según las temperaturas de experimentación (28 y 32 °C) (Naranjo-Gómez *et al.*, 2014).

El ensayo duró 30 días, tomándose muestras de sangre periférica cada 15 días para la evaluación de genotoxicidad, según lo indicado por Ayllon y García-Vazquez (2000). Asimismo, parámetros fisicoquímicos de calidad de agua con la temperatura (°C) se midieron diariamente y el oxígeno disuelto (mg L<sup>-1</sup>) y pH cada dos días (Cuadro 1).

### Datos Biométricos

Los datos de peso (g) y longitud total (mm) se midieron utilizando una balanza digital (Ohaus Traveler TA 152, 0.01 g) y un

vernier (Karson 150 mm, material ABS, margen de error ± 0.05 mm), considerando la metodología de Mariluz (2015).

#### Tasa de crecimiento absoluto (TCA) y específico (TCE)

La TCA es un coeficiente que evalúa el cambio de peso (g) y longitud total (mm) de un individuo o población por unidad de tiempo (Brown *et al.*, 1988). La TCE mide el porcentaje de aumento de peso (g) y longitud total (mm) por día de los alevines evaluados (Hopkins, 1992) mediante las siguientes fórmulas:

- TCA (g/día<sup>-1</sup>) = (Pf-Pi/N° días), donde Pf= Promedio final de peso (g) y Pi = Promedio inicial de peso (g).
- TCA (mm día<sup>-1</sup>) = (Lf-Li/N° días), donde Lf = Promedio final de longitud total (mm) y Li = Promedio inicial de longitud total (mm).
- TCA (% día<sup>-1</sup>) = (LN[Pf] - LN[Pi]/N° días) \* 100, donde LN(Pf) = Logaritmo natural del promedio final de peso (g) y LN(Pi) = Logaritmo natural del promedio inicial de peso (g).
- TCE (% día<sup>-1</sup>) = (LN[Lf] - LN[Li]/N° días) \* 100, donde LN(Lf) = Logaritmo natural del promedio final de longitud total (mm) y LN(Li) = Logaritmo natural del promedio inicial de longitud total (mm).

### Evaluación de Genotoxicidad

Los alevines de tilapia se sacrificaron mediante una sobredosis de metasulfonato de triclaína (MS 222) (Tamaru *et al.*, 2001). Se extrajeron las muestras de sangre de la vena caudal, a través de un corte transversal en las colas. Se hicieron los frotis en láminas portaobjeto. Posteriormente, se procedió a evaluar la genotoxicidad mediante la estimación de anomalías nucleares (AN) y micronúcleos (MN).

Para la identificación de AN se tomó en cuenta los criterios descritos por Carrasco *et al.* (1990), donde se determinaron las si-

Cuadro 1. Parámetros fisicoquímicos de calidad de agua durante el ensayo subletal de HgCl<sub>2</sub> en alevines de *Oreochromis niloticus*, según la temperatura (28 y 32 °C)

Temperatura (°C)		Oxígeno disuelto (mgL <sup>-1</sup> )		pH	
Media	DE	Media	DE	Media	DE
28.08	0.20	6.90	0.26	6.31	0.30
31.94	0.21	6.91	0.31	6.31	0.27

Cuadro 2. CL<sub>50</sub> de HgCl<sub>2</sub> a 28 y 32 °C a las 48, 72 y 96 h de exposición y límites de confianza mínimo y máximo para alevines de *Oreochromis niloticus*

Temperatura (°C)	Tiempo (horas)	CL <sub>50</sub> HgCl <sub>2</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	Límites de confianza	
			Mínimo	Máximo
28	48	0.46 <sup>ab</sup>	0.40	0.56
	72	0.45 <sup>ab</sup>	0.39	0.58
	96	0.39 <sup>a</sup>	0.33	0.49
32	48	0.90 <sup>c</sup>	0.84	1.01
	72	0.99 <sup>c</sup>	0.93	1.12
	96	0.66 <sup>bc</sup>	0.60	0.76

Valores con letras distintas indican diferencias significativas (p<0.05)

güentes categorías: célula con núcleo con ampolla, presentando un pliegue en la membrana nuclear (abreviado como *BL*, del inglés *blebbed*); eritrocito binucleado, dado que tiene dos núcleos de similar tamaño (abreviado como *BN*, del inglés *binoclei*); célula con núcleo con muesca (abreviado como *NT*, del inglés *notched*); y eritrocito con núcleo lobulado (abreviado como *LB*, del inglés *lobed*).

Los MN fueron caracterizados según lo establecido por Grisolia (2002), donde el MN debe estar separado del núcleo de la célula y tener una coloración similar a este. Además, el MN debe encontrarse dentro del citoplasma celular y su tamaño debe ser menor a un tercio del núcleo principal.

Las observaciones se ejecutaron empleando un microscopio Nikon Eclipse E100 con un objetivo de 100x. El conteo de AN y MN se realizó por el método descrito por Al-Sabti y Metcalfe (1995), donde se descartaron los eritrocitos sobrepuestos o dañados. Se expresó en porcentaje (%), calculado a partir de la siguiente fórmula (Santamaría *et al.*, 2012): MN o AN (%) = (N° células con MN o AN/2000) \* 100.

#### Mortalidad (%)

Los datos de mortalidad se tomaron cada 15 días, estimándose a partir de la fórmula descrita por Tsang y Quintanilla (2008). Mortalidad (%) = (N° muertos/Total evaluados) \* 100.

## Análisis de Datos

La  $CL_{50}$  se determinó por el método Probit empleando el programa IBM SPSS Statistics v. 23. Los valores de peso (g), longitud total (mm), TCA, TCE, AN, MN y mortalidad (%) no cumplieron con los criterios de normalidad (Shapiro Wilk) y homogeneidad de varianza (Levene), por lo que se aplicó el método no paramétrico de Scheirer Ray Hare, seguido del análisis post-hoc Dunnett, empleando el programa Rstudio v. 3.4).

## RESULTADOS

### Determinación de $CL_{50}$

La  $CL_{50}$  para  $HgCl_2$  se incrementó con la temperatura (de 28 a 32 °C) a cada tiempo de evaluación (48, 72 h), pero disminuyeron a las 96 h para ambas temperaturas. No obstante, la  $CL_{50}$  obtenidos a 28 y 32 °C no presentaron diferencias significativas entre 48 y 72 h ( $p>0.05$ ), pero hubo diferencias significativas entre temperaturas ( $p<0.05$ ) (Cuadro 2).

### Ensayo subletal de $HgCl_2$

#### *Datos biométricos*

Los alevinos presentaron peso y longitud total similares entre tratamientos al inicio del experimento ( $p>0.05$ ). Sin embargo, los peces en el día 15 que no fueron expuestos a  $HgCl_2$  a 32 °C y peces expuestos a 0.07 mg L<sup>-1</sup> de  $HgCl_2$  a 28 °C presentaron un menor crecimiento (peso y longitud total). Para el día 30, los ejemplares cultivados en ausencia de  $HgCl_2$  obtuvieron menor peso ( $1.08 \pm 0.19$  g) a 28 °C, en comparación con los alevinos sometidos a 32 °C ( $1.84 \pm 0.45$  g). Por otro lado, los alevinos mantenidos a 0.07 mg L<sup>-1</sup> de  $HgCl_2$  y 32 °C mostraron menores valores de peso y longitud total en comparación con el resto de los tratamientos en el día 30 (Cuadros 3 y 4).

### *Tasa de crecimiento absoluto (TCA) y específico (TCE)*

Los resultados de TCA para peso indicaron que individuos sin exposición a  $HgCl_2$  y mantenidos a 32 °C alcanzaron mayor crecimiento en comparación con ejemplares cultivados en presencia de 0.04 mg L<sup>-1</sup> de  $HgCl_2$  a 32 °C ( $p<0.05$ ), y estos últimos también presentaron el menor TCA frente al resto de tratamientos. En el caso de TCA para longitud total se demostró que peces en ausencia de  $HgCl_2$  a 32 °C mostraron mayor crecimiento ( $p<0.05$ ) frente a los alevinos de los tratamientos de 0.04 mg L<sup>-1</sup> de  $HgCl_2$  y 32 °C, y 0.07 mg L<sup>-1</sup> de  $HgCl_2$  para 28 °C y 32 °C.

Para TCE se determinó que los porcentajes de peso se incrementaron en tratamientos que no contenían  $HgCl_2$  para 32 °C ( $p<0.05$ ) en comparación con los alevinos sometidos a 0.04 y 0.07 mg L<sup>-1</sup> de  $HgCl_2$  a 32 °C (Cuadro 3). Por otra parte, los valores más altos TCE para la longitud total se observaron en alevinos cultivados sin  $HgCl_2$  a 32 °C en comparación a los evaluados a 0.04 mg L<sup>-1</sup> y 0.07 mg L<sup>-1</sup> de  $HgCl_2$  a 32 °C ( $p<0.05$ ) (Cuadro 4).

### Análisis de AN y MN

En las muestras de sangre periférica de *Oreochromis niloticus* se observaron eritrocitos con núcleo central de forma elíptica y contornos definidos, que corresponden a células con morfología normal (Figura 1A). Además, se encontraron eritrocitos con AN (Figura 1B, C, D, E) y MN (Figura 1F).

En la evaluación del día 0 a 28 °C se obtuvo mayor porcentaje de *BN* para organismos expuestos a 0.04 mg L<sup>-1</sup> de  $HgCl_2$  ( $p<0.05$ ); sin embargo, cuando la temperatura se incrementó a 32 °C disminuyó la presencia de *BN* ( $p<0.05$ ). No obstante, individuos que fueron sometidos a 0.07 mg L<sup>-1</sup> de  $HgCl_2$  a 28 °C mostraron un menor porcentaje de muestras con *BN* frente a los alevinos

Cuadro 3. Datos de peso (g), tasa de crecimiento absoluto (TCA) y tasa de crecimiento específico (TCE) para alevines de *Oreochromis niloticus* sometidos a dos temperaturas (28 y 32 °C) y tres concentraciones de HgCl<sub>2</sub> (mg L<sup>-1</sup>)

HgCl <sub>2</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	Temp (°C)	Día 0		Día 15		Día 30		TCA (mm día <sup>-1</sup> )		TCE (% día <sup>-1</sup> )	
		Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE
0.00	28	0.42 <sup>abc</sup>	0.07	0.94 <sup>a</sup>	0.28	1.08 <sup>a</sup>	0.19	0.02 <sup>ab</sup>	0.01	3.14 <sup>ab</sup>	1.63
	32	0.44 <sup>b</sup>	0.02	0.55 <sup>a</sup>	0.04	1.84 <sup>a</sup>	0.43	0.05 <sup>b</sup>	0.02	4.72 <sup>b</sup>	0.96
0.04	28	0.41 <sup>ab</sup>	0.04	0.86 <sup>a</sup>	0.19	1.12 <sup>a</sup>	0.47	0.02 <sup>ab</sup>	0.01	3.15 <sup>ab</sup>	1.13
	32	0.45 <sup>ab</sup>	0.22	0.90 <sup>a</sup>	0.27	1.11 <sup>a</sup>	0.54	0.01 <sup>a</sup>	0.01	2.40 <sup>a</sup>	0.94
0.07	28	0.44 <sup>ac</sup>	0.06	0.53 <sup>a</sup>	0.20	1.12 <sup>a</sup>	0.70	0.02 <sup>ab</sup>	0.02	2.72 <sup>ab</sup>	1.33
	32	0.49 <sup>c</sup>	0.07	0.77 <sup>a</sup>	0.30	1.09 <sup>a</sup>	0.24	0.02 <sup>ab</sup>	0.01	2.65 <sup>a</sup>	0.33

Valores con letras distintas dentro de columnas indican diferencias significativas (p<0.05)

Cuadro 4. Datos de longitud total (mm), tasa de crecimiento absoluto (TCA) y tasa de crecimiento específico (TCE) para alevines de *Oreochromis niloticus* sometidos a dos temperaturas (28 y 32 °C) y tres concentraciones de HgCl<sub>2</sub> (mg L<sup>-1</sup>)

HgCl <sub>2</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	Temp. (°C)	Día 0		Día 15		Día 30		TCA (mm día <sup>-1</sup> )		TCE (% día <sup>-1</sup> )	
		Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE
0.00	28	34.50 <sup>ab</sup>	0.50	39.00 <sup>a</sup>	3.00	42.65 <sup>a</sup>	1.35	0.27 <sup>ab</sup>	0.09	0.73 <sup>ab</sup>	0.23
	32	31.00 <sup>a</sup>	1.00	31.65 <sup>b</sup>	0.35	49.25 <sup>a</sup>	0.75	0.61 <sup>b</sup>	0.01	1.60 <sup>b</sup>	0.08
0.04	28	31.40 <sup>a</sup>	1.14	38.76 <sup>ab</sup>	3.54	41.80 <sup>a</sup>	6.10	0.35 <sup>ab</sup>	0.20	0.96 <sup>ab</sup>	0.51
	32	33.20 <sup>ab</sup>	4.32	39.10 <sup>a</sup>	3.58	41.80 <sup>a</sup>	6.94	0.20 <sup>a</sup>	0.08	0.57 <sup>a</sup>	0.25
0.07	28	33.60 <sup>ab</sup>	3.85	35.80 <sup>ab</sup>	4.09	42.30 <sup>a</sup>	7.98	0.22 <sup>a</sup>	0.21	0.55 <sup>a</sup>	0.45
	32	36.80 <sup>b</sup>	5.45	37.80 <sup>ab</sup>	3.03	41.68 <sup>a</sup>	3.47	0.13 <sup>a</sup>	0.06	0.34 <sup>a</sup>	0.14

Valores con letras distintas dentro de columnas indican diferencias significativas (p<0.05)

mantenidos a una concentración similar de HgCl<sub>2</sub> a 32 °C (p<0.05). Eritrocitos con núcleo *LB* se observaron en peces cultivados sin HgCl<sub>2</sub> a 28 °C, pero no a 32 °C. Asimismo, se determinó una mayor presencia de eritrocitos con núcleo *BL* en los tratamientos a 32 °C con concentraciones de 0.04 y 0.07 mg L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> (p<0.05). Además, se observó que la frecuencia de eritrocitos con núcleo *NT* aumentó a 32 °C, excepto en los grupos sin exposición a HgCl<sub>2</sub>, donde la presencia de células *NT* fue mayor a 28 °C (p<0.05) (Figura 2A).

Respecto a los resultados del día 15, el porcentaje de eritrocitos *BN* incrementó a 32 °C para todas las concentraciones de HgCl<sub>2</sub>. Hubo mayor presencia de células con núcleo *LB* a 0.04 mg L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> y 0.07 mg L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> (p<0.05), ambos a 32 °C. La frecuencia de muestras con núcleo *BL* aumentó para el tratamiento expuesto a 0.04 mg L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> a 28 °C. No obstante, el grupo evaluado a 0.07 mg L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> y 32 °C presentó un elevado número de células con núcleos *BL* (p<0.05). Los eritrocitos con núcleo *NT* se incrementaron en el grupo

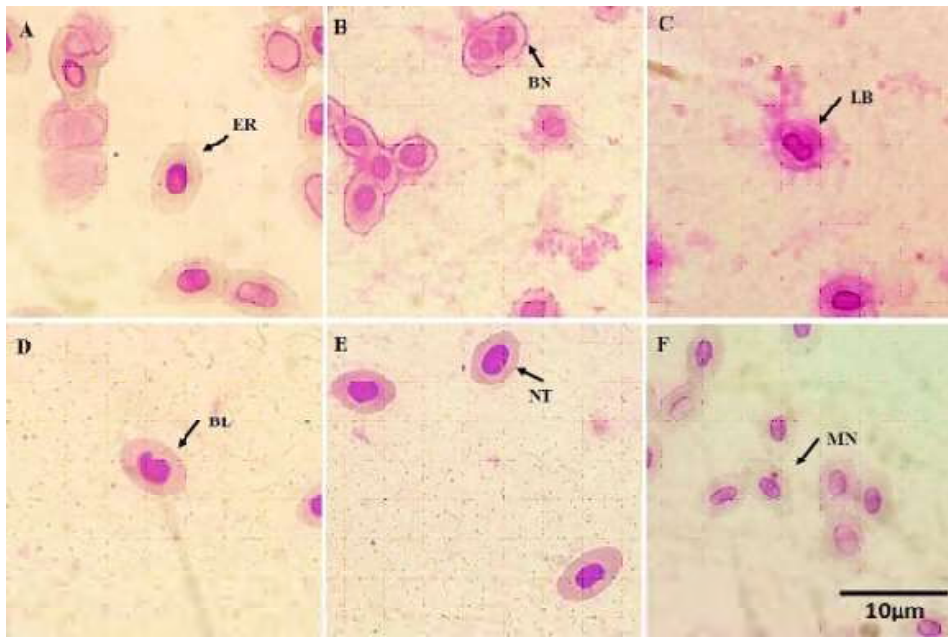


Figura 1. Eritrocitos de sangre periférica de *O. niloticus* A. Eritrocito con núcleo normal (ER), B. Binucleados (BN), C. núcleo lobulado o *lobed* (LB), D. núcleo con ampolla o *blebbed* (BL), E. núcleo con muesca o *notched* (NT) y F. micronúcleo (MN)

de 0.04 mg L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> a 28 °C, mientras que los cultivados a 0.07 mg L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> lo hicieron a 32 °C (p<0.05) (Figura 2B).

Las observaciones de AN durante el día 30 mostraron un aumento en el porcentaje de muestras con eritrocitos *BN* en alevines expuestos a 0.04 mg L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> a 28 °C y 0.07 mg L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> a 32 °C. Asimismo, para células con núcleo *LB* se observó una mayor frecuencia en los individuos sometidos a 0.04 mg L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> y 28 °C en contraste con el grupo cultivado a 32 °C (p>0.05). Sin embargo, a una concentración de 0.07 mg L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> la presencia de estos eritrocitos se incrementó a 32 °C. Al analizar células con núcleos *BL*, se determinó un mayor porcentaje para alevines sometidos a 0.04 mg L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> a 28 °C y 0.07 mg L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> para 32 °C (p<0.05). Del mismo modo, la frecuencia de muestras con núcleos *NT* aumentó en alevines cultivados a 0.07 mg L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> a 32 °C (p<0.05) (Figura 2C).

En el caso de células con presencia de micronúcleos (MN), en el día 0 se observó una mayor frecuencia para los tratamientos de 0.04 mg L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> a 28 °C y 0.07 mg L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> a 32 °C. Asimismo, para el día 15, todos los tratamientos aumentaron el número de MN en los individuos mantenidos a 32 °C. Finalmente, la frecuencia de eritrocitos con MN a 0.07 mg L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> a 32 °C superó el porcentaje en comparación a los individuos cultivados a 28 °C para el día 30 (p<0.05) (Figura 3).

### Mortalidad (%)

Los resultados de mortalidad (%) corresponden a cada día de evaluación. En el día 15 se observó la mayor mortalidad (3%) en organismos expuestos a 0.07 mg L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> y 28 °C, mientras que la sobrevivencia fue del 100% en los demás tratamientos. Sin embargo, para el día 30, se presentaron casos de mortalidad para alevines de tilapia cul-



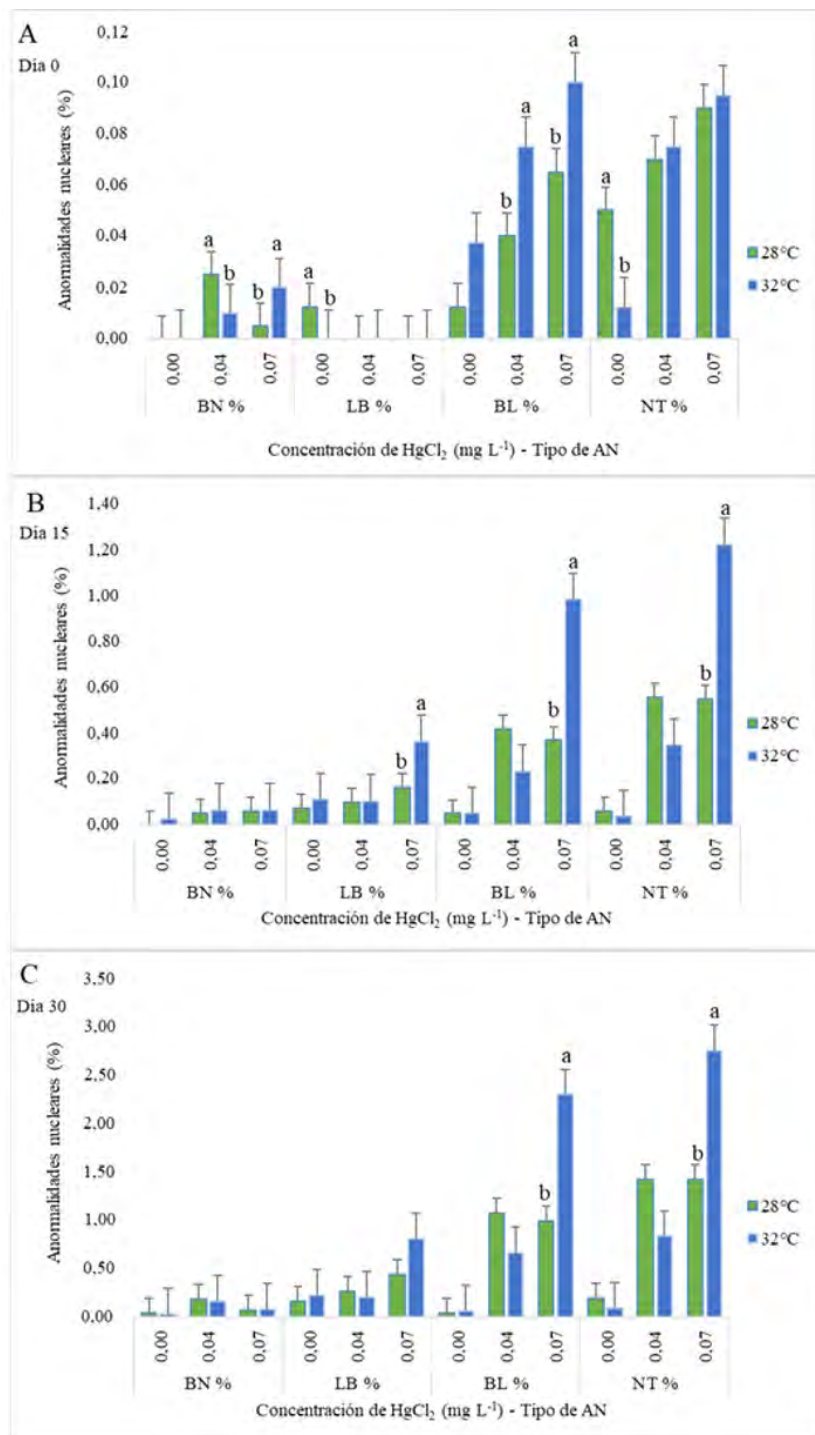


Figura 2. Células binucleadas (BN), Núcleos lobulados o *lobed* (LB), Núcleos con ampolla o *blebbed* (BL) y Núcleos con muesca o *notched* (NT) presentes en eritrocitos de alevines de *Oreochromis niloticus* expuestos a dos concentraciones de HgCl<sub>2</sub> y temperaturas de 28 y 32 °C. A. Día 0, B. Día 15, C. Día 30. Se ilustran la media ± DE. Letras distintas indican diferencias significativas (p<0.05)

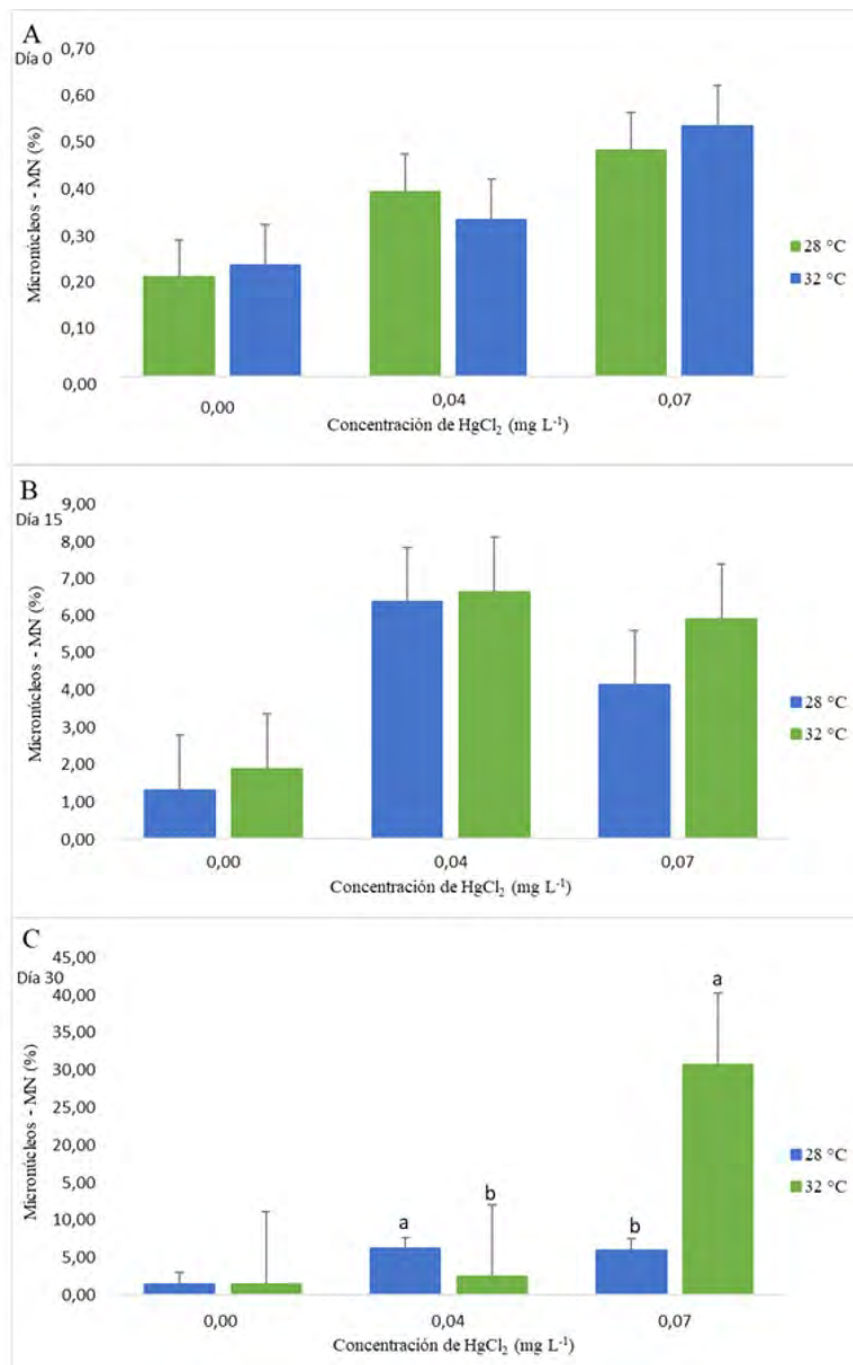


Figura 3. Micronúcleos (MN %) presentes en eritrocitos de alevines de *Oreochromis niloticus*, expuestos a dos concentraciones de HgCl<sub>2</sub> y temperaturas de 28 y 32 °C. A. Día 0, B. Día 15, C. Día 30. Se ilustran la media ± DE. Letras distintas indican diferencias significativas (p < 0.05)

Cuadro 5. Datos de mortalidad (%) en alevines de *Oreochromis niloticus* expuestos a diferentes concentraciones de HgCl<sub>2</sub> (mg L<sup>-1</sup>) y temperaturas (28 y 32 °C).

HgCl <sub>2</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	Temp (°C)	Mortalidad (%)		
		d 0	d 15	d 30
0.00	28	0	0	0
	32	0	0	4
0.04	28	0	0	0
	32	0	0	4
0.07	28	0	3	8
	32	0	0	4

tivados a 32 °C (4%), seguido de peces expuestos a 0.04 mg L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> y 32 °C (4%), y ejemplares mantenidos a 0.07 mg L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> para 28 °C (8%) y 32 °C (4%) (Cuadro 5).

## DISCUSIÓN

Los resultados descritos evidenciaron que a una mayor temperatura los organismos soportan mayor concentración de HgCl<sub>2</sub> hasta llegar a una mortalidad de la mitad de los alevines (CL<sub>50</sub>). Resultados similares fueron demostrados por Ishikawa *et al.* (2007) en *O. niloticus* sometidos a HgCl<sub>2</sub> a 24.4 °C, donde los datos de CL<sub>50</sub> fueron 0.37, 0.28 y 0.22 mg L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> correspondientes a las 48, 72 y 96 horas. Asimismo, en el trabajo de Jasim *et al.* (2016) se encontró que en alevines *O. niloticus* sometidos a 26.8 °C, la CL<sub>50im</sub> para las 48, 72 y 96 horas fue 0.75, 0.54 y 0.30 mg L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub>, respectivamente. Los resultados de ambos trabajos demostraron que el aumento de la temperatura tiende a generar valores más altos de CL<sub>50</sub> para HgCl<sub>2</sub> y a su vez disminuye a medida que transcurre el tiempo de exposición.

Respecto a la TCA y TCE, la temperatura influencia el crecimiento de *O. niloticus*. En este sentido, Azaza *et al.* (2008), El-Sherif

y El-Feky (2009), Pandit y Nakaura (2010) y Workagegn (2012) demostraron que el crecimiento de *O. niloticus*, en condiciones adecuadas, aumenta a medida que la temperatura llega a 32 °C y disminuye al exceder esta temperatura. Además, estudios realizados por Vallee y Ulmer (1972), Muñoz-Escobar y Palacio-Baena (2010), encontraron que el crecimiento se veía afectado para organismos sometidos a Hg, debido al elevado costo metabólico requerido por la depuración y detoxificación celular, realizados por el retículo endoplasmático liso de los hepatocitos. Ante esta evidencia y los resultados de este trabajo, se evidencia que la exposición al HgCl<sub>2</sub> y la interacción con la temperatura tiene un impacto negativo sobre el crecimiento de los alevines.

En relación con los valores obtenidos en la evaluación de genotoxicidad se observó la inducción espontánea de AN y MN, que según Prieto *et al.* (2008) es debido a las lesiones generadas en el ADN en las células de interfase-S. Esto ha sido observado en *Astyanax bimaculatus* (BN: 0.015%, BL: 0.05% y LB: 0.03%) (Santamaría *et al.*, 2012), *C. macropomum* (MN: 2.4%) (Rocha *et al.*, 2011), *Salmo trutta* (MN: 0.6%), *Anguilla anguilla* (MN: 0.2%), *Phoxinus phoxinus* (MN: 0.38%) (Rodríguez-Cea *et al.*, 2003) y *A. bimaculatus* (MN: 0.31%) (Matsumoto y Colus, 2000). El aumento de la concentración de HgCl<sub>2</sub> ocasionó daños en las células de *O. niloticus*, similar a los resultados de Nirchio *et al.* (2019), quienes demostraron que la frecuencia de células con núcleo NT fue mayor a la concentración más alta de HgCl<sub>2</sub>, presentando 3.84% y 7.71%, correspondiente a 0 y 0.25 mg g<sup>-1</sup> en *Andinoacara rivulatus*. Esto se debe a que los compuestos de Hg causan un colapso general en los mecanismos antioxidantes de la célula al unirse a los grupos sulfhidrido del glutatión, bloqueando su función como eliminador de radicales libres, dejándolos disponibles para causar daño en el ADN (Rodríguez *et al.*, 2017).

Un estudio realizado por Thier *et al.* (2003) demostró que una de las características del  $\text{HgCl}_2$  es provocar un efecto adverso sobre la tubulina, subunidad estructural de los microtúbulos, cuya función es la organización del citoplasma, además de ser un componente de las fibras del huso. De esta forma, el  $\text{HgCl}_2$  altera la polimerización de la tubulina, ocasionando la contracción de los cromosomas metafásicos, un retraso en la división del centrómero y un movimiento anafásico más lento.

Por otro lado, el incremento de la temperatura influyó en la aparición de AN y MN en los organismos evaluados. Çava<sup>o</sup> y Ergene-Gözükara (2005), en *Mugil cephalus* registraron durante los meses de verano (28 °C) un mayor número de células con MN (7.05‰), eritrocitos con núcleos *LB* (0.84‰) y *NT* (1.70‰) en comparación con las demás estaciones. Sin embargo, la mayor frecuencia de eritrocitos con núcleos *BN* y *BL* fue en primavera (22 °C) y otoño (20 °C), en contraste con los meses de invierno (14 °C), indicando que los organismos sufren mayor daño en el ADN con la aparición de AN y MN al afrontar un aumento de temperatura. La temperatura óptima para *O. niloticus* se encuentra entre 28 y 31 °C, de modo que, al exceder esta temperatura el organismo requiere mayor energía y, por ende, consume más oxígeno (Tsang y Quintanilla, 2008). Asimismo, se ha comprobado que los cambios en la temperatura alteran los componentes lipídicos de las células sanguíneas, además de modificar la fluidez de la membrana, el entorno de proteínas y las interacciones proteína-lípido de los eritrocitos en animales poiquiloterms (Dey *et al.*, 1993; Avrova, 1999).

Además, se pudo evidenciar que la temperatura produjo un aumento del efecto genotóxico de  $\text{HgCl}_2$ , semejante a lo descrito por Guilherme *et al.* (2008) que evaluaron AN en *Liza aurata* cultivada con Hg, quienes encontraron que en el verano (23-27.7 °C) y otoño (18.5-20.2 °C), las células

con núcleos se incrementaron frente a los meses de invierno y primavera. Asimismo, Waheed *et al.* (2020) mencionaron que el incremento de la temperatura en un medio acuático genera un mecanismo acelerado en las branquias, de este modo, los contaminantes o sustancias químicas tóxicas disueltas (Hg) ingresan con facilidad al tejido del pez. La toxicidad de los metales en los organismos aumenta en proporción al incremento de la temperatura, al acelerar el mecanismo toxicológico (Cairns *et al.*, 1975; Heugens *et al.*, 2001; Khan *et al.*, 2006).

Finalmente, se observó que la tasa de mortalidad se incrementa a medida que aumenta la concentración del  $\text{HgCl}_2$  al que fueron sometidos los organismos evaluados. Esto podría atribuirse al efecto inmunosupresor del Hg en *O. niloticus*, lo que genera respuestas como leucocitosis, neutrofilia y linfopenia (El-Boshy y Taha, 2011). De igual manera, Amend *et al.* (1969) observaron que la mortalidad tenía relación con la necrosis y separación epitelial de las branquias. Similar a lo expresado por Muñoz-Escobar y Palacio-Baena (2010), quienes demostraron que, la mortandad de las larvas aumentaba según la concentración, como se dio en ejemplares *Dendrosophus bogerti*, las cuales alcanzaron un total de 5% al estar cultivados a 0.08 mg L<sup>-1</sup> de  $\text{HgCl}_2$ , a 20 °C.

## CONCLUSIONES

- El incremento de temperatura provocó una variación en la concentración letal media de cloruro de mercurio ( $\text{HgCl}_2$ ), donde los resultados de  $\text{CL}_{50}$  para  $\text{HgCl}_2$  obtenidos para 28 °C fueron menores a los valores de  $\text{CL}_{50}$  a 32 °C.
- El aumento de la temperatura generó un incremento en la genotoxicidad del  $\text{HgCl}_2$  en los eritrocitos de *Oreochromis niloticus*, produciendo mayor frecuencia de anormalidades nucleares (AN) y micronúcleos (MN).

## Agradecimiento

A la Universidad Científica del Sur (CIENTIFICA) por el financiamiento parcial a través del «Fondo Semilla 2018» (R.D. N.º 02 - DGIDI-CIENTIFICA-2017), y a la Coordinación de Laboratorios de Ciencias Naturales de CIENTIFICA por haber brindado los equipos, materiales y ambientes necesarios para la ejecución de la investigación.

## LITERATURA CITADA

1. **Amend D, Yasutake W, Morgan R. 1969.** Some factors influencing susceptibility of rainbow trout to the acute toxicity of an ethyl mercury phosphate formulation (Timsan). *T Am Fish Soc* 98: 419-425. doi: 10.1577/1548-8659(1969)-98[419:SFISOR]2.0.CO;2
2. **Al-Sabti K, Metcalfe C. 1995.** Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutat Res-Gen Tox En* 343: 121-135. doi: 10.1016/0165-1218(95)90078-0
3. **Ávila F, Looor J. 2018.** Niveles de mercurio en peces *Oreochromis niloticus* (tilapia) del Embalse la Esperanza del Cantón Bolívar. Tesis de Ingeniero en Medio Ambiente. Calceta: Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López. 50 p.
4. **Avrova N. 1999.** Biochemical mechanisms of the adaptation in vertebrate to the changing environment: the role of lipids. *Zh Evol Biokhim Fiziol* 35: 170-180.
5. **Ayllon F, García-Vázquez E. 2000.** Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in European minnow *Phoxinus phoxinus* and mobile *Poecilia latipinna*: an assessment of the fish micronucleus test. *Mutat Res* 467: 177-186. doi: 10.1016/S1383-5718(00)00033-4
6. **Azaza M, Dhraïef M, Kraïem M 2008.** Effects of water temperature on growth and sex ratio of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus) reared in geothermal waters in southern Tunisia. *J Therm Biol* 33: 98-105. doi: 10.1016/j.jtherbio.2007.05.007
7. **Bates B, Kundzewicz Z, Wu S. 2008.** Climate change and water. Technical paper of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Geneva: IPCC Secretariat. 210 p.
8. **Brown AH Jr, Johnson ZB, Chewing JJ, Brown CJ. 1988.** Relationships among absolute growth rate, relative growth rate and feed conversion during postweaning feedlot performance tests. *J Anim Sci* 66: 2524-2529. doi: 10.2527/jas1988.66102524x
9. **Cairns J, Heath A, Parker B. 1975.** The effects of temperature upon the toxicity of chemicals to aquatic organisms. *Hydrobiologia* 47: 135-171. doi: 10.1007/BF00036747
10. **Carrasco K, Tilbury K, Myers M. 1990.** Assessment of the piscine micronucleus test as an *in situ* biological indicator of chemical contaminant effects. *Can J Fish Aquat Sci* 47: 2123-2136. doi: 10.1139/f90-237
11. **Çava° T, Ergene Gözükkara S. 2005.** Micronucleus test in fish cells: a bioassay for *in situ* monitoring of genotoxic pollution in the marine environment. *Environ Mol Mutagen* 46: 64-70. doi: 10.1002/em.20130
12. **De la Vega E. 2018.** Contaminación de mercurio en atún y otros peces pelágicos por causa del hombre. Fundación Pesca Limpia. [Internet]. Disponible en: <https://todosobreelatlun.com/wp-content/uploads/2018/03/Mercurio-y-Atn-Enrique-De-La-Vega.pdf>
13. **Dey I, Szegletes T, Buda C, Nemcsok J, Farkas T. 1993.** Fish erythrocytes as a tool to study temperature induced responses in plasma membranes. *Lipids* 28: 743-746. doi: 10.1007/BF02535997
14. **El-Sherif M, El-Feky A. 2009.** Performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings. II. Influence of different water temperatures. *Int J Agric Biol* 11: 1814-9596.
15. **El-Boshy M, Taha R. 2011.** Effects of mercuric chloride on the immunological, hematological, biochemical parameters

- and diseases resistance of Nile Tilapia challenged with *Aeromonas hydrophila*. *Nat Sci* 9: 7-15.
16. **García-Estrada G, López-Hernández A, Prol-Ledesma R. 2001.** Temperature-depth relationships based on log data from the Los Azufres geothermal field, Mexico. *Geothermics* 30: 111-132. doi: 10.1016/S0375-6505(00)00039-0
  17. **Grisolia C. 2002.** A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomycin C and various pesticides. *Mutat Res-Gen Tox En* 518: 145-150. doi: 10.1016/S1383-5718(02)00086-4
  18. **Gómez L, Larduet Y, Abrahantes N. 2001.** Contaminación y biodiversidad en ecosistemas acuáticos. El fitoplancton de la bahía de Santiago de Cuba. *Rev Invest Mar* 22: 191-197.
  19. **Guilherme S, Válega M, Pereira M, Santos M, Pacheco M. 2008.** Erythrocytic nuclear abnormalities in wild and caged fish (*Liza aurata*) along an environmental mercury contamination gradient. *Ecotox Environ Safe* 70: 411-421. doi: 10.1016/j.ecoenv.2007.08.016
  20. **Heugens E, Hendriks A, Dekker T, Straalen N, Admiraal W. 2001.** A review of the effects of multiple stressors on aquatic organisms and analysis of uncertainty factors for use in risk assessment. *Crit Rev Toxicol* 31: 247-284. doi: 10.1080/20014091111695
  21. **Holmstrup M, Bindsbol A, Oostingh G, Duschl A, Scheil V, Köhler H, Loureiro S, et al. 2010.** Interactions between effects of environmental chemicals and natural stressors: a review. *Sci Total Environ* 408: 3746-3762. doi: 10.1016/j.scitotenv.2009.10.067
  22. **Hopkins K. 1992.** Reporting fish growth: a review of the basics 1. *World Aquac Soc* 23: 173-179. doi: 10.1111/j.1749-7345.1992.tb00766.x
  23. **Ishikawa N, Ranzani-Paiva M, Lombardi J. 2007.** Acute toxicity of mercury (HgCl<sub>2</sub>) to Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Bol Inst Pesca* 33: 99-104.
  24. **Jasim M, Sofian-Azirun M, Yusoff I, Rahman M. 2016.** Bioaccumulation and histopathological changes induced by toxicity of mercury (HgCl<sub>2</sub>) to tilapia fish *Oreochromis niloticus*. *Sains Malays* 45: 119-127.
  25. **Khan M, Ahmed S, Catalin B, Khodadoust A, Ajayi O, Vaughn M. 2006.** Effect of temperature on heavy metal toxicity to juvenile crayfish, *Orconectes immunis* (Hagen). *Environ Toxicol* 21: 513-520. doi: 10.1002/tox.20213
  26. **Mariluz A. 2015.** Evaluación de los parámetros productivos y de calidad de agua en el cultivo de tilapia *Oreochromis niloticus* en sistemas de recirculación cerrada en laboratorio. Callao, Perú: Universidad Nacional del Callao. [Internet]. Disponible en: <http://hdl.handle.net/20.500.12952/1000>
  27. **Matsumoto F, Cólus I. 2000.** Micronucleus frequencies in *Astyanax bimaculatus* (Characidae) treated with cyclophosphamide or vinblastine sulfate. *Genet Mol Biol* 23: 489-492. doi: 10.1590/S1415-47572000000200041
  28. **Muñoz-Escobar E, Palacio-Baena J. 2010.** Efectos del cloruro de mercurio (HgCl<sub>2</sub>) sobre la sobrevivencia y crecimiento de renacuajos de *Dendrosophus bogerti*. *Actual Biol* 32: 189-197.
  29. **Naranjo - Gómez J, Cardona F, García F, Ramírez K, Morales J, Barragán I. 2014.** Efectos inmunotoxicológicos e histopatológicos de la exposición a concentraciones subletales de cloruro de mercurio (HgCl<sub>2</sub>) en Cachama blanca (*Piaractus brachy-pomus*). *Rev Ces Med Vet Zootec* 9: 26-42.
  30. **Nervárez-Rodríguez M, López M, Quezada L. 2013.** Metales pesados en peces de las presas del municipio de Chihuahua durante las estaciones del año. En: IV Congreso Internacional de Docencia e Investigación en Química. México. Universidad Autónoma Metropolitana.

31. **Nirchio M, Choco O, Quizhpe P, Hernández J, Oliveira C. 2019.** Genotoxic effects of mercury chloride on the neotropical fish *Andinoacara rivulatus* (Cichlidae: Cichlasomatini). *Rev Biol Trop* 67: 745-754. doi: 10.15517/rbt.v67i4.34133
32. **Noyes P, McElwee M, Miller H, Clark B, Van Tiem L, Walcott K, Erwin K, Levin E. 2009.** The toxicology of climate change: environmental contaminants in a warming world. *Environ Int* 35: 971-986. doi: 10.1016/j.envint.2009.02.006
33. **Oze G, Oze R, Anunuso C, Ogukwe C, Nwanjo N, Okorie K. 2006.** Heavy metal pollution of fish of Qua-Iboe river estuary: possible implications for neurotoxicity. *Int J Toxicol* 3: 56-59. doi: 10.5580/2903
34. **Pandit N, Nakamura M. 2010.** Effect of high temperature on survival, growth, and feed conversion ratio of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Our Nature* 8: 219-224. doi: 10.3126/on.v8i1.4331
35. **Pajares E. 2014.** Políticas públicas y cambio global: una prospectiva del cambio climático en la Amazonía Andina, Lima, Perú: Oxfam América. 146 p.
36. **Peñaloza M, Camargo M, Palacio J. 2003.** Genotoxicidad del cloruro de mercurio en dos especies ícticas (*Prochilodus magdalenae* y *Oreochromis* sp.). *Actu Biol* 25: 105-111.
37. **Prieto Z, León-Incio J, Quijano-Jara C, Fernández R, Polo-Benites E, Vallejo-Rodríguez R, Villegas-Sánchez L. 2008.** Efecto genotóxico del dicromato de potasio en eritrocitos de sangre periférica de *Oreochromis niloticus* (tilapia). *Rev Peru Med Exp Salud Pública* 25: 51-58.
38. **Raissy M. 2013.** Determination of mercury in some freshwater fish species from Chahrmahal va Bakhtyari Province, Iran, and potential limits for human consumption. *B Environ Contam Tox* 91: 667-672. doi: 10.1007/s00128-013-1118-0
39. **Reglamento del Comité Institucional de Ética en Investigación con Animales y Biodiversidad. Universidad Científica del Sur. 2017.** 14 p. [Internet]. Disponible en: [https://www.cientifica.edu.pe/sites/default/files/reglamento\\_del\\_comite\\_inst\\_etica\\_en\\_inves\\_con\\_animales\\_y\\_biod.pdf](https://www.cientifica.edu.pe/sites/default/files/reglamento_del_comite_inst_etica_en_inves_con_animales_y_biod.pdf)
40. **Rocha C, Cunha L, Pinheiro R, Bahia M, Burbano R. 2011.** Studies of micronuclei and other nuclear abnormalities in red blood cells of *Colossoma macropomum* exposed to methylmercury. *Genet Mol Biol* 34: 694-697. doi: 10.1590/S1415-47572011000400024
41. **Rodrigues A, Maciel P, Silva L, Leite J, Ferreira A, Gomes V, Linde-Arias A, et al. 2017.** Chronic effects of methylmercury on *Astronotus ocellatus*, an Amazonian fish species. *J Aquat Pollut Toxicol* 1: 1-14.
42. **Rodríguez-Cea A, Ayllon F, García-Vázquez E. 2003.** Micronucleus test in freshwater fish species: an evaluation of its sensitivity for application in field surveys. *Ecotox Environ Safe* 56: 442-448. doi: 10.1016/S0147-6513(03)00073-3
43. **Rojas L, Mata C, Oliveros A, Salazar-Lugo R. 2013.** Histología de branquias, hígado y riñón de juveniles del pez neotropical *Colossoma macropomum* (Characiformes, Characidae) expuesto a tres temperaturas. *Rev Biol Trop* 61: 797-806.
44. **Salazar-Lugo R, León A, Lemus M. 2009.** Efecto del cadmio y de la temperatura sobre el conteo de células sanguíneas del pez dulceacuícola *Colossoma macropomum*. *Rev Cient (Maracaibo)* 19: 7-14.
45. **Santamaría W, Mora-Romero C, Escobar-Buitrago P, Casallas P, Santamaría Y. 2012.** Inducción de micronúcleos y otras anomalías nucleares en *Astyanax gr. bimaculatus* (Pisces: Characidae) expuestas a fenantreno. *Orinoquia* 16: 237-247.

46. **Tamaru C, Cole B, Bailey R, Brown C, Ako H. 2001.** A manual for commercial production of the swordtail, *Xiphophorus helleri*. Center for Tropical and Subtropical Aquaculture. 20 p. [Internet]. Available in: [http://www.ctsa.org/files/publications/CTSA\\_-1286316728616527475841.pdf](http://www.ctsa.org/files/publications/CTSA_-1286316728616527475841.pdf)
47. **Tapia F. 2017.** Interacción de temperatura y clorpirifos (PYRINEX®) sobre la estabilidad genética de *Poecilia reticulata* «Gupi». Tesis de Biólogo. Lima, Perú: Univ. Nacional Mayor de San Marcos. 73 p.
48. **Thier R, Bonacker D, Stoiber T, Böhm K, Wang M, Unger E, Bolt H, Degen G. 2003.** Interaction of metal salts with cytoskeletal motor protein systems. *Toxicol Lett* 140: 75-81. doi: 10.1016/S0378-4274(02)00502-7
49. **Tsai S, Boush G, Matsumura F. 1975.** Importance of water pH in accumulation of inorganic mercury in fish. *B Environ Contam Tox* 13:188-193. doi: 10.1007/BF01721736
50. **Tsang S, Quintanilla M. 2008.** Manual sobre reproducción y cultivo de tilapia. El Salvador: Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG), CENDEPESCA. 64 p.
51. **Vallee B, Ulmer D. 1972.** Biochemical effects of mercury, cadmium, and lead. *Annu Rev Biochem* 41: 91-128. doi: 10.1146/annurev.bi.41.070172.000515
52. **Vargas P. 2009.** El cambio climático y sus efectos en el Perú. Lima, Perú: Banco Central de Reserva del Perú. 59 p.
53. **Waheed R, El Asely A, Bakery H, El-Shawarby R, Abuo-Salem M, Abdel-Aleem N, Malhat F, et al. 2020.** Thermal stress accelerates mercury chloride toxicity in *Oreochromis niloticus* via up-regulation of mercury bioaccumulation and HSP70 mRNA expression. *Sci Total Environ* 718: 137326. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.137326
54. **Weinberg J. 2007.** Introducción a la contaminación por mercurio para las ONG. Lima, Perú: Instituto Peruano de Energía Nuclear – IPEN. 166 p.
55. **Workagegn K. 2012.** Evaluation of growth performance, feed utilization efficiency and survival rate of juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) reared at different water temperature. *Aquacult Int* 2: 59-64. doi: 10.5376/ija.2012.02.0009