

NanoZebra: de la edad de piedra a la edad nano y cómo un pez puede ayudarnos a navegar por ellas

NanoZebra: From the stone age to the nano age and how a fish can help us navigate through them

Enrique Salas Vidal,^{*1} Denhi Schnabel Peraza*

ABSTRACT: Throughout the history of humanity, the discovery and use of materials has been an engine for the advancement of societies that have managed to take advantage of them. However, they have also represented emerging risks for health and the degradation of the environment due to the properties of the materials. In the present article a brief recount of this history is made from the stone age to the present day, as well as the value that the use of different models of organisms and in particular the zebrafish in the evaluation of toxicity as one of the fundamental aspects of studying the effects of nanomaterials.

KEYWORDS: zebrafish, nanomaterials, toxicity.

RESUMEN: A lo largo de la historia de la humanidad el descubrimiento y uso de materiales ha sido un motor para el avance de las sociedades que han logrado aprovecharlos. Sin embargo, también han representado riesgos emergentes para la salud y la degradación del medio ambiente debido a las propiedades de los materiales. En el presente artículo se hace un breve recuento de esta historia desde la edad de piedra hasta nuestros días, así como del valor que ha tenido el uso de diferentes modelos de organismos y en particular el pez cebra en la evaluación de la toxicidad como uno de los aspectos fundamentales de estudio de los efectos de los nanomateriales.

PALABRAS CLAVE: pez cebra, nanomateriales, toxicidad.

Introducción

La historia de la humanidad parecería estar definida principalmente por personajes que dieron forma a tradiciones religiosas, escuelas filosóficas, escuelas del conocimiento científico o bien porque lograron conquistar vastos territorios a través de largas campañas de invasiones que fueron registrados por su relevancia y cuyos legados aún ejercen una enorme influencia en la humanidad.

Recibido: 10 de enero de 2018.

Aceptado: 30 de abril de 2018.

* Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biotecnología, Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular. Cuernavaca, Morelos, México.

¹ Autor para correspondencia: (esalas@ibt.unam.mx).

Tradicionalmente la mayoría de las clases de historia en las escuelas, e incluso los textos en los que se sustentan, terminan por ser recuentos de temas y personajes “relevantes”. Sin embargo, los procesos históricos son sumamente complejos y requieren de un análisis más integral que nos permita llegar a tener cierto grado de entendimiento no solo del pasado, sino también del presente (Roberts, 2013). Hay elementos en los que habitualmente no se hace hincapié en muchos textos de historia, pero, no obstante, han sido de una relevancia indudable para la humanidad. Nos referimos en particular al descubrimiento y uso de materiales diversos con un papel definitorio en el destino de las sociedades que lograron utilizarlos. Algunos vestigios de estos materiales han perdurado hasta nuestros días e incluso han sido utilizados como referencia para describir o clasificar las primeras etapas o periodos de la prehistoria de la humanidad. De estas etapas, buena parte de lo que llegó a subsistir son herramientas o utensilios de la vida cotidiana fabricadas inicialmente con piedra, y, en etapas más avanzadas de la civilización, elaboradas con bronce y hierro.

Hoy en día podría parecer un poco primitiva la manera en cómo se llegaron a clasificar estas “edades” de la prehistoria de la humanidad denominadas: Edad de Piedra, de Bronce y de Hierro. Pero, tomemos en cuenta que estas primeras aproximaciones parecen haberse inspirado originalmente en el libro *De la naturaleza de las cosas* escrito por el filósofo romano Tito Lucrecio Caro hace más de dos mil años. A lo largo del tiempo esta forma de clasificación continuó utilizándose siendo formalizada por el anticuario y arqueólogo danés Christian Jürgensen Thomsen,¹ pudiéndose encontrar este tipo de clasificaciones aún en textos modernos.

Las primeras culturas recurrieron a materiales que encontraban en la naturaleza

Deseamos resaltar en el presente texto que los materiales empleados para confeccionar los diferentes utensilios, y que resistieron al paso del tiempo, abrieron una ventana al pasado por medio de la cual podemos darnos una idea tanto de las técnicas requeridas como de las habilidades particulares alcanzadas por diferentes culturas para aprovechar estos elementos (Tenner, 2009). Las primeras culturas recurrieron inicialmente a materiales encontrados en la naturaleza, logrando modificaciones mínimas en su composición comparativamente a lo que ocurre actualmente, pero mayores en cuanto a la forma de su fabricación y así producir herramientas de uso cotidiano importantes en la caza de sus alimentos para su subsistencia, así como para la recolección durante el periodo conocido como Edad de Piedra, en el cual, las comunidades primitivas lograron avances tecnológicos importantes per-

¹ https://en.wikipedia.org/wiki/Christian_J%C3%BCrgensen_Thomsen

mitiéndoles, eventualmente, desarrollar la ganadería y la agricultura. Con el tiempo, lograron obtener diferentes minerales a partir de fuentes naturales como el cobre, utilizado más adelante, en la Edad de Bronce, para generar aleaciones, y, mucho tiempo después, para aprovechar el hierro en la fabricación de acero durante la Edad de Hierro. Estos materiales junto con los avances científicos y las diferentes tecnologías alcanzadas moldearon la vida y la cultura de las comunidades humanas que las aprovecharon (American Chemical Society, 2017). Sin embargo, a lo largo de este camino de innovación y descubrimiento, los nuevos materiales que permitieron la fabricación de diferentes herramientas representaron, al mismo tiempo, nuevos riesgos para la salud de las personas que las producían. Algunos de ellos tuvieron su origen desde el descubrimiento de los primeros materiales como ocurrió con el desarrollo del bronce. Antiguamente, el bronce fue utilizado para la fabricación de utensilios, armas, monedas y joyas. Durante la Edad de Bronce la aleación para trabajarlo se realizaba con arsénico, tanto en el viejo mundo como en lo que ahora es el continente americano por algunas culturas precolombinas. Desafortunadamente, el uso del arsénico hace al proceso de fabricación del bronce altamente tóxico, pues el arsénico provoca un severo daño en los vasos sanguíneos desembocando en el desarrollo de gangrena en las extremidades, lo que se conoce como: “enfermedad del pie negro”. Eventualmente el arsénico fue remplazado por estaño, que es menos tóxico para la fabricación de bronce (Idrovo, 2005). El bronce en la actualidad se fabrica como una aleación de cobre con estaño principalmente.

Por supuesto, también otros metales han tenido un papel muy relevante en la fabricación de diferentes objetos de importancia en diversas culturas. Un ejemplo es el plomo, uno de los metales más extraídos a partir de yacimientos naturales, razón por la cual también es uno de los más liberados al ambiente a lo largo de la historia. Los depósitos naturales de plomo contienen también plata, mineral de alto valor económico y debido al desarrollo del proceso de extracción de la plata conocido como copelación, utilizado de forma dominante por cerca de 5,000 años, se ha contribuido enormemente a la liberación de plomo al medio ambiente (Nriagu, 1998). El plomo también se ha utilizado para la fabricación de objetos como tablillas para escribir, cañerías, bañeras o en forma de láminas para el recubrimiento de techos, entre otros.² Desafortunadamente, el plomo es muy tóxico y hay periodos de la historia de la humanidad en los que pudo haber contribuido a la caída de imperios, como probablemente ocurrió con el Imperio romano. Durante este último, una de las enfermedades pandémicas fue la gota, causada por la acumulación de ácido úrico debido a fallas en la actividad de los riñones. Algunos tipos de gota pueden ser provocados por la ingesta de plomo, el cual fue muy abundante en el vino romano pues las vasijas en las

² <https://es.wikipedia.org/wiki/Plomo>

que era elaborado se fabricaban con plomo y no con bronce o latón por el desagradable sabor que dejaban los óxidos que se forman con estas aleaciones (Nriagu, 1983).

Aparición de productos derivados de procesos químicos y físicos

Sin embargo, no sólo los materiales más simples o las materias primas (como los metales) son relevantes, también los productos derivados de procesos químicos y físicos por medio de los cuales se generan nuevos materiales han tenido consecuencias importantes para la humanidad y el medio ambiente.

Un ejemplo reciente es el caso de los polímeros sintéticos o del plástico. En 1870, John Wesley Hyatt junto con su hermano Isaiah lograron fabricar un novedoso material al que llamaron celuloide para remplazar al cada vez más escaso marfil obtenido de los elefantes africanos y asiáticos, ampliamente utilizado en la época para la elaboración de bolas de billar, entre muchos otros utensilios distintivos de las clases acomodadas (Powers, 1993). Más adelante se desarrollaron una gran variedad de polímeros plásticos, cuyo impacto positivo en la vida diaria de las sociedades modernas es innegable, pero, por otro lado, con consecuencias altamente negativas: anualmente millones de toneladas de plásticos que no se reciclan terminan contaminando el planeta (Plastics Europe, 2015).

En la actualidad, cantidad de compuestos químicos diferentes son utilizados comercialmente, su número se ha vuelto prácticamente incalculable, sin embargo, tan solo entre los Estados Unidos de América y los países europeos, el número de compuestos utilizados en los diversos procesos industriales alcanza entre 75,000 y 140,000, de los cuales no se conocen, en la mayoría de los casos, los posibles efectos ambientales y en la salud humana que pueden provocar (Judson *et al.*, 2009). De este universo de compuestos, un grupo que ha alcanzado gran auge en años recientes son los llamados nanomateriales.

El nacimiento conceptual de la nanotecnología puede ubicarse en el año de 1959, en particular con la conferencia: *There's plenty of room at the bottom*,³ dictada por Richard Feynman en la reunión de la Sociedad Americana de Física (Feynman, 1960). En esa conferencia Feynman sugirió la posibilidad de generar y aplicar productos de dimensiones nanométricas. Años después, con el desarrollo de diferentes tecnologías como el microscopio de efecto túnel, con resolución subnanométrica (Eigler y Schweizer, 1990), el descubrimiento y la preparación de algunos de los primeros nanomateriales basados en carbono (Iijima, 1991), como los fullerenos (moléculas compuestas de carbono de formas diferentes que pueden llegar a tener estructuras muy complejas),

³ Hay mucho espacio en el fondo.

ha tenido un auge espectacular el desarrollo de nanomateriales —los cuales son, en alguna de sus dimensiones, menores a los 100 nanómetros—. Este tipo de materiales ha cobrado gran interés debido a sus características fisico-químicas únicas, por lo que tienen aplicaciones novedosas en campos tan diversos como la medicina, la electrónica, y la aeronáutica, entre muchas otras áreas. Todo este tipo de aplicaciones parecerían muy ajenas a nuestra vida diaria, empero el uso de nanomateriales se ha extendido muchísimo, ya para el año 2012 se estimaba el uso de materiales nano estructurados en más de mil productos comerciales (Papp, 2008; McIntyre, 2012). Con los nanomateriales ha ocurrido un proceso similar al de otros elementos descubiertos o inventados en el pasado: lamentablemente, se ha encontrado que algunos de estos compuestos representan riesgos importantes para la salud humana (Mu *et al.*, 2014) y para el medio ambiente en general (Colvin, 2003).

Evaluación de los compuestos químicos para caracterizar sus efectos en la salud y el medio ambiente

La pregunta natural que surge es ¿cómo podemos evaluar de forma adecuada la gran cantidad de compuestos químicos a los cuales no vemos expuestos diariamente y caracterizar sus efectos potencialmente adversos para la salud y el medio ambiente? La respuesta o más bien dicho, las estrategias para llevar a cabo este tipo de evaluaciones tienen sus orígenes en los antiguos griegos, los primeros en dejar registros escritos sobre el uso de organismos vivos y en particular de animales para realizar experimentos en la forma de vivisecciones o cirugías exploratorias en estudios anatómicos (Franco, 2013). Siglos más tarde, el uso de diferentes especies animales en la investigación biomédica aumentó a partir del siglo veinte de nuestra era, y continúan siendo de gran utilidad para la evaluación de una gran variedad de compuestos. Cabe resaltar que en años recientes se han incrementado los esfuerzos para reducir el número de animales utilizados en las evaluaciones toxicológicas y en la investigación biomédica, además de buscar remplazos y formas de refinar los estudios como alternativas aceptables al uso de organismos vivos en la investigación (Russell, 2005; Liebsch *et al.*, 2011). En este sentido, el organismo que ha cobrado gran auge para diferentes tipos de estudios es el pez cebra, o *Danio rerio* por su nombre científico, originario de la India y de la región de los Himalayas que comparte con países vecinos (Spence *et al.*, 2008). Este pez fue introducido a Europa en 1905 para su venta en acuarios y desde un inicio fue un éxito inmediato entre los aficionados debido a que es fácil que crezca y se reproduzca en cautiverio (Creaser, 1934). Algunos años después comenzó a usarse como modelo animal en la investigación científica y en la docencia, publicándose algunos de los primeros trabajos científicos en los años treinta del siglo pasado (Goodrich y Nichols, 1931; Roosen-Runge, 1938). Desde un inicio se reconocieron en estos peces características que aun hasta nuestros días representan grandes ventajas para su uso en el laboratorio.

rio; por ejemplo, una sola hembra sexualmente madura puede liberar en pocos minutos hasta 95 huevos que son fecundados por un macho de manera casi inmediata, lo cual inicia el desarrollo embrionario que ocurre con gran celeridad, puesto que larvas de peces “nacen” 5 días después del inicio de su desarrollo al liberarse de la estructura que los protegió (el corion, que es un equivalente al cascarón de los huevos de pollo). El tamaño de los embriones es muy conveniente (poco menos de 1mm de diámetro) para ser manipulados bajo el microscopio lo cual, aunado a su transparencia y a su velocidad de desarrollo, facilita la experimentación con estos organismos (Creaser, 1934).

Actualmente se cuenta con la secuencia del genoma del pez cebra el cual mostró que 71% de los genes presentes en el genoma humano tienen un equivalente en el pez cebra y aproximadamente del total de genes que en humanos se han vinculado con algún tipo de enfermedad con bases genéticas 81% de éstos presentan un homólogo en el pez cebra (Howe *et al.*, 2013). Estas características junto con la facilidad y al bajo costo con que se pueden mantener a las colonias de peces cebra han favorecido que se establezca como un modelo importante en la investigación. Su relevancia ha llevado a la generación de protocolos estandarizados para el uso de embriones de pez cebra para ensayos de pruebas de toxicidad, ensayo conocido como FET test, desarrollado por la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE). En la actualidad, ensayos de este tipo son utilizados en países como Alemania, Inglaterra, Canadá, Estados Unidos de Norteamérica y Japón, para evaluar muestras de agua proveniente de plantas de tratamiento de aguas residuales que son desechadas de ciudades e industrias (Embry *et al.*, 2010). También se ha utilizado a los peces cebra en la evaluación del efecto biológico de nanomateriales que contienen diferentes elementos como el oro, plata, aluminio, cobre, cerio, fierro, níquel, titanio, zinc así como otros elementos no metálicos como el carbono, selenio y el silicón (Shaw y Handy, 2011). Los efectos reportados en la supervivencia de embriones, larvas y adultos de peces cebra, o en el desarrollo embrionario es muy variado e incluso contradictorio (Shaw y Handy, 2011; Brundo *et al.*, 2016), por lo que aún falta mucho para llegar a conocer a fondo los efectos que tienen los diferentes nanomateriales en los sistemas biológicos. Algunos factores que se han considerado como potencialmente responsables de las diferencias en los efectos observados son las variaciones en el tamaño, en la estructura y en la aglomeración de estos compuestos que se generan desde la síntesis de los nanomateriales; también se ha visto que el tipo de vehículo utilizado para la exposición al nanomaterial e incluso la manera de prepararlo para dispersarlo y mantenerlo en suspensión, que generalmente se lleva a cabo por sonicación, puede provocar cambios en los nanomateriales debido a la formación de radicales reactivos (Taurozzi *et al.*, 2011; Soares *et al.*, 2017).

Todos estos efectos han considerado únicamente lo que ocurre dentro de condiciones controladas de laboratorio; sin embargo, muchos autores han propuesto que el comportamiento de los nanomateriales al ser liberados al

FIGURA 1. Pez cebra.



medio ambiente, puede ser diferente y presentar efectos no considerados o identificados. Se han realizado pruebas con nanomateriales de dióxido de titanio y de plata en donde se simula lo que ocurre cuando hay exposición a la luz del sol, encontrando que en estas condiciones se provoca un aumento en la toxicidad en células en cultivo y en embriones de pez cebra al exponerse a nanomateriales en estas condiciones (George *et al.*, 2014). De hecho, se sabe que diferentes nanomateriales pueden interactuar con otros compuestos en el medio ambiente, tanto naturales como con compuestos químicos provenientes de actividades domésticas e industriales (Wang *et al.*, 2016), e incluso con diferentes macromoléculas presentes en los organismos vivos en el medio ambiente (Bourgeault *et al.*, 2017; Mboyi *et al.*, 2017). Claro está que las aplicaciones de los nanomateriales en una gran diversidad de áreas, como la generación de vehículos para vacunas (Dubey *et al.*, 2016), o para encapsular moléculas con actividad antitumoral y mejorar su permeabilidad y estabilidad (Evensen *et al.*, 2016) o bien en el desarrollo de tecnologías para la manipulación de células o estructuras celulares dentro de organismos completos (Johansen *et al.*, 2016) muestran que también nos pueden aportar grandes beneficios para la sociedad en general.

Por lo anterior, tanto los beneficios como los riesgos de los nanomateriales deben ser evaluados de forma constante y rigurosa, aprovechando el gran capital intelectual de diferentes grupos de investigación en áreas diversas, así como la infraestructura que han logrado establecer en las instituciones de educación superior, en centros de investigación y empresas localizadas a lo largo y ancho del país. Determinar la seguridad del uso de nanomateriales presentes en objetos con los que interactuamos es indispensable para tener un desarrollo responsable y sustentable de la nanotecnología. Al día de hoy, no hay evidencia contundente de que los nanomateriales causen efectos deletéreos en la salud del ser humano; no obstante, se sabe

por experimentos *in vitro* e *in vivo* que uno de los efectos que llegan a tener diferentes nanomateriales es promover la acumulación de especies de oxígeno reactivas y promover la inflamación en diferentes tejidos, lo cual podría llegar a causar efectos adversos en la salud.

En el laboratorio nos hemos interesado en estudiar la importancia de las especies de oxígeno reactivas (EORS) en el desarrollo embrionario normal del pez cebra; de este modo, hemos determinado la presencia de enzimas encargadas de producir EOR como las NADPH oxidasas, así como enzimas encargadas de metabolizar las EOR, como las glutatión peroxidadasas, durante el desarrollo embrionario del pez cebra. Sabemos que es necesario una regulación fina de la producción y la remoción de las EOR lo que genera un balance para que se lleve a cabo el desarrollo embrionario correctamente; este conocimiento y las metodologías que hemos establecido a lo largo de muchos años de experiencia en nuestros trabajos de investigación nos permite ahora comenzar a evaluar el efecto que pueden llegar a tener diferentes nanomateriales en el balance de las EOR durante el desarrollo embrionario en el modelo animal del pez cebra, por medio del cual esperamos poder determinar con mayor certeza en el futuro cercano los efectos de diferentes nanomateriales a los que cada vez nos encontramos expuestos con mayor frecuencia.

Referencias

- American Chemical Society. (2017). Man and materials through History. En: National Historic Chemical Landmarks.
- Bourgeault, A., Legros, V., Gonnet, F., Daniel, R., Paquirissamy, A., Benatar, C., Spalla, O., Chaneac, C., Renault, J. P., Pin, S. (2017). Interaction of TiO₂ nanoparticles with proteins from aquatic organisms: the case of gill mucus from blue mussel. *Environmental science and pollution research international*, 24: 13474-13483. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-8801-3>
- Brundo, M. V., Pecoraro, R., Marino, F., Salvaggio, A., Tibullo, D., Saccone, S., Bramanti, V., Buccheri, M. A., Impellizzeri, G., Scuderi, V., Zimbone, M., Privitera, V. (2016). Toxicity evaluation of new engineered nanomaterials in zebrafish. *Frontiers in physiology*, 7:130. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00130>
- Colvin, V. L. (2003). The potential environmental impact of engineered nanomaterials. *Nature biotechnology*, 21: 1166-1170. <https://doi.org/10.1038/nbt875>
- Creaser, C. W. (1934). The technic of handling the zebra fish (*Brachydanio rerio*) for the production of eggs which are favorable for embryological research and are available at any specified time throughout the year. *Copeia*: 159-161. <https://doi.org/10.2307/1435845>
- Dubey, S., Avadhani, K., Mutalik, S., Sivadasan, S. M., Maiti, B., Girisha, S. K., Venugopal, M. N., Mutoloki, S., Evensen, O., Karunasagar, I., Munang'andu, H. M. (2016). Edwardsiella tarda OmpA encapsulated in chitosan nanoparticles shows superior protection over inactivated whole cell vaccine in orally vacci-

- nated fringed-lipped peninsula carp (*Labeo fimbriatus*). *Vaccines*, 4.
<https://doi.org/10.3390/vaccines4040040>
- Eigler, D. M., Schweizer, E. K. (1990). Positioning single atoms with a scanning tunneling microscope. *Nature*, 344: 524-526. <https://doi.org/10.1038/344524a0>
- Embry, M. R., Belanger, S. E., Braunbeck, T. A., Galay-Burgos, M., Halder, M., Hinton, D. E., Leonard, M. A., Lillicrap, A., Norberg-King, T., Whale, G. (2010). The fish embryo toxicity test as an animal alternative method in hazard and risk assessment and scientific research. *Aquat Toxicol*, 97: 79-87.
<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.12.008>
- Evensen, L., Johansen, P. L., Koster, G., Zhu, K., Herfindal, L., Speth, M., Fenaroli, F., Hildahl, J., Bagherifam, S., Tulotta, C., Prasmickaite, L., Maelandsmo, G. M., Snaar-Jagalska, E., Griffiths, G. (2016). Zebrafish as a model system for characterization of nanoparticles against cancer. *Nanoscale*, 8: 862-877.
<https://doi.org/10.1039/C5NR07289A>
- Feynman, R. P. (1960). There's plenty of room at the bottom. *Engineering and Science*, 2-36.
- Franco, N. H. (2013). Animal experiments in biomedical research: A historical perspective. *Animals: An open access journal from MDPI*, 3: 238-273.
<https://doi.org/10.3390/ani3010238>
- George, S., Gardner, H., Seng, E. K., Chang, H., Wang, C., Yu Fang, C. H., Richards, M., Valiyaveetil, S., Chan, W. K. (2014). Differential effect of solar light in increasing the toxicity of silver and titanium dioxide nanoparticles to a fish cell line and zebrafish embryos. *Environmental science & technology*, 48: 6374-6382.
<https://doi.org/10.1021/es405768n>
- Goodrich, H. B., Nichols, R. (1931). The development and the regeneration of the color pattern in brachydanio rerio. *Journal of Morphology*, 52: 513-523.
<https://doi.org/10.1002/jmor.1050520207>
- Howe, K., Clark, M. D., Torroja, C. F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., Collins, J. E., Humphray, S., McLaren, K., Matthews, L., McLaren, S., Sealy, I., Caccamo, M., Churcher, C., Scott, C., Barrett, J. C., Koch, R., Rauch, G. J., White, S., Chow, W., Kilian, B., Quintais, L. T., Guerra-Assuncao, J. A., Zhou, Y., Gu, Y., Yen, J., Vogel, J. H., Eyre, T., Redmond, S., Banerjee, R., Chi, J., Fu, B., Langley, E., Maguire, S.F., Laird, G.K., Lloyd, D., Kenyon, E., Donaldson, S., Sehra, H., Almeida-King, J., Loveland, J., Trevanion, S., Jones, M., Quail, M., Willey, D., Hunt, A., Burton, J., Sims, S., McLay, K., Plumb, B., Davis, J., Clee, C., Oliver, K., Clark, R., Riddle, C., Elliot, D., Threadgold, G., Harden, G., Ware, D., Begum, S., Mortimore, B., Kerry, G., Heath, P., Phillimore, B., Tracey, A., Corby, N., Dunn, M., Johnson, C., Wood, J., Clark, S., Pelan, S., Griffiths, G., Smith, M., Glithero, R., Howden, P., Barker, N., Lloyd, C., Stevens, C., Harley, J., Holt, K., Panagiotidis, G., Lovell, J., Beasley, H., Henderson, C., Gordon, D., Auger, K., Wright, D., Collins, J., Raisen, C., Dyer, L., Leung, K., Robertson, L., Ambridge, K., Leongamornlert, D., McGuire, S., Gilderthorp, R., Griffiths, C., Manthravadi, D., Nichol, S., Barker, G., Whitehead, S., Kay, M., Brown, J., Murnane, C., Gray, E., Humphries, M., Sycamore, N., Barker, D., Saunders, D., Wallis, J., Bab-

- bage, A., Hammond, S., Mashreghi-Mohammadi, M., Barr, L., Martin, S., Wray, P., Ellington, A., Matthews, N., Ellwood, M., Woodmansey, R., Clark, G., Cooper, J., Tromans, A., Grafham, D., Skuce, C., Pandian, R., Andrews, R., Harrison, E., Kimberley, A., Garnett, J., Fosker, N., Hall, R., Garner, P., Kelly, D., Bird, C., Palmer, S., Gehring, I., Berger, A., Dooley, C. M., Ersan-Urun, Z., Eser, C., Geiger, H., Geisler, M., Karotki, L., Kirn, A., Konantz, J., Konantz, M., Oberlander, M., Rudolph-Geiger, S., Teucke, M., Lanz, C., Raddatz, G., Osogawa, K., Zhu, B., Rapp, A., Widaa, S., Langford, C., Yang, F., Schuster, S. C., Carter, N. P., Harrow, J., Ning, Z., Herrero, J., Searle, S. M., Enright, A., Geisler, R., Plasterk, R. H., Lee, C., Westerfield, M., de Jong, P. J., Zon, L. I., Postlethwait, J. H., Nusslein-Volhard, C., Hubbard, T. J., Roest Crollius, H., Rogers, J., Stemple, D. L. (2013). The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, 496: 498-503.
<https://doi.org/10.1038/nature12111>
- Idrovo, A. J. (2005). Posibles efectos en la salud asociados con la metalurgia precolumbina. *Biomédica*, 25: 295-303.
- Iijima, S. (1991). Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature*, 354: 56-58.
<https://doi.org/10.1038/354056a0>
- Johansen, P. L., Fenaroli, F., Evensen, L., Griffiths, G., Koster, G. (2016). Optical micromanipulation of nanoparticles and cells inside living zebrafish. *Nature communications*, 7: 10974. <https://doi.org/10.1038/ncomms10974>
- Judson, R., Richard, A., Dix, D.J., Houck, K., Martin, M., Kavlock, R., Dellarco, V., Henry, T., Holderman, T., Sayre, P., Tan, S., Carpenter, T., Smith, E. (2009). The toxicity data landscape for environmental chemicals. *Environmental health perspectives*, 117: 685-695. <https://doi.org/10.1289/ehp.0800168>
- Liebsch, M., Grune, B., Seiler, A., Butzke, D., Oelgeschlager, M., Pirow, R., Adler, S., Riebeling, C., Luch, A. (2011). Alternatives to animal testing: Current status and future perspectives. *Archives of toxicology*, 85: 841-858.
<https://doi.org/10.1007/s00204-011-0718-x>
- Mboyi, A. V., Kamika, I., Momba, M. (2017). The ability of consortium wastewater protozoan and bacterial species to remove COD in the presence of nanomaterials under varying pH conditions. *Journal of environmental science and health Part A, Toxic/hazardous substances & environmental engineering*, 52: 697-709.
<https://doi.org/10.1080/10934529.2017.1301744>
- McIntyre, R. (2012). Common nano-materials and their use in real world applications. *Science Progress*, 95: 1-22.
<https://doi.org/10.3184/003685012X13294715456431>
- Mu, Q., Jiang, G., Chen, L., Zhou, H., Fourches, D., Tropsha, A., Yan, B. (2014). Chemical basis of interactions between engineered nanoparticles and biological systems. *Chemical reviews*, 114: 7740-7781.
<https://doi.org/10.1021/cr400295a>
- Nriagu, J. O. (1983). Saturnine gout among Roman aristocrats – Did lead-poisoning contribute to the fall of the Empire. *New Engl J Med*, 308: 660-663.
<https://doi.org/10.1056/NEJM198303173081123>

- Nriagu, J. O. (1998). Tales told in lead (vol. 281, pg. 1622, 1998). *Science*, 282: 51-51.
- Papp, T. S., D., Weiss, D., Castranova, V., Vallyathan, V., Rahman, Q. (2008). Human health implications of nanomaterial exposure. *Nanotoxicology*, 2: 9-27.
<https://doi.org/10.1080/17435390701847935>
- PlasticsEurope. (2015). *Plasticsdthe Facts 2014/2015: An Analysis of European Plastics Production, Demand and Waste Data*. Technical Report. In.
- Powers, V. (1993). *The bakelizer*. American Chemical Society.
- Roberts, J. M. W., O. A. 2013. *The history of the world*. New York: Oxford University Press.
- Roosen–Runge, E. C. (1938). On the early development—bipolar differentiation and cleavage—of the zebra fish, *Brachydanio rerio*. *The Biological Bulletin*, 75: 119-133.
- Russell, W. M. (2005). The three Rs: Past, present and future. *Anim Welf*, 14: 279–286.
- Shaw, B. J., Handy, R. D. (2011). Physiological effects of nanoparticles on fish: A comparison of nanometals *versus* metal ions. *Environment international*, 37: 1083-1097. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2011.03.009>
- Soares, J. C., Pereira, T., Costa, K. M., Maraschin, T., Basso, N. R., Bogo, M. R. (2017). Developmental neurotoxic effects of graphene oxide exposure in zebrafish larvae (*Danio rerio*). *Colloids and surfaces B, Biointerfaces*, 157: 335-346.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.05.078>
- Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C., Smith, C. (2008). The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 83: 13-34. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2007.00030.x>
- Taurozzi, J. S., Hackley, V. A., Wiesner, M. R. (2011). Ultrasonic dispersion of nanoparticles for environmental, health and safety assessment-issues and recommendations. *Nanotoxicology*, 5: 711-729.
<https://doi.org/10.3109/17435390.2010.528846>
- Tenner, E. (2009). *Our own devices: How technology remakes humanity*. Vintage.
- Wang, Z., Zhu, W., Qiu, Y., Yi, X., Von dem Bussche, A., Kane, A., Gao, H., Koski, K., Hurt, R. (2016). Biological and environmental interactions of emerging two-dimensional nanomaterials. *Chemical Society Reviews*, 45: 1750-1780.
<https://doi.org/10.1039/C5CS00914F>

