

Evaluación de genotoxicidad a través de la frecuencia de Micronúcleos en eritrocitos de *Piaractus mesopotamicus* (pacúes) expuestos *in vivo* a nanopartículas de plata

Assessment of genotoxicity by Micronucleus frequency in *Piaractus mesopotamicus* erythrocytes exposed to silver nanoparticles *in vivo*

Davico, Carla¹; Bacchetta, Carla^{2,5}; López, Gerardo³; Cazenave, Jimena^{2,4,5}; Poletta, Gisela^{1,5}; Simoniello, M.Fernanda^{1*}

¹Cát. Toxicología, Farmacología y Bioq. Legal Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas, UNL. Ciudad Universitaria, Santa Fe, Argentina. ²Instituto Nacional de Limnología (CONICET-UNL). Ciudad Universitaria UNL Santa Fe, Argentina (3000). ³Nanotek S.A. ⁴Facultad de Humanidades y Ciencias. Ciudad Universitaria, Santa Fe, Argentina. ⁵Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Av. Rivadavia 1917 (C1033AAJ). Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Argentina.

*fersimoniello@yahoo.com.ar

Recibido: 29 de septiembre de 2015

Aceptado: 5 de octubre de 2015

Resumen. El uso creciente de nanomateriales en productos industriales y de consumo ha incrementado la preocupación mundial respecto a sus posibles efectos adversos en los sistemas biológicos. Como consecuencia de la falta de un marco legislativo y la ausencia de un consenso sobre los protocolos experimentales, las investigaciones ecotoxicológicas se llevan a cabo a un ritmo mucho más lento que la producción de nuevas nanopartículas. Por esta razón, existe una necesidad creciente de realizar estudios que aporten conocimiento sobre el riesgo de estos contaminantes emergentes de propiedades únicas. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la frecuencia de micronúcleos (FMN) en eritrocitos de ejemplares juveniles de pacú (*Piaractus mesopotamicus*) expuestos a nanopartículas de plata (Nano-Ag) a las concentraciones de 0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (control); 2,5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; y 25 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, durante 24 horas. Se observó que la FMN se incrementó significativamente ($p < 0,01$) en la concentración de 25 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, mientras que no hubo diferencias significativas entre los grupos expuestos a 2,5 y 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y el control. Estos resultados sugieren que los eventos aneugénicos o clastogénicos podrían representar un posible mecanismo de toxicidad de Nano-Ag en esta especie.

Palabras claves: Peces; Nanomateriales; Micronúcleos, Genotoxicidad

Abstract. The growing use of nanomaterials in consumer and industrial products has aroused global concern about possible adverse effects on biological systems. Due to the lack of a regulation framework and the absence of a consensus on the experimental protocols, ecotoxicological investigations are carried out much slower than the production of new nanoparticles. For this reason, there is a growing need for studies that provide knowledge about the risk of these emerging contaminants of unique properties. The objective of the present study was to evaluate the frequency of micronuclei (FMN) in erythrocytes of juvenile *Piaractus mesopotamicus* exposed to silver nanoparticles (nano-Ag; Nanotek SA) at concentrations of 0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (control); 2.5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; and 25 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, for 24 hours ($n = 10$ per treatment). The FMN show a significant increase ($p < 0.01$) in fish exposed to 25 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ of Nano-Ag, while there were no significant differences among the groups exposed to 2.5 and 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ with the control. These results suggest that the aneugenic or clastogenic events may represent a possible mechanism of toxicity of Nano-Ag in this specie.

Keywords: Fishes; Nanomaterials; Micronucleus; Genotoxicity

Introducción

El uso creciente de nanomateriales (NM) en productos industriales y de consumo ha incrementado la preocupación mundial respecto a sus posibles efectos adversos en los sistemas biológicos (Savolainen y col. 2010). Como consecuencia de la falta de un marco legislativo y la ausencia de un consenso sobre los protocolos experimentales, las investigaciones eco-

toxicológicas se llevan a cabo a un ritmo mucho más lento que la producción de nuevas nanopartículas. Por esta razón, existe una necesidad creciente de realizar estudios que aporten conocimiento sobre el riesgo de estos contaminantes emergentes de propiedades únicas (Dhawan y Sharma 2010). Si bien las perspectivas de utilidad de los NM en áreas como la

medicina y la energética son prometedoras, las propiedades que los hacen atractivos también contribuyen a su perfil toxicológico (Landsiedel y col. 2009).

Entre los NM más prometedores con propiedades antibacterianas se encuentran las Nanopartículas de plata (Nano-Ag), que exhiben una mayor actividad química debido a su relación superficie-volumen y estructura cristalográfica (Flower y col. 2012). Sin embargo, el rápido incremento en la producción de estas nanopartículas ha derivado en un aumento potencial de la exposición del hombre y el medio ambiente (Chen y Schluesener 2008). A pesar de su uso generalizado, hay datos limitados sobre la seguridad, toxicología y vías posibles de exposición a Nano-Ag, siendo aún menos numerosos los trabajos que investigan su posible interacción con el ADN. Se han propuesto una variedad de mecanismos para explicar la toxicidad de Nano-Ag, incluyendo la interacción con las membranas celulares (Sondi y Salopek-Sondi 2004; Morones y col. 2005), citotoxicidad (Braydich-Stolle y col. 2005, Chae y col. 2009; Taju y col. 2013), apoptosis (Hsin y col. 2008; Choi y col. 2010), inducción de especies reactivas del oxígeno (EROS) (He y col. 2012; Van Aerle y col. 2013) y la interacción de los iones Ag^+ con las proteínas y/o enzimas celulares (Matsumura y col. 2003; Morones y col. 2005; Choi y col. 2009).

Debido a sus características físico-químicas, los NM pueden tener propiedades genotóxicas impredecibles. Pueden causar daños en el ADN indirectamente, mediante la promoción de estrés oxidativo y la respuesta inflamatoria. Alternativamente, al ser suficientemente pequeñas, pueden atravesar las membranas celulares y tener acceso al núcleo, donde pueden interactuar directamente con el ADN, causando daño a la molécula (Singh y col. 2009).

Los efectos genotóxicos de los contaminantes pueden ser monitoreados utilizando el Ensayo de micronúcleos (MN), siendo éste una de las pruebas más ampliamente utilizadas en las evaluaciones genotóxicas debido a la sensibilidad en la detección de daño en el material genético y su rápida realización (Cavas y Könen 2007). Por su parte, el ensayo de MN ha sido ampliamente utilizado en peces para evaluar el daño al ADN generado por contaminantes en el agua, tanto en condiciones de laboratorio como a campo (Al-Sabti y Metcalfe 1995; Minissi y col. 1996; Hayashi y col. 1998).

La utilización de peces como bioindicadores

puede ayudar a detectar posibles problemas en el medio ambiente. Resultados obtenidos en ensayos con peces pueden ser útiles para la evaluación de los posibles efectos en la salud de otros organismos de sustancias potencialmente tóxicas presentes en el medio ambiente (Matsumoto y col. 2006).

Piaractus mesopotamicus (Pisces, Characidae) es un pez sudamericano, ampliamente utilizado en el cultivo de peces debido a su fácil manejo y buena velocidad de crecimiento (Jomori y col. 2003). Se lo encuentra naturalmente en aguas continentales de Argentina y países limítrofes de la Cuenca del Plata, que comprende los ríos Paraná, Paraguay y Uruguay (Ringuelet y col. 1967; Agostinho y col. 1997; Bechara y col. 1997; Hahn y col. 1997).

El objetivo de este trabajo fue evaluar mediante el Test de MN las posibles modificaciones en el material genético de los eritrocitos de *P. mesopotamicus* causado por la exposición *in vivo* a nanopartículas de plata.

Materiales y métodos

Se obtuvieron 40 ejemplares juveniles de pacú (*Piaractus mesopotamicus*) con una longitud estándar promedio de $8,1 \pm 0,5$ cm y un peso promedio de $23,9 \pm 4,4$ g de una granja de piscicultura local. Con el propósito de lograr su aclimatación, los peces se colocaron en tanques de 150 litros con agua dechlorada durante dos semanas. Se los alimentó una vez al día con *pellets* comerciales secos. La alimentación fue suspendida 24 horas antes del comienzo de las pruebas. Los juveniles fueron expuestos a una solución coloidal de Nano-Ag (Nanotek S.A.) a las concentraciones de $0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (control); $2,5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y $25 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Luego de 24 horas de exposición, los ejemplares ($n=10$ por tratamiento) fueron sacrificados, extrayéndose sangre para analizar la Frecuencia de MN (FMN).

La caracterización de las nanopartículas de plata se llevó a cabo a través de microscopía electrónica de transmisión. Las imágenes obtenidas a partir de una suspensión acuosa del producto mostraron partículas de forma esférica de un tamaño entre 20 y 25 nm (Figura 1). A través de espectrofotometría de absorción atómica, se constató la entrada y acumulación de plata total en hígado, cerebro y branquias de los peces expuestos a todas las concentraciones de Nano-Ag (Bacchetta y col. 2014).

La FMN se llevó a cabo de acuerdo a la técnica descripta por Koppe-Grisolia y Torres-Cordeiro

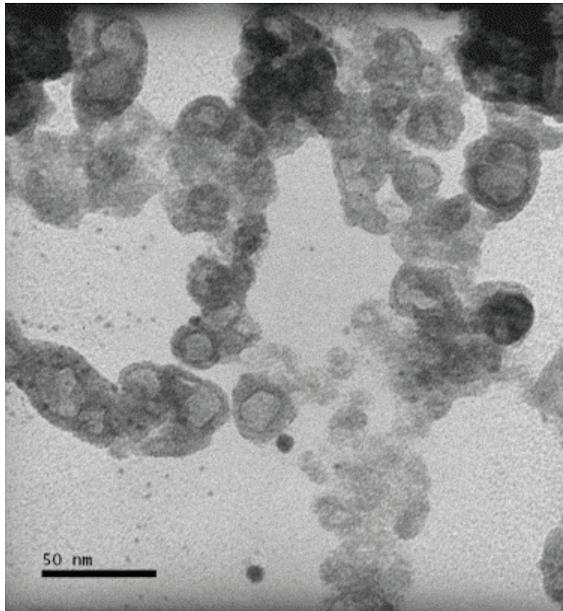


Figura 1. Imagen de microscopio electrónico de Nano-Ag (Nanotek S.A.).

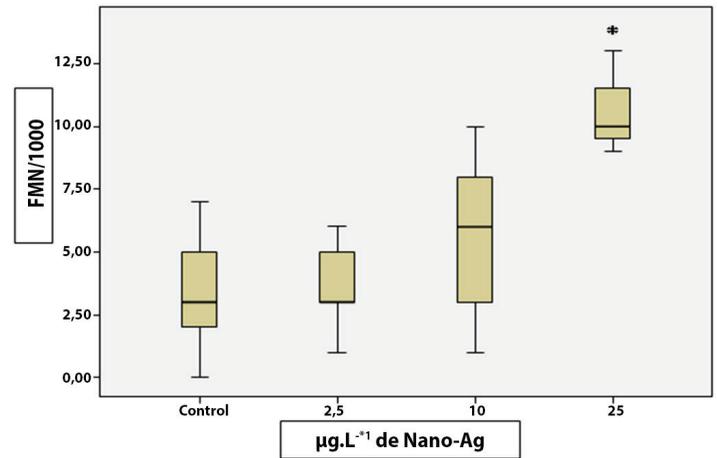


Figura 2. Box-Plot de los resultados obtenidos para la Frecuencia de Micronúcleos / 1000 eritrocitos de peces expuestos a diferentes concentraciones de Nano-Ag.

*Diferencia estadísticamente significativa respecto del control negativo ($p < 0,01$; Test de Mann-Whitney).

(2000). Cada muestra se realizó por duplicado. Los extendidos fijados fueron teñidos durante 10 minutos con Giemsa en una dilución 1:10, centrifugada y filtrada previamente para reducir la presencia de grumos de colorante, que pudieran interferir en la identificación de los MN. Por cada ejemplar se analizaron 1000 células (500 de cada preparado) bajo microscopio óptico con una magnificación de 1000X y se registró la FMN, definida como la cantidad de células que presentan MN por cada 1000 células contabilizadas. Los criterios para la identificación de los MN fueron los siguientes (Heddle 1973; Koppe-Grisolia 2002):

- 1) El tamaño del MN debe ser menor que un tercio del tamaño del núcleo principal.
- 2) El MN no debe solaparse con el núcleo principal y, si está en contacto con éste, los bordes de cada uno deben ser perfectamente distinguibles.
- 3) El MN debe poseer el mismo color e intensidad de tinción que el núcleo principal.

Análisis estadístico

Se utilizó el paquete estadístico SPSS 14.0 para Windows. Los datos fueron evaluados en normalidad mediante el test de Kolmogorov-Smirnov y en homogeneidad de varianza mediante el test de Levene. Se utilizó el test de Kruskal Wallis seguido de Mann-Whitney para comparar FMN entre los grupos expuestos y el control negativo.

Resultados

No se observaron cambios comportamentales evidentes ni mortalidad en los especímenes expuestos a las distintas concentraciones de Nano-Ag. Respecto a los grupos expuestos a Nano-Ag, se observó que la FMN se incrementó significativamente ($p < 0,01$) en la concentración de 25 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ($1,20 \pm 2,08$). Por el contrario, no hubo diferencia entre los grupos expuestos a 2,5 y 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ($\text{FMN} = 0,52 \pm 1,64$ y $0,90 \pm 2,85$ respectivamente) respecto del grupo control ($\text{FMN} = 0,99 \pm 2,42$; $p > 0,01$; Figura 2).

Discusión

Estudios de laboratorio han informado acerca de la toxicidad de Nano-Ag para una amplia gama de organismos. Sin embargo, las concentraciones que causan efectos van desde algunos $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ hasta $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, lo que refleja que la especie testeada, tipo de partícula y condiciones de exposición son determinantes (Griffitt y col. 2008; Wu y Zhou 2013; McShan y col. 2014). Particularmente, informes anteriores muestran que las Nano-Ag pueden ser tóxicas para los peces. Farkas y col. (2010) indicaron citotoxicidad en cultivos primarios de hepatocitos de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) a concentraciones de Nano-Ag de aproximadamente 20mg/L. En la misma especie, Joo y col. (2013) indicaron bioacumulación de plata en hígado, branquias y músculo luego de 14 días de exposición crónica a Nano-Ag.

Por otro lado, Griffitt y col. (2013) han investigado la exposición crónica a Nano-Ag en el pez cebra (*Danio rerio*), analizando alteraciones en la carga tisular, la morfología general de las branquias, y los perfiles de expresión génica global. Los autores reportaron que las Nano-Ag que se acumulan en las branquias no parecen generar alteraciones morfológicas observables en dicho tejido a nivel microscópico, a las concentraciones y duraciones de exposición analizados. Sin embargo, la exposición y/o acumulación de Nano-Ag indujeron alteraciones dramáticas en los perfiles globales de transcripción de genes en las branquias expuestas. Estos resultados fueron similares a los presentados anteriormente por los mismos investigadores en una exposición aguda (48hs) (Griffitt y col. 2009).

Investigaciones llevadas a cabo en salmónidos demuestran que las células de peces tienen una baja capacidad de reparación del ADN dañado y que debido a sus condiciones particulares de hábitat, son muchos más sensibles a daños genotóxicos producidos por contaminantes acuáticos que las células de anfibios, aves y mamíferos (Edwards y col. 1986). En el presente estudio, se observó un aumento significativo en la FMN para la concentración más alta ($25 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). Kim y col. (2013) llevaron a cabo el Ensayo Cometa y el test de MN para evaluar la genotoxicidad de Nano-Ag en células CHO-K1, y reportaron que Nano-Ag estimula la rotura del ADN y la formación de MN en forma dependiente de la dosis. Sin embargo, en una intensa búsqueda bibliográfica, no se han encontrado hasta el momento informes que utilicen la FMN en peces expuestos in vivo a Nano-Ag.

Estos resultados sugieren que la FMN permite detectar precozmente (24 hs) efectos genotóxicos y que los eventos aneugénicos o clastogénicos podrían representar un posible mecanismo de toxicidad de Nano-Ag en la especie estudiada.

Bibliografía citada

Agostinho A.A., Hahn N.A., Gomes L.C., Bini L.M. Estructura trófica. En: Vazzoler A.E., Agostinho A.A., Hahn N.S. A planície de inundação do alto rio Paraná: aspectos físicos, biológicos e sócio econômicos. Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Brazil. 1997. p.229-248.

Al-Sabti K. y Metcalfe C.D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutat Res.* 1995;343:121-135.

Bacchetta C., Gervasio S.G., Rossi A., Ale A., Campana M., López G., Parma M.J., Monseprat, J.M., Cazenave J. Toxicidad de nanopartículas de plata: bioacumulación y estrés oxidativo en peces. *Biología Acuática.* 2014;29:94-95.

Bechara J.A, Varela M.E., Martínez M.C. Evaluación empírica de la tasa de consumo de invertebrados y de alimento complementario en juveniles de pacú (*Piaractus mesopotamicus*). *Revista de Ictiología.* 1997;5:23-25.

Braydich-Stolle L., Hussain S.M., Schlager J.J., Hofmann M. In vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells. *Toxicol. Sci.* 2005;88(2):412-419.

Cavas T., Könen S. Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay. *Mutagenesis.* 2007;22(4):263-8.

Chae Y.J., Pham C.H., Lee J., Bae E., Yi J., Gu M. Evaluation of the toxic impact of silver nanoparticles on Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Aquat. Toxicol.* 2009;94:320-7.

Chen X. y Schluesener H.J. Nano-silver: A nanoparticle in medical application. *Toxicol Lett.* 2008;176:1-12.

Choi J.E., Kim S., Ahn J.H., Youn P., Kang J.S., Park K., Yi J., Ryu D.Y. Induction of oxidative stress and apoptosis by silver nanoparticles in the liver of adult zebrafish. *Aquat Toxicol.* 2010;15(100):151-159.

Choi O., Clevenger T.E., Deng B., Surampalli R.Y., Ross L., Hu Z. Role of sulfide and ligand strength in controlling nanosilver toxicity. *Water Res.* 2009;43:1879-86.

Dhawan A., Sharma V. Toxicity assessment of nanomaterials: methods and challenges, *Anal Bioanal Chem.* 2010;398:589-605.

Edwards R., Millburn P., Hutson D.H. Comparative toxicity of cis-cypermethrin in rainbow trout, frog, mouse and quail. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1986;84(3):512-522.

Farkas J., Christian P., Urrea J.A., Roos N., Hassellöv M., Tollefsen K.E., Thomas K.V. Effects of

silver and gold nanoparticles on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquat Toxicol.* 2010;96:44-52.

Flower N.A.L., Brabu B., Revathy M., Gopalakrishnan C., Raja S.V., Murugan S., Kumaravel T.S. Characterization of synthesized silver nanoparticles and assessment of its genotoxicity potentials using the alkaline comet assay. *Mutat Res.* 2012;742:61-65.

Griffitt R.J., Hyndman K., Denslow N.D., Barber D.S. Comparison of molecular and histological changes in Zebrafish gills exposed to metallic nanoparticles. *Toxicol. Sci.* 2009;107(2):404-415.

Griffitt R.J., Lavelle C.M., Kane A.S., Denslow N.D., Barber D.S. Chronic nanoparticulate silver exposure results in tissue accumulation and transcriptomic changes in zebrafish. *Aquat Toxicol.* 2013;130-131:192-200.

Griffitt R.J., Luo J., Gao J., Bonzongo J.C., Barber D.S. Effects of particle composition and species on toxicity of metallic nanomaterials in aquatic organisms. *Environ Toxicol Chem.* 2008;27(9):1972-1978.

Hahn N.S., Andrian I.F., Fugi R., Lescano de Almedia V.L. Ecología trófica. In: Vazzoler A.E., Agostinho A.A., Hahn N.S. A planície de inundação do alto rio Paraná: aspectos físicos, biológicos e sócio econômicos. Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Brazil. 1997. p.209-228.

Hayashi M., Ueda T., Uyeno K., Wada K., Kinnae N., Saotome K., Tanaka N., Takai A., Sasaki Y.F., Asano N., Sofuni T., Ojima Y. Development of genotoxicity assay systems that use aquatic organisms. *Mutat Res.* 1998;399:125-133.

He D., Dorantes-Aranda J.J., Waite T.D. Silver nanoparticle-algae interactions: oxidative dissolution, reactive oxygen species generation and synergistic toxic effects. *Environ Sci Technol.* 2012;46:8731-8.

Heddle J.A. A rapid in vivo test for chromosomal damage. *Mutat Res.* 1973;18:307-317.

Hsin Y.H., Chena C.F., Huang S., Shih T.S., Lai P.S., Chueh P.J. The apoptotic effect of nanosilver is mediated by a ROS- and JNK-de-

pendent mechanism involving the mitochondrial pathway in NIH3T3 cells. *Toxicol Lett.* 2008;179(3):130-139.

Jomori R., Carneiro D.J., Malheiros E.B., Portella M.C. Growth and survival of pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) juveniles reared in ponds or at different initial larviculture periods indoors. *Aquaculture.* 2003;221:277-287.

Joo H.S., Kalbassi M.R., Yu I.J., Lee J.H., Johari S.A. Bioaccumulation of silver nanoparticles in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Influence of concentration and salinity. *Aquat Toxicol.* 2013;140-141:398-406.

Kim H.R., Park Y.J., Shin D.Y., Oh S.M., Chung K.H. Appropriate in vitro methods for genotoxicity testing of silver nanoparticles. *Environ Health Toxicol.* 2013;28:1-8.

Koppe-Grisolia C. A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomycin and various pesticides. *Mutat Res.* 2002; 518: 145-150.

Koppe-Grisolia C. y Torres-Cordeiro C.M. Variability in micronucleus induction with different mutagens applied to several species of fish. *Genet Mol Biol.* 2000;23(1):235-239.

Landsiedel R., Kapp M.D., Schulz M., Wiench K., Oesch F. Genotoxicity investigations on nanomaterials: Methods, preparation and characterization of test material, potential artifacts and limitations. Many questions, some answers. *Mutat Res.* 2009;681:241-258.

Matsumoto S.T., Mantovani M.S., Malagutti M.I., Dias A.L., Fonseca I.C., Marin-Morales M.A. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. *Genet Mol Biol.* 2006;29:148-158.

Matsumura Y., Yoshikata K., Kunisaki S., Tsuchido T. Mode of bactericidal action of silver zeolite and its comparison with that of silver nitrate. *App Environ Microbiol.* 2003;69(7):4278-4281.

McShan D., Ray P.C., Yu H. Molecular toxicity mechanism of nanosilver. *J Food Drug Anal.* 2014;22:116-127.

Minissi S., Ciccotti E., Rizzoni M. Micronucleus test in erythrocytes of *Barbus plebejus* (Teleostei, Pisces) from two natural environments: a bioassay for the in situ detection of mutagens in freshwater. *Mutat Res.* 1996;367:245–251.

Morones J.R., Elchiguerra J.L., Camacho A., Holt K., Kouri J.B., Ramírez J.T., Miguel J.Y. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology.* 2005;16(10):2346–2353.

Ringuelet, R.A., Arámburu R.H., Alonso de Arámburu A. Los peces argentinos de agua dulce. Comisión de Investigación Científica (CIC). La Plata, Provincia de Buenos Aires. 1967; 602 pp. p.

Savolainen K., Alenius H., Norppa H., Pylkkänen L., Tuomi T., Kasper G. Risk assessment of engineered nanomaterials and nanotechnologies—a review. *Toxicology.* 2010;269:92–104.

Singh N., Manshian B., Jenkins G.J.S., Griffiths S.M., Williams P.M., Maffei T.G.G., Wright C.J., Doak S.H. *NanoGenotoxicology: The DNA da-*

maging potential of engineered nanomaterials. Biomaterials. 2009;30:3891–3914.

Sondi I. y Salopek-Sondi B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *J Colloid Interface Sci.* 2004;275(1):177–182.

Taju G., Abdul Majeed S., Nambi K.S.N., Sahul Hameed A.S. Development and characterization of cell line from the gill tissue of *Catla catla* (Hamilton, 1822) for toxicological studies. *Chemosphere.* 2013;90:2172–2180.

Van Aerle R., Lange A., Moorhouse A., Paszkiewicz K., Johnston B.D., Bastos E., Booth T., Tyler C.R., Santos E.M. Molecular mechanisms of toxicity of silver nanoparticles in zebrafish embryos. *Environ Sci Technol.* 2013;47:8005-14.

Wu Y. y Zhou Q. Silver nanoparticles cause oxidative damage and histological changes in medaka (*Oryzias latipes*) after 14 days of exposure. *Environ Toxicol Chem.* 2013;32(1):165-73.