

**Centro de Investigación Científica y de Educación  
Superior de Ensenada, Baja California**



---

**Maestría en Ciencias  
en Acuicultura**

---

**Efecto de nanopartículas de plata en la supervivencia *in vitro*  
del parásito *Perkinsus marinus* y su efecto *in vivo* en el ostión  
*Crassostrea corteziensis***

Tesis  
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de  
Maestro en Ciencias

Presenta:

Cecilia Bravo Guerra

Ensenada, Baja California, México  
2018

Tesis defendida por

**Cecilia Bravo Guerra**

y aprobada por el siguiente Comité

---

**Dr. Jorge Abelardo Cáceres Martínez**  
Director de tesis

Miembros del comité

**Dra. Beatriz Cordero Esquivel**

**Dra. Ernestina Castro Longoria**

**Dra. Rebeca Vásquez Yeomans**



---

**Dr. Jorge Abelardo Cáceres Martínez**  
Coordinador del Posgrado en Acuicultura

---

**Dra. Rufina Hernández Martínez**  
Directora de Estudios de Posgrado

*Cecilia Bravo Guerra © 2018*

*Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor y director de la tesis.*

Resumen de la tesis que presenta **Cecilia Bravo Guerra** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Acuicultura.

**Efecto de nanopartículas de plata en la supervivencia *in vitro* del parásito *Perkinsus marinus* y su efecto *in vivo* en el ostión *Crassostrea corteziensis***

Resumen aprobado por:

---

Dr. Jorge Abelardo Cáceres Martínez  
**Director de tesis**

La Perkinsosis es una enfermedad de declaración obligatoria ante la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), cuyo agente causal es *Perkinsus marinus* (protozoo) que afecta a diferentes especies de ostiones de importancia comercial, como el ostión de placer *C. corteziensis*. Se han probado tratamientos para su control, con diferentes niveles de éxito y con posibilidades de aplicación en reproductores mantenidos en laboratorios de producción larvaria. Las propiedades biocidas de nanopartículas de plata (AgNPs) les confieren potencial quimioterapéutico contra enfermedades, por lo que están siendo utilizadas como terapia alternativa en medicina humana y veterinaria. En este sentido, es necesario determinar su factibilidad de uso como tratamiento alternativo para la perkinsosis, considerando su efecto directo en el parásito; así como, en los tejidos y en la supervivencia del hospedero. Se evaluó el efecto de AgNPs en la supervivencia *in vitro* de *P. marinus* y en el daño tisular y supervivencia del ostión de placer. Se obtuvo la mortalidad del 50% de *P. marinus* a una concentración de 0.0927 mM en 24 h de exposición; mientras que la misma concentración en ensayos *in vivo* en el ostión *C. corteziensis*, con aplicaciones repetidas durante 5 días, la mortalidad acumulada fue del 8%. El análisis histológico realizado, revela daños en los tejidos del ostión atribuidos al efecto de la inyección, así como al efecto tóxico de la plata, cuya presencia dentro de la pared de las hiposporas de *P. marinus* se corroboró por MET. Las principales reacciones asociadas fueron la inflamación y necrosis, en diferentes grados de magnitud, siendo mayor a partir de la concentración 0.927 mM de Ag. Estos resultados muestran una alta susceptibilidad de *P. marinus* a las AgNPs ante 0.0927 mM de Ag y de *C. corteziensis* a una concentración 10 veces mayor. Los resultados obtenidos demuestran que existe una dosis apropiada de AgNPs, que es letal para *P. marinus in vitro* pero que no lo es para su hospedero *C. corteziensis in vivo*, lo que sugiere que el potencial terapéutico de la AgNPs Argovit<sup>TM</sup>, debe continuar estudiándose.

**Palabras clave:** *C. corteziensis*, nanopartículas de plata, ostión, Perkinsosis, *P. marinus*.

Abstract of the thesis presented by **Cecilia Bravo Guerra** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Aquaculture.

**Effect of silver nanoparticles on the *in vitro* survival of the parasite *Perkinsus marinus* and its effect *in vivo* on the oyster *Crassostrea corteziensis***

Abstract approved by:

---

Dr. Jorge Abelardo Cáceres Martínez  
**Thesis Director**

Perkinsosis is a notifiable disease by the World Organisation for Animal Health (OIE), whose causal agent is *Perkinsus marinus* (protozoa) that affects different species of oysters of commercial importance, such as the pleasure oyster *C. corteziensis*. Treatments have been tested for their control, with different levels of success and with possibilities of application in reproducers maintained in larval production laboratories. The biocidal properties of silver nanoparticles (AgNPs) give them chemotherapeutic potential against diseases, which is why they are being used as alternative therapy in human and veterinary medicine. In this sense, it is necessary to determine its feasibility of use as an alternative treatment for perkinsosis, considering its direct effect on the parasite; as well as, in the tissues and in the survival of the host. The effect of AgNPs on the *in vitro* survival of *P. marinus* and on tissue damage and survival of the pleasure oyster was evaluated. The 50% mortality of *P. marinus* was obtained at a concentration of 0.0927 mM of Ag in 24 h of exposure; whereas the same concentration in *in vivo* tests in the oyster *C. corteziensis*, with repeated applications during 5 days, the cumulative mortality was 8%. The histological analysis carried out revealed damage to the oyster tissues attributed to the effect of the injection, as well as the toxic effect of silver, whose presence within the hypnospore wall of *P. marinus* was corroborated by TEM. The main associated reactions were inflammation and necrosis, in different degrees of magnitude, being greater from the concentration 0.927 mM of Ag. These results show a high susceptibility of *P. marinus* to the AgNPs before 0.0927 mM of Ag and *C. Corteziensis* at a concentration 10 times higher. The results obtained show that there is an appropriate dose of AgNPs, which is lethal for *P. marinus in vitro* but not for its host *C. corteziensis in vivo*, which suggests that the therapeutic potential of AgNPs Argovit™ should continue to be studied.

**Keywords:** *Crassostrea corteziensis*, silver nanoparticles, oyster, Perkinsosis, *P. marinus*.

## **Dedicatoria**

*A mi madre Carolina Guerra Delgado, por ser el pilar fundamental de todo lo que soy. Por tu amor y apoyo incondicional.*

*A mis sobrinos Cristóbal, Pedro, Julieta, Julia, Leonel y Helena, por que se que les encantará el maravilloso mundo de la ciencia.*

*A mi compañero de vida José David, por todo lo vivido, por tu amor y sabiduría.*

*Busca la libertad y te convertirás en cautivo de tus deseos. Busca la disciplina y hallarás la libertad.*

*Frank Herbert*

## Agradecimientos

Al Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada (CICESE), especialmente al Departamento de Acuicultura por aceptarme en este posgrado, el cuál me permitió extender mis conocimientos y aumentar mis aspiraciones.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por brindarme la oportunidad económica para realizar mis estudios de posgrado.

A mi director de tesis, Dr. Jorge Cáceres Martínez, mis más sinceros agradecimientos por proporcionar el sustento científico para realizar esta tesis, por el conocimiento transmitido, la orientación constante y entusiasmo en todo momento.

A mis sinodales, por sus consejos y comentarios que fueron un gran aporte para la realización de esta tesis, pero sobretodo por su paciencia y apoyo en todo momento. A la Dra. Beatriz Cordero Esquivel, por el conocimiento y apoyo en torno al cultivo de microalgas. A la Dra. Rebeca Vásquez Yeomans por su apoyo constante en las técnicas moleculares, en la extracción de ADN y análisis PCR. A la Dra. Ernestina Castro Longoria por su apoyo y orientación en el procesamiento de muestras y realización de MET.

A la Dra. Karla Oyuky Juárez Moreno, por ser parte importante en la toma de decisiones para realizar la tesis y asesoría constante.

Al proyecto del CONACyT “Estudio del efecto de nanopartículas de plata en virus, bacterias y parásitos de organismos acuáticos”, y la Dra. María Cristina Chávez Sánchez del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C (CIAD).

A la Red Internacional de Bionanotecnología con Impacto en Biomedicina, Alimentación y Bioseguridad, a la Dra. Nina Bogdanchikova y todo su equipo, especialmente a la Dra. Yanis Toledano Magaña y al Dr. Juan Carlos García por su por su orientación y consejos.

Al Comité de Sanidad Acuícola del Estado de Nayarit (CESANAY), en especial a la Oceanóloga Gloria Padilla Lardizábal por su apoyo en la recolección y el envío de ostiones.

A la M. en C. Yanet Guerrero Rentería, técnico del Laboratorio de Biología y Patología de Organismos Acuáticos del Departamento de Acuicultura, por el entrenamiento técnico y elaboración de laminillas histológicas, estandarización de protocolos histológicos, así como la cotización y compra de reactivos. Gracias por el apoyo incondicional y buena amistad. Por siempre en mi corazón “La reina del microtomo”.

Al equipo técnico, por su apoyo en todo momento, al M. en C. Abelardo Campos Espinoza por su orientación y apoyo en el uso de equipos en el Departamento de Acuicultura, a Luis Alberto Murillo Valenzuela y a Adrián Celaya Ortega, por su apoyo en la reparación y mantenimiento del sistema utilizado.

Al Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada (LNMA–CICESE), en especial al M. en C. Juan Manuel Martínez Andrade por su orientación y servicio técnico en Microscopía Electrónica.

A la M. en C. Gissel Tinoco Orta y la Dra. Ana Ruth Álvarez por su apoyo técnico y orientación en técnicas moleculares.

A mis compañeros de generación, Araceli, Leydy, Andrés y Geraldo, por su amistad y apoyo en todo momento, por todos los libros, referencias, consejos y momentos compartidos.

A mis compañeros del laboratorio, Doris y Miriam, por todos los buenos momentos compartidos, así como al Dr. Roberto Cruz Flores, por el conocimiento compartido.

A los investigadores del Departamento de Acuicultura, por generar motivación en mí para continuar en este camino de la ciencia. Los admiro demasiado a todos.

A toda mi familia por su amor y alegría, principalmente a mis abuelos, a mi mamá, hermanos y sobrinos. Gracias a todos, sin duda son parte importante de mi formación personal y profesional. A mis primas Dul y Maria por ser mis amigas fieles y compañeras de muchas aventuras, los amo infinitamente.

A mis amigas, que a pesar de la distancia siempre fueron apoyo y amor incondicional, me enorgullezco de cada una de nosotras.

A mi querido gordo, Che gracias por darme los mejores consejos, sin duda eres parte importante de esta etapa en mi vida. Gracias por tu amor y sabiduría. Te amo.

## Tabla de contenido

Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatorias.....	iv
Agradecimientos .....	v
Lista de figuras .....	ix
Lista de tablas.....	x
<b>Capítulo 1. Introducción .....</b>	<b>1</b>
1.1. Antecedentes .....	3
1.1.1. Enfermedad de “Dermo” o Perkinsosis.....	3
1.1.2. Nanopartículas y la plata.....	4
1.1.3. Características de AgNPs .....	7
1.1.4. Potencial biocida de AgNPs.....	8
1.1.5. Toxicidad de AgNPs Argovit™ .....	9
1.2. Justificación .....	11
1.3. Hipótesis.....	12
1.4. Objetivos .....	12
1.4.1. Objetivo general.....	12
1.4.2. Objetivos específicos.....	12
<b>Capítulo 2. Metodología.....</b>	<b>13</b>
2.1. Aislamiento de <i>P. marinus</i> .....	13
2.1.1. Obtención de <i>C. corteziensis</i> presuntamente parasitados.....	13
2.1.2. Cultivo de <i>P. marinus</i> .....	13
2.2. Confirmación de <i>P. marinus</i> .....	15
2.2.1. Extracción de ADN.....	15



2.2.2. Análisis por PCR.....	16
2.3. Nanopartículas de plata y preparación de los tratamientos.....	16
2.4. Bioensayo <i>in vitro</i> de <i>P. marinus</i> .....	18
2.4.1. Análisis de ultraestructura mediante microscopía electrónica de transmisión (MET) .....	20
2.5. Experimentos <i>in vivo</i> en <i>C. corteziensis</i> .....	20
2.5.1. Obtención de <i>C. corteziensis</i> aparentemente sanos.....	20
2.5.2. Primer bioensayo: Aplicación única de diferentes dosis de AgNPs .....	21
2.5.3. Segundo bioensayo: Aplicación múltiple de diferentes dosis de AgNPs .....	22
2.6. Análisis histológico .....	23
2.7. Análisis estadístico .....	24
<b>Capítulo 3. Resultados</b> .....	26
3.1. Cultivo <i>in vitro</i> de <i>P. marinus</i> .....	26
3.2. Mortalidad <i>in vitro</i> de <i>P. marinus</i> .....	27
3.2.1. Ultraestructura de <i>P. marinus</i> utilizando MET.....	29
3.3. Bioensayos <i>in vivo</i> en <i>C. corteziensis</i> .....	31
3.3.1. Primer bioensayo: Aplicación única de diferentes dosis de AgNPs .....	31
3.3.2. Segundo bioensayo: Aplicación múltiple de diferentes dosis de AgNPs .....	32
3.4 Análisis histológico .....	33
<b>Capítulo 4. Discusión</b> .....	43
<b>Capítulo 5. Conclusiones</b> .....	49
5.1 Recomendaciones .....	49
<b>Literatura citada</b> .....	50
<b>Anexos</b> .....	56

## Lista de figuras

Figura		Página
1	Mecanismo de acción de las AgNPs.....	9
2	Cultivo <i>in vitro</i> de <i>P. marinus</i> . ....	14
3	Ensayo <i>in vitro</i> con <i>P. marinus</i> .....	18
4	Hipnosporas de <i>P. marinus</i> .....	19
5	Aplicación de AgNPs a <i>C. corteziensis</i> .....	21
6	Ensayo <i>in vivo</i> con <i>C. corteziensis</i> .....	22
7	Secciones de cortes para histología.....	23
8	Conteo de hipnosporas de <i>P. marinus</i> .....	25
9	Seguimiento de cultivo <i>in vitro</i> de <i>P. marinus</i> .....	25
10	Electroforesis en gel de agarosa de los productos amplificados por PCR para identificar a <i>P. marinus</i> .....	26
11	Porcentaje de mortalidad de <i>P. marinus</i> en los distintos tiempos de exposición.....	27
12	Registro fotográfico de <i>P. marinus</i> .....	28
13	Ultraestructura de hipnospora de <i>P. marinus</i> .....	29
14	Heces recuperadas de los diferentes tratamientos.....	31
15	Secciones de músculo aductor del ostión que reflejan diferencias entre una inflamación y una necrosis.....	33
16	Sección de músculo aductor con distintos grados de inflamación.....	34
17	Diferencias en la magnitud de la inflamación y necrosis.....	36
18	Lesión del sitio adyacente a la inyección en corte histológico del músculo aductor.....	38
19	Precipitados en tejido conectivo de glándula digestiva.....	39
20	Sección de tejido conectivo.....	39
21	Precipitados en células reticulares del tejido conectivo en manto.....	40
22	Sección de intestino en glándula digestiva.....	40
23	Sección del epitelio del intestino.....	41
24	Sección de músculo aductor con edemas y vasos dilatados.....	41

## Lista de tablas

Tabla		Página
1	Tratamientos de control de <i>P. marinus</i> .....	2
2	Tipos de estabilización de partículas metálicas.....	6
3	Características fisicoquímicas de las nanopartículas.....	7
4	Concentraciones inhibitorias de AgNPs Argovit™ ante distintos modelo biológicos.....	10
5	Características fisicoquímicas de AgNPs Argovit™.....	17
6	Mortalidad de ostiones con una sola aplicación.....	30
7	Mortalidad diaria y acumulada de ostiones expuestos a múltiples aplicaciones.....	32
8	Componentes del medio de cultivo fluido de tioglicolato .....	55
9	Componentes del medio de cultivo DME: Ham's F12.....	55
10	Componentes para solución Davidson's.....	60

## Capítulo 1. Introducción

---

México se encuentra entre los principales países productores de ostión a nivel mundial. Su producción ronda las 50 000 toneladas anuales (CONAPESCA, 2014). Dicha producción se obtiene principalmente por el semi cultivo y captura del ostión americano *Crassostrea virginica* en el Golfo de México; por el semi cultivo del ostión de placer *Crassostrea corteziensis*, endémico del noroeste del país y el cultivo de ostión japonés *Crassostrea gigas*, producidos en el litoral del Pacífico mexicano y el mar de Cortés (Cáceres-Martínez y Vásquez-Yeomans, 2013; CONAPESCA, 2014). Las enfermedades constituyen uno de los principales factores que afectan a la producción y entre ellas, la Perkinsosis, causada por el protozooario *Perkinsus marinus*, considerada de declaración obligatoria por la Organización Mundial de Sanidad Animal (World Organisation for Animal Health, OIE), afecta principalmente a *C. virginica* y *C. corteziensis* del Golfo de México y del Pacífico mexicano respectivamente (Burreson *et al.*, 1994; Cáceres-Martínez *et al.*, 2008). El control de enfermedades de moluscos bivalvos, a través del uso de terapéuticos (antibióticos, antisépticos, medicamentos) es una tarea prácticamente imposible debido a las limitantes para su aplicación en las zonas de cultivo; sin embargo, su control es factible en caso de mantenimiento y manejo de reproductores y producción larvaria en laboratorio. Algunas alternativas de tratamientos que han sido propuestos, ya sea para disminuir de la infección *in vivo* o para erradicar al parásito *in vitro*, se presentan en la Tabla 1.

En general, los tratamientos propuestos tienen ciertas limitantes, ya que en la mayoría de los casos solo disminuyen la infección, sin erradicar al parásito. Además, suelen ser poco prácticos, ya que su aplicación se limita mayoritariamente a condiciones *in vitro*; por otro lado, el uso de muchos de los tratamientos puede tener un impacto negativo al ambiente si los efluentes de agua no se neutralizan adecuadamente o por la toxicidad que puedan ejercer sobre los hospederos. En este escenario, es necesario valorar alternativas de tratamientos, especialmente para reproductores en laboratorios de producción de semilla de ostión, para potenciar su cultivo y asegurar stocks libres del parásito. Dado al creciente uso terapéutico de las nanopartículas de plata (AgNPs), se propone valorarlas como una alternativa para el tratamiento de la perkinsosis en el ostión. La presente investigación permitirá evaluar la toxicidad de distintas concentraciones de plata, a partir de AgNPs Argovit™, tanto en el parásito como en el hospedero. Esta información permitirá evaluar el potencial quimioterapéutico de AgNPs como tratamiento alternativo de la perkinsosis en el ostión de placer *C. corteziensis*.

**Tabla 1. Tratamientos para el control de *P. marinus*.** Algunos tratamientos probados tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo*.

Tratamiento	Tipo de ensayo	Dosis o concentración	Tiempo de exposición	Vía de administración	Efectos	Referencia
Cloración	<i>In vitro</i>	300 ppm	30 min	En medio de cultivo	Muerte de trofozoito. El parásito puede sobrevivir en los tejidos del ostión, se recomienda incrementar la concentración y el tiempo de exposición	Bushek <i>et al.</i> (1997)
Agua dulce	<i>In vitro</i>	-	30 min	En medio de cultivo		
Temperatura	<i>In vitro</i>	>40 °C	1 h	En medio de cultivo		
Irradiación UV	<i>In vitro</i>	> 28,000 $\mu\text{Ws}/\text{cm}^2$	-	En medio de cultivo y en agua de mar	Evita la proliferación y conduce a la muerte del parásito	Bushek y Howell (2000)
Lasalocida y verde de malaquita	<i>In vitro</i>	10 mg/L	1 día	Baños químicos	Inhibe el desarrollo de <i>P. marinus</i>	Calvo y Bureson (1994)
Cicloheximida	<i>In vivo</i> en <i>C. virginica</i>	10 mg/L	30 días	Baños químicos	Reduce la prevalencia del parásito, aunque no se elimina por completo	
Bacitracina	<i>In vitro</i>	1 y 10 mg/mL	15 días con evaluación cada 3 días	En el medio de cultivo	Reducción significativa de la tasa de crecimiento de <i>P. marinus</i>	Faisal <i>et al.</i> (1999)
	<i>In vivo</i> en <i>C. virginica</i>	5 y 50 mg/mL	6 semanas	Oral, encapsulados en vesículas lipídicas	Reduce la intensidad de la infección	
Desinfectantes orgánicos de N-halamina	<i>In vitro</i>	25 mg/L	12 h	En agua de mar	Daño en la permeabilidad de la membrana y de las funciones osmorreguladoras, provocando lisis de las células del parásito	Delaney <i>et al.</i> (2003)
Cobre ( $\text{CuCl}_2$ )	<i>In vitro</i>	0.1, 15, y 40 mg/L	14 días	En el medio de cultivo	15 y 40 mg/L reducen la proliferación.	Foster <i>et al.</i> (2011)
	<i>In vivo</i> en <i>C. virginica</i>	318 $\mu\text{g}/\text{L}$	14 días	Disuelto en agua	Reduce la intensidad de infección en hemocitos. Acumulación de Cu en branquias, hepatopáncreas y hemolinfa	

## 1.1. Antecedentes

### 1.1.1. Enfermedad de “Dermo” o Perkinsosis

Algunos protozoarios provocan enfermedades en invertebrados marinos, entre ellos, *P. marinus* es considerado uno de los parásitos más importantes para el ostión americano *C. virginica* en la costa este de Estados Unidos por las mortalidades que ha provocado desde los años 40s (Levine, 1978; Burreson *et al.*, 1994; Andrews, 1996; Burreson y Ragone-Calvo, 1996). Desde su descripción inicial se ha generado controversia respecto a su taxonomía (Joseph *et al.*, 2010), inicialmente fue descrito por Mackin, Owen, y Collier (1950) como un hongo, *Dermocystidium marinum*, por lo que a la enfermedad se le dio el nombre de “dermo”. Posteriormente se reclasificó como *Labyrinthomyxa marina* (Mackin y Ray, 1966) y finalmente fue nombrado *P. marinus*, integrante del phylum Apicomplexa (Levine, 1978) debido a la presencia de un organelo que asemejan a un complejo apical característico de dicho filo. Norén *et al.* (1999) proponen un nuevo posicionamiento del género *Perkinsus*, de acuerdo a su afinidad genética y estructural con *Parvilucifera* sp., parásito de un dinoflagelado, incluyéndolos en un nuevo filo denominado Perkinsozoa, el cual es un grupo divergente del linaje de los dinoflagelados y los apicomplexa. Actualmente, se considera que cómo especie, es el agente causal de la enfermedad de “dermo” o perkinsosis (Villalba *et al.*, 2004).

*P. marinus* es un endoparásito de los moluscos, principalmente de ostreidos del género *Crassostrea*, se distribuye en la costa este de Estados Unidos de América (EUA) en el Atlántico, desde Maine hasta Florida (Andrews, 1996; Burreson y Ragone-Calvo, 1996), a lo largo de la costa del Golfo de México hasta la Península de Yucatán (Burreson *et al.*, 1994; Aguirre-Macedo *et al.*, 2007) infectando al ostión americano *C. virginica* y al noreste de Brasil en el Río Paraíba infectando a *Crassostrea rhizophorae* (da Silva *et al.*, 2013). Su presencia también ha sido confirmada en *C. gigas* cultivado en la costa del Pacífico Mexicano (Enríquez-Espinoza *et al.*, 2015), en el ostión de placer *C. corteziensis* y el ostión de mangle *Saccostrea palmula* en donde se ha demostrado el desarrollo de la infección (Cáceres-Martínez *et al.*, 2012; Jorge Cáceres-Martínez *et al.*, 2016).

Es un parásito altamente patógeno para *C. virginica* en la costa este de EUA, el comportamiento de la infección es menos letal para dicha especie en las condiciones prevalecientes en las lagunas costeras mexicanas del Golfo de México (Gullian-Klanian *et al.*, 2008). En el Pacífico Mexicano la especie más afectada es *C. corteziensis* aunque no asociada con mortalidades masivas (Cáceres-Martínez *et al.* 2016). De acuerdo con Perkins (1996) y Villalba *et al.* (2004), *P. marinus* se pueden transmitir de hospedero a

hospedero y todas las fases de su ciclo de vida son infecciosas. La fase vegetativa se inicia con un trofozoíto inmaduro que está formado por una célula semi esférica entre 1.9 y 3.4  $\mu\text{m}$ , posee organelos como con un núcleo y al madurar desarrolla un vacuoplasto al interior de una gran vacuola excéntrica, donde se multiplica, por fisión binaria o palintomía, fase que se conoce como esquizonte o tomonte, que da lugar a un gran número de células hijas, se liberan y continuarán el ciclo como trofozoíos en los tejidos y fagocitado por lo hemocitos en la hemolinfa de su hospedero; la fase de resistencia, hipnospora o prezoosporangio, se forma al dejar al hospedero ya sea a través de las heces o de organismos muertos. En este estadio, *P. marinus* aumenta drásticamente su tamaño (20-80  $\mu\text{m}$ ) y desarrolla una gran pared celular que le confiere resistencia a las condiciones ambientales. Se hacen diversas hipótesis sobre la composición de la pared celular, donde se sugiere que está conformada por celulosa o de algún complejo de polisacáridos (Perkins, 1966). Si las condiciones son apropiadas, puede desencadenarse el proceso de formación de zoosporas biflageladas que son liberadas al exterior con lo cual las posibilidades de infectar a un nuevo hospedero aumentan. Una vez que las zoosporas ingresan al hospedero, se cree pierden sus flagelos y se desarrollan como trofozoíto en los tejidos del ostión (Gauthier y Vasta, 1993; Bushek *et al.*, 1994; Perkins, 1996; Sunila *et al.*, 2001; Villalba *et al.*, 2004).

El desarrollo de los métodos de cultivo *in vitro* para *P. marinus* ha sido un recurso clave no solo para estudios celulares, moleculares y genéticos para su reconocimiento, sino también para el uso de distintos tratamientos para su control (Joseph *et al.*, 2010). La técnica más utilizada para la obtención de las células del parásito es el desarrollo de hipnosporas con la incubación de los tejidos infectados en medio fluido de tioglicolato (MFT) desarrollada por Ray (1966) o el aislamiento de los trofozoítos directamente de hemolinfa o tejidos (Gauthier y Vasta, 1993).

### **1.1.2. Nanopartículas y la plata**

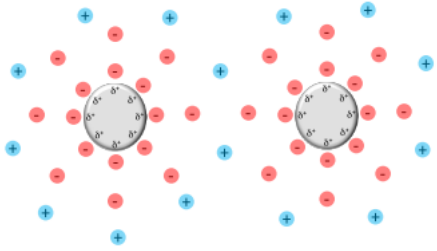
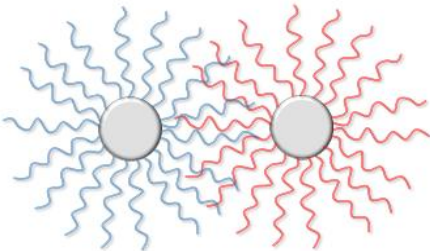
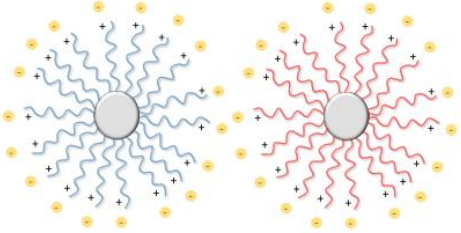
La plata (Ag) es un metal de transición con número atómico de 47, masa atómica de 107.87, y generalmente monovalente (+1). El número de electrones en la capa externa es la que determina la reactividad química de un elemento, en este caso la plata, su configuración ( $[\text{Kr}] 4d^{10} 5s^1$ ) cuenta con un electrón desapareado, disponible para combinarse en otros compuestos mediante enlaces iónicos, dando lugar a los iones de plata ( $\text{Ag}^+$ ), presente en todas las soluciones simples de compuestos de plata soluble y el cual puede ser fácilmente reducido a plata metálica ( $\text{Ag}^0$ ) (Tavard *et al.*, 2003).

El uso de la plata como agente microbicida se remonta a antiguas civilizaciones, como en Grecia en la época de Alejandro Magno, en la que se añadía una moneda de plata en los almacenes de agua para conservarla pura. Posteriormente se elaboraron los utensilios o recipientes de plata, los cuales retardaban el crecimiento de los microorganismos que estropeaban los alimentos y bebidas. A finales del siglo XIX aparecieron los primeros productos derivados de la plata, como el nitrato de plata en soluciones diluidas, para el tratamiento de infecciones, así como tratar quemaduras en la piel (Morones-Ramírez, 2009). En la década de 1920 la Food and Drug Administration (FDA) de los EUA aprobó las soluciones de plata iónica, como agentes antibacterianos (Cardoso, 2016). En la actualidad, con el desarrollo de la nanotecnología y las nanopartículas (NPs), se utiliza en una amplia gama de industrias tales como, informática, electrónica, catálisis química, cosméticos, productos de purificación y desinfección de agua y alimentos; además las AgNPs han surgido con diversas aplicaciones médicas que van desde desinfección y recubrimiento de material quirúrgico y de curación, apósitos y vendajes con base de plata hasta el tratamiento de infecciones y quemaduras en la piel (Kim *et al.*, 2007; Morones Ramírez, 2009; Rai *et al.*, 2009; Fabrega *et al.*, 2011; Cardoso, 2016).

La nanotecnología ha cambiado la perspectiva funcional de los materiales empleados en la medicina (Leyva-Gómez, 2013), un ejemplo son las AgNPs, que exhiben modificaciones significativas en sus propiedades físicas y químicas, conferidas por su tamaño (Cardoso, 2016), generalmente <100 nm y que contienen entre 20 y 15,000 átomos de plata (Singh *et al.*, 2011). Al tener un tamaño nanométrico, su energía superficial es mayor (cuanto más pequeña es una partícula, la fracción de átomos en la superficie aumenta). Al aumentar el número de átomos superficiales, incrementa la reactividad química de la superficie y por lo tanto la fuerza de atracción entre partículas, por lo que tienden a aglomerarse y perder estabilidad (referencias). Para evitar esto, se utilizan agentes estabilizantes, como el citrato, goma arábiga o polivinilpirrolidona (PVP) (ChEBI, 2018), los cuales originan una fuerza de repulsión, que contrarrestan las fuerzas de Van der Waals que atraen dos partículas cercanas (Gómez-Villarraga, 2016). La liberación de iones de plata puede ser resultado de un fenómeno de desorción, provocado por la oxidación de las AgNPs ante la presencia de un agente oxidante (Leyva-Gómez, 2013). Las técnicas más utilizadas para la estabilización de partículas se describen en la Tabla 2.



**Tabla 2. Tipos de estabilización de partículas metálicas.** La información y los esquemas fueron tomados de Gómez-Villarraga (2016).

Estabilización	Descripción	Esquema
<b>Electrostática</b>	Genera compuestos iónicos disueltos en solución, entre los iones en la superficie de las NPs y sus respectivos contraiones. Se produce una doble capa alrededor y genera una repulsión de tipo electrostático entre las partículas.	
<b>Estérica</b>	Proporciona una capa protectora o barrera física, a través de la adsorción de materiales como polímeros o dendrímeros, en la superficie de las mismas. Generando una repulsión osmótica entre las coberturas de las partículas.	
<b>Electrostérica</b>	Combina la estabilización electrostática y la estérica. Se usan agentes tensoactivos iónicos (surfactantes) que contienen un grupo polar, que genera una doble capa eléctrica y una cadena lipofílica que produce la repulsión estérica.	

Se utilizan distintos métodos de obtención de AgNPs, de manera general se clasifican en: métodos físicos, los cuáles reducen el tamaño de agregación del material hasta alcanzar un tamaño nanométrico, como son la condensación de gases e irradiación láser; y los métodos químicos, a partir de la reducción de sales de plata en solución, utilizando agentes reductores como el formaldehído, el citrato, el borohidruro de sodio, o bien la reducción amoniacal de plata, utilizando azúcares reductores como la glucosa, maltosa y galactosa. (Marambio-Jones y Hoek, 2010; Singh, 2011; Leyva-Gómez, 2013).

### 1.1.3. Características de AgNPs

La evaluación del potencial biocida de las AgNPs se atribuye a las distintas características fisicoquímicas que poseen tales como la distribución del tamaño de la partícula, la morfología, el agente estabilizante o cobertura utilizada, el potencial zeta y el perfil de resonancia de plasmones (Leyva-Gómez, 2013), las cuales determinan su comportamiento en el medio (Tabla 3).

**Tabla 3. Características fisicoquímicas de las NPs.**

Propiedad	Técnica de medición	Medición	Característica o rango de medición
<b>Tamaño de la partícula</b>	Dispersión de luz dinámica	Distribución del tamaño de la partícula	1-100 nm
<b>Morfología</b>	Microscopía electrónica de barrido o de transmisión	Forma de la partícula	Esférica, triangulares, cúbicas, irregulares, etc.
<b>Potencial zeta</b>	Analizador de flujo de potencial y de flujo de corriente	Cambios en el potencial de la superficie y en las fuerzas de repulsión electrostáticas entre partículas	Las nanopartículas con un potencial z fuera del rango $\pm 30$ milivoltios (mV), son estables en suspensión
<b>Resonancia del plasmón superficial</b>	Espectrofotometría de UV-vis	Excitación colectivas de electrones libres en la superficie de partículas	Densidad de electrones en la superficie medida en nm
<b>Radio hidrodinámico</b>	Dispersión de luz dinámica	Mides las fluctuaciones en la dispersión	El tamaño de la partícula incluyendo la capa eléctrica dipolar a su superficie

Además de las características de las nanopartículas, su potencial biocida se verá fuertemente afectado por las condiciones experimentales, tales como el medio de cultivo y sus componentes. Vazquez-Muñoz *et al.* (2017) observaron que el medio de cultivo influye directamente en la actividad antimicrobiana de la AgNPs, variando las concentraciones inhibitorias (CI) hasta en 3 órdenes de magnitud, esto al observar que componentes tales como peptona y/o dextrosa pueden afectar la liberación o disponibilidad de iones de plata  $Ag^+$ . De igual manera, los iones de plata en medios biológicos y ambientales que contienen  $Cl^-$ , como el agua de mar, su uso está limitado por la formación de cloruro de plata ( $AgCl$ ) compuesto que tiene una solubilidad muy baja, de manera que precipita rápidamente (Fabrega *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 2011; Canesi *et al.*, 2012).

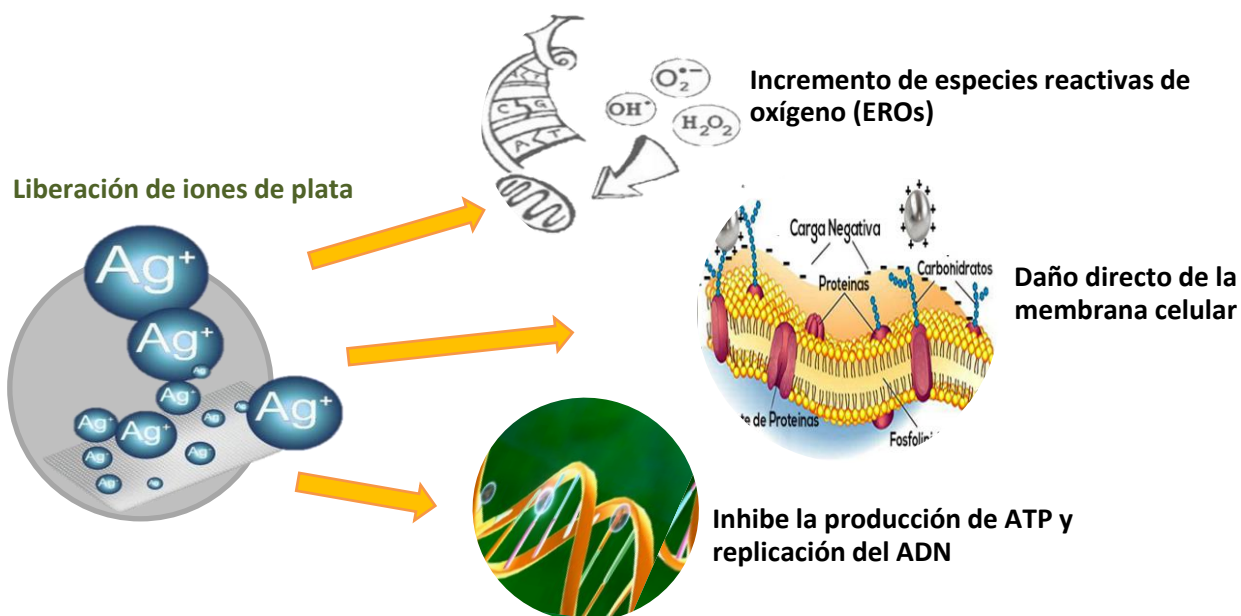
#### 1.1.4. Potencial biocida de AgNPs

El efecto tóxico de las AgNPs ha sido bien documentado ( Kim *et al.*, 2007a; Singh *et al.*, 2008; Marambio-Jones y Hoek, 2010; Abe *et al.*, 2014; Vázquez- Muñoz, 2017), pero poco se conoce sobre las vías o mecanismos por las que interactúan y ejercen este efecto. La toxicidad de los metales se ve influida por las características químicas en su superficie que tienen gran afinidad con ligandos intracelulares de O, N y S, presentes en macromoléculas. Se han propuesto diversos mecanismos de interacción entre las nanopartículas y las células, en su actuación como metal, ion o NPs (Figura 1). Esta interacción se da a partir de la producción de radicales libres que es uno de los principales mecanismos de toxicidad de nanopartículas. La liberación de iones de plata provoca un incremento de especies reactivas de oxígeno (EROs) o radicales libres, que incluyen iones de oxígeno y peróxidos, como anión superóxido ( $O_2^-$ ) y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), que pueden llevar al estrés oxidativo, causando daños significativos a las estructuras celulares, derivando en daño a la membrana, mitocondria, y ADN.

Los radicales libres son especies químicas muy reactivas, que tienen un electrón desapareado o libre capaz de capturar un electrón de moléculas estables con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica. Posteriormente, la molécula estable que se lo cede se convierte a su vez en un radical libre por quedar con un electrón desapareado, iniciándose así una reacción en cadena que destruye nuevas células (Avello y Suwalsky, 2006; Marambio-Jones y Hoek, 2010; Singh *et al.*, 2011). Un efecto derivado de la interacción de los radicales libres y las membranas biológicas es la peroxidación lipídica. La estructura básica de todas las membranas es la bicapa lipídica, rica en ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), la cual la vuelve vulnerable al ataque de un radical hidroxilo, que sustrae un hidrógeno a la cadena lateral del ácido graso, formando un radical carbonado, generando así una cadena de reacciones oxidativas consecutivas (Avello y Suwalsky, 2006). Kim *et al.* (2007) sugieren que el mecanismo antimicrobial está dado por la generación de radicales libres en la superficie de las NPs, esto al demostrar que un agente antioxidante (*N-Acetylcystein*, NAC) influye en la actividad antimicrobiana de las AgNPs, los cuales inducen a dañar la membrana de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, y consecuentemente la inhibición del crecimiento bacteriano.

Otro mecanismo propuesto, es que las NPs puede aglomerarse en la superficie o penetrar hacia el interior de la célula, afectando la permeabilidad de la misma, ya que la plata iónica interactúa fuertemente con grupos tiol de enzimas vitales de la membrana y los inactiva (Singh *et al.*, 2008); causando la pérdida de contenido celular e interrupción de la replicación del ADN, al interactuar al interior de la célula con compuestos que contienen azufre y fósforo (Avello y Suwalsky, 2006; Marambio-

Jones y Hoek, 2010). Dibrov *et al.* (2002) indican que las bajas concentraciones de Ag (hasta 10  $\mu\text{M}$ ) inducen una filtración masiva de protones a través de la membrana de *Vibrio cholerae*, indicando que la liberación de los iones  $\text{Ag}^+$  interactúan con proteínas, modificando la carga electrostática de la membrana y, con gran probabilidad de llevar a la muerte celular. Los iones libres en solución, dentro o fuera de la célula viva, interactúan electrostáticamente con los puntos ionizables de las moléculas, especialmente proteínas. Estos puntos de unión, específicamente de protones por parte de moléculas orgánicas, ocurre entre los átomos de oxígeno de grupos como silicatos ( $-\text{SiO}^-$ ), carbonilos ( $\text{R}-\text{C}=\text{O}$ ), carboxilatos ( $\text{R}-\text{COO}^-$ ) y éteres ( $\text{R}_1-\text{O}-\text{R}_2$ ) (Singh *et al.*, 2011).



**Figura 1. Mecanismo de acción de las AgNPs.** Se inicia con la liberación de los iones de plata, los cuales inducen a la formación de radicales libres, interactuando con la membrana celular, llevando a la desnaturalización de la misma o al estrés oxidativo. De introducirse al medio intracelular, puede formar enlaces covalentemente, al interactuar con compuestos que contienen azufre y fósforo, interrumpiendo la replicación del ADN.

### 1.1.5. Toxicidad de AgNPs Argovit™

En esta tesis, se utilizarán AgNPs marca Argovit™ (AgNPs Argovit™) en el marco del proyecto “Estudio del efecto AgNPs en virus, bacterias y parásitos de organismos acuáticos” del CONACyT y de la red Internacional de Bionanotecnología del Centro de Nanotecnología de la UNAM. La toxicidad relativa de estas nano partículas fue evaluada por Vazquez-Muñoz *et al.* (2017), en ensayos *in vitro* a nivel celular

ante distintos sistemas biológicos (SB), desde virus hasta células humanas, obteniendo concentraciones inhibitorias en el orden de magnitud de  $10^1 \mu\text{g} / \text{mL}$ , en todos los SB (Tabla 4). Se sustentó el trabajo experimental con un meta análisis, al evaluar el efecto tóxico del mismo nanomaterial ante los diversos grupos taxonómicos, encontrando concentraciones letales que van de  $10^{-1}$  a  $10^2 \mu\text{g} / \text{mL}$  de plata.

**Tabla 4. Concentraciones inhibitorias de AgNPs Argovit™ ante distintos modelos biológicos.** Modificado de Vazquez-Muñoz *et al.* (2017).

Sistema biológico	Organismo / línea celular	Concentración inhibitoria de AgNPs Argovit™* ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Concentración inhibitoria de AgNPs* (mM)
Virus	Virus de la fiebre del Valle del Rift (RVFV)	CE <sub>98</sub> =12	0.111
Bacterias	<i>E. coli</i> (Gram negativa) <i>S. aureus</i> (Gram positiva)	CMI=12 CMI =12	0.111
Hongo y levadura	<i>C. albicans</i> <i>F. oxysporum</i>	CMI =45 CMI =20	0.417
Protista	<i>Rhodomonas</i> sp.	CMI = 4	0.0371
Línea celular animal	Vero Dendritic (murine)	DL <sub>90</sub> =7.5	0.0695
Líneas celulares de cáncer humano	HeLa MDA-MB-231	DL <sub>100</sub> =10 DL <sub>100</sub> =10	0.0927

\*contenido de plata a partir de las AgNPs Argovit™; CE= concentración efectiva; CMI= concentración mínima inhibitoria; DL= dosis letal.

Cómo se mencionó anteriormente, el uso de AgNPs es cada vez más amplio en medicina humana y veterinaria, por lo que ha llamado la atención sobre su posible uso en sanidad acuícola y en este sentido, ya se han realizado diversos estudios; por ejemplo, Fuentes-Valencia (2017) evaluó y comparó la toxicidad de AgNPs Argovit™ y nanopartículas de plata sintetizadas en el Departamento de Física de la Universidad de Texas (UTSA) con el fin de determinar si las AgNPs tienen potencial para ser utilizadas para controlar infestaciones por parásitos ciliados en peces de cultivo. Para tal efecto, se utilizó al protozoario ciliado *Tetrahymena* sp., considerado frecuentemente como modelo biológico en ciliados de agua dulce (Sauvant *et al.*, 1999). Este parásito se expuso a diferentes concentraciones de nanopartículas y se demostró que el uso de AgNPs Argovit™ en el agua, produce la ruptura de la membrana celular y por lo tanto la muerte celular de *Tetrahymena* sp.; sin embargo, la toxicidad de las NPs fue muy variable, ya que las concentraciones letales (CL<sub>100</sub>) fueron  $3.06 \times 10^{-5}$  y  $9.8 \times 10^{-8}$  mM de plata, a los 15 min, para las AgNPs Argovit™ y UTSA respectivamente. Los resultados de las evaluaciones *in vitro* demostraron que ambas AgNPs mataron al ciliado *Tetrahymena* sp., utilizando concentraciones muy por debajo a lo

que se reportan otros autores al utilizar ciliados de agua dulce (Shi *et al.*, 2013; Abe *et al.*, 2014), por lo que se cree que su uso tendría un menor riesgo para peces tratados y para el ambiente en el que sea aplicado.

Por su parte, Juárez-Moreno *et al.* (2017), demuestran el efecto antiviral de las AgNPs Argovit™ administradas intramuscularmente en juveniles de camarón blanco (*Litopeneus vannamei*) infectados con el virus del síndrome de la mancha blanca (VSMB). Estos autores encontraron que la tasa de supervivencia fue superior al 90%, utilizando concentraciones de hasta 0.185 mM de plata en un periodo de exposición de 96 h. Adicionalmente se evaluó el efecto antiviral en organismos tratados con Argovit™, previo a la infección con el VSMB, obteniendo una tasa de supervivencia del 80% de los camarones, respecto al 10% de supervivencia reportado para organismos no tratados previamente a infección viral, además se demuestra que los camarones no se vieron afectados por estrés al ser expuestos a una sola aplicación de dicho tratamiento en 96 h. Lo que permite explorar el uso potencial de AgNPs como agente antiviral para el tratamiento de enfermedades en organismos acuícolas, como el VSMB en el cultivo de camarón.

La evidencia de la capacidad biocida de las AgNPs Argovit™ ante distintas líneas y cultivos celulares, en experimentos *in vitro*, así como su efecto *in vivo* en invertebrados marinos, como el caso del camarón, permite evaluar la toxicidad *in vitro* del parásito *P. marinus* y el efecto en su hospedero el ostión *C. corteziensis*.

## 1.2. Justificación

Es importante explorar alternativas en el tratamiento de las enfermedades infecciosas que desarrollan los organismos de interés acuícola, tal es el caso de la perkinsosis en el ostión. El protozooario *P. marinus* encuentra en ambos litorales de México, infectando al ostión americano *C. virginica* en el Golfo de México, y al ostión de placer *C. corteziensis* en el Pacífico Mexicano. Considerando el potencial biocida de nanopartículas de plata a concentraciones muy bajas, ya sea para disminuir, inhibir o erradicar no solo bacterias, sino también protozoarios, hongos y virus, se plantea la posibilidad de que dicho tratamiento sea letal para el parásito *in vitro*. Por otra parte, este efecto tóxico de las AgNPs al no ser selectivo hacia microorganismos, también puede afectar a las células del hospedero, por lo que, una de las limitantes del uso de AgNPs es su posible toxicidad reflejada en daños tisulares y la supervivencia de los organismos

tratados. Por lo anterior, se evaluará el efecto de distintas concentraciones de AgNPs, con el fin de determinar su toxicidad en el parásito *P. marinus* así como en su hospedero, el ostión de placer *C. corteziensis*.

### 1.3. Hipótesis

Las propiedades biocidas de las AgNPs, a la dosis adecuada, provocarán la muerte *in vitro* de *P. marinus*, parásito de *C. corteziensis*.

Las propiedades biocidas de las AgNPs provocarán alteraciones tisulares y posiblemente afectarán la supervivencia *in vivo* de *C. corteziensis*, hospedero de *P. marinus*.

### 1.4. Objetivos

#### 1.4.1. Objetivo general

Evaluar el potencial quimioterapéutico de nanopartículas de plata Argovit™ como tratamiento alternativo de la perkinsosis en el ostión de placer *C. corteziensis*.

#### 1.4.2. Objetivos específicos

1. Evaluar *in vitro*, el efecto de distintas concentraciones y tiempo de exposición de las nanopartículas de plata sobre la supervivencia y la morfología del protozoario *P. marinus*.
2. Evaluar *in vivo* distintas concentraciones y frecuencia de aplicación de las nanopartículas de plata en la supervivencia de *C. corteziensis*.
3. Describir los posibles daños celulares y tisulares en *C. corteziensis* expuesto a las nanopartículas de plata.

## Capítulo 2. Metodología

---

### 2.1. Aislamiento de *P. marinus*

Para obtener al parásito *P. marinus*, se solicitó a personal del Comité Estatal de Sanidad Acuícola de Nayarit (CESANAY), recolectar y enviar al laboratorio ejemplares presuntamente infectados del ostión *C. corteziensis*, proveniente de una localidad en donde *P. marinus* es endémico.

#### 2.1.1. Obtención de *C. corteziensis* presuntamente parasitados

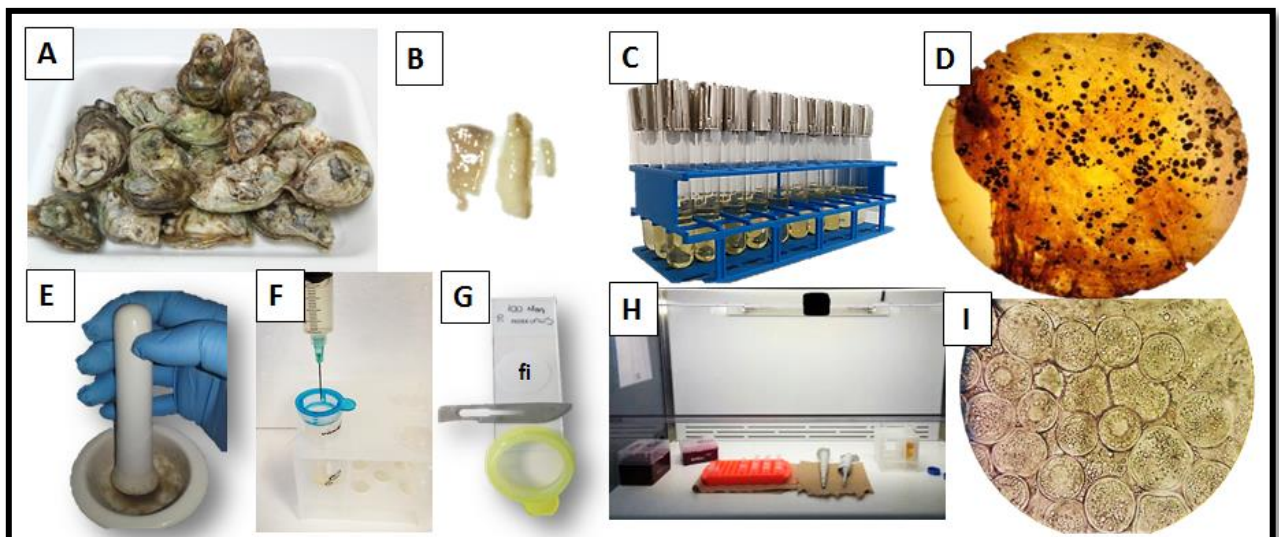
Se recibieron 120 ostiones con una longitud promedio de  $6.2 \pm 2$  cm, procedentes de Boca de Camichín, Nayarit, México. Los ostiones presuntamente parasitados fueron transportados vía aérea al laboratorio de Biología y Patología de Organismos Acuáticos del CICESE, en una hielera con bolsas de gel congelante. A su arribo, los ostiones fueron lavados con agua de mar y se distribuyeron en estanques de mantenimiento previamente preparados. Los organismos se mantuvieron en los estanques de 50 L de agua de mar (35 ups), a 25 °C, aireación constante y alimentación con pasta de microalgas (Instant Algae Shellfish Diet 1800).

#### 2.1.2. Cultivo de *P. marinus*

Del lote de ostiones, se sacrificaron 30, de los cuales se obtuvo recto, branquia y manto (~2 g) (Figuras 2A y 2B). El tejido se cortó finamente ( $<1 \text{ mm}^3$ ) con un bisturí estéril y se incubó en 10 mL de medio de cultivo fluido de tioglicolato (MFT) preparado de acuerdo al protocolo de Ray (1966) (Figura 2C), los tejidos de cada ostión se incubaron por separado. Los tubos con MFT y los tejidos se mantuvieron en oscuridad durante 7 días a temperatura ambiente ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) para favorecer el desarrollo de hiposporas de *P. marinus*. Una vez terminado el tiempo de incubación, se tomó una fracción del tejido y se colocó en un portaobjetos, se trituró con un bisturí, se agregó una gota de lugol para teñir y determinar si era positivo o no a la presencia de hiposporas, el resultado se consideró positivo al observar células teñidas de negro-azul (Figura 2D). Se seleccionaron los casos positivos de los cuales, el resto del tejido



correspondiente se maceró delicadamente con ayuda de un mortero estéril para facilitar la separación de las hipnosporas (Figura 2E). El macerado obtenido de cada ostión se tomó por separado con una jeringa de 10 mL y se hizo pasar por una serie de filtros (Falcon® Cell Strainer) de 100, 70, 40 y 20  $\mu\text{m}$  para retener el mayor número de hipnosporas (Figura 2F) (Cruz- Flores *et al.*, 2015). Se cortaron las mallas de los filtros con el material retenido (Figura 2G) y se colocaron por separado en tubos de microcentrifuga de 1.5 mL realizando una serie de lavados con agua de mar estéril y filtrada (5 lavados con 1 mL de agua de mar, centrifugación a 10,000 rpm x 3 min., temperatura ambiente) para reducir la contaminación bacteriana. Una vez que se aislaron las hipnosporas de *P. marinus*, se mantuvieron en medio de cultivo DME:Ham's F-12 suplementado con 5% de suero fetal de bovino (SFB) y suministrando antibiótico, Penicilina G (200 U/mL) y Estreptomina (200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Se agregó 1 mL de medio de cultivo a cada tubo con el filtro; las hipnosporas retenidas se agitaron con vortex para resuspenderlas, se mantuvieron en incubación a 28°C durante 6 días. Adicionalmente se hizo una siembra de hipnosporas en 10 mL de medio DME:Ham's F12 contenidos en una caja de Petri de vidrio para cultivo celular y se mantuvo a 28°C como respaldo.



**Figura 2. Cultivo *in vitro* de *Perkinsus marinus*.** A) lote de ostiones vivos; B) secciones de tejidos de branquia, manto y recto; C) incubación de tejidos en MFT; D) hipnosporas de *P. marinus* teñidas con lugol, vista al microscopio en 10x; E) tejido infectado macerado en el mortero; F) aislamiento de hipnosporas mediante filtrado; G) corte de la malla del filtro con las hipnosporas retenidas (fi); H) inóculo de filtros con hipnosporas en medio DME: Hams F12; I) hipnosporas en medio de cultivo, vista al microscopio invertido en 40 x.

Para dar seguimiento al cultivo, se realizaron conteos directos en un microscopio invertido. Inicialmente se realizaron conteos en cámara de Neubauer; sin embargo, el tamaño y baja densidad celular no permitió los conteos por este método, por lo que se optó por realizar conteos directos, considerando muestras homogenizadas de 10  $\mu$ L que se agregaban en los pocillos de una placa de cultivo celular. La preparación del medio de cultivo y los inóculos se realizaron en condiciones de esterilidad utilizando en todo momento la campana de flujo laminar (Figura 2H). Los protocolos de preparación de medios de cultivo se describen en el anexo 1.

## **2.2. Confirmación de *P. marinus***

Para confirmar si las hipnosporas obtenidas correspondían a *P. marinus*. Se realizó el análisis de su ADN mediante la técnica molecular conocida como reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). Se utilizaron 3 muestras de hipnosporas, la primera a partir de uno de los filtros con hipnosporas retenidas, y los dos restantes directamente del medio de cultivo con hipnosporas.

### **2.2.1. Extracción de ADN**

Se realizó la extracción de ADN utilizando el kit DNeasy<sup>®</sup> Blood & Tissue Kit (QIAGEN), siguiendo el procedimiento del fabricante. Las muestras se colocaron individualmente en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL y se centrifugaron a 13 800 rpm por tres minutos para formar un pellet. Posteriormente, se retiró el sobrenadante, se agregaron 180  $\mu$ L de buffer ATL y 20  $\mu$ L de proteinasa K, se mezcló con vórtex y se incubó a 56°C por 3 h con agitación cada 15 minutos. Después, se agregaron 200  $\mu$ L de buffer AL, se mezcló con vórtex y se incubó nuevamente a 56°C durante 10 min. Después, se agregaron 200  $\mu$ L de etanol al 100% mezclando con vórtex. Con una pipeta, la mezcla se depositó en una columna spin (DNeasy Mini spin column) y se centrifugó a 8 000 rpm por 1 min. Se agregaron 500  $\mu$ L del Buffer AW1 y se centrifugó por 1 min a 10 000 rpm. Se agregaron 500  $\mu$ L del Buffer AW2 y se centrifugó por 3 min a 13,800 rpm. Se transfirió la columna a un tubo para microcentrífuga estéril de 1.5 mL, se agregaron 100  $\mu$ L de buffer de elución AE al centro de la membrana de la columna, se dejó incubar durante 15 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 10 000 rpm durante 1 min. Las soluciones de ADN se almacenaron a 4 °C hasta realizar el análisis de PCR.

### 2.2.2. Análisis por PCR

La prueba de PCR se realizó a partir de iniciadores que amplifican la región espaciadora no transcrita (non-transcribed spacer, NTS) del ARN ribosomal, usando los oligonucleótidos especie-específicos para *Perkinsus marinus* (Marsh *et al.*, 1995; Robledo *et al.*, 1998, 1999), NTS-1F (5'- CAC TTG TAT TGT GAA GCA CCC - 3') y NTS-2R (5'- TTG GTG ACA TCT CCA AAT GAC -3'), obteniendo un producto de 307 pares de bases (pb). Las mezclas de PCR fueron de 25 µL utilizando los siguientes componentes: Amortiguador 1X (Tris- HCl 10 mM, pH 8.5, KCl 50 mM, MgCl 2 1.5 mM), 100 µM dNTP, 1 µM de cada primer, 1.5 U de Taq DNA polimerasa y 1 µg del ADN templado (Marsh *et al.*, 1995). La reacción de PCR se realizó en un termociclador Apollo (marca Continental Lab Products). Las condiciones de amplificación están descritas en el artículo de Elandalousi *et al.* (2004) y resumiendo fueron las siguientes: Desnaturalización inicial a 91°C por 3 minutos; 35 ciclos de 91°C por 1 min., 58°C por 1 min. 1 seg., 72°C por 1 min. 2 seg. y una extensión final de 72°C por 10 min. En todas las reacciones se incluyó un control positivo de ADN genómico de tejido de ostión infectado por *P. marinus* y un control negativo que consistió en agua estéril. Los productos de PCR (10 µl) se detectaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %. Los geles se corrieron por 1 h a 100 V y se tiñeron con una solución de Gel Red (20 µg/mL) (Biotium®). Se utilizó como referencia un marcador de peso molecular de 0.1 a 1 Kpb (Bioline®) en una concentración de 1 µg/µl.

### 2.3. Nanopartículas de plata y preparación de los tratamientos

Las AgNPs Argovit™ cuentan con certificación internacional para su utilización en medicina veterinaria y humana. Es una preparación con una concentración del 20% (200 mg/mL) de nanopartículas de plata (AgNPs) en agua, que consta del 1.2 % (12 mg/mL) de plata metálica (Ag<sup>0</sup>) cubiertas de polivinilpirrolidona (PVP) al 18.8% (18 mg/mL) (Juarez-Moreno *et al.*, 2017). Sus características se describen en la Tabla 5.

**Tabla 5. Características fisicoquímicas de AgNPs Argovit™.** Tomado de Juárez-Moreno *et al.* (2017).

Propiedades	Argovit™
Forma de las nanopartículas de plata	Esféricas
Contenido de plata metálica (mg/mL)	12
Contenido de Polivinilpirrolidona (PVP) (mg/mL)	188
Promedio del diámetro de la partícula: plata metálica (nm)	35 ± 15
Intervalo de tamaño de plata metálica por MET (nm)	1 a 90
Diámetro hidrodinámico: plata metálica con PVP (nm)	70
Potencial Z (mV)	-15
Superficie de resonancia del plasmón	420 nm
Estructura del PVP por FTIR	Confirmado

PVP: polivinilpirrolidona; FTIR: espectrometría infrarroja de transformada de Fourier; MET: microscopía electrónica de transmisión.

Se prepararon 10 mL de una solución madre de AgNPs, con una concentración de 9.27 mM (1000 µg/mL), que se calculó a partir del contenido de plata metálica (Ag<sup>0</sup>) de las mismas (12 000 µg/mL). Las soluciones se prepararon con agua destilada y se mantuvieron en oscuridad a 4°C, hasta su utilización en los bioensayos.

Igualmente se prepararon soluciones madre para los dos tratamientos de referencia, uno con nitrato de plata (AgNO<sub>3</sub>) en una solución al 9.27 mM y otro con una solución de 15 660 µg/mL de Polivinilpirrolidona (PVP), equivalente a la cobertura de la concentración más alta de Ag<sup>0</sup> de las AgNPs Argovit™ (ver cálculo en Anexo 3). La concentración del tratamiento de PVP es reportada en µg/mL dado a que se trata de un polímero, por lo que las moléculas poliméricas tienen distinto tamaño y peso molecular. Como control general, se utilizó agua destilada ya que todos los tratamientos fueron preparados con la misma. A partir de estas soluciones primarias, se hicieron las diluciones correspondientes para alcanzar las concentraciones utilizadas en los bioensayos.

## 2.4. Bioensayo *in vitro* de *P. marinus*

Con base en el estudio realizado por Vazquez-Muñoz *et al.* (2017), quienes sustentan con un meta análisis que la concentración letal para distintos sistemas biológicos (Tabla 4), en la mayoría de los estudios, se encuentran en un rango de  $10^{-1}$  a  $10^2$   $\mu\text{g}/\text{mL}$  de plata, se optó por utilizar las siguientes concentraciones:

1. **AgNPs 1:** 0.0092 mM o 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de  $\text{Ag}^0$
2. **AgNPs 2:** 0.0927 mM o 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de  $\text{Ag}^0$
3. **AgNPs 3:** 0.927 mM o 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de  $\text{Ag}^0$
4. **AgNO<sub>3</sub>:** 0.927 mM

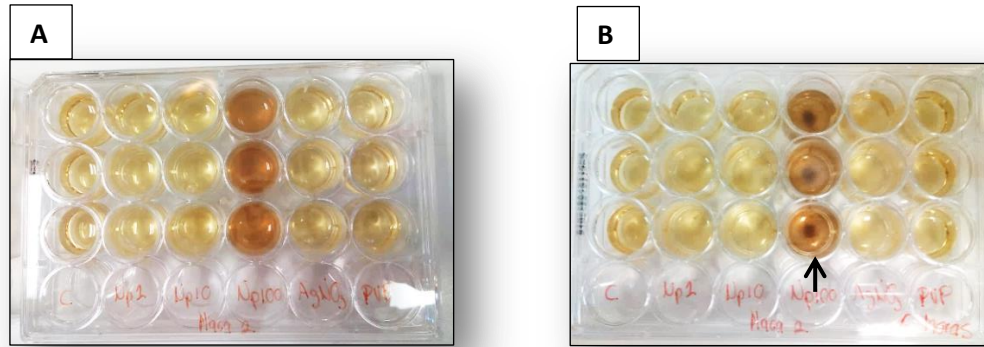
**PVP\*:** 1 566  $\mu\text{g}/\text{mL}$

### 5. Medio de cultivo

\*equivalente a la proporción presente de la concentración más alta de  $\text{Ag}^0$  de las AgNPs Argovit™

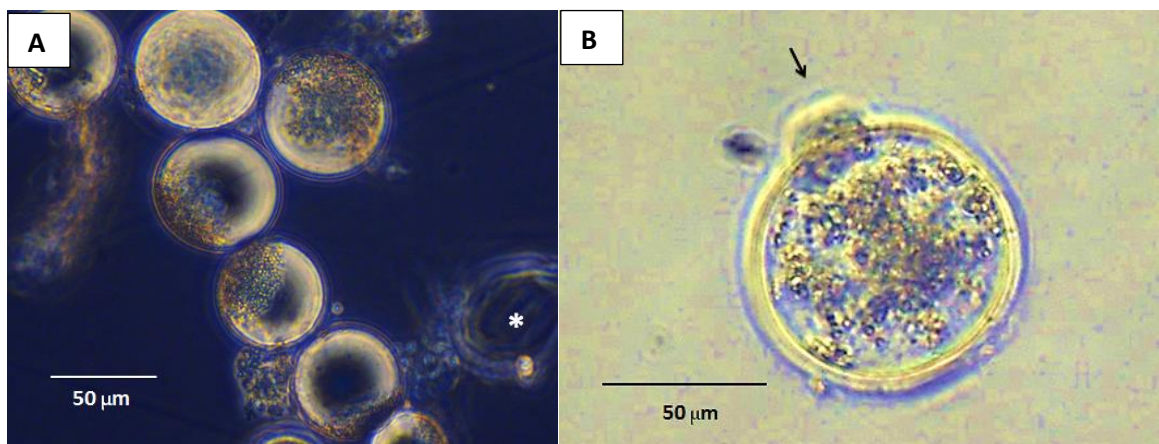
En una placa de 24 pocillos de cultivo celular (VWR®) se colocaron 10  $\mu\text{L}$  de hiposporas en medio de cultivo, con  $84 \pm 3$  hiposporas por cada pocillo. Se adicionaron 890  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo DME:Ham's F12 y 100  $\mu\text{L}$  de cada tratamiento, logrando en 1 mL las distintas concentraciones de Ag. Cada tratamiento y control se realizaron por triplicado.

Se establecieron 4 tiempos de exposición: 1, 6, 12 y 24 h. Para cada evaluación, se utilizó una placa con las características mencionadas anteriormente. Antes y después de la exposición a los tratamientos (Figura 3), se realizó conteo directo de las hiposporas de *P. marinus*, obteniendo por diferencia, el porcentaje de mortalidad en cada tratamiento y por cada tiempo de exposición. La evaluación de la mortalidad entre los tiempos de exposición, no se puede considerar como mortalidades acumuladas o interpretar de tal manera, ya que se realizó en placas separadas.



**Figura 3. Ensayo *in vitro* con *P. marinus*.** Placas de 24 pocillos con *P. marinus* en medio DME: Ham's F12 y los tratamientos por triplicado. A: Inicio de exposición a tratamientos B: Tratamientos después de la exposición por 6 h. Se utilizó una placa por cada tiempo de exposición. Se observan precipitados al fondo de los pocillos con la concentración de 0.927 mM de AgNPs 3 (señalado con flecha).

Para la evaluación de mortalidad del protozooario *P. marinus*, se consideró la morfología característica de la hipnospora, célula esférica con una pared bien definida, que puede variar en tamaño entre 10 y 70  $\mu\text{m}$  de diámetro (Figura 4A). Una forma irregular sugiere una alteración en el equilibrio osmótico de la célula con su medio que conlleva a la destrucción de la misma; por otra parte, las hipnosporas rotas implican la muerte de la célula. Adicionalmente, en las hipnosporas vivas se observó el proceso de multiplicación y reducción celular para dar origen a la formación del tubo de descarga y liberación de zoosporas (zoosporulación) (Figura 4B).



**Figura 4. Hipnosporas de *P. marinus*.** A) Se consideran vivas las células con forma esférica, pared celular bien definida y actividad de multiplicación celular en su interior. Se consideran muertas las células con forma irregular (marcada con \*) y sin evidencias de actividad celular o hipnosporas vacías. B) Multiplicación celular y formación de tubo de descarga (señalado con flecha).

Se realizó un registro fotográfico de la apariencia de las hipnosporas utilizando un microscopio invertido. Adicionalmente se destinaron muestras de hipnosporas para el análisis de la ultraestructura de *P. marinus* una vez expuesto a los distintos tratamientos.

#### **2.4.1. Análisis de ultraestructura mediante microscopía electrónica de transmisión (MET)**

Para el análisis de la ultraestructura de *P. marinus*, se colocaron 500  $\mu$ L de las hipnosporas aisladas y 500  $\mu$ L de medio de cultivo fresco y se centrifugaron (10 000 rpm, 5 min, temperatura ambiente) en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL. Se retiró el sobrenadante, se agregaron 900  $\mu$ L de medio de cultivo y se resuspendieron las hipnosporas usando el vortex. Las muestras son: Control en medio de cultivo (por 24 h) y la concentración de AgNPs 2 de 0.0927 mM de Ag (por 24 h). La fijación de las muestras fue con Glutaraldehído al 2.5 % en amortiguador de Cacodilato de sodio 0.1 M (pH 7.4), por 4 h a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron en 3 series en Cacodilato de sodio 0.1 M (pH 7.4) por 3 h. Se hizo la post fijación en tetraóxido de osmio  $\text{OsO}_4$  1% por 4 h a 4°C. Posteriormente se lavaron y se almacenaron a 4°C en Cacodilato de sodio 0.1 M. Las muestras fijadas fueron deshidratadas en series de etanol a diferentes concentraciones (20, 40, 60, 80, y dos cambios al 100 %). Posteriormente fueron embebidas en resina Spurr (Low viscosity kit, PELCO®) en diferentes concentraciones de etanol/resina (80/20, 60/40, 40/60, 20/80, y dos cambios al 100% de resina, finalmente se polimerizaron a 60°C durante 12 h. Una vez polimerizadas las muestras se realizaron ultracortes de 70 nm con un ultramicrotomo (Leica, Ultracut R) y se analizaron al TEM. No se realizó post-tinción de las muestras para poder detectar con facilidad las NPs de plata, se capturaron imágenes para su posterior análisis.

### **2.5. Experimentos *in vivo* en *C. corteziensis***

#### **2.5.1. Obtención de *C. corteziensis* aparentemente sanos**

Se obtuvo un lote de 190 organismos aparentemente sanos, con una longitud promedio de  $10.5 \pm 2$  cm de desviación típica, procedentes del Estado de Sinaloa, México. Los organismos fueron transportados

vía aérea al laboratorio de Biología y Patología de Organismos Acuáticos del CICESE, en una hielera con bolsas de gel congelante. Los ostiones fueron lavados y se mantuvieron en aclimatación por 7 días en agua de mar (35 ups), aireación constante, a 25 °C y alimentados *ad libitum* con cultivo vivo de microalgas *Isochrysis* sp. variedad tahitiana (T-Iso).

### 2.5.2. Primer bioensayo: Aplicación única de diferentes dosis de AgNPs

Para el bioensayo se asignaron aleatoriamente 5 ostiones por cada unidad experimental (UE), considerando 6 tratamientos por triplicado, utilizando un total de 90 organismos (N=90). Las unidades experimentales consistieron en acuarios de vidrio con volumen de 15 L, bajo las condiciones descritas en el apartado 2.5.1.

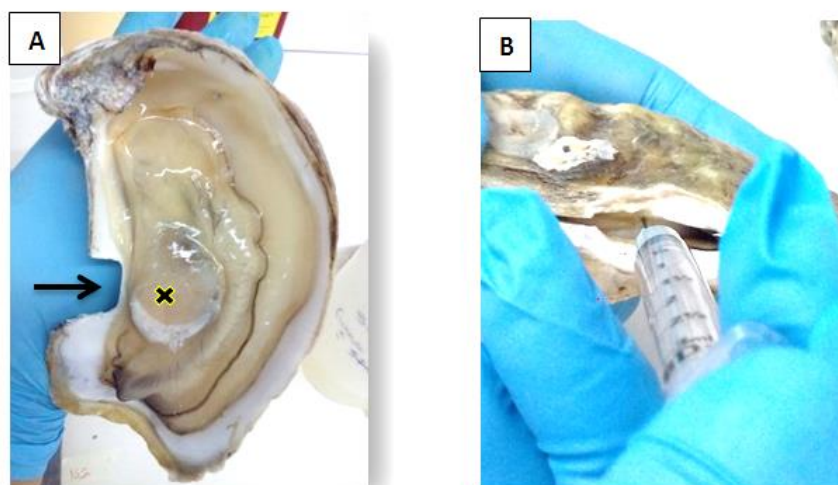
La aplicación de los tratamientos fue vía una inyección en el músculo aductor. Para tal efecto, se realizó una muesca, con ayuda de un esmeril, en el borde de la concha, a la altura del músculo aductor (Figura 5). La inyección fue realizada con una jeringa de 3 mL con aguja medida 23G x 25 mm marca BD Plastipak™, administrando 100 µL de cada tratamiento:

1. **AgNPs 2:** 0.0927 mM o 10 µg/mL de Ag<sup>0</sup>
2. **AgNPs 3:** 0.927 mM o 100 µg/mL de Ag<sup>0</sup>
3. **AgNPs 4:** 9.27 mM o 1000 µg/mL de Ag<sup>0</sup>
4. **AgNO<sub>3</sub>:** 9.27 mM
5. **PVP:** 15 660 µg/mL
6. **Agua destilada\***

\*tratamientos de referencia.

Estos tratamientos fueron elegidos con base en el trabajo reportado por Juarez-Moreno *et al.* (2017), quienes utilizan las AgNPs Argovit™ en concentraciones de hasta 0.185 mM de Ag<sup>0</sup> para el tratamiento del VSMB en juveniles de camarón blanco *L. vannamei*, sin comprometer la supervivencia de los organismos tratados. Con el fin de evaluar la toxicidad de las AgNPs en ostiones adultos, se extendió el rango de concentraciones hasta 9.27 mM de Ag<sup>0</sup> (AgNPs 4).



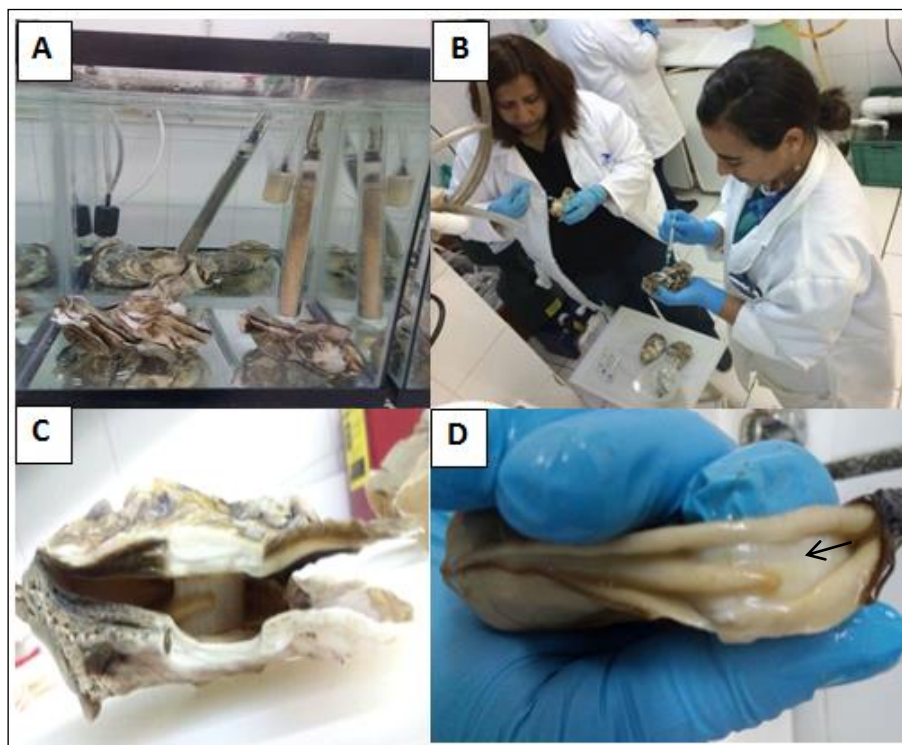


**Figura 5. Aplicación de AgNPs a *C. corteziensis*.** A) Ostión al que se le ha retirado la valva derecha para que se pueda observar la posición del músculo aductor (marcado con una X en la imagen) en dónde se aplicó la inyección. La flecha indica la muesca realizada; B) Ejemplar vivo del bioensayo en dónde se muestra el procedimiento de inyección del tratamiento correspondiente, en el músculo aductor.

Una vez aplicadas las inyecciones, se tomó un ostión de cada tratamiento a las 24, 48, 72, 96 y 120 h para ser fijado en solución Davidson y posteriormente hacer el análisis histológico correspondiente. Se registró la mortalidad diaria y acumulada de los ostiones durante el experimento.

### 2.5.3. Segundo bioensayo: Aplicación múltiple de diferentes dosis de AgNPs

A partir del lote de ostiones mencionado anteriormente, se asignaron aleatoriamente 4 ostiones (N=72) por cada unidad experimental (UE) manteniendo las condiciones estándar mencionados en el apartado 2.5.1. Los tratamientos utilizados fueron los mencionados en el apartado 2.5.2, con la diferencia de que en este bioensayo se realizaron hasta 5 aplicaciones intramusculares (una inyección cada 24 h). Se llevó el registro de la mortalidad diaria entre los tratamientos.



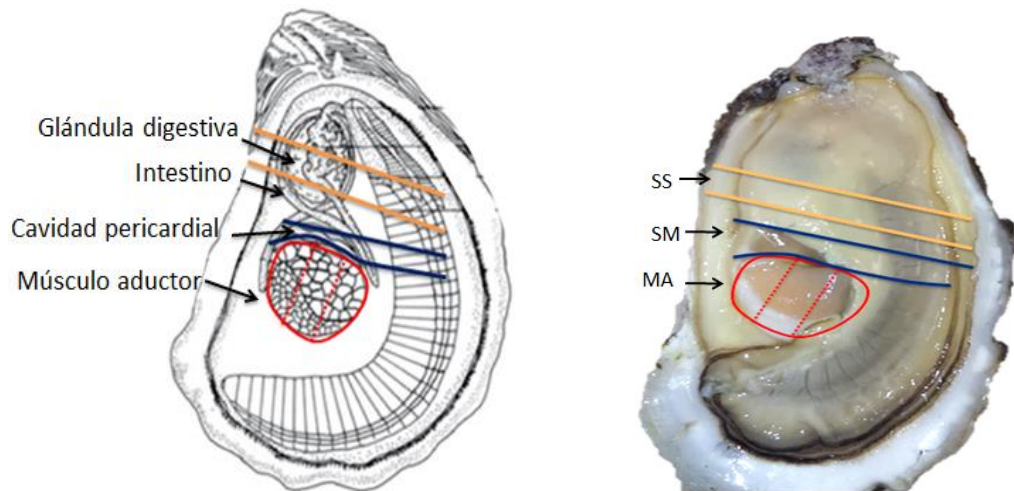
**Figura 6. Ensayo *in vivo* con *C. corteziensis*.** A) Distribución aleatoria de ostiones en unidades experimentales, que constan de acuarios divididos en dos secciones, cada una con 15 L de agua de mar, a 25°C y aireación constante; B) aplicación diaria de los tratamientos vía intramuscular; C) organismo muerto *post* exposición al tratamiento  $\text{AgNO}_3$  después de 3 inyecciones; D) parte lateral posterior del cuerpo de ostión muerto, una vez removido de la concha, en el cual se observa el músculo aductor inflamado (señalado con la flecha).

Los ostiones muertos durante el bioensayo y los supervivientes al final del mismo, se fijaron en solución Davidson para su posterior procesamiento histológico, donde se evaluó el daño a los tejidos y la presencia de plata en el organismo.

## 2.6. Análisis histológico

Después de un periodo de fijación de al menos 72 h en solución Davidson, el cuerpo de los ostiones se dividió y cortó, con ayuda de un bisturí, en 3 secciones: Sección superior (SS) que incluyó a la glándula digestiva, manto y branquias; sección media (SM) que incluyó a la cavidad pericárdica, intestino y branquia; y la sección del músculo aductor (MA), realizando cortes transversales (Figura 7).

Se realizaron las tinciones de Hematoxilina-Eosina (Shaw y Battle, 1957) y revelado de plata o autometalografía (ATM) (Miller *et al.*, 2016) (Ver anexos 4 y 5). El análisis histológico se realizó para ilustrar el daño y la presencia de plata en los tejidos.



**Figura 7. Secciones de cortes para histología.** Se ilustran los tres cortes realizados al ostión. Con naranja se indica la sección superior (SS) que incluye principalmente glándula digestiva, branquias y manto; la sección media (SM) azul incluye el corazón, intestino, branquia y manto; y en rojo el músculo aductor (MA) con tres cortes transversales. Esquema modificado de Kennedy *et al.* (1996).

## 2.7. Análisis estadístico

Para el ensayo *in vitro*, se consideró como variable de respuesta la mortalidad de las células con base en su morfología, el resultado se expresó en porcentaje (%). Se contrastaron las varianzas de la mortalidad registrada entre los tratamientos referentes a cada tiempo de exposición por separado. Se realizó un análisis de varianza Anova de 1 vía o Kruskal-Wallis en función del cumplimiento de los supuestos estadísticos correspondientes para contrastar el efecto de las distintas concentraciones de AgNPs en cada evaluación realizada. En todos los casos se realizó la prueba *post hoc* de Fisher.

Para los ensayos *in vivo*, se consideró como variable de respuesta la mortalidad acumulada registrada en cada tratamiento. El primer bioensayo no cumplió con los supuestos de normalidad y homocedasticidad, por lo que se optó por usar la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Para el segundo bioensayo, cumpliendo con los supuestos de normalidad y homocedasticidad, se llevó a cabo el análisis de varianza Anova de 1 vía, contrastando diferencias estadísticamente significativas con la prueba *post hoc* de Fisher.

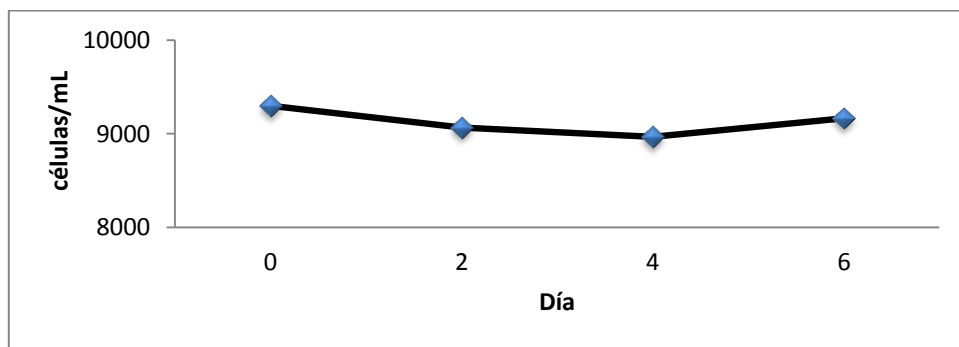
Derivado del análisis histológico, se contrastó la magnitud de la inflamación y la necrosis del músculo aductor. Se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (H), en pruebas separadas por orden de magnitud (ligera, media y severa), para determinar si existen diferencias en la respuesta manifestada entre las distintas concentraciones de AgNPs; en todos los casos, se realizó la prueba *a posteriori* de Tukey.

El análisis estadístico fue realizado utilizando el programa Statistica versión 10, considerando en todos los casos, el alfa o nivel de significancia de 0.05.

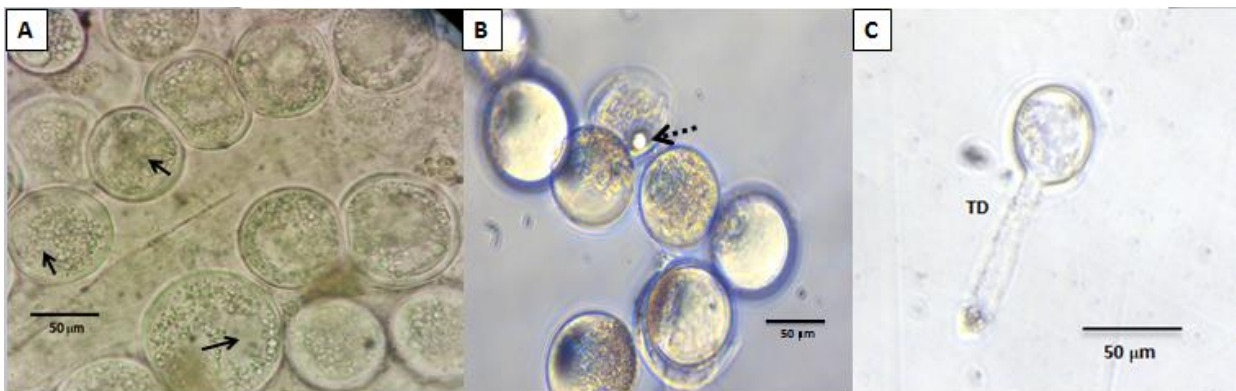
## Capítulo 3. Resultados

### 3.1. Cultivo *in vitro* de *P. marinus*

A pesar de que el número de ejemplares infectados por *P. marinus* en la muestra fue del 13 %, se logró con éxito el desarrollo de las hipnosporas, el aislamiento y mantenimiento del parásito. Se mantuvieron hipnosporas de *P. marinus* en medio de cultivo durante 6 días, realizando conteos y evaluando su morfología cada dos días. La concentración de hipnosporas se mantuvo estable (Figura 8), en algunos casos se observó proliferación celular y formación del tubo de descarga (Figura 9).

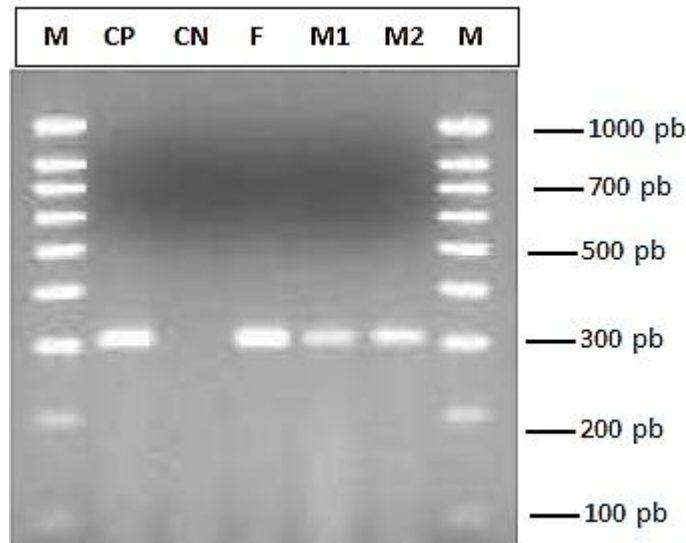


**Figura 8. Conteo de hipnosporas de *P. marinus*.** Conteos directos en los días 0, 2, 4 y 6, previo a la realización de los bioensayos.



**Figura 9. Seguimiento de cultivo *in vitro* de *P. marinus*.** A) Día 0, aislamiento de las hipnosporas de *P. marinus*, vista en microscopio óptico en 40x; B) día 2, hipnosporas en aparente proliferación y con la marca para desarrollo del tubo de descarga (señalado con flecha punteada); C) día 6, desarrollo de un tubo (TD) de descarga, característico de esta fase de vida. Barras de escala = 50  $\mu\text{m}$ .

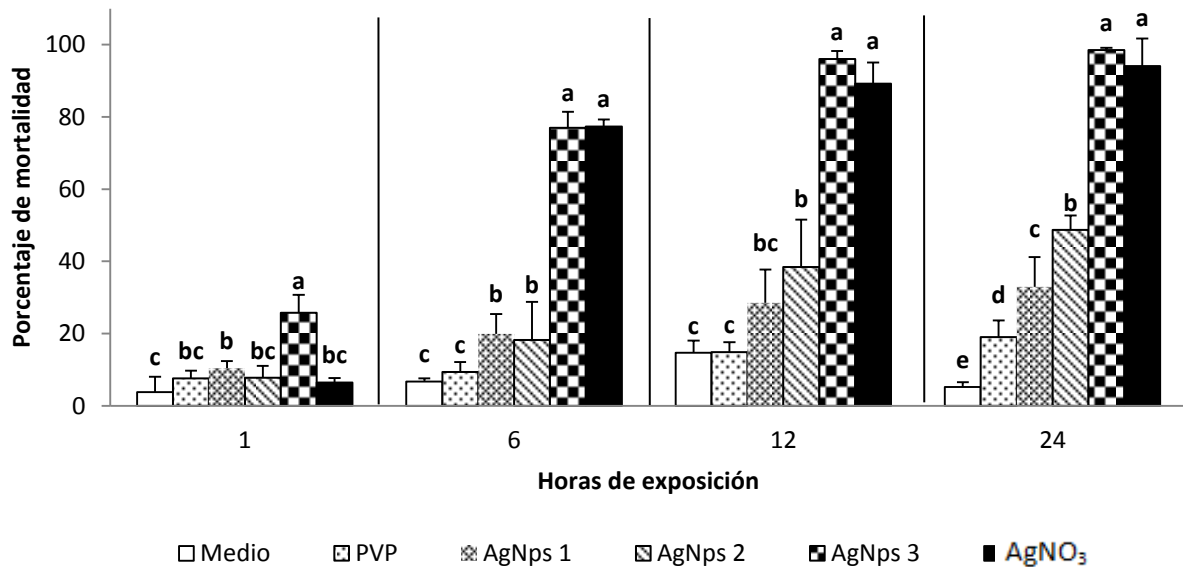
El análisis de ADN mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) demostró que las hipnosporas corresponden a *P. marinus*, al obtener un producto de 307 pb, a partir de los iniciadores para la región NTS (Figura 10).



**Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa de los productos amplificados por PCR para identificar a *P. marinus*.** M: marcador de paso molecular, CP: control positivo, CN: control negativo, F: filtro con hipnosporas, M1 y M2: muestras 1 y 2 de hipnosporas en medio de cultivo. El resultado es positivo para las muestras analizadas.

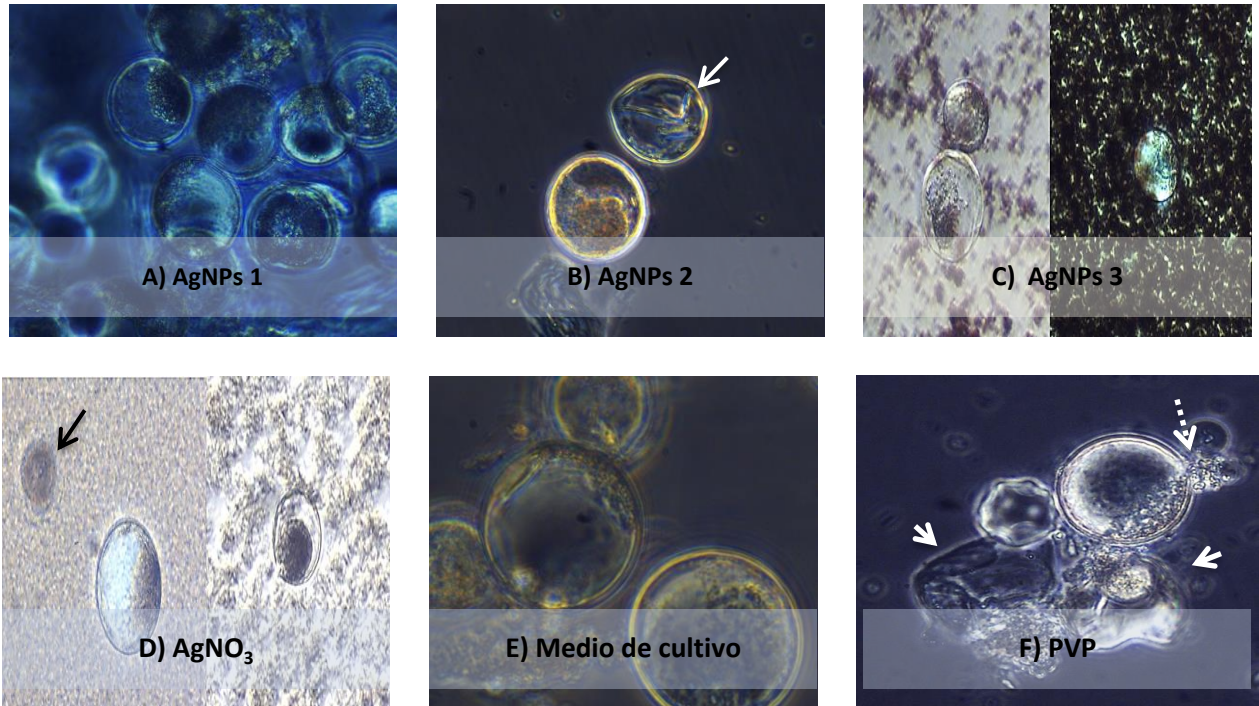
### 3.2. Mortalidad *in vitro* de *P. marinus*

En la Figura 11 se grafica la mortalidad de las hipnosporas de *P. marinus* en distintos tiempos de exposición. Después de una hora de exposición, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre la concentración de AgNPs 3, respecto al resto de los tratamientos. Posteriormente, la concentración AgNPs 3 y el  $\text{AgNO}_3$ , 0.927 mM de Ag, mostraron ser altamente letal para las hipnosporas de *P. marinus*, ya que la mortalidad superó el 70 % (DL70) en solo 6 h de exposición; igualmente, se observan diferencias entre las concentraciones de AgNPs 2 respecto a AgNPs 1 y los tratamientos de referencia PVP y medio de cultivo a partir de las 6 h de exposición (Figura 11). Después de 12 h de exposición se muestra la tendencia de la evaluación anterior, al ser significativamente mayor la mortalidad en el tratamiento AgNPs 3 y  $\text{AgNO}_3$ . En la última evaluación, a las 24 h, la dosis letal (DL100) se registra en el tratamiento AgNPs 3, la dosis letal media (DL50) se obtuvo con la concentración de AgNPs 2 en 24 h, la cual resulta ser estadísticamente diferente al resto de los tratamientos.



**Figura 11. Porcentaje de mortalidad de *P. marinus* en los distintos tiempos de exposición.** En el eje horizontal se indican los tratamientos y en el eje vertical el porcentaje de mortalidad, contrastando diferencias estadísticas en cada evaluación con las diferentes letras (<sup>abc</sup>), mediante el análisis *a posteriori* de Fisher (LSD). Medio de cultivo, PVP: 1566 µg/mL, AgNPs1: 0.00927 mM de Ag, AgNPs2: 0.0927 mM de Ag, AgNPs3: 0.927 mM de Ag, AgNO<sub>3</sub>: 0.927 mM.

Se llevó el registro fotográfico en cada evaluación de mortalidad, el cual se muestra en la Figura 12. Los principales efectos observados son las alteraciones en la estructura esférica de las hiposporas (señalados por flechas blancas), mostrando en algunos casos, la desintegración total de la célula (Figura 12D, señalado con flecha negra). A partir de las 6 h de exposición, en los tratamientos con la concentración más alta de plata, tanto en AgNPs 3 como en AgNO<sub>3</sub>, se encontraron precipitados al fondo de los pocillos, conservando la morfología en algunas hiposporas (Figura 12 C y 12 D).



**Figura 12. Registro fotográfico de *P. marinus*.** Apariencia de las hiposporas en los diferentes tratamientos. A) 24 h en 0.00927 mM de Ag, se mantiene la morfología de las células; B) 12 h en 0.0927 mM de Ag, comienza a ser evidente la alteración de la morfología de las hiposporas; C) 6 y 12 h en 0.927 mM de Ag, se observan los precipitados de AgNPs al fondo, las pocas hiposporas sobrevivientes aún conservan su morfología; D) 12 y 24 h en  $\text{AgNO}_3$ , en la esquina superior izquierda se observa el residuo de una hipospora desintegrada completamente, precipitados de  $\text{AgNO}_3$  en el fondo; E) 24 h en medio de cultivo DME:Ham's F12, morfología característica de las hiposporas en aparente estado inactivo; F) 24 h en tratamiento PVP, se ve deformidad de la pared celular, la única célula que conserva su morfología se observa liberando su contenido (flecha punteada).

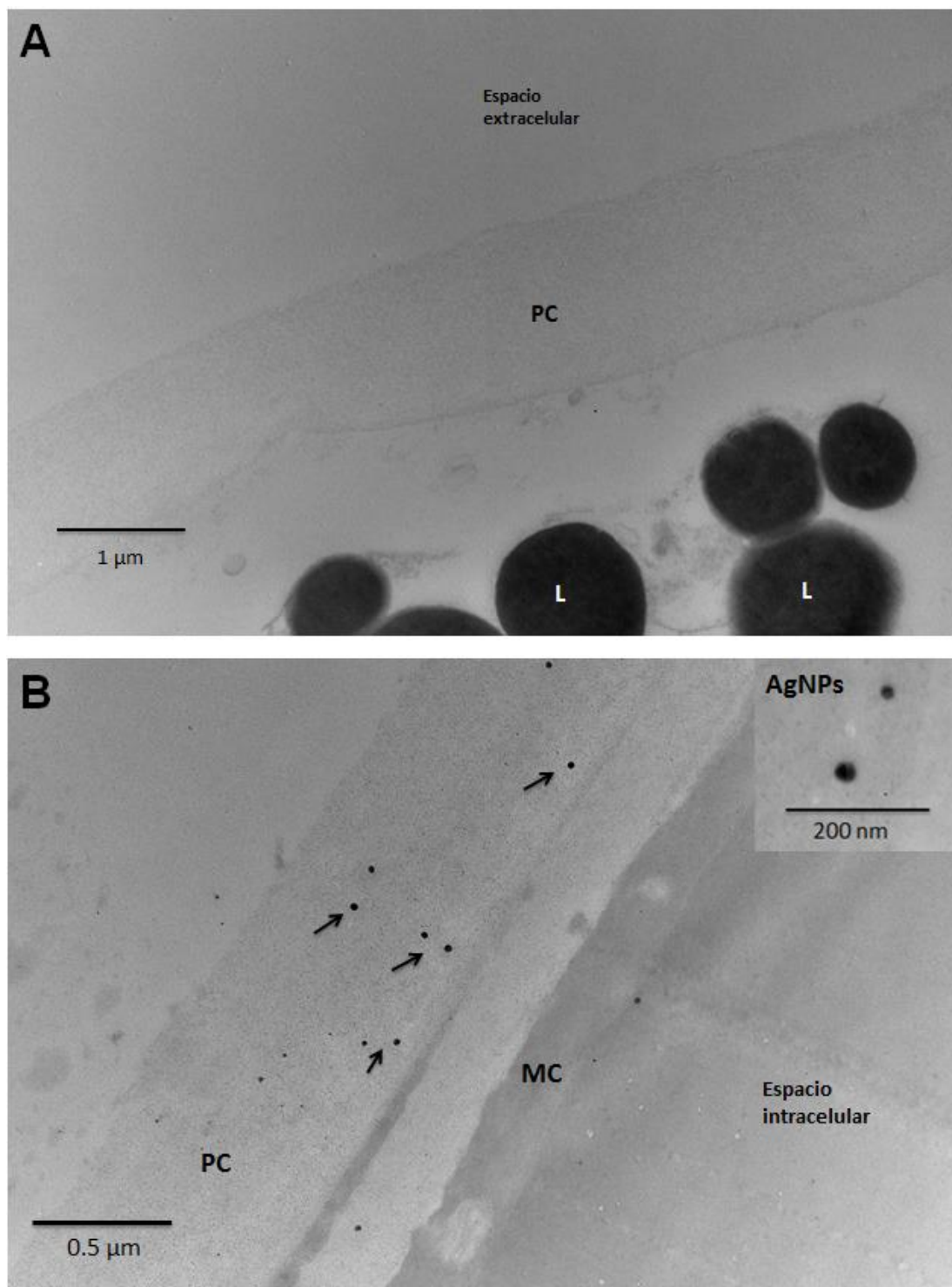
Juzgando por la apariencia, todos los tratamientos reflejan un efecto tóxico sobre las hiposporas de *P. marinus*, incluso el tratamiento de PVP, aunque en menor magnitud, respecto a los tratamientos de AgNPs.

### 3.2.1. Ultraestructura de *P. marinus* utilizando MET

El análisis de la ultraestructura mediante MET, permitió identificar distintas estructuras características de las hiposporas de *P. marinus*, como una pared que delimita a la hipospora, continua a una capa intermedia y la membrana celular, al interior se encuentra una gran vacuola, rodeada de gotas de lípidos.



En el tratamiento con AgNPs se observa claramente la presencia de ellas dentro de la pared celular (Figura 13).



**Figura 13. Ultraestructura de hipospora de *P. marinus*.** A) acercamiento a la pared celular (PC) en el tratamiento control, la cual contrasta de la capa de la pared celular (PC) y al interior de la hipospora, sobresalen gotas de lípidos (L). TEM 10,000 x; B) Acercamiento en la pared de la hipospora expuesta a AgNPs 2 por 24 h, se señalan estructuras como la membrana celular (MC) y la bien definida pared celular (PC), donde se observa la presencia de AgNPs, señaladas con las flechas. TEM 20,000x.

### 3.3. Bioensayos *in vivo* en *C. corteziensis*

#### 3.3.1. Primer bioensayo: Aplicación única de diferentes dosis de AgNPs

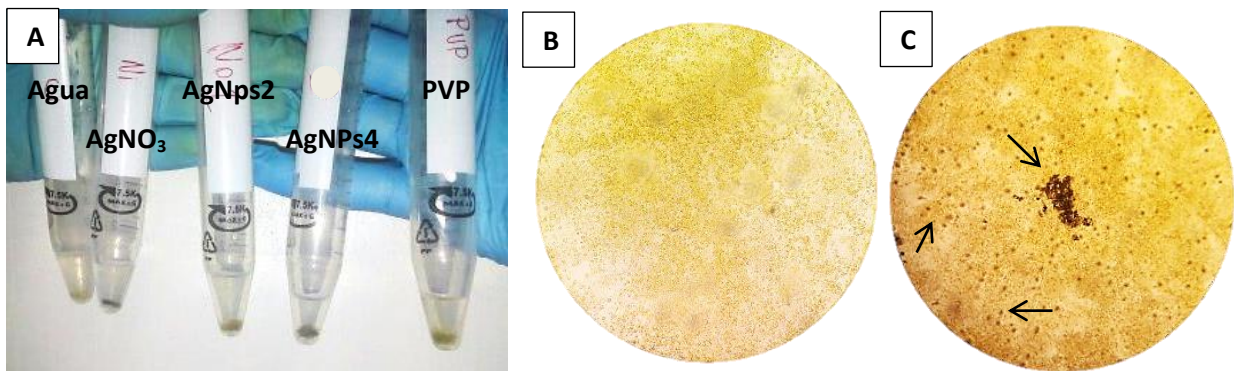
La mortalidad registrada de los organismos, no muestra diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, de acuerdo al valor estadístico de Kruskal-Wallis:  $H_{5,18} = 3.4$ ,  $p = 0.638$  (Tabla 6). Después de 120 h de ser aplicada una dosis de las distintas concentraciones de AgNPs y los tratamientos de referencia, se observaron 3 ostiones muertos; el primero corresponde al tratamiento PVP y se detectó a las 24 h después de la inyección; este organismo presentó el recto desecho debido a la inyección, atribuyendo su muerte al daño ocasionado por la manipulación. A las 48 h de aplicación, se encontró un ostión moribundo en el tratamiento de  $\text{AgNO}_3$  (9.27 mM) y a las 72 h un ostión muerto en la concentración más alta de AgNPs 4 (9.27 mM de Ag).

**Tabla 6. Mortalidad de ostiones con una sola aplicación.** Mortalidad registrada después de la aplicación única de cada tratamiento durante 5 días de exposición.

Tratamiento	PVP	AgNPs 4	$\text{AgNO}_3$	-	-
Horas post exposición	24	48	72	96	120
Ostiones muertos	1 <sup>ns</sup>	1 <sup>ns</sup>	1 <sup>ns</sup>	0 <sup>ns</sup>	0 <sup>ns</sup>
Observación	Recto deshecho	Valvas separadas	Valvas separadas	No hay mortalidad	No hay mortalidad

<sup>ns</sup>No significativo. No hay diferencias estadísticamente significativas en la entre la mortalidad y las distintas dosis de plata.

Adicionalmente, se observaron a simple vista diferencias en la coloración de las heces de los organismos entre los distintos tratamientos (Figura 14), la coloración amarilla o dorada, está dado por el alimento vivo con *Isochrysis* sp. (Figura 14 B). En los tratamientos con mayor contenido de plata, AgNPs 4 y  $\text{AgNO}_3$ , se encontró que las heces muestran una coloración oscura, lo que da un indicio de que la plata está siendo excretada por los organismos a través de las heces (Figura 14 C).



**Figura 14. Heces recuperadas de los diferentes tratamientos.** A) Contraste en la coloración de las heces a simple vista, observando heces en color oscuro en los tratamientos nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) y AgNPs 4; B) heces en el tratamiento de referencia (agua destilada); C) heces de ostiones expuestos a 9.27 mM de AgNPs, señalando los presuntos precipitados de plata (vista en 10x).

Debido a que no se registraron mortalidades importantes realizando una sola aplicación, se realizó el segundo bioensayo *in vivo*, realizando aplicaciones continuas de las distintas concentraciones de AgNPs.

### 3.3.2. Segundo bioensayo: Aplicación múltiple de diferentes dosis de AgNPs

Las diferencias en la mortalidad registrada después de múltiples aplicaciones fueron estadísticamente significativas ( $F_{5,12} = 3.78$ ,  $p = 0.0274$ ) (Tabla 7). El tratamiento con  $\text{AgNO}_3$  demostró ser altamente letal para *C. corteziensis*, al obtener el 100 % de mortalidad realizando hasta cuatro inyecciones con dosis de 9.27 mM cada 24 h. Los tratamientos con AgNPs 3 y 4, las concentraciones de 0.927 y 9.27 mM de Ag, después de 5 inyecciones, resultaron con el 50 y 58 % de mortalidad, respectivamente. En los tratamientos de referencia con agua destilada y PVP se observó una mortalidad del 33 %. La menor mortalidad registrada (8 %), después de 5 inyecciones, fue con la concentración de 0.0927 mM de Ag a partir de las AgNPs 2 (Tabla 7).

**Tabla 7. Mortalidad diaria y acumulada de ostiones expuestos a múltiples aplicaciones.** Mortalidad diaria y acumulada de ostiones, registrada durante 5 días de inyección de cada tratamiento.

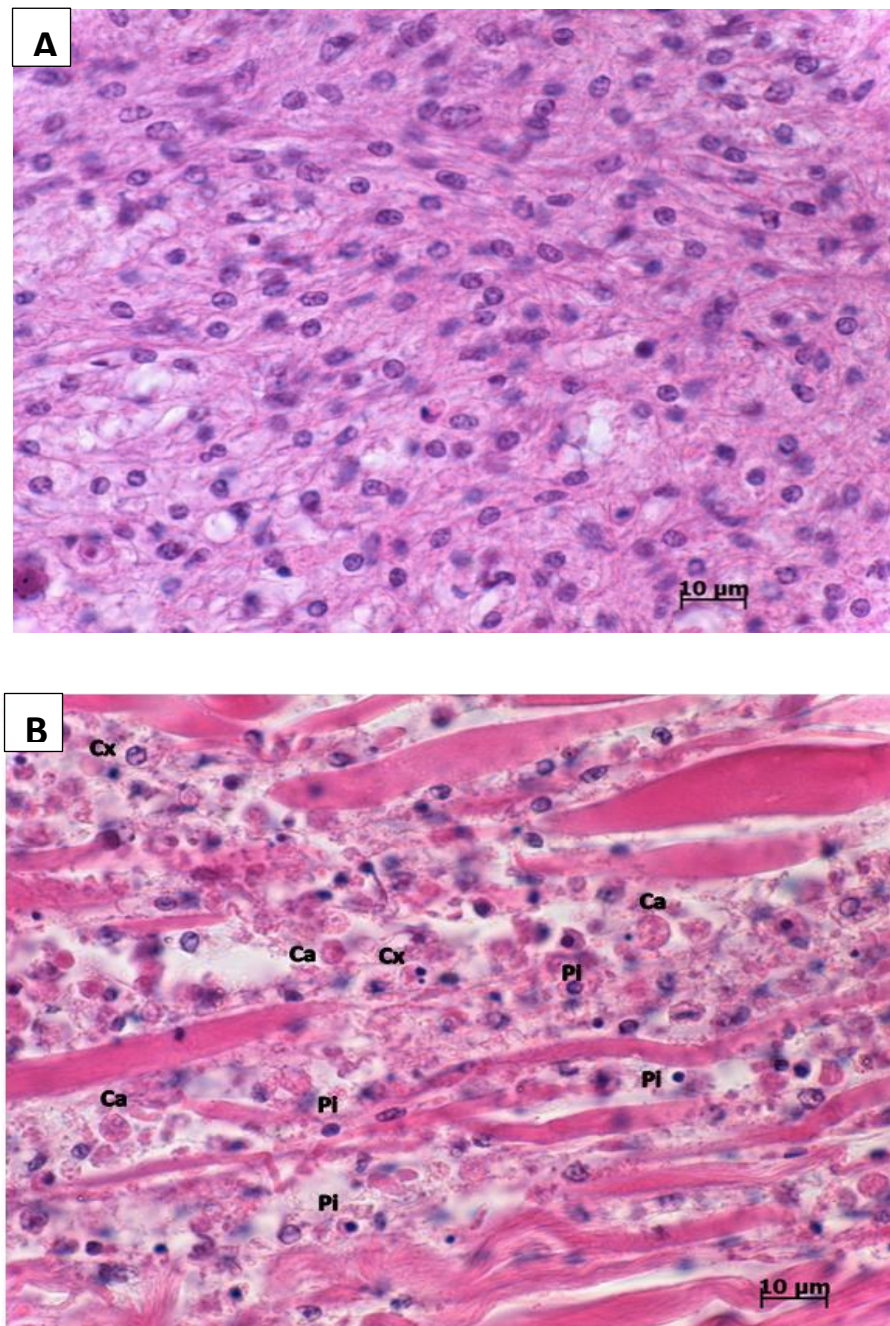
Tratamiento	Día/ Inyección					Mortalidad acumulada	Porcentajes de Mortalidad
	1/1	2/1	3/1	4/1	5/1		
Agua destilada	0	1	2	1	0	4 <sup>bc</sup>	33
PVP	0	1	0	1	2	4 <sup>bc</sup>	33
AgNPs 2: 0.0927 mM	0	0	0	0	1	1 <sup>c</sup>	8
AgNPs 3: 0.927 mM	0	0	2	2	2	6 <sup>bc</sup>	50
AgNPs 4: 9.27 mM	0	0	0	4	3	7 <sup>ab</sup>	58
AgNO <sub>3</sub> : 9.27 mM	0	4	5	3	0	12 <sup>a</sup>	100

<sup>abc</sup> Las letras de significancia estadística se agruparon con base al análisis *post hoc* de Fisher ( $P < 0.05$ ), mostrando diferencias estadísticamente significativas entre distintos tratamientos.

Además de la evaluación de la supervivencia de los ostiones expuestos a distintas concentraciones de AgNPs, se realizó la descripción de los daños tisulares producidos por la aplicación de los distintos tratamientos, mediante el análisis histológico.

### 3.4 Análisis histológico

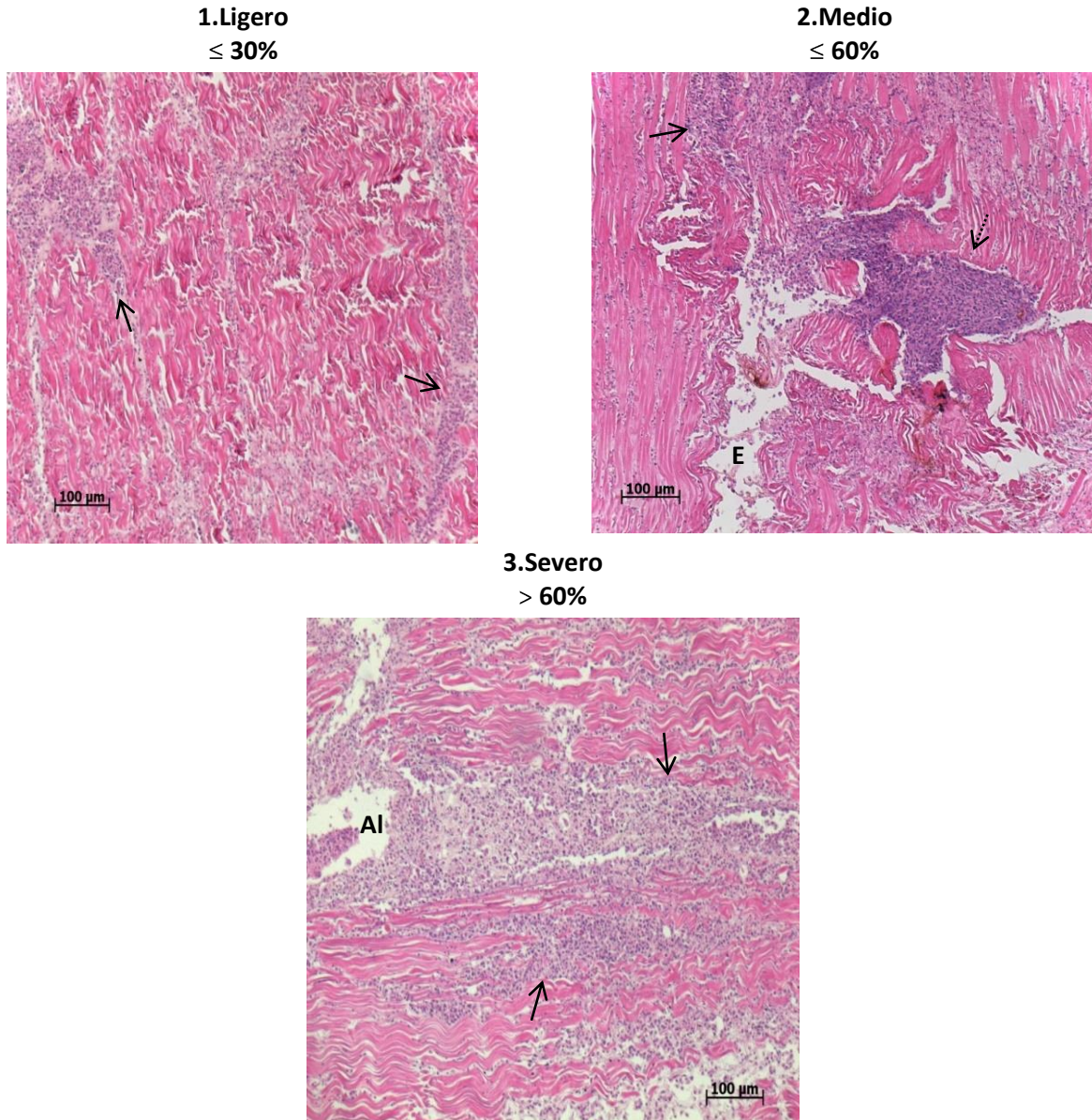
El análisis histológico mostró los daños atribuidos al proceso de inyección y al efecto de AgNPs empleadas en distintas concentraciones. En la Figura 15 A, se muestra la respuesta inflamatoria, de carácter reversible, a consecuencia de la introducción de la aguja y expansión del fluido inyectado. La necrosis tisular, que comprende un estado irreversible de la célula, como consecuencia de la toxicidad del AgNO<sub>3</sub>. La degradación de los tejidos por necrosis, muestra una gran infiltración de hemocitos dañados, que ilustran los signos de la necrofanerosis: cariorrexis (cx) o fragmentación del núcleo, la picnosis (pi) o núcleos picnóticos, mostrando retracción del núcleo con condensación de la cromatina y la cariólisis (ca), donde ocurre la disolución del núcleo y pérdida de la estructura normal del citoplasma mostrando gran afinidad acidófila, los cuales se ilustran en la Figura 15 B.



**Figura 15. Secciones de músculo aductor del ostión que reflejan diferencias entre una inflamación y una necrosis. A)** Efecto por inyección. Reacción inflamatoria reversible, reflejada en una gran infiltración de hemocitos, acumulados entre las fibras musculares. El tratamiento aplicado fue agua destilada. **B)** Efecto tóxico del  $\text{AgNO}_3$ . Degradación de los tejidos por signos de necrosis; cariorrexis (cx), la picnosis (pi) o núcleos picnóticos y la cariólisis (ca). Tinción hematoxilina-eosina.

En todos los tratamientos se observó inflamación en el músculo aductor, el cual puede ser un efecto reversible atribuido a la inyección, sin embargo, se observan distintas magnitudes de la inflamación:

ligero, considerando la infiltración focal de hemocitos, cubriendo hasta el 30 % de tejido; medio, induciendo la respuesta focal y difusa de hasta 60 % del tejido; y severo, con inflamación difusa en más del 60 % del tejido (Figura 16).

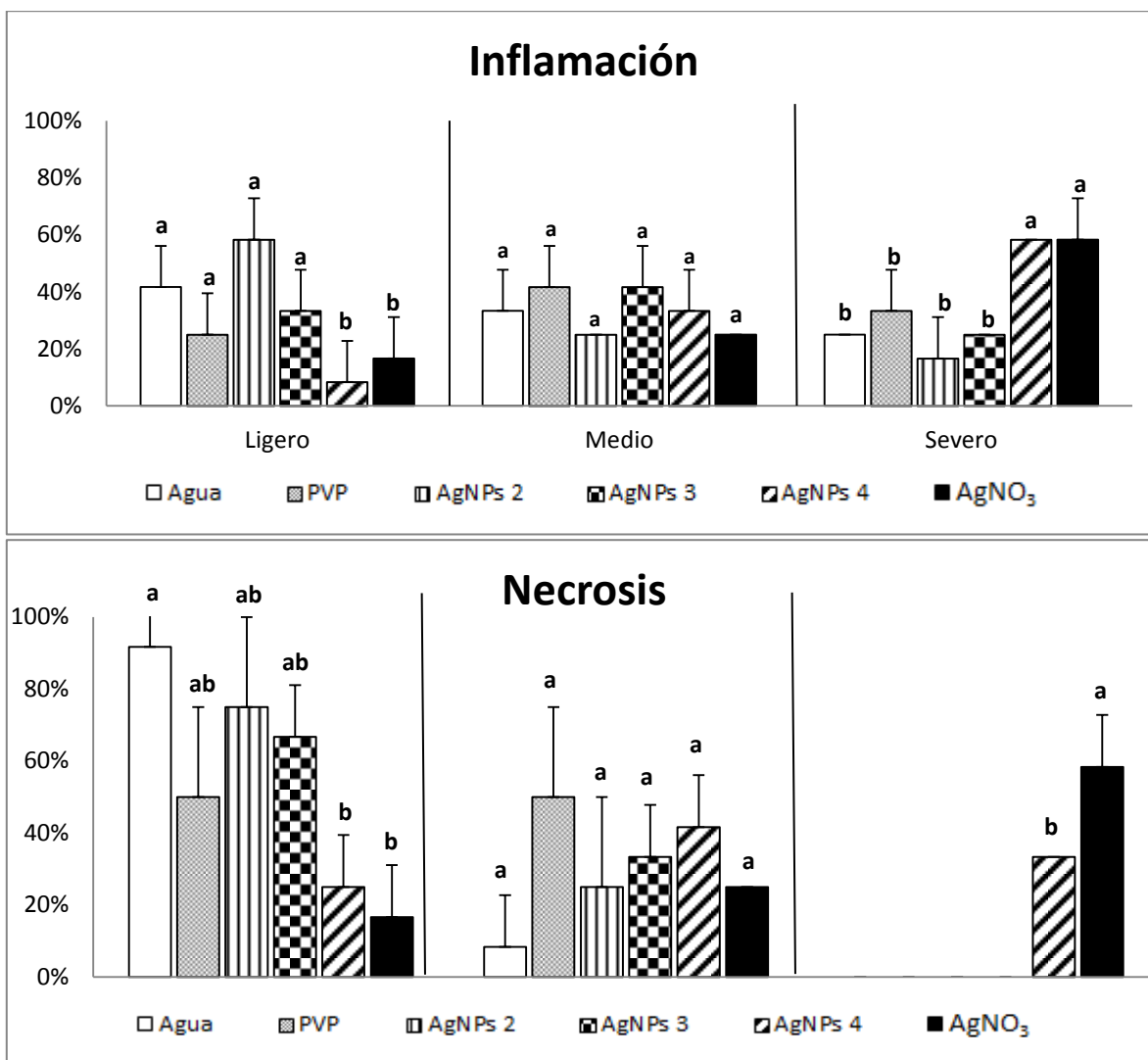


**Figura 16. Sección de músculo aductor con distintos grados de inflamación.** A) Inflamación ligera (flechas) en el tratamiento AgNPs 3, con infiltración difusa de hemocitos (coloración morada); B) Inflamación media (flecha punteada) con infiltración de hemocitos focal y difusa, tratamiento de AgNPs 4, acompañada de separación de las fibras musculares por acumulación de líquidos o edemas (E); C) Infamación severa (flechas), con infiltración de hemocitos en la mayoría del tejido, tratamiento de AgNPs 4 acompañada de la autólisis del tejido (AI), dado a que se trata de un organismo muerto.

Se determinó que existen diferencias en la respuesta inflamatoria entre las distintas concentraciones de AgNPs; la reacción de menor magnitud (Figura 17 A) se observó mayormente en las concentraciones de

AgNPs 2, AgNPs 3 y los tratamientos de referencia, siendo estadísticamente diferente ( $H_{5,18}= 12.08$ ,  $p= 0.03$ ) a la concentración de 9.27 mM de Ag, en forma de AgNPs y  $AgNO_3$ . Por el contrario, la respuesta inflamatoria severa se observó en el tratamiento AgNPs 4, encontrando diferencias significativas en las lesiones, respecto al resto de los tratamientos ( $H_{5,18}=13.78$ ,  $p=0.01$ ). La respuesta inflamatoria de magnitud media, no muestra diferencias estadísticamente significativas ( $H_{5,18}= 5.66$ ,  $p= 0.34$ ), reflejando dicho efecto por la aplicación de hasta 5 inyecciones en los ostiones tratados.

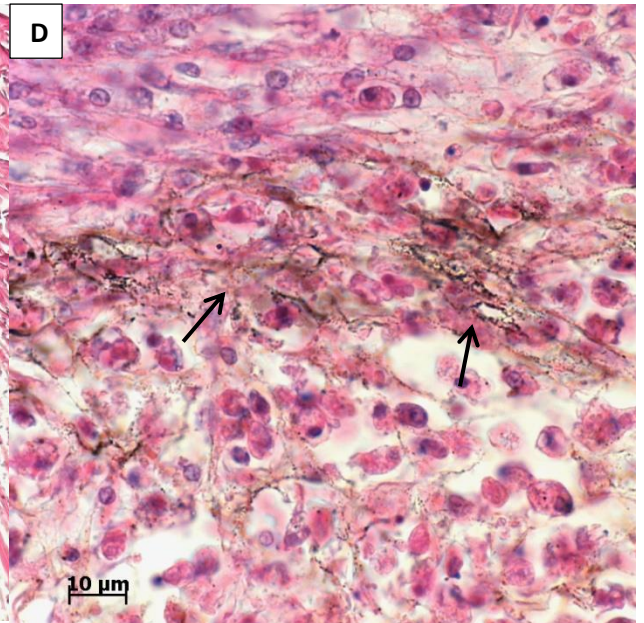
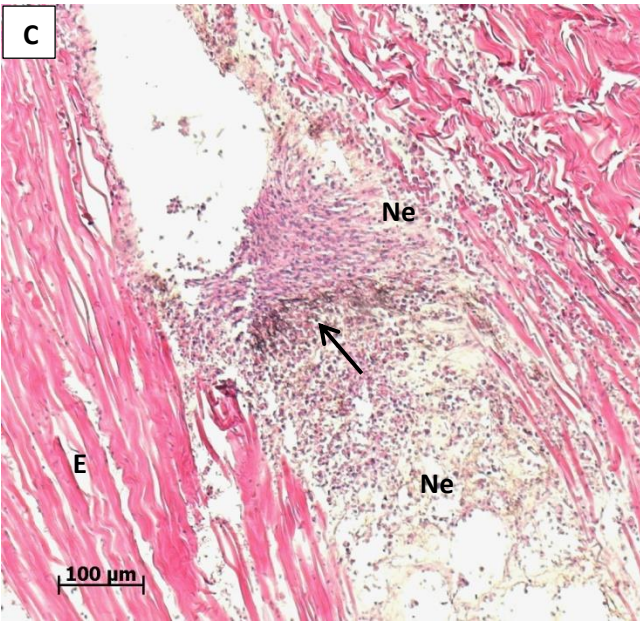
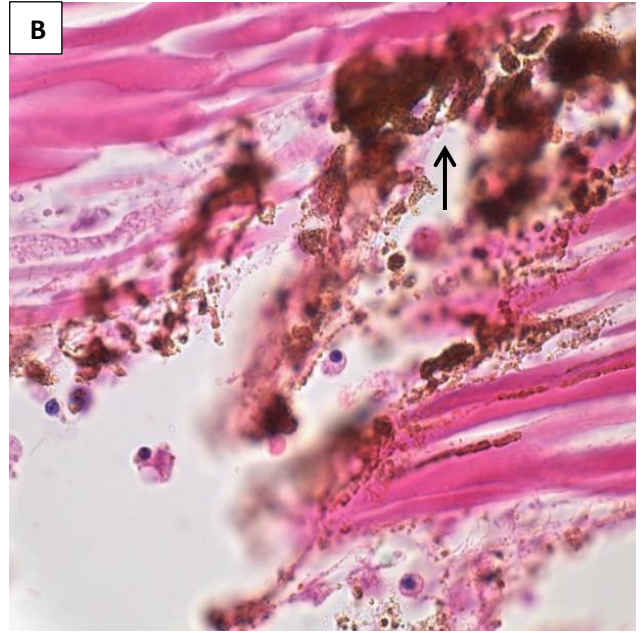
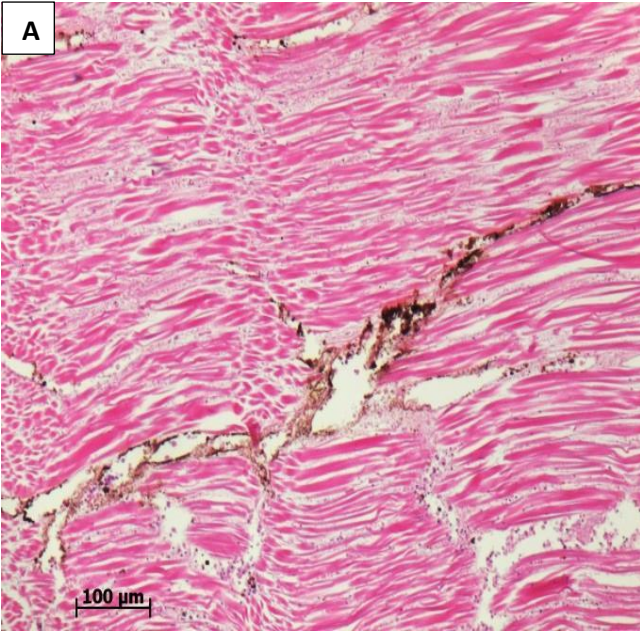
Igualmente, esta comparación se hizo en el grado de degradación del tejido, expresando tres magnitudes de necrosis: ligero (15 % de degradación), medio (hasta 30% de degradación) y severa (> 30 % de degradación), encontrando una tendencia similar a la inflamación, al mostrar mayor daño con AgNPs 4 y la misma concentración usada con el  $AgNO_3$  ( $H_{5,18}=16.38$ ,  $p= 0.005$ ) (Figura 17B). En la mayoría de los casos, los tratamientos con mayor contenido de plata,  $AgNO_3$  y AgNPs 4, la necrosis se acompaña del proceso de autólisis del tejido, esto ocurre específicamente en las evaluaciones de los organismos muertos. Se atribuye que las AgNPs, en la concentración más alta empleada, influyen en la degradación del tejido por efecto tóxico de la plata.

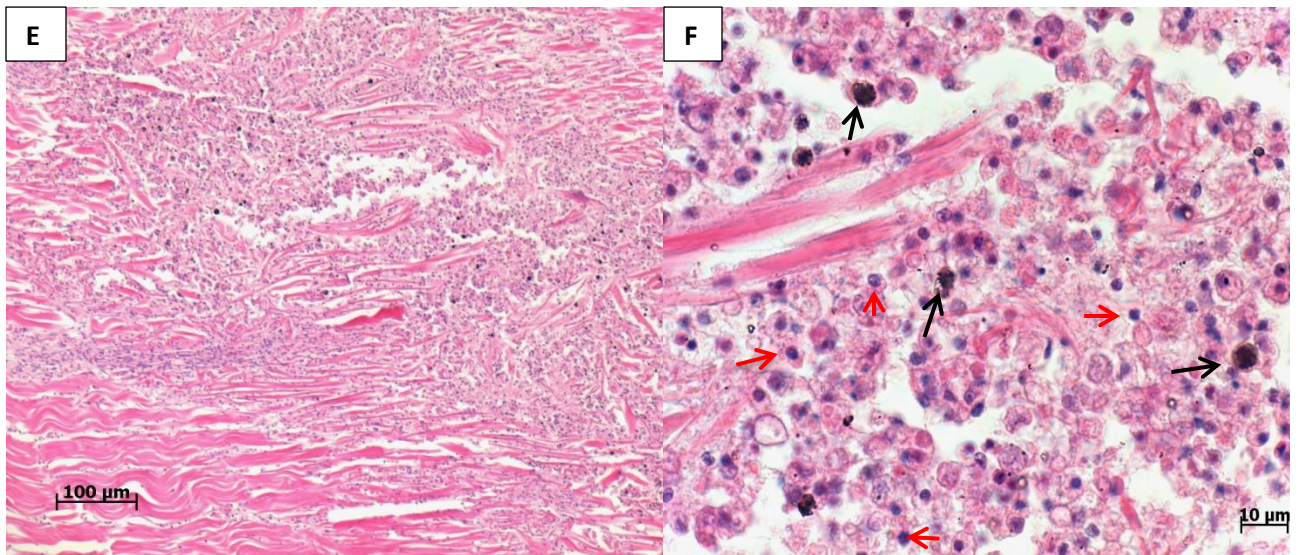


**Figura 17. Diferencias en la magnitud de la inflamación y necrosis.** Se presenta el porcentaje de organismos que expresan las magnitudes: ligera, media y severa. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas en la magnitud de la inflamación respecto a la concentración de AgNPs empleada.

El principal daño observado fue en el músculo aductor, sitio donde fueron realizadas las inyecciones, ya que en el sitio adyacente a la inyección se observan la presencia de precipitados de plata, atribuidos a los tratamientos con AgNPs 4 y al AgNO<sub>3</sub> (Figura 18).

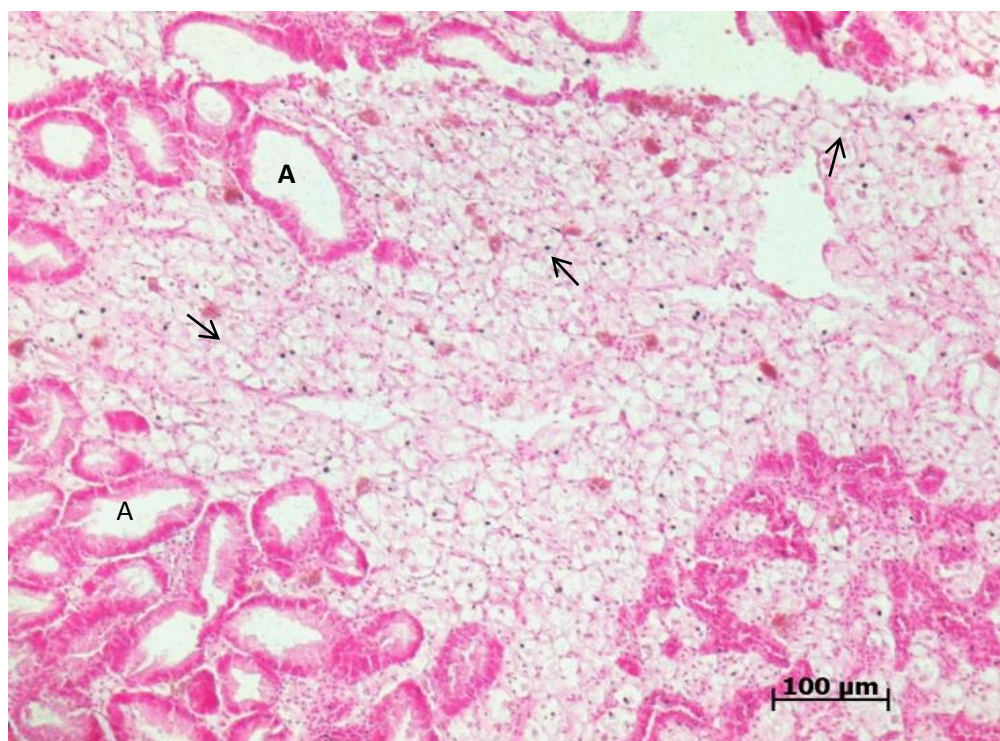




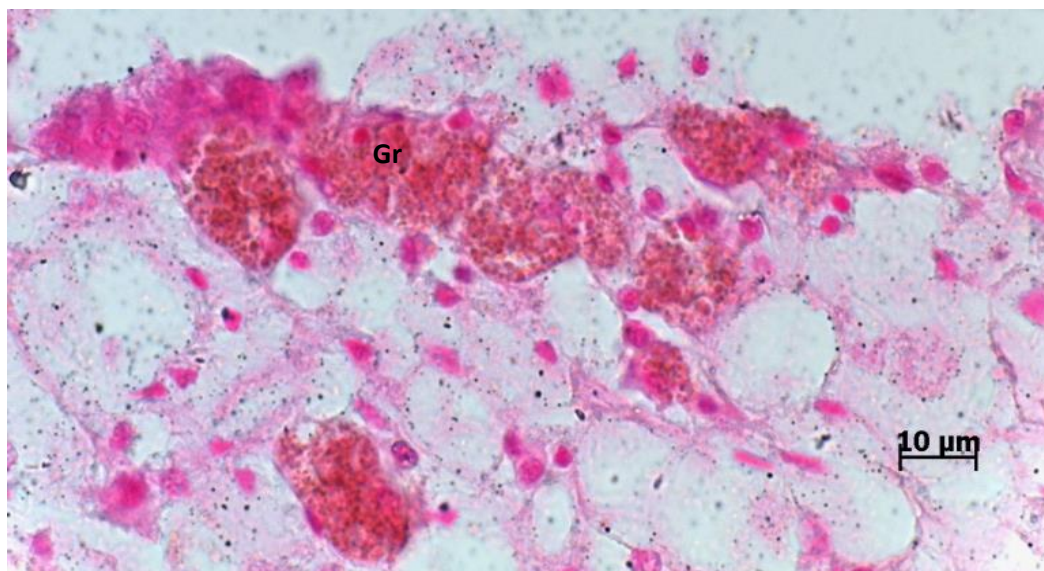


**Figura 18. Lesión del sitio adyacente a la inyección en corte histológico del músculo aductor. A)** tratamiento de 9.27 mM de  $\text{AgNO}_3$ . Se delimitan los residuos de  $\text{AgNO}_3$  en el borde de la lesión, se observa la necrosis difusa del tejido y la separación de las fibras musculares; **B)** acercamiento de la imagen A, donde se observa la presencia de hemocitos picnóticos, la degradación por necrosis de las fibras musculares y de coloración oscuras por residuos del  $\text{AgNO}_3$ ; **C)** tratamiento de AgNPs 4. Se observa una necrosis (Ne) severa acompañada de edemas (Ed) y fuerte degradación del tejido; **D)** acercamiento de la imagen, en la que se observan los residuos de AgNPs sobre las fibras degradadas; **E)** tratamiento PVP, en donde se presentan precipitados puntuales, acompañado de inflamación y desacomodo de fibras musculares; **F)** en el acercamiento, se observan los precipitados de PVP (flechas) sobre hemocitos y no en tejido como se observó en los casos anteriores, observando la degradación del tejido y hemocitos picnóticos (flechas rojas).

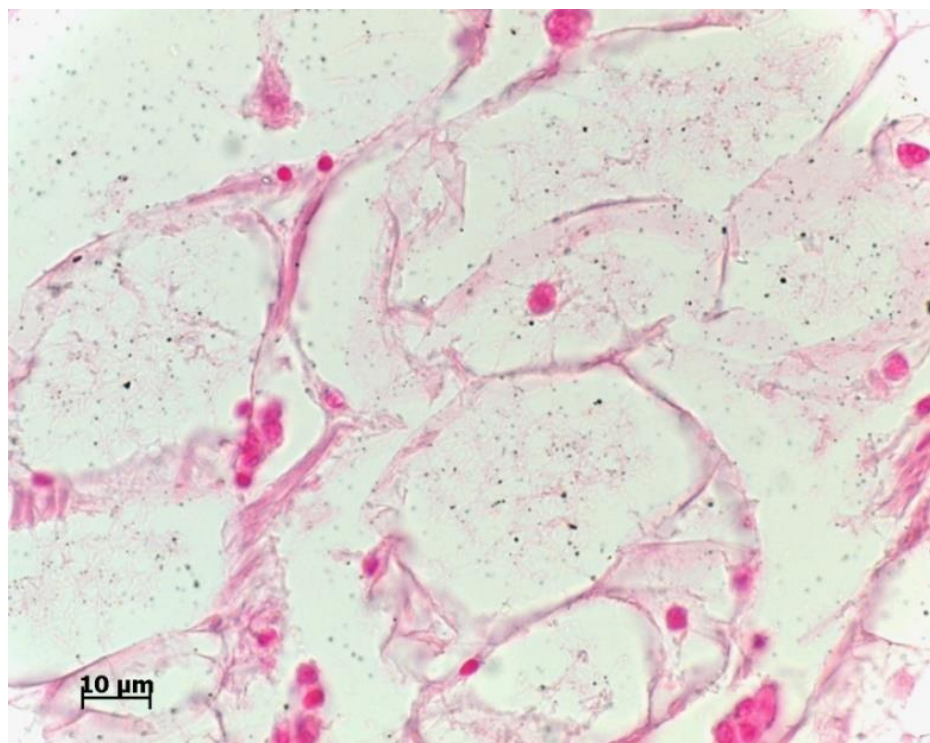
En algunos organismos, generalmente a partir de 0.927 mM de Ag (AgNPs 3), se asocia la presencia de precipitados de plata en tejido conectivo de manto, glándula digestiva y músculo aductor del ostión. Algunas fotografías (Figuras 19-24) que asocian los principales daños atribuidos a las AgNPs se muestran a continuación:



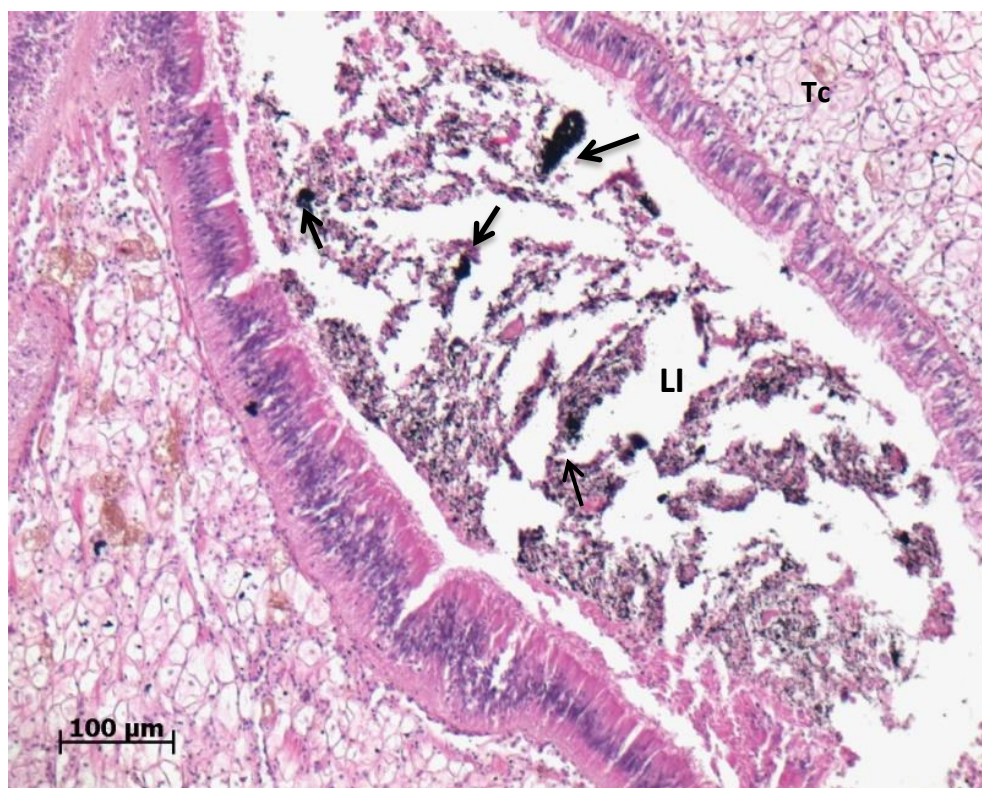
**Figura 19. Precipitados en tejido conectivo de glándula digestiva.** Se presentan diversos precipitados de plata en tejido conectivo (señalados con flechas). Se observa, además, la atrofia (A) de los túbulos digestivos. Tratamiento AgNPs 4 con tinción de ATM.



**Figura 20. Acercamiento de tejido conectivo.** Se observan pequeños precipitados de AgNPs dispersos en todo el tejido, acompañados de hemocitos tipo granulocitos (Gr). Tinción de autometalografía de plata (ATM).



**Figura 21. Precipitados en células reticulares del tejido conectivo en manto.** Se contrastan los precipitados del  $\text{AgNO}_3$  en forma difusa sobre todo el tejido. Tinción de ATM.



**Figura 22. Sección de intestino en glándula digestiva.** En el lumen del intestino (LI) se observan precipitados de AgNPs (señalados con flechas). En tejido conectivo (Tc) de la glándula digestiva, también muestra residuos de NpsAg acompañados de células cafés. Tratamiento AgNPs 4, tinción H-E.



**Figura 23. Acercamiento del epitelio columnar del intestino.** Tratamiento  $\text{AgNO}_3$ , donde se observan incrustaciones en los núcleos del epitelio ciliar, en donde se contrastan los precipitados de plata con la tinción de ATM. LI (lúmen del intestino) y Tc (tejido conectivo de glándula digestiva).



**Figura 24. Sección de músculo aductor con edemas y vasos dilatados.** Dilatación de los senos de hemolinfa (S), acompañado de acumulación de líquidos o edemas (E). Tratamiento  $\text{AgNO}_3$ , tinción H-E.

## Capítulo 4. Discusión

---

La toxicidad de AgNPs se ha estudiado en protozoarios parásitos y de vida libre como una posible alternativa de control y como sujetos de estudio de la interacción entre AgNPs y organismos unicelulares. Fuentes-Valencia (2017) contrastó el efecto de 2 tipos de AgNPs (AgNPs Argovit™, AgNPs UTSA) contra el ciliado *Tetrahymena* sp., que es considerado un parásito facultativo de peces dulceacuícolas y modelo en investigación biomédica (Elliott, 1959), y determinó que las concentraciones letales medias de plata (CL50) después de 15 minutos de exposición en agua dulce, fueron de 0.0232  $\mu\text{M}$ , para las AgNPs Argovit™, y 0.037 nM, para las AgNPs UTSA, ocasionando en ambos casos la ruptura de la membrana celular. Abe *et al.* (2014) demuestran el efecto citotóxico de AgNPs contra el ciliado de vida libre *Paramecium caudatum*, registrando la CL50 de 0.0927 mM, la cual mata al ciliado después de 20 min de exposición. Estos autores consideraron la ausencia de movilidad ciliar del protozoario, como el indicador de mortalidad. Rossi-Bergmann *et al.* (2012) evaluaron el potencial terapéutico de 2 tipos de AgNPs, sintetizadas químicamente (Q-AgNPs) y biológicamente (B-AgNPs), contra el parásito *Leishmania amazonensis*, protozoario flagelado agente causal de la enfermedad zoonótica leishmaniasis (Aoun y Bouratbine, 2014), encontrando mayor toxicidad por parte de las B-AgNPs respecto las Q-AgNPs, al obtener concentraciones inhibitorias (CI50) de 25  $\mu\text{M}$  y 100  $\mu\text{M}$ , respectivamente.

En el presente estudio, se determinó que la concentración de 0.0927 mM de Ag, a partir de AgNPs Argovit™, produce la mortalidad *in vitro* (DL50) y deformidades estructurales de las hipnosporas de *P. marinus* en 24 h de exposición, la presencia de las AgNPs dentro de la pared de la hipnospora, se corroboró por MET. Comparando los resultados en trabajos previamente realizados en protozoarios respecto al presente estudio, se pone en evidencia la actividad antiprotozoaria de las AgNPs, al mostrar similitud en el efecto en la supervivencia y alteraciones en la morfología celular. Dicho efecto está relacionado con la producción de radicales libres por parte de las AgNPs, los cuales interactúan con los lípidos de la estructura básica de la membrana celular, al desencadenar el proceso de peroxidación lipídica (Avello y Suwalsky, 2006) o bien con interacción de la plata iónica con grupos tiol de enzimas vitales de la membrana, aglomerándose en la superficie o penetrando hacia el interior de la célula, afectando la permeabilidad de la misma (Singh *et al.*, 2008). Como se mencionó anteriormente, en las microfotografías del análisis de la ultraestructura de las hipnosporas (Figura 13), se observó la presencia de AgNPs en la pared celular, lo que sugiere que las alteraciones morfológicas se encuentran relacionadas con las AgNPs.

Considerando los estudios realizados previamente en protozoarios, no es posible realizar una comparación directa entre las diferentes dosis de AgNPs empleadas, dado que las concentraciones inhibitorias o letales que en estos se utilizaron están comprendidas en un rango de nM a mM en contenido de plata, además de las diferencias en las condiciones empleadas en cada evaluación, como el medio de cultivo, la concentración celular o características fisicoquímica de las NPs. Generalmente, en los estudios *in vitro* con organismos unicelulares o cultivos celulares que son expuestos a AgNPs o cualquier componente de Ag, resultan ser mucho más evidente la toxicidad reflejada, al inducir la mortalidad o inhibición celular en el medio de cultivo, en un tiempo relativamente corto, esto debido a la interacción directa entre célula y la sustancia tóxica. En este sentido sería conveniente estandarizar este tipo de bioensayos para determinar con precisión, la interacción de AgNPs con organismos unicelulares como los protozoarios.

Un punto clave respecto al potencial terapéutico de la AgNPs es que su toxicidad no es selectiva (Singh *et al.*, 2011), por lo tanto en un organismo multicelular, las AgNPs serán tóxicas para todas sus células; no obstante, los organismos multicelulares poseen mecanismos de defensa innatos, es decir, expresan mecanismos de mediación celular como los hemocitos, en el caso de los moluscos bivalvos, en reacciones que involucran la defensa interna, reparación de los tejidos, transporte de nutrientes, digestión y excreción, que les permiten contener y eliminar este tipo de sustancias de su cuerpo (Cheng *et al.*, 1996; Figueras y Novoa, 2011; Toche, 2012); al ser organismos filtro alimentadores, llevan a cabo procesos de internalización de partículas a micro y nano escala mediante mecanismos fisiológicos llamados endo y fagocitosis, cumpliendo funciones como la digestión intracelular e inmunidad celular (Canesi *et al.*, 2012).

Es bien sabido que los bivalvos tienen la capacidad de concentrar metales en sus tejidos, siendo cuatro o cinco ordenes de magnitud mayor a la concentración en los tejidos respecto a la concentración en el agua (Simkiss *et al.*, 1982; Roesijadi, 1996). Por tal motivo, este tipo de organismos son utilizados en programas de monitoreo de la contaminación como centinelas biológicas y, a nivel internacional existen programas específicos de monitoreo de la contaminación ambiental con ostiones y mejillones como el programa "National Status and Trends (NS&T)" a cargo de La Administración Nacional Oceánica y Atmosférica (NOAA, por sus siglas en inglés), en Maryland, Estados Unidos (Roesijadi, 1996; Canesi *et al.*, 2012), quien documenta rangos de concentraciones para distintos metales en *C. virginica*, en hábitats con distinto grado de contaminación, registrando para la plata un rango de entre 0.3 a 7  $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$  en peso seco de tejido de ostión, que datan de un ambiente poco contaminado a uno muy contaminado en la costa Atlántica de Norteamérica (Roesijadi, 1996)

El proceso de bioacumulación está mediado por diversos factores como la biodisponibilidad del metal y los mecanismos celulares a los que se enfrenta al entrar al organismo, así como factores del medio ambiente, como la variabilidad estacional y contaminación local, que van a influir en la reactividad del metal. En este sentido es importante subrayar la capacidad intrínseca de los moluscos bivalvos para contener sustancias tóxicas, como metales pesados incluyendo a la Ag, por lo que es recomendable realizar la evaluación cuantitativa de los residuos de AgNPs en los tejidos y heces del ostión.

En la presente investigación el tratamiento AgNPs 2, la concentración de 0.0927 mM de Ag, indujo la mortalidad *in vitro* y deformidades estructurales de *P. marinus*, pero *in vivo*, el mismo tratamiento administrado por 5 días, no generó mortalidades importantes (8%) para *C. corteziensis*. Lo que hace suponer que, como se explicó anteriormente, los propios mecanismos de defensa del ostión ante estas NPs quizás eviten o reduzcan la biodisponibilidad y por tanto la toxicidad de la plata para actuar contra el parásito.

Es importante resaltar, que la toxicidad reflejada a partir de las AgNPs 2 ante el parásito en medio de cultivo (50% de mortalidad en 24 h) y aplicadas intramuscularmente al ostión, mostró una diferencia en la DL50 en un orden de magnitud, al ser 10 veces mayor en la evaluación *in vivo* sobre los ostiones, ya que AgNPs 3 produce la mortalidad del 50% de los organismos.

El análisis histológico realizado, revela daños en los tejidos del ostión atribuidos al efecto de la inyección, así como al efecto tóxico de la plata. Las principales reacciones asociadas fueron la inflamación y necrosis, en diferentes grados de magnitud, así como la presencia de precipitados de plata, principalmente en el músculo aductor, sitio donde se aplicó de la inyección, en tejido conectivo de glándula digestiva y manto. Los mecanismos implicados en el arresto de compuestos metálicos incluyen la unión de proteínas, como las metaloproteínas, a metales, tanto fisiológicos (zinc y cobre) como xenobióticos (como cadmio, mercurio y plata), a través de grupos sulfhidrilos (-SH o tiol) (Kägi y Kojima, 1987); o por la unión del metal con macromoléculas biológicas, a través de ligando específicos de gran afinidad como el O, N y S, en proteínas y enzimas, teniendo como consecuencia la interrupción de los procesos vitales (Nieboer y Richardson, 1980) y la deposición de gránulos por parte de los hemocitos granulares o granulocitos (Roesijadi 1996).

Diversos estudios ( Cheng, 1988; Sanders *et al.*, 1991; Moraga *et al.*, 2005; Hull *et al.*, 2011; McCarthy *et al.*, 2013; Sonawane, 2015; Bouallegui *et al.*, 2017) han evaluado la toxicidad *in vivo* de distintas nanopartículas o iones metálicos en moluscos bivalvos, los cuales tratan de comprender la



bioacumulación de metales en los tejidos, sus implicaciones ecológicas y efectos perjudiciales. Bouallegui *et al.* (2017) reportan que AgNPs en el medio ambiente pueden generar reacciones inflamatorias en branquias como consecuencia de la respuesta inmune innata en los mejillones (*Mytilus galloprovincialis*). Estos autores encontraron que la intensidad de la inflamación se vio fuertemente afectada por el tamaño de las AgNPs (<100 nm) y el tiempo de exposición (12 h), denotando que el mecanismo de captación es el principal factor subyacente a la toxicidad de los AgNPs, ya que, al ser expuesto a través del agua, las branquias sufrieron cambios morfológicos asociados a la inflamación. Efectos similares fueron observados por Sonawane (2015) al describir el efecto en agua de distintas sales metálicas sobre las branquias del bivalvo de agua dulce *Lamellidens marginalis*, encontrando daños asociados a la degeneración lamelar, edemas y necrosis en las células epiteliales intercelulares.

El efecto de la inyección de un compuesto tóxico es evaluado por Pauley (1966), en el que se describe la histopatología de la respuesta inflamatoria inducida experimentalmente por inyección de un solvente tóxico (aguarrás o trementina) en el músculo aductor y tejido conectivo del ostión *C. gigas*, el cual reporta entre los principales efectos fibras musculares necróticas con núcleos picnóticos, edemas, infiltración de hemocitos, hipertrofia del epitelio renal, así como la presencia de células cafés en tejido conectivo. En el presente estudio, al ser la vía de administración mediante una inyección intramuscular, el músculo aductor fue donde se observó el mayor daño histológico. La inyección intramuscular de los distintos tratamientos provocó una clara respuesta inmunológica del ostión, representada por la inflamación difusa en el sitio de inyección, misma que ocurre por infiltración de una gran cantidad de hemocitos, los cuales colaboran en la reparación del daño tisular (ruptura del tejido por la acción mecánica de la inyección), mediante la formación de un “tapón” de hemocitos, que reemplaza el tejido dañado, desde el interior de la lesión hacia la superficie; seguido de la acción de los fibroblastos al realizar el depósito de colágeno, posteriormente se eliminan los restos celulares mediante acción fagocítica de los granulocitos, para finalizar con la reestructuración del tejido; sin embargo, dicha respuesta inmune puede terminar con la destrucción del tejido dañado o la completa reparación del mismo, lo cual con el tiempo produce fibrosis y cicatrización (Fisher, 1986; Sparks y Morado, 1988; Novoa *et al.*, 2011). Este proceso inflamatorio ocurrió en todos los ostiones tratados, incluyendo los de referencia; sin embargo, la magnitud de la inflamación permitió diferenciar entre la respuesta inflamatoria asociada a la inyección y aquella derivada de la toxicidad de las AgNPs Argovit™, al ser mayor en los tratamientos de plata.

Cuando el efecto tóxico de AgNPs supera la capacidad de los sistemas de protección, se comprometerán en forma irreversible los mecanismos homeostáticos, dañando y eventualmente causando la muerte

celular. La necrosis se define como la muerte celular, ya sea por alguna lesión o material tóxico, reconocible por los signos morfológicos de la necrofanerosis. En el citoplasma se pierde la estructura normal, luce homogéneo y opaco (afinidad acidófila), alteraciones mitocondriales (permeabilización de la membrana mitocondrial) y el aumento de la concentración citosólica de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) que produce la activación de proteasas. Las etapas de la alteración nuclear incluyen: la picnosis, resultando en la retracción del núcleo con condensación de la cromatina; la cariólisis o disolución del núcleo; la cariorrexis, la fragmentación del núcleo en trozos con cromatina condensada, que representan, aparentemente, formas distintas de reacción (Chuaqui *et al.*, 1994; Proskuryakov *et al.*, 2003). Este daño fue más severo en el tratamiento de  $\text{AgNO}_3$  y de la dosis más alta de AgNPs 4.

Otro factor a considerar, es que el uso de plata como agente antimicrobiano es limitado ya que la disponibilidad y reactividad del metal está en función de los componentes con los que interactúa. El uso de Nps en agua de mar puede afectar la naturaleza química, y por lo tanto la toxicidad, comportamiento y destino, esto al formar agregados, aglomerados o precipitados (Matranga y Corsi, 2012). El modo de exposición a las AgNPs es determinante ya que la actividad de los iones de plata en un ambiente salino, induce a la formación de compuestos estables con un gran número de aniones; por ejemplo el ión plata  $\text{Ag}^+$  al ionizarse con el  $\text{Cl}^-$ , da lugar al cloruro de plata ( $\text{AgCl}$ ), el cual tiene una solubilidad muy baja y precipita rápidamente en solución (Marambio-Jones y Hoek, 2010; Matranga y Corsi, 2012; Canesi *et al.*, 2012). Sanders *et al.* (1991) mencionan que la bioacumulación de plata en el ostión, está inversamente correlacionada con la salinidad, viéndose involucrada la biodisponibilidad del metal en ambientes marinos. En este sentido, la inyección intramuscular de las AgNPs, confiere, teóricamente, una mayor conservación de su estructura y propiedades biocidas de la NPs.

Una observación adicional, es la diferencia en la coloración de las heces de los organismos tratados con plata, respecto a los tratamientos de referencia, lo que sugiere que los derivados de la plata fueron excretados a través de las heces. Hull *et al.* (2011), exponen almejas (*Corbicula fluminea*) a nanopartículas de oro en el agua, encontrando la presencia de nanopartículas dentro del tracto digestivo de la almeja, las cuales fueron excretadas a través de las heces, sugiriendo que la biotransformación y la biodeposición jugarán un papel importante en el destino y transporte de nanopartículas persistentes en sistemas acuáticos. Lo que abre una ventana de exploración sobre el destino y comportamiento de las AgNPs, una vez excretadas por el organismo.

Este tipo de estudios básicos son esenciales para abordar los impactos potenciales de las AgNPs sobre organismos acuáticos como el ostión. En este sentido, se reconoce que se obtuvo una dosis apropiada

de AgNPs, que es letal para *P. marinus in vitro* pero que no lo es para su hospedero *C. corteziensis in vivo*, lo que sugiere que el potencial terapéutico de la AgNPs Argovit<sup>TM</sup>, se debe explorar en organismos infectados experimentalmente con *P. marinus*. Sin embargo, se debe considerar que su uso para el tratamiento de enfermedades infecciosas en moluscos bivalvos se puede ver afectado por los mecanismos de defensa del organismo, los cuales comprometen la biodisponibilidad y reactividad del nanomaterial, así como el destino y tratamiento de los derivados de AgNPs en los efluentes contaminados.

En general, los nanomateriales metálicos, como partículas, tubos o fibras que contienen oro y plata, así como los óxidos metálicos (zinc, cobre o titanio), surgen como una alternativa a los antibióticos convencionales en el tratamiento de enfermedades infecciosas, por sus propiedades biocidas (Vázquez-Muñoz, 2017). Se considera a la plata como un ingrediente básico en la futura generación de los antibióticos, gracias a su amplio espectro tóxico no selectivo (Singh *et al.*, 2008; Morones-Ramírez, 2009). En ese sentido, al no diferenciar organismos patógenos de las células sanas de los tejidos las AgNPs ejercen un efecto quimioterapéutico y no antibiótico como se indica anteriormente.

## Capítulo 5. Conclusiones

---

Se demuestra el efecto tóxico de las AgNPs Argovit™ ante el parásito *P. marinus* en su fase de resistencia, estableciendo la DL50 con la concentración de 0.0927 mM de plata de las AgNPs, en 24 h de exposición.

Se demuestra la incorporación de las AgNPs Argovit™ en la pared celular de las hiposporas de *P. marinus*.

Se demuestra el efecto tóxico de las AgNPs Argovit™ en el ostión *C. corteziensis* después de diversas aplicaciones, obteniendo la DL50 a la concentración de 0.927 mM de plata de las AgNPs, concentración 10 veces mayor que la DL50 para *P. marinus*.

Las mortalidades observadas en los tratamientos de referencia están presuntamente relacionadas por el efecto de la aplicación de 5 inyecciones.

Se observó el daño en los tejidos, asociando la necrosis al efecto tóxico de AgNPs y AgNO<sub>3</sub> y la inflamación del sitio de la inyección por efecto de la aplicación en los tratamientos de referencia.

Existe una dosis apropiada de AgNPs, que es letal para *P. marinus in vitro* pero que no lo es para su hospedero *C. corteziensis in vivo*, lo que sugiere que el potencial terapéutico de la AgNPs Argovit™, debe continuar estudiándose.

### 5.1 Recomendaciones

Es necesario probar el potencial terapéutico de NpsAg, en ostiones infectados experimentalmente con *P. marinus* y estudiar detalladamente los posibles efectos secundarios como la bioacumulación y el impacto de las AgNPs residuales en el ambiente.

Se recomienda realizar la evaluación cuantitativa de plata en los tejidos y heces del ostión, a través de técnicas espectrofotométricas.

Corroborar las características fisicoquímicas de las AgNPs previo a los bioensayos así como en el medio de cultivo utilizado.

## Literatura citada

---

- Abe, T., Haneda, K., Haga, N. 2014. Silver nanoparticle cytotoxicity and antidote proteins against silver toxicity in *Paramecium*. *Nano Biomedicine*, 6: 35-40.
- Aguirre-Macedo, M.L., Simá-Álvarez, R.A., Román-Magan, M.K., Güemez-Ricalde, J.I. 2007. Parasite Survey of the Eastern Oyster *Crassostrea virginica* in Coastal Lagoons of the Southern Gulf of Mexico. *Journal of Aquatic Animal Health*, 19: 270-279.
- Andrews, J.D. 1996. History of *Perkinsus marinus*, a pathogen of oysters in Chesapeake Bay 1950-1984. *Journal of Shellfish Research*, 15: 13-16.
- Aoun, K., Bouratbine, A. 2014. Cutaneous Leishmaniasis in North Africa: a review. *Parasite*, doi: 10.1051/parasite/2014014
- Avello, M., Suwalsky, M. 2006. Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea*, 429: 161-172.
- Bouallegui, Y., Ben Younes, R., Bellamine, H., Oueslati, R. 2017. Histopathology and analyses of inflammation intensity in the gills of mussels exposed to silver nanoparticles: role of nanoparticle size, exposure time, and uptake pathways. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 27: 582-591.
- Burreson, E.M., Alvarez, R.S., Martinez, V. V., Macedo, L.A. 1994. *Perkinsus marinus* (Apicomplexa) as a potential source of oyster *Crassostrea virginica* mortality in coastal lagoons of Tobasco, Mexico. *Diseases of aquatic organisms*. 20: 77-82.
- Burreson, E.M., Ragone-Calvo, L.M. 1996. Epizootiology of *Perkinsus marinus* disease of oysters in Chesapeake-Bay, with emphasis on data since 1985. *Journal of Shellfish Research*, 15: 17-34.
- Bushek, D., Ford, S.E., Allen Jr, S.K. 1994. Evaluation of methods using Ray's fluid thioglycollate medium for diagnosis of *Perkinsus marinus* infection in the eastern oyster *Crassostrea virginica*. *Annual Review of Fish Diseases*, 4: 201-217.
- Bushek, D., Holley, R.A., Kelly, M.C. 1997. Treatment of *Perkinsus marinus*-contaminated materials. National Shellfisheries Association Annual Meeting., Fort Walton Beach, FL. Apr. 20-24, 1997. *Journal of Shellfish Research*, 16(1):330.
- Bushek, D., Howell, T. 2000. The effect of UV irradiation on *Perkinsus marinus* and its potential use to reduce transmission via shellfish effluents. Northeast Regional Aquaculture Center, NRAC Publication No. 00-008.
- Cáceres-Martínez, J., Ortega, M.G., Vásquez-Yeomans, R., García-Pineda, T. de J., Stokes, N.A., Carnegie, R.B. 2012. Natural and cultured populations of the mangrove oyster *Saccostrea palmula* from Sinaloa, Mexico, infected by *Perkinsus marinus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 110: 321-325.

- Cáceres-Martínez, J., Madero-López, L.H., Padilla-Lardizábal, G., Vásquez-Yeomans, R. 2016. Epizootiology of *Perkinsus marinus*, parasite of the pleasure oyster *C. corteziensis*, in the Pacific coast of Mexico. *Journal of Invertebrate Pathology*, 139: 12-18.
- Cáceres-Martínez, J., Vásquez-Yeomans, R. 2013. Enfermedades, parásitos y episodios de mortalidad de ostiones de importancia comercial en México y sus implicaciones para la producción. *Ciencia Pesquera*, 21: 5-48.
- Cáceres-Martínez, J., Vásquez-Yeomans, R., Padilla-Lardizábal, G., del Río Portilla, M.A. 2008. *Perkinsus marinus* in pleasure oyster *C. corteziensis* from Nayarit, Pacific coast of México. *Journal of Invertebrate Pathology*, 99: 66-73.
- Calvo, G., Burreson, E. 1994. *In vitro* and *in vivo* effects of chemotherapeutants on the oyster parasite, *Perkinsus marinus*. (Mackin, Owen, and Collier). *Journal of Shellfish Research*, 13: 101-107.
- Canesi, L., Ciacci, C., Fabbri, R., Marcomini, A., Pojana, G., Gallo, G. 2012. Bivalve molluscs as a unique target group for nanoparticle toxicity. *Marine Environmental Research*, 76: 16-21.
- Cardoso, P.C. 2016. Nanopartículas de plata: obtención, utilización como antimicrobiano e impacto en el área de la salud. *Revista del Hospital de Niños en Buenos Aires*, 58: 19-28.
- ChEBI. 2018. Coated silver nanoparticle. Chemical Entities of Biological Interest, European Molecular Biology Laboratory. Consultado el 2 de agosto de 2018 en: <https://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI:82776>.
- Cheng, T.C. 1996. Hemocytes: Forms and Functions. En: Kennedy, V. S., Newell, R. I. E., Eble, A. F. (eds.), *The eastern oyster: Crassostrea virginica*, pp. 299-333. Maryland Sea Grant College.
- Cheng, T.C. 1988. *In vivo* effects of heavy metals on cellular defense mechanisms of *Crassostrea virginica*: Phagocytic and endocytotic indices. *Journal of Invertebrate Pathology*, 51: 215-220.
- Chuaqui, B., Duarte, S., González, D., Oddó, D., Rosemberg, H. 1994. Daño celular irreverible: Necrosis. En: Chuaqui, B., González, S. (eds.). *Manual de Patología General*, Pontificia Universidad Católica de Chile.
- CONAPESCA. 2014. Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca 2014 de la Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca. SAGARPA. México.
- Cruz- Flores, R., Vázquez-Yeomans, R., Cáceres-Martínez, J.A. 2015. A novel method for separation of Rickettsiales-like organism "*Candidatus Xenohaliotis californiensis*" from host abalone tissue. *Journal of microbiological methods*, 79-82.
- Delaney, M., Brady, Y., Worley, S. 2003. The effectiveness of N-halamine disinfectant compounds on *Perkinsus marinus*, a parasite of the eastern oyster *Crassostrea virginica*. *Journal of Shellfish Research*, 22: 91-94.
- Dibrov, P., Dzioba, J., Gosink, K.K., Häse, C.C. 2002. Chemiosmotic mechanism of antimicrobial activity of Ag<sup>+</sup> in *Vibrio cholerae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46: 2668-70.

- Elliott, A.M. 1959. Biology of *Tetrahymena*. Annual Review of Microbiology, 13: 79-96.
- Enríquez-Espinoza, T.L., Castro-Longoria, R., Mendoza-Cano, F., Grijalva-Chon, J.M. 2015. *Perkinsus marinus* en *Crassostrea gigas* y *Chione flucitifraga* de Bahía de Kino, Sonora, México. Biotecnia, 17: 10.
- Fabrega, J., Luoma, S.N., Tyler, C.R., Galloway, T.S., Lead, J.R. 2011. Silver nanoparticles: Behaviour and effects in the aquatic environment. Environment International, 37: 517-531.
- Faisal, M., La Peyre, J., Elsayed, E. 1999. Bacitracin inhibits the oyster pathogen *Perkinsus marinus* in vitro and in vivo. Journal of Aquatic Animal Health, 11: 130-138.
- Figueras, A., Novoa, B. (Eds.) 2011. Enfermedades de moluscos bivalvos de interés en acuicultura. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Fundación Observatorio Español de Acuicultura. pp 542.
- Fisher, W.S. 1986. Structure and Functions of Oyster Hemocytes. En: Michel Brehélin (ed.), Immunity in Invertebrates: Cells, Molecules, and Defense Reactions, pp. 25-35. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Foster, B., Grewal, S., Graves, O., Hughes Jr., F.M., Sokolo, I.M. 2011. Copper exposure affects hemocyte apoptosis and *Perkinsus marinus* infection in eastern oysters *Crassostrea virginica* (Gmelin). Fish & Shellfish Immunology, 31: 341-349.
- Fuentes-Valencia, M.A. 2017. Toxicidad de nanopartículas de plata en el protozoo *Tetrahymena sp.* Tesis de Maestría. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Gauthier, J.D., Vasta, G.R. 1993. Continuous *in Vitro* Culture of the Eastern Oyster Parasite *Perkinsus marinus*. Journal of Invertebrate Pathology, 62: 321-323.
- Gómez-Villarraga, F. 2016. Nanopartículas metálicas y sus aplicaciones. Portal Innovación y ciencia. Consultado el 03 de Julio de 2018. consultado en [https://innovacionyciencia.com/documentos/nanoparticulas\\_metalicas\\_y\\_sus\\_aplicaciones.pdf](https://innovacionyciencia.com/documentos/nanoparticulas_metalicas_y_sus_aplicaciones.pdf)
- Gullian-Klanian, M., Herrera-Silveira, J.A., Rodríguez-Canul, R., Aguirre-Macedo, L. 2008. Factors associated with the prevalence of *Perkinsus marinus* in *Crassostrea virginica* from the southern Gulf of Mexico. Diseases of aquatic organisms, 79: 237-247.
- Hull, M.S., Chaurand, P., Rose, J., Auffan, M., Bottero, J.Y., Jones, J.C., Schultz, I.R., Vikesland, P.J. 2011. Filter-feeding bivalves store and biodeposit colloiddally stable gold nanoparticles. Environmental Science and Technology, 45: 6592-6599.
- Joseph, S.J., Fernández-robledo, J.A., Gardner, M.J., El-sayed, N.M., Kuo, C., Schott, E.J., Wang, H. *et al.* 2010. The Alveolate *Perkinsus marinus*: Biological Insights from EST Gene Discovery. BMC genomics, 11: 228.

- Juarez-Moreno, K., Gonzalez, E.B., Girón-Vazquez, N., Chávez-Santoscoy, R.A., Mota-Morales, J.D., Perez-Mozqueda, L.L., Garcia-Garcia, M.R. *et al.* 2017. Comparison of cytotoxicity and genotoxicity effects of silver nanoparticles on human cervix and breast cancer cell lines. *Human and Experimental Toxicology* 36: 931-948.
- Juarez-Moreno, K., Mejía-Ruiz, C.H., Díaz, F., Reyna-Verdugo, H., Re, A.D., Vázquez-Félix, E.F., Bogdanchikova, N. 2017. Effect of silver nanoparticles on the metabolic rate, hematological response, and survival of juvenile white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Chemosphere*, 169: 716-724.
- Kägi, J.H.R., Kojima, Y. 1987. Chemistry and Biochemistry of Metallothionein. En: Kägi J.H.R., Kojima Y. (eds) *Metallothionein II. Experientia Supplementum*, vol 52. pp. 25-61. Birkhäuser, Basel.
- Kim, J.S., Kuk, E., Yu, K.N., Kim, J.-H., Park, S.J., Lee, H.J., Kim, S.H. *et al.* 2007. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 3: 95-101..
- Levine, N.. 1978. *Perkinsus* gen. n. and other new taxa in the protozoan phylum Apicomplexa. *The Journal of Parasitology*, 64: 549.
- Leyva-Gómez, G. 2013. Nanopartículas de plata: tecnología para su obtención, caracterización y actividad biológica. *Investigación en Discapacidad*, 2: 18-22.
- Mackin, J.G., Owen, M.M., Collier, A. 1950. Preliminary Note on the Occurrence of a New Protistan Parasite *Dermocystidium marinum* n. sp. in *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Science*, 111: 328-329.
- Mackin, J.G., Ray, S.M. 1966. The taxonomic relationships of *Dermocystidium marinum* Mackin, Owen and Collier. *Journal of Invertebrate Pathology*, 8: 544-545.
- Marambio Jones, C., Hoek, E. 2010. A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. *Journal of Nanoparticle Research*, 12: 1531-1551.
- Matranga, V., Corsi, I. 2012. Toxic effects of engineered nanoparticles in the marine environment: Model organisms and molecular approaches. *Marine Environmental Research*, 76: 32-40.
- McCarthy, M.P., Carroll, D.L., Ringwood, A.H. 2013. Tissue specific responses of oysters, *Crassostrea virginica*, to silver nanoparticles. *Aquatic Toxicology*, 138-139: 123-128.
- Miller, D.L., Yu, I.J., Genter, M.B. 2016. Use of Autometallography in Studies of Nanosilver Distribution and Toxicity. *International Journal of Toxicology*, 35: 47-51.
- Moraga, D., Meistertzheim, A.-L., Tanguy-Royer, S., Boutet, I., Tanguy, A., Donval, A. 2005. Stress response in  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Cd}^{2+}$  exposed oysters (*Crassostrea virginica*): An immunohistochemical approach. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 141: 151-156.
- Morones-Ramírez, R. 2009. El uso de la plata en los antibióticos del futuro. *Revista Digital Universitaria* 10 (10), ISSN: 1067-6079.



- Nieboer, E., Richardson, D.H.S. 1980. The replacement of the nondescript term «heavy metals» by a biologically and chemically significant classification of metal ions. *Environmental Pollution. Series B, Chemical and Physical*, 1: 3-26.
- Norén, F., Moestrup, Ø., Rehnstam-Holm, A.S. 1999. *Parvilucifera infectans* Noren et Moestrup gen. et sp. nov. (Perkinsozoa phylum nov.): A parasitic flagellate capable of killing toxic microalgae. *European Journal of Protistology*, 35: 233-254.
- Pauley, G.B. 1966. The Acute Inflammatory Reaction in two different tissues of the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*. *Journal of Shellfish Research*, 23: 1913-1921.
- Perkins, F.O. 1996. The structure of *Perkinsus marinus* (Mackin, Owen and Collier, 1950) Levine, 1978 with comments on taxonomy and phylogeny of *Perkinsus* spp. *Journal of Shellfish Research*, 15: 67-87.
- Proskuryakov, S.Y., Konoplyannikov, A.G., Gabai, V.L. 2003. Necrosis: A specific form of programmed cell death?. *Experimental Cell Research*, 283: 1-16.
- Raj, M., Yadav, A., Gade, A. 2009. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances*, 27: 76-83.
- Ray, S. 1966. A review of the culture method for detecting *Dermocystidium marinum*, with suggested modifications and precautions. *Proceedings of the National Shellfisheries Association*.
- Roesijadi, G. 1996. Environmental Factors: Response to Metals. En Kennedy, V. S., Newell, R. I. E., Eble, A. F. (eds.), *The eastern oyster: Crassostrea virginica*, pp. 515-532. Maryland Sea Grant College.
- Rossi-Bergmann, B., Pacienza-Lima, W., Marcato, P.D., de Conti, R., Durán, N. 2012. Therapeutic Potential of Biogenic Silver Nanoparticles in Murine Cutaneous Leishmaniasis. *Journal of Nano Research*, 20: 89-97.
- Sanders, J.G., Riedel, G.F., Abbe, G.R. 1991. Factors controlling the spatial and temporal variability of trace metal concentrations in *Crassostrea virginica* (Gmelin). En Elliott, M., Ducrotoy, J.P. (eds.), *Estuaries and coasts : spatial and temporal intercomparisons*, pp. 335-339. Olsen & Olsen.
- Sauvant, N.P., Pepin, D., Piccinni, E. 1999. *Tetrahymena pyriformis*: A tool for toxicological studies. A review. *Chemosphere*, 38: 1631-1669.
- Shi, J., Xu, B., Sun, X., Ma, C., Yu, C., Zhang, H. 2013. Light induced toxicity reduction of silver nanoparticles to *Tetrahymena Pyriformis*: Effect of particle size. *Aquatic Toxicology*, 132-133: 53-60.
- da Silva, P.M., Vianna, R.T., Guertler, C., Ferreira, L.P., Santana, L.N., Fernández-Boo, S., Ramilo, A. *et al.* 2013. First report of the protozoan parasite *Perkinsus marinus* in South America, infecting mangrove oysters *Crassostrea rhizophorae* from the Paraíba River (NE, Brazil). *Journal of Invertebrate Pathology*, 113: 96-103.
- Simkiss, K., Taylor, M., Mason, A.Z. 1982. Metal detoxification and bioaccumulation in molluscs. *Marine biology letters*, 3: 187-201.

- Singh, M., Singh, S., Prasad, S., Gambhir, I.S. 2008. Nanotechnology in Medicine and Antibacterial Effect of. Digest Journal of Nanomaterials and Biostructure, 3: 115-122.
- Singh, S.K., Shrivastava, S., Dash, D. 2011. Metallic Nanoparticles: Biological Perspective. En Rai, M., Duran, N. (eds.), Metal Nanoparticles in Microbiology, pp. 285-289. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Sonawane, S.M. 2015. Effect of Heavy Metals on Gills of Fresh Water Bivalve *Lamellidens marginalis*. IOSR Journal of Environmental Science, 9: 5-11.
- Sparks, A.K., Morado, J.F. 1988. Inflammation and wound repair in bivalve molluscs. Disease Processes in Marine Bivalve Molluscs in special publication. American Fisheries Society.
- Sunila, I., Hamilton, R.M., Duncan, C.F. 2001. Ultrastructural Characteristics of the *In Vitro* Cell Cycle of the Protozoan Pathogen of Oysters, *Perkinsus marinus*. The Journal of Eukaryotic Microbiology, 48: 348-361.
- Tavard, A., Demay, F., Bevan, N. 2003. Larousse Enciclopedia Estudiantil: Esencial. 3rd ed. Ediciones Larousse México.
- Toche, P. 2012. Visión panorámica del sistema inmune. Revista Médica Clínica Las Condes, 23: 446-457.
- Vázquez- Muñoz, R. 2017. Evaluación de las interacciones entre las nanopartículas de plata y microorganismos patógenos. Tesis de doctorado. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California.
- Vazquez-Muñoz, R., Borrego, B., Juárez-Moreno, K., García-García, M., Mota Morales, J.D., Bogdanchikova, N., Huerta-Saquero, A. 2017. Toxicity of silver nanoparticles in biological systems: Does the complexity of biological systems matter? Toxicology Letters, 276: 11-20.
- Villalba, A., Reece, K.S., Camino Ordás, M., Casas, S.M., Figueras, A. 2004. Perkinsosis in molluscs: A review. Aquatic Living Resources, 17: 411-432.

## Anexos

### Anexo I Preparación de medios de cultivo

Medio de cultivo fluido de tioglicolato (Ray, 1966)

**Tabla 8. Componentes del medio de cultivo fluido de tioglicolato.** Tomado de Ray (1966)

Componente	Cantidad	Descripción del producto
<b>Medio de tioglicolato</b>	30.15 g	HIMEDIA® M765-500G
<b>Cloruro de sodio</b>	20 g	Fagalab® Cas:7647-14-5
<b>Agua destilada</b>	1 L	Sparkletts®
<b>Cloranfenicol</b>	200 µg/mL de medio	Sigma Aldrich Cas: 56-75-7
<b>Nystatin</b>	200 U/mL de medio	Sigma Aldrich Cas: 1400-61-9

Se disuelve el medio de cultivo de tioglicolato y el cloruro de sodio en agua destilada hirviendo. Se agregan 10 mL de medio de cultivo en tubos de vidrio y se esteriliza en autoclave a 120 °C por 20 min. Previo a la incubación de los tejidos, se agrega el cloranfenicol y suavemente se agrega una capa de nystatin. La incubación será de 5 a 7 días en oscuridad y temperatura ambiente.

**Tabla 9. Componentes del medio de cultivo DME: Ham's F-12.** Tomado de Gauthier y Vasta (1993)

Componente	Proporción/Concentración	Cantidad	Marca
<b>Agua grado biología molecular</b>	1 L	1 L	
<b>Sales oceánicas</b>	30 ppm	30 g	Sigma
<b>Medio DME</b>	1	8.3 g	
<b>Mezcla de nutrientes Ham's F-12</b>	2	16.6 g	
<b>Hepes</b>	50 mM	12 g	Sigma
<b>Bicarbonato de sodio</b>	3.6 mM	0.3 g	Sigma
<b>Penicilina G</b>	200 U/mL	0.12 g	Sigma
<b>Estreptomina</b>	200 µg/mL	0.2 g	Sigma
<b>Suero fetal de bovino (inactivo)</b>	5 %	50 mL	Gibco

La preparación del medio de cultivo fue en campana de flujo laminar. Se disolvió la sal oceánica en el agua grado biología molecular y se filtra al vacío (0.22  $\mu\text{m}$ ) para esterilizar. Se agrega cada uno de los componentes en el orden descrito, solubilizando cada que se incorpora uno nuevo. Se agrega el SFB inactivo (56 °C por 30 min con agitación) y se incorpora suavemente. Se filtra nuevamente el medio de cultivo, para eliminar partículas no disueltas.

## Anexo 2. Cultivo *in vitro* de *P. marinus*

### Materiales

- Kit de disección estéril
- Tubos de vidrio para incubación de tejidos
- Navaja de histología
- Mortero
- Filtros estériles de 100, 70 y 40  $\mu\text{m}$
- Tubos de microcentrífuga estériles
- Cajas Petri estériles
- Agua de mar estéril
- Medios de cultivo (Anexo I)

1. Se obtiene recto, branquia y manto ( $\sim 2$  g) de 20 ostiones presuntamente infectados.
2. El tejido se corta finamente ( $<1$  mm<sup>3</sup>) con un bisturí, navaja estériles.
3. Las secciones de tejido finamente picado se incuban en 10 mL de medio de cultivo fluido de tioglicolato preparado de acuerdo al protocolo de Ray (1966), cada ostión se incuba por separado.
4. Dejar incubando por 5-7 días en oscuridad y temperatura ambiente ( $20 \pm 2^\circ\text{C}$ ).
5. Para confirmar el desarrollo de hipnosporas, se toma una submuestra del tejido incubado y se coloca en un portaobjetos, se agrega una gota de lugol y se observa al microscopio. Si el resultado es positivo, se observan células esféricas teñidas de negro-azul.
6. El medio de cultivo, junto con el tejido incubado, se filtrarán a través de una serie de luz de malla de 120, 100, 70 y 40  $\mu\text{m}$ , para recolectar el mayor número de hipnosporas.
7. Las hipnosporas recolectadas en el filtro de 40  $\mu\text{m}$  se enjuagarán con 150 mL de agua de mar estéril y filtrada; posteriormente se harán 10 lavados en tubos eppendorf estériles colocando la malla del filtro con las hipnosporas y 1 mL de agua de mar estéril (10,000 rpm x 5 min, temperatura ambiente) para reducir la contaminación bacteriana.
8. Se agrega 0.5 mL de medio de cultivo y se agita para suspender las hipnosporas. Se hace la siembra de la hipnosporas en una concentración de  $10^5$  (o dependiendo de la concentración que se obtenga) en 10 mL de medio DME:Ham's F-12 (1:2) (Gauthier y Vasta, 1993) contenidos en una caja de Petri de vidrio para cultivo celular.
9. Se mantendrán a  $28^\circ\text{C}$  y serán examinados frecuentemente para contrastar las fases de crecimiento.

### Anexo 3. Cálculo de concentraciones

Despejando la siguiente fórmula (1) se considera como **C1** a la concentración de plata metálica ( $\text{Ag}^0$ ) que se va a preparar (ej.  $10 \mu\text{g/mL}$ ); **V1** el volumen de solución a preparar (ej.  $5 \text{ mL}$ ); **C2** la concentración de  $\text{Ag}^0$  en la solución de AgNPs Argovit™ ( $12\,000 \mu\text{g/mL}$ ); y **V2** el volumen de solución de Argovit™ a utilizar.

$$C1V1=C2V2 \quad (1)$$

#### TRATAMIENTOS

1. Agua destilada
2. AgNPs: Concentración  $9.27 \text{ mM}$  de Ag

Para preparar una solución de  $9.27 \text{ mM}$  o  $1000 \mu\text{g/mL}$  de  $\text{Ag}^0$  en un volumen de  $5 \text{ mL}$  se requiere:

$$V2 = \frac{(1000 \mu\text{g/mL})(5000 \mu\text{L})}{12000 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}} = 420 \mu\text{L de AgNPs}$$

Entonces para hacer la solución se requieren:  **$420 \mu\text{L}$  de AgNPs +  $4580 \mu\text{L}$  de agua destilada**

3. Nitrato de plata: concentración de  $9.27 \text{ mM}$  de  $\text{AgNO}_3$

Para convertir la concentración de mM a  $\mu\text{g/mL}$  se utilizó la masa molar del  $\text{AgNO}_3$  y despejando con la siguiente fórmula (2) se obtuvo la concentración de nitrato de plata en microgramos por mililitro ( $\mu\text{g/mL}$ ).

$$1 \text{ M (AgNO}_3) = 169.87 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

$$1 \text{ mM} = 0.16987 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$$

$$9.27 \text{ mM} = \left(\frac{\text{mmol}}{\text{L}}\right) \left(\frac{1 \text{ mol}}{1000 \text{ mmol}}\right) \left(\frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ mL}}\right) \left(\frac{169.87 \text{ g}}{1 \text{ mol}}\right) \left(\frac{1 \cdot 10^6 \mu\text{g}}{1 \text{ g}}\right) = 1574.7 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \quad (2)$$

O multiplicando directamente la concentración en mM por la masa molar del  $\text{AgNO}_3$ :

$$9.30 \cdot 169.87 = 1579.8 \mu\text{g/mL}$$

Para una concentración de  $1579.8 \mu\text{g/mL}$  de nitrato de plata, en un volumen final de  $5000 \mu\text{L}$ , se requiere:  **$7.873 \text{ mg}$  de  $\text{AgNO}_3$  +  $5 \text{ mL}$  de agua**

#### 4. Polivinilpirrolidona (PVP)

- Contenido de PVP en nanopartículas de plata Argovit™: **188 mg/mL o 188 000 µg/mL**
- Contenido de plata metálica (Ag<sup>0</sup>) en Argovit™: 12 mg/mL o 12 000 µg/mL

I.- Se calcula el volumen de AgNPs para lograr una concentración de 1000 µg/mL de Ag<sup>0</sup> en un mililitro de solución:

$$V_2 = (1000 \text{ ng/mL}) (1000 \text{ µl}) / (12000 \text{ ng/µl}) = \mathbf{83.33 \text{ µl o } 0.0833 \text{ mL de AgNPs}}$$

II.- Calcular el contenido de PVP en 0.0833 mL de AgNPs:

$$1 \text{ mL de AgNPs} \rightarrow 188 \text{ mg de PVP}$$

$$0.0833 \text{ mL de AgNPs} \rightarrow 15.66 \text{ mg o } 15660 \text{ µg de PVP}$$

Entonces en 1 mL de solución con 1000 µg/mL de Ag<sup>0</sup>, el contenido de PVP es de 15660 µg/mL, es decir, 1000 µg de Ag<sup>0</sup> está cubierto por 15660 µg de PVP.

III. Cálculo para preparar 5 mL de solución de PVP

$$1 \text{ mL AgNPs} \rightarrow 15\,660 \text{ µg de PVP}$$

$$5 \text{ mL de AgNPs} \rightarrow 78\,300 \text{ µg de PVP}$$

Entonces se requieren: **78.3 mg de PVP + 5 mL de agua destilada.**

## Anexo 4. Procedimiento histológico

1.- Fijación de los ostiones utilizando el cuerpo entero. Se utiliza fijador Davidson's por al menos 72 h.

### Preparación de la solución fijadora Davidson's

**Tabla 10. Componentes para preparar 1 litro de solución Davidson's.**

Reactivo	ml
Glicerina	100
Formaldehído 37%	200
Etanol 96%	300
Agua de mar filtrada	300
Ácido Acético	100

2.-Técnica de deshidratación en deshidratador de tejidos automático (Hitoquinette).

	Tiempo (h)
Etanol 80%	1
Etanol 96% - I	2
Etanol 96% - II	2
Etanol 100% - I	2
Etanol 100% - II	2
Etanol 100% -III	1
Xileno I	1
Xileno II	2
Parafina	2
Parafina I	2
<u>Parafina II</u>	<u>2</u>
Total	19 h

3.- Incluir las muestras deshidratadas e impregnadas en parafina en la estación de inclusión y cortar secciones de los bloques en parafina en micrótopo rotatorio secciones de 6-7 micras de grosor.



### Protocolo/desparafinación y tinción de laminillas histológicas

1. Xilol /6min
2. Xilol/6min
3. Alcohol etílico abs /30 sumergidas
4. Alcohol etílico abs /30 sumergidas
5. Alcohol etílico 95%/30 sumergidas
6. Alcohol etílico 95% /30 sumergidas
7. Lavar en agua corriente por 3 min.(hasta que el xileno no se perciba).

### Protocolo de tinción HE

8. Teñir con Hematoxilina de Harris durante 6 min, efectuar agitación (subir y bajar). La tinción de núcleos, es una tinción regresiva.
9. Eliminar exceso de Hematoxilina, enjuagando y agitando bajo el chorro (lento), sin golpear las laminillas, con el con agua de la llave, por 2 min.
10. Pasar al Alcohol ácido (0.3 ml de HCl/ 200 ml 70% ETOH) durante 1 min.
11. Enjuagar al chorro (lento) de agua de la llave por 5 min (si permanece restos de Alcohol ácido en el tejido, continuará el blanqueamiento aun meses después).
12. Solución saturada de Carbonato de Sodio (NaHCO<sub>2</sub>) o Litio por 2 min. Examinar a la vista que los núcleos estén teñidos de color azul claro.
13. Enjuague con agua de llave / 3 min
14. Eosina "Y" 2.5 min. agitando (tinción del citoplasma, tinción regresiva)
15. Alcohol etílico 95% /40 sumergidas
16. Alcohol etílico 95% /40 sumergidas
17. Alcohol etílico 100% /40 sumergidas
18. Alcohol etílico 100% /40 sumergidas
19. Xileno(I) 10 min sin agitación, hasta que las laminillas se aclaren, si están nubladas, aún tienen agua)
20. Xileno(II) 10 min sin agitación
21. Montar las laminillas con resina sintética o Cytoseal \*60 de baja viscosidad

## Anexo 5. Tinción de Autometalografía de plata (ATM)

1.- Lavar los vasos Coplin, con capacidad de 50 mL, con solución Farmer: 9 partes de tiosulfato de sodio al 10 % + 1 parte de ferricianida de potasio al 10%. Dejar enjuagando 48 h previo a la tinción y lavar posteriormente con agua ultra pura.

**Solución Farmer:** 4.5 g de tiosulfato de sodio en 45 mL de agua desionizada + 0.5 g de Ferricianida en 5 mL de agua desionizada.

2.- Se utilizan laminillas cargadas tipo “superfrost” o revestidas de gelatina. Desparafinar y rehidratar los cortes histológicos de manera rutinaria y colocarlas en el vaso Coplin para realizar la tinción.

3.- Preparar la solución de revelado (Lactato de plata y celulosa) en un tubo de 50 mL estéril, y agregar la solución en el vaso Coplin con las laminillas, protegiéndolo muy bien de la luz.

### Solución de revelado:

- 30 mL de Carboxymetil celulosa al 2%
- 5 mL de citrato buffer (para preparar 100 mL: 25.5 g de ácido cítrico monohidratado + 23.5 g de Trisodium citrato (dihidratado) ajustando un volumen de 100 mL. Ajustar pH a 3.8)
- 0.42 g de hidroquinona en 7.5 mL de agua desionizada
- 0.06 g de lactato de plata disuelto en 7.5 mL de agua desionizada

4.- Se incuban las laminillas en la solución de revelado, a temperatura de 26 °C con agitación por aprox. 1 h (45-90 min). Evitar exponer a la luz.

5.- Se reemplaza la solución de revelado por una solución de tiosulfato de sodio al 5 %, lavar por 10 min y enjuagar suavemente con agua desionizada.

6.- Las laminillas se contra tiñen en una solución de Nuclear Fast Red y se montan con resina.

**Solución Nuclear fast red:** 5 g de sulfato de aluminio + 0.1 g de nuclear fast red disueltos en 100 mL de agua destilada. Calentar lentamente, hasta hervir. Dejar enfriar, filtrar y agregar granos de thymol para preservar.

### Procedimiento de tinción:

- |   |        |
|---|--------|
| 1. Agua destilada   | 1 min  |
| 2. Solución Nuclear fast red  | 10 min |
| 3. Agua destilada   | 1 min  |
| 4. Etanol 70%   | 1 min  |
| 5. Etanol 96%   | 1 min  |
| 6. Etanol 100%  | 5 min  |
| 7. Etanol 100%  | 5 min  |
| 8. Montar las laminillas con resina sintética o Cytoseal *60 de baja viscosidad |        |