



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

ACTIVIDAD INMUNOESTIMULANTE DE
NANOPARTÍCULAS DE ORO EN CAMARÓN BLANCO
(*Litopenaeus vannamei*) CONTRA *Vibrio parahaemolyticus*

T E S I S

Que para obtener el grado de

Maestra en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación en Biotecnología)

P r e s e n t a

Marlene Anahí Tello Olea

La Paz, Baja California Sur, febrero de 2018

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz B. C. S. siendo las 15:00 horas del día 8 del Mes de Diciembre del 2017 se procedió por los abajo firmantes miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. a liberar la Tesis de Grado titulada

**" ACTIVIDAD INMUNOESTIMULANTE DE
NANOPARTÍCULAS DE ORO EN CAMARÓN BLANCO
(*Litopenaeus vannamei*) CONTRA *Vibrio
parahaemolyticus*"**

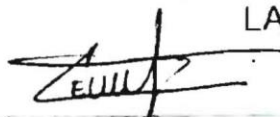
Presentada por el alumno

Marlene Anahi Tello Olea

Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN Biotecnología

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA



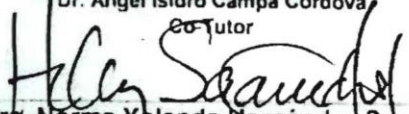
Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez
Co-Director de Tesis



Dr. Sergio Rosales Mendoza
Co-Director de Tesis



Dr. Angel Isidro Campa Córdova
Co-Tutor



Dr. Norma Yolanda Hernández Saavedra,
Directora de Estudios de Posgrado y
Formación de Recursos Humanos

Conformación de Comités

Comité Tutorial

Co-Director de tesis: Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. (CIBNOR)

Co-Director de tesis: Dr. Sergio Rosales Mendoza

Universidad Autónoma de San Luís Potosí (UASLP)

Tutor: Dr. Angel Isidro Campa Córdoba

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. (CIBNOR)

Comité Revisor de Tesis

Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez

Dr. Sergio Rosales Mendoza

Dr. Angel Isidro Campa Córdoba

Jurado de Examen

Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez

Dr. Sergio Rosales Mendoza

Dr. Angel Isidro Campa Córdoba

Suplente

Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle

Resumen

Litopenaeus vannamei (camarón blanco) es una de las especies de crustáceos más cultivadas en acuicultura. Recientemente las cepas de *Vibrio parahaemolyticus* asociadas a la Enfermedad de la Necrosis Aguda del Hepatopáncreas han causado pérdidas económicas importantes en esta industria. Una de las estrategias para combatir esta enfermedad incluye la administración de inmunoestimulantes. En este sentido la nanotecnología presenta diversas aplicaciones en este campo debido a que las nanopartículas (partículas de 0-100 μm) tienen un gran potencial por las propiedades derivadas de sus dimensiones, que incluyen la capacidad de activar componentes del sistema inmune. En particular, tanto estudios *in-vivo* como *in-vitro* en ratones han probado la capacidad de las nanopartículas de oro (AuNPs) para modular el sistema inmune. El objetivo de esta investigación fue evaluar la capacidad inmunoestimulante e inmunoprotectora de AuNPs administradas oralmente en camarón frente a una infección experimental con *V. parahaemolyticus*. Las AuNPs se caracterizaron morfo-fisicoquímicamente mediante Espectrofotometría Ultravioleta –Visible, Microscopía Electrónica de Transmisión, Dispersión de luz dinámica (DLS) y Potencial Z. Las AuNPs se administraron vía oral (dosis única) evaluando 3 niveles de dosis (0,2; 2 y 20 μg de AuNPs por gramo de alimento) tomando muestras cada 24h por 6 días. Se evaluó la supervivencia, daños a tejidos mediante histología, conteo de hemocitos totales, actividad superóxido dismutasa, catalasa y peroxidasa. Se analizó la expresión a nivel transcripcional del receptor tipo Toll-3 y profenoloxidasa (proPO), genes relacionados a la función inmune en hemocitos e intestino. Las AuNPs empleadas tuvieron un tamaño promedio de 18.57 ± 4.37 nm, se encuentran medianamente dispersas y con un potencial negativo de -10.3 ± 0.208 (pH=7). No se encontraron signos histológicos de toxicidad o daño al tejido en ninguna de las dosis probadas. Se observó una inmunoestimulación temprana a nivel sistémico en términos de la expresión del receptor tipo Toll-3 y de proPO para hemocitos; así como de Toll-3 en intestino; lo que sugiere que las nanopartículas de oro son seguras y capaces de inmunoestimular a nivel temprano. La dosis media de AuNPs indujo una disminución del daño histopatológico respecto al control positivo y una supervivencia del 80% en los organismos retados con *V.parahaemolyticus*-AHPND. Las AuNPs son una alternativa promisoriosa para el control de patógenos en la industria camarinícola, con capacidad de generar una estrategia de control de la enfermedad AHNDP causada por *V. parahaemolyticus*.

Palabras clave: *Litopenaeus vannamei*, *Vibrio parahaemolyticus*, Nanopartículas de oro, Inmunoestimulantes, Supervivencia.

Vo.Bo.
Dr. Sergio Rosales Mendoza
Co-tutoría

Vo.Bo.
Dr. Carlos Angulo Valadez
Co-tutoría

Summary

Litopenaeus vannamei (white shrimp) is one of the most cultivated crustacean species in aquaculture. Recently, the *Vibrio parahaemolyticus* strains associated to the Acute Hepatopancreatic Necrotic Disease have caused significant economic losses in this industry. One of the strategies to fight this disease relies in using immunostimulants. In this sense, nanotechnology offers several applications in this field due to the fact that nanoparticles (particles of 0-100 μm) have great potential for the properties derived from their dimensions, which include capacity to activate immune system components. According to *in vivo* and *in vitro* studies in mice have tested the ability of gold nanoparticles (AuNPs) to modulate the immune system. This study aimed to evaluate the immunostimulant and immunoprotective capacity of AuNPs administered orally in shrimp against an experimental infection with *V. parahaemolyticus*. AuNPs were characterized morpho-physicochemically by Ultraviolet-Visible Spectrophotometry, Transmission Electron Microscopy, Dynamic Light Scattering (DLS) and ζ (Zeta) Potential. AuNPs were administered orally (single dose) evaluating three level doses (0.2, 2 and 20 μg AuNPs per gram of feed), taking samples every 24 hours for 6 days. Survival rate, tissue damage by histology, total hemocyte count, superoxide dismutase, catalase and peroxidase activity were evaluated. Expression of Toll-3 like receptor and prophenoloxidase (proPO) genes related to the immune system in hemocytes and gut was also analyzed. The AuNPs had an average size of 18.57 ± 4.37 nm, are moderately dispersed and with a negative ζ potential of -10.3 ± 0.208 mV, pH=7. No histological signs of toxicity or tissue damage were found in any doses tested. Early immunostimulation was recorded at systemic level in terms of Toll-3 like receptor and proPO expression in hemocytes and Toll-3 expression in gut; suggesting that gold nanoparticles are safe and able to immunostimulate at early level. The group receiving the medium dose of AuNPs induced a decrease in histopathological damage when compared to positive control and a 80% survival rate upon challenge with *V. parahaemolyticus*-AHPND. The AuNPs are a promising alternative to the control of pathogens in shrimp industry, having implications in the development of strategies to control AHPND disease.

Keywords: *Litopenaeus vannamei*, *Vibrio parahaemolyticus*, Gold nanoparticles, Immunostimulants, Survival.

Vo.Bo.
Dr. Sergio Rosales Mendoza
Co-tutoría

Vo.Bo.
Dr. Carlos Angulo Valdez
Co-tutoría

Dedicatoria

A mi familia.

José Luis Tello Ávila y Juana Olea Cabrera (Mis padres)

Iveth Azucena Tello Olea y Luis Rodolfo Tello Olea (Mis hermanos)

Son un pilar muy importante en mi vida.

Donde quiera que la vida me lleve siempre tendré todos aquellos hermosos recuerdos y enseñanzas.

Ikigai (生き甲斐)

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada 589379 y el financiamiento de los proyectos: INFR-2014-01/225924 y PDCPN2014-01/ 248033 para la realización de esta tesis.

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S. C., (CIBNOR), por la infraestructura para llevar a cabo las clases y los experimentos así como el área de posgrado.

A mi comité tutorial. Al Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez, el Dr. Sergio Rosales Mendoza y el Dr. Angel Campa Córdova que me apoyaron en todo lo posible durante esta etapa de mi vida. Por sus consejos, recomendaciones y enseñanzas tanto personales como académicas.

Al M. en C. Pablo Monsalvo Spencer, técnico responsable del laboratorio húmedo de organismos acuáticos y al M. en C. Gabriel Robles Villegas por su apoyo en mis inicios de cultivo de camarón y los tips brindados.

Al técnico del Laboratorio de Nutrición Acuícola Sandra de la Paz Reyes, por todo su apoyo y la facilitación de las instalaciones para el mantenimiento de organismos y el desarrollo de los bioensayos. Al grupo de trabajo del laboratorio de ese momento. A Eduardo, a Bryan Licon. A nivel personal es un gusto el conocerlos. Gracias por ayudarme a ser alguien menos perfeccionista.

Al Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle, por el uso y disposición del lugar de trabajo y equipo en el laboratorio de patógenesis microbiana.

A la Dra. Martha Reyes Becerril, técnico responsable del Laboratorio de Patogénesis Microbiana por su apoyo con el material y reactivos para el análisis de mis muestras así como en las técnicas inmunológicas.

A la Dra. María del Carmen Rodríguez Jaramillo, técnico responsable del Laboratorio de Histología e Histoquímica y a la técnico María Eulalia Meza Chávez. Por todo su tiempo, sus consejos y paciencia, así como todo el aprendizaje que me han otorgado de manera personal así como en las técnicas de histología y la interpretación de mis resultados en este apartado.

Al Dr. Antonio Luna González, la Dra. Ruth Escamilla Montes, el Dr. Genaro Diarte Plata, al M. en C Jesús Arturo Fierro Coronado, Diana, Gaby Mendoza y Montse, por todo su apoyo y enseñanzas durante el periodo de mi estancia en CIIDIR-Sinaloa. Por su disposición y amabilidad en todo el proceso. Me llevo muy buenos recuerdos.

A la M. en C. Norma Angélica Ochoa Álvarez, responsable del Laboratorio de Diagnóstico Microbiológico, por todo su apoyo, amabilidad y conocimientos compartidos en la parte microbiológica.

Al Dr. Martín Ramírez Orozco, responsable del Laboratorio de Biomedicina Bioquímica y Molecular por sus consejos académicos y en la identificación de cepas de *V. parahaemolyticus*.

A la Dra. Alma Gabriela Palestino Escobedo, responsable del laboratorio de Biopolímeros y Nanoestructuras de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Por recibirme en mi periodo de estancia, por su disposición, tiempo y conocimientos así como el apoyo de todo su equipo de trabajo. Muchas gracias por hacerme sentir como en casa.

Al M. en C. Adrián Esteban Velázquez Lizárraga por todo su apoyo y asistencia en las técnicas de qPCR. Me has ayudado mucho, te agradezco por ello.

Al Grupo de trabajo del Dr. Carlos Angulo (GIV) el cual me ha servido de apoyo y enseñanza tanto de técnicas como consejos. Por su colaboración. Me llevo grandes aprendizajes.

Al grupo de Patogénesis Microbiana, del cual mediante los seminarios y el aporte de éstos me ha enriquecido a nivel profesional.

A Susana Luna y Ana María Talamantes, prestadoras de servicio de la Biblioteca. Su aporte en la búsqueda bibliográfica fue de gran ayuda en el desarrollo de la tesis. Muchas gracias por su amabilidad y disposición conmigo.

A mis compañeros de maestría que han logrado mantener un buen ambiente de convivencia y respeto entre todos.

A Rosa, quien me ha hecho tener amenas pláticas además del enorme respeto que tengo por ella y sus hermosas hijas. Es grato saber que aún me recuerde a pesar del tiempo y la distancia. Mis mejores deseos para ella siempre.

A mi familia y amigos en SLP, que más allá de la distancia aún me aconsejan, escuchan y apoyan, sacándome una sonrisa en cualquier momento. Son y seguirán siendo una parte importante de mí en cualquier lugar.

A mis recientes amigos Catalina y Miguel cuya vida se ha visto modificada por la inclusión de mi persona en sus vidas. Les agradezco muchas cosas. Tantas que sólo ellos saben cuán importantes han sido en este tiempo académico y en general en mi vida. Espero seguir conservando su amistad y lo que nos depare el futuro, sin importar nada, tengan por seguro que los tendré siempre en mi memoria.

Aquellos que aún me faltan por nombrar y los que ya no están aquí, que me han apoyado. A los que con sus enseñanzas me han hecho amar la naturaleza por la maravilla de algo tan simple y complejo a la vez. Quienes han despertado en mí esa curiosidad del saber en la ciencia y que me han hecho crecer a lo largo de mi vida. Todos han aportado una parte de lo que soy en este momento. Muchas gracias.

Contenido

| | |
|--|------|
| Resumen | i |
| Summary | ii |
| Dedicatoria | iii |
| Contenido | vii |
| Lista de figuras | x |
| Lista de tablas | xiii |
| Nomenclatura / Unidades (SI) | xiv |
| Glosario | xv |
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1 <i>Vibrio parahaemolyticus</i> | 1 |
| 1.2 Sistema inmune (SI) en crustáceos..... | 2 |
| 1.3 Inmunoestimulantes..... | 4 |
| 1.4 Nanopartículas e inmunoestimulantes..... | 5 |
| 1.4.1.1 Nanopartículas metálicas..... | 6 |
| 1.4.1.2 Nanopartículas de oro (AuNP) | 6 |
| 1.4.1.3 Biocompatibilidad y baja toxicidad de AuNPs..... | 6 |
| 1.4.1.4 Interacción y mecanismo de acción de nanopartículas..... | 6 |
| 2. ANTECEDENTES | 7 |
| 3. JUSTIFICACIÓN | 10 |
| 4. HIPÓTESIS | 11 |
| 5. OBJETIVO GENERAL | 11 |
| 5.1 Objetivos particulares..... | 11 |
| 6. MATERIAL Y MÉTODOS | 12 |
| 6.1 Obtención y caracterización de AuNPs..... | 12 |
| 6.1.1 Espectrofotometría Ultravioleta –Visible..... | 12 |

| | |
|---|-----------|
| 6.1.2 Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM) | 12 |
| 6.1.3 Dispersión de luz dinámica (DLS) | 13 |
| 6.1.4 Potencial Z..... | 13 |
| 6.2 Preparación de los tratamientos..... | 14 |
| 6.2.1 Concentración de nanopartículas | 14 |
| 6.2.2 Incorporación de las AuNPs al alimento | 15 |
| 6.3 Animales..... | 15 |
| 6.4 Diseño experimental dosis-respuesta de las AuNP | 15 |
| 6.4.1 Extracción de hemolinfa | 16 |
| 6.4.2 Conteo de hemocitos circulantes (CTH)..... | 16 |
| 6.4.3 Actividad de enzimas antioxidantes | 17 |
| 6.4.3.1 Actividad Superóxido dismutasa..... | 17 |
| 6.4.3.2 Actividad Peroxidasa | 17 |
| 6.4.3.3 Actividad Catalasa | 18 |
| 6.4.4 Histología..... | 18 |
| 6.4.5 Extracción de ARN total y síntesis de ADN complementario | 19 |
| 6.4.6 Expresión de genes en PCR tiempo real (qPCR) | 20 |
| 6.5 Diseño experimental para el reto con <i>V. parahaemolyticus</i> | 21 |
| 6.5.1 Identificación de la cepa de <i>V. parahaemolyticus</i> asociada a AHPND..... | 22 |
| 6.5.2 Cultivo de <i>V. parahaemolyticus</i> - AHPND | 23 |
| 6.5.3 Histología..... | 23 |
| 6.6 Análisis Estadísticos..... | 24 |
| 7. RESULTADOS | 24 |
| 7.1 Obtención y caracterización de AuNPs..... | 24 |
| 7.2 Dosis-respuesta de las AuNPs..... | 26 |
| 7.2.1 Supervivencia..... | 26 |
| 7.2.2 Conteo de hemocitos circulantes..... | 26 |
| 7.2.3 Actividad Superóxido dismutasa..... | 27 |
| 7.2.4 Actividad Peroxidasa | 28 |
| 7.2.5 Actividad Catalasa..... | 29 |
| 7.2.6 Histología..... | 30 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 7.2.7 | Análisis de la expresión de genes en PCR tiempo real | 33 |
| 7.3 | Reto con <i>V. parahaemolyticus</i> | 36 |
| 7.3.1 | Identificación de la cepa de <i>V. parahaemolyticus</i> asociada a AHPND..... | 36 |
| 7.3.2 | Ensayo dosis letal media (LD ₅₀)..... | 38 |
| 7.3.3 | Supervivencia Bioensayo-reto..... | 39 |
| 7.3.4 | Histología..... | 40 |
| 8. | DISCUSIÓN | 42 |
| 8.1 | Obtención y caracterización de AuNPs..... | 43 |
| 8.1.1 | Espectrofotometría Ultravioleta –Visible..... | 43 |
| 8.1.2 | Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM) | 44 |
| 8.1.3 | Dispersión de luz dinámica (DLS) | 44 |
| 8.1.4 | Potencial ζ (zeta)..... | 45 |
| 8.2 | Dosis-respuesta de las AuNPs..... | 46 |
| 8.2.1 | Conteo de hemocitos circulantes..... | 46 |
| 8.2.2 | Actividad de Enzimas Antioxidantes | 46 |
| 8.2.3 | Histología..... | 48 |
| 8.2.4 | Análisis de la expresión de genes en PCR tiempo real | 49 |
| 8.3 | Reto infeccioso con <i>V. parahaemolyticus</i> | 52 |
| 8.3.1 | Histopatología | 54 |
| 9. | CONCLUSIONES | 56 |
| 10. | PERSPECTIVAS | 57 |
| 11. | ANEXOS | 58 |
| | Anexo A. Solución Anticoagulante..... | 58 |
| | Anexo B. Buffer de fosfatos | 58 |
| | Anexo C. Solución de Davidson. | 59 |
| 12. | LITERATURA CITADA | 60 |

Lista de figuras

- Figura 1.** Caracterización de nanopartículas de oro a concentración de $2 \mu\text{g g}^{-1}$ de alimento. (A) Espectro UV-Visible de nanopartículas de oro. (B) Análisis morfológico de AuNPs: Derecha: TEM de nanopartículas de oro sintetizadas por el método de Turkevich. Se observa forma ovoide de estas nanopartículas. Izquierda: Histograma de distribución de tamaños de AuNPs. El software ImageJ se utilizó para el análisis de las imágenes TEM. (C) Espectro EDS de Nanopartículas de oro. Los picos en las posiciones de oro elemental están indicados por \blacktriangledown . (D) DLS de AuNPs el cual muestra el diámetro hidrodinámico de la solución, análisis por triplicado. 25
- Figura 2.** Conteo de hemocitos totales de *L. vannamei* expuesto a AuNPs vía oral por 6 días. (A) $0.2 \mu\text{g g}^{-1}$ alimento, (B) $2 \mu\text{g g}^{-1}$ alimento, (C) $20 \mu\text{g g}^{-1}$ alimento, (T0) Tiempo 0, (W) Control sin AuNPs. 27
- Figura 3.** Tasa de inhibición de la enzima Superóxido dismutasa en sobrenadante de hemolinfa de camarón blanco (*L. vannamei*) alimentados con dieta control o dieta con AuNPs a distintas concentraciones. Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$). Los datos se presentan como la media \pm S.E. 28
- Figura 4.** Actividad peroxidasa en sobrenadante de hemolinfa de camarón alimentado con distintas concentraciones de nanopartículas de oro en la dieta. Los resultados son presentados como la media \pm S.E. Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) se muestran con letras diferentes entre los tratamientos de cada tiempo. 29
- Figura 5.** Actividad catalasa en sobrenadante de hemolinfa de camarón alimentado con distintas concentraciones de nanopartículas de oro en la dieta. Los resultados son presentados como la media \pm S.E. 30
- Figura 6 a-d.** Vista del corte transversal del hepatopáncreas de *L.vannamei*. Túbulo (T); Capa mioepitelial (Mel); Lumen (Lum); Células B (B); Células mioepiteliales (Mfn); Seno hemal (Sh); hemocitos (*). Sección en parafina de $4 \mu\text{m}$, tinción H&E. Longitud de la barra en a, c, e, g, i = $150 \mu\text{m}$; b, d, f, h, j = $200 \mu\text{m}$ 31
- Figura 6 e-j.** Vista del corte transversal del hepatopáncreas de *L.vannamei*. Túbulo (T); Capa mioepitelial (Mel); Lumen (Lum); Células B (B); Células mioepiteliales (Mfn); Seno hemal (Sh); hemocitos (*). Sección en parafina de $4 \mu\text{m}$, tinción H&E. Longitud de la barra en a, c, e, g, i = $150 \mu\text{m}$; b, d, f, h, j = $200 \mu\text{m}$ 32

- Figura 7.** Análisis de la expresión de TLR en hemocitos de camarón blanco en respuesta a la administración de AuNPs a concentraciones de 0,2; 2 y 20 $\mu\text{g g}^{-1}$. Los datos se presentan como la media \pm S.E 33
- Figura 8.** Análisis de la expresión de proPO en hemocitos de camarón blanco en respuesta a la administración de AuNPs a concentraciones de 0,2; 2 y 20 $\mu\text{g g}^{-1}$. Los datos se presentan como la media \pm S.E. Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$). 34
- Figura 9.** Análisis de la expresión de TLR en intestino de camarón blanco en respuesta a la administración de AuNPs a concentraciones de 0,2; 2 y 20 35
- Figura 10.** Cultivo en placa: A) CHROMagar y B) Agar TCBS para la identificación de *V. parahaemolyticus*. 36
- Figura 11.** Cultivo de la cepa IPNGEV16, tinción Gram. Objetivo 100X. 37
- Figura 12.** Gel de electroforesis de la extracción de ADN genómico. Cepa IPNGEV16. Línea 1, Marcador de peso molecular (1Kbplus, Invitrogen®); Línea 2, Cepa IPNGEV16 (Cultivo directo); Línea 3, Cepa IPNGEV16 (Resiembra en placa). 37
- Figura 13.** Electroforesis del producto de PCR anidada en gel de agarosa al 1.5% de la cepa IPNGEV16. Línea 1, Control negativo; Línea 2, Cepa IPNGEV16 (Cultivo directo); Línea 3, Cepa IPNGEV16 (Resiembra en placa); Línea 4, Marcador de peso molecular (1Kbplus, Invitrogen®). 38
- Figura 14.** Regresión lineal por el método de Finney para el cálculo de la dosis letal media (LD_{50}) en camarones infectados con 3 concentraciones de *V. parahaemolyticus*-AHPND. 38
- Figura 15.** Gráfico de supervivencia en camarones infectados con *V. parahaemolyticus*. (+) Control positivo, bacteria + alimento comercial; (-) Control negativo, sin bacteria+ alimento comercial; 0.2, 2, 20, concentraciones ($\mu\text{g g}^{-1}$) de AuNPs utilizadas para el bioensayo-reto + infección con bacteria, respectivamente. Los resultados se presentan como la media \pm S.E. 39
- Figura 16 a-d.** Análisis histopatológico del hepatopáncreas de camarones infectados por inmersión con *V. parahaemolyticus* (Tiempo 36h, dosis= 9×10^5 UFC/mL). Infiltración hemocítica (ih), nódulos hemocíticos (nh), bacterias (*), desprendimiento de células epiteliales (Dc), hipertrofia del lumen (\blacktriangledown), atrofia tubular (At), pérdida estructura tubular (I). a), grupo control: alimento comercial sin suspensión bacteriana; b-c-d, Control positivo: alimento comercial + suspensión bacteriana; e-f, g-h, i-j, Grupos alimentados con AuNPs (0.2, 2 y 20 $\mu\text{g g}^{-1}$) + suspensión bacteriana, respectivamente. Sección en parafina de 4 μm , tinción H&E. Longitud de la barra =100 μm 40
- Figura 16 e-j.** Análisis histopatológico del hepatopáncreas de camarones infectados por inmersión con *V. parahaemolyticus* (Tiempo 36h, dosis= 9×10^5 UFC/mL). Infiltración hemocítica (ih), nódulos hemocíticos (nh), bacterias (*), desprendimiento de células epiteliales (Dc), hipertrofia del lumen (\blacktriangledown), atrofia

tubular (At), pérdida estructura tubular (I). a), grupo control: alimento comercial sin suspensión bacteriana; b-c-d, Control positivo: alimento comercial + suspensión bacteriana; e-f, g-h, i-j, Grupos alimentados con AuNPs (0.2, 2 y 20 $\mu\text{g g}^{-1}$) + suspensión bacteriana, respectivamente. Sección en parafina de 4 μm , tinción H&E. Longitud de la barra =100 μM 41

Lista de tablas

| | |
|--|----|
| Tabla I. Similitudes en mecanismos del SI en mamíferos y crustáceos | 9 |
| Tabla II. Relación del volumen necesario para obtener las distintas concentraciones de Nanopartículas utilizadas en los experimentos empleando una solución madre a 9.96 mM | 15 |
| Tabla III. Genes relacionados con el sistema inmune del camarón blanco (<i>L. vannamei</i>) y primers utilizados para la técnica de PCR en tiempo real. | 20 |
| Tabla IV. Reactivos PCR anidada. | 23 |
| Tabla V. Potencial ζ de nanopartículas de oro en función del pH. | 26 |
| Tabla VI. Dosis letal media software Statplus v6.2.2.0. | 39 |

Nomenclatura / Unidades (SI)

nm =nanómetro / 1 nm= 1×10^{-9} m.

M=molar / 1M=1 mol m⁻³

μM= micromolar / 1 μM = 1×10^{-6} mol m⁻³

mM=milimolar / 1mM= 1×10^{-3} mol m⁻³

μg= microgramo / 1μg= 1×10^{-9} kg

μg g⁻¹= microgramos por gramo / 1 μg g⁻¹ = 1×10^{-3} g kg⁻¹

g.mol⁻¹= gramos por mol / Peso molecular de un compuesto

L= litro / 1L= 0.01 m³

mL= mililitro /1mL= 1×10^{-6} m³

μL= microlitro / 1 μL= 1×10^{-9} m³

mg L⁻¹= miligramos por litro / 1 mg L⁻¹= 1×10^{-3} kg m⁻³

h= hora / 1h=3600 s

rpm= revoluciones por minuto / 1rpm=0.104719755 rad.s⁻¹

ng=nanogramo / 1ng = 1×10^{-12} kg

u= unidades / Unidades de una enzima

mOsm.kg⁻¹= miliosmoles por kg / Presión molar

μm= micrómetro / 1 μm= 1×10^{-6} m

g=gravedad / 1g = 9.8m s⁻²

mV= milivoltio / 1V=Joule.Coulomb=1 m²kg s⁻³ A⁻¹

KeV=electronvolt / 1KeV= $1.602176565 \times 10^{-16}$ J1KeV= $1.602176565 \times 10^{-16}$ J

Glosario

Enfermedad: “Alteración o desviación del estado fisiológico en una o varias partes del cuerpo, por causas en general conocidas, manifestada por síntomas y signos característicos, y cuya evolución es más o menos previsible”. (WHO, 2016)

Inmunoestimulante: Sustancia que incrementa la habilidad del sistema inmune para combatir infecciones y enfermedades (NCI, 2016).

Nanotecnología: Campo de la ciencia aplicada dedicado al estudio, diseño, síntesis, control y manipulación de la materia a una escala menor que un micrómetro (nanogov, 2016).

Sistema inmune: Red de células, tejidos y órganos que en conjunto trabajan para proteger el cuerpo contra infecciones (NIAID, 2016).

1. INTRODUCCIÓN

La acuicultura es la producción y/o proceso de cría de organismos acuáticos en cultivos de alta densidad, el cual requiere de un mayor control para evitar el desarrollo de enfermedades. Entre los organismos cultivados comúnmente se encuentran peces, moluscos y crustáceos, dentro de los cuales destaca el camarón blanco (FAO, 2004; FAO 2016), siendo la especie *Litopenaeus vannamei* una de las especies más cultivadas debido a su alta tasa de crecimiento y su resistencia a rangos amplios de temperatura (FAO, 2004). Sin embargo la industria camarinícola ha sido afectada a lo largo del tiempo por diversas enfermedades infecciosas causadas en su mayoría por virus y bacterias causando una alta mortalidad que se traduce en pérdidas económicas (Lightner, 1996; Lightner *et al.*, 2011; Walker y Winton, 2010). Entre los patógenos más relevantes se encuentran el Virus del Síndrome Taura, el Virus del síndrome de la mancha blanca (TSV y WSSV por sus siglas en inglés, respectivamente) y recientemente *Vibrio parahaemolyticus* (Lightner y Redman, 1998; Soto *et al.*, 2015).

1.1 *Vibrio parahaemolyticus*

Vibrio parahaemolyticus es una bacteria perteneciente a la familia *vibrionaceae*. Son bacilos Gram negativos, cortos, en forma de coma, móviles, halotolerantes, anaerobios facultativos (Luna *et al.*, 2016); es comúnmente encontrada en ambientes marinos o estuarios, unida a superficies en el agua o en asociación con diferentes especies de moluscos (Broberg *et al.*, 2011). Recientemente *V. parahaemolyticus* adquirió un plásmido (plásmido pVA) que posee una toxina binaria (ToxA y ToxB), similar a una proteína relacionada a insectos "Photorhabdus", toxina producida por la bacteria *Photorhabdus luminescens* (Li *et al.*, 2014) Las cepas que contienen este plásmido se han asociado con el Síndrome de Mortalidad Temprana (EMS), mejor conocida como Síndrome de la

Necrosis Aguda del Hepatopáncreas (AHPND por sus siglas en inglés), en el cual generalmente existe una atrofia severa del hepatopáncreas con un desprendimiento masivo de las células epiteliales en dicho órgano, presencia de infiltración hemocítica, necrosis (Joshi *et al.*, 2014; Lai *et al.*, 2015; Nunan *et al.*, 2014). Estas alteraciones morfológicas son utilizadas en el diagnóstico de esta enfermedad mediante análisis histológico (Tran *et al.*, 2013).

Durante los últimos años la tasa de contaminación por *V. parahaemolyticus* se ha incrementado (FAO, 2013). Además, algunas cepas están asociadas como la principal causa de gastroenteritis humana debido a la ingesta de marisco contaminado (Broberg *et al.*, 2011; CDC, 2013).

Un estado de enfermedad es consecuencia de una compleja interacción de tres factores: El medio ambiente, el hospedero y el patógeno, los cuales se denominan triada epidemiológica (CDC, 2012). En este sentido, los crustáceos poseen mecanismos de defensa que los protegen en contra de invasores o partículas extrañas (sistema inmune).

1.2 Sistema inmune (SI) en crustáceos

Los crustáceos son invertebrados; carecen de Inmunoglobulinas propias de la inmunidad adaptativa, por lo que su respuesta inmune está constituida principalmente por la inmunidad innata que consiste en barreras físicas, así como mecanismos celulares y humorales para combatir agentes extraños y/o enfermedades (Aguirre *et al.*, 2009). La respuesta inmune celular incluye mecanismos tales como nodulación, encapsulación y melanización (Vazquez *et al.*, 2009); mientras que la respuesta humoral involucra la síntesis y liberación de distintos compuestos: péptidos antimicrobianos (AMP por sus siglas en inglés), inhibidores de proteinasas, factores parecidos a citocinas, entre otros (Tassanakajon *et al.*, 2013).

Uno de los principales mecanismos de defensa en crustáceos son los hemocitos, células presentes en la hemolinfa (análogo de la sangre en humanos) que juegan un rol central en la inmunidad no específica (Johansson *et al.*, 2000); participan en la fagocitosis, melanización, producción de compuestos oxidantes y en la cascada de coagulación (Aguirre *et al.*, 2009). Hasta la fecha los hemocitos se categorizan en tres grupos: hialinos, granulados y semi-granulosos (Aguirre *et al.*, 2009; Rodríguez, 1996). Los hemocitos hialinos son células pequeñas con una alta relación núcleo citoplasma y pocos o nulos gránulos citoplasmáticos. Sus funciones están relacionadas con la coagulación y fagocitosis (Söderhäll y Cerenius, 1992). Los hemocitos granulados tienen actividad fagocítica y de encapsulación; además almacenan las enzimas que constituyen el sistema profenoloxidasa (proPO) (Johansson y Soderhall, 1989) y son los que poseen el núcleo más pequeño de los tres con un alto contenido de gránulos (Zhang *et al.*, 2006). Los hemocitos semigranulosos poseen diversos gránulos citoplasmáticos, intervienen en los procesos de encapsulación, fagocitosis y melanización donde participa el sistema proPO; además, sintetizan y liberan las peneidinas, péptidos antimicrobianos (AMPs por sus siglas en inglés) que promueven la adhesión mediada por integrinas de granulocitos y semigranulocitos (Tassanakajon *et al.*, 2013).

Otras moléculas importantes presentes en la respuesta inmune del camarón son la lisozima, que cataliza la hidrólisis de la pared celular bacteriana previniendo la invasión de bacterias patógenas (Ji *et al.*, 2011); así como las lectinas, familia de proteínas que reconocen azúcares terminales de glicoproteínas y glicolípidos presentes en los microorganismos, involucradas en la activación de la ProPO, (Wei *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2009). La ProPO participa en el proceso de melanización en defensa contra patógenos o agentes extraños (Söderhäll y Cerenius, 1998; Wang *et al.*, 2006). Durante las reacciones inmunocelulares, en especial en la fagocitosis y melanización se producen y liberan moléculas altamente tóxicas que ayudan en la muerte y degradación del agente invasor, tales

como especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) y de nitrógeno (RNS, por sus siglas en inglés) que pueden dañar también tejidos del hospedero. Para evitar esto el hospedero cuenta con defensas antioxidantes (Morales, 2014). La superóxido dismutasa y catalasa son enzimas antioxidantes que actúan convirtiendo el anión superóxido y peróxido de hidrógeno producidos en respuesta a los mecanismos de defensa contra patógenos, convirtiéndolos en componentes menos dañinos para el organismo (H_2O y CO_2). Estas enzimas son de manera indirecta indicadores de actividad del sistema inmune en crustáceos (Campa *et al.*, 2002b; Lin *et al.*, 2010). Todas estas respuestas humorales y celulares permiten a los crustáceos ser capaces de combatir enfermedades.

Para controlar la proliferación de microorganismos patógenos en acuicultura se utilizan antibióticos. Sin embargo el amplio y frecuente uso de ellos con el tiempo ha resultado en el desarrollo de cepas resistentes debido a la transferencia horizontal de genes (proceso que permite compartir material genético entre organismos) (Defoirdt *et al.*, 2011). Por ello, el desarrollo de estrategias capaces de controlar el crecimiento y desarrollo de enfermedad de bacterias patogénicas es de gran importancia para asegurar la salud animal en la industria.

1.3 Inmunoestimulantes

Una de las estrategias utilizadas es potenciar la inmunidad y resistencia para asegurar la salud de los organismos, esto mediante el uso de probióticos, prebióticos e inmunoestimulantes (Akhter *et al.*, 2015; Hai *et al.*, 2015). Un inmunoestimulante es una sustancia que activa el Sistema inmune causando una respuesta global acelerando el reconocimiento y la eliminación de agentes patógeno-infecciosos y sustancias extrañas (Apines y Amar, 2015). En hemocitos de camarón se ha demostrado la activación de la respuesta celular mediante la administración de inmunoestimulantes tales como microorganismos probióticos, lisados de patógenos o sus componentes estructurales tales como β -glucanos, y lipopolisacáridos (Apines y Amar, 2015; Campa *et al.*, 2002). Esta respuesta

puede variar significativamente dependiendo del componente y del número de receptores presentes en la célula (Bowie y O'Neill, 2000; Ji *et al.*, 2009). Dentro de las nuevas estrategias se propone el uso de nanopartículas como vacunas, adjuvantes e inmunoestimulantes.

1.4 Nanopartículas e inmunoestimulantes

Las nanopartículas (NPs) son partículas cuyo tamaño es menor o igual a 100 nm; su tamaño, morfología, área de superficie, conductividad y tipo de distribución les confiere nuevas propiedades sobre los sólidos volumétricos (Kreyling *et al.*, 2011). Éstas partículas han ganado interés debido a que se pueden aplicar como antimicrobianos, vehículos de entrega de fármacos y como inmunoestimulantes (Shalan *et al.*, 2015; Swain *et al.*, 2014; Vimal *et al.*, 2014). En 2009, Rajeshkumar *et al.* administraron en el camarón tigre negro (*Penaeus monodon*) una vacuna de ADN basada en el gen VP28 del WSSV, formulada con nanopartículas de quitosán. Esta vacuna indujo una supervivencia relativa de hasta el 50% de los organismos 30 días post-tratamiento en comparación al control que presentó 100% de mortalidad (Rajeshkumar *et al.*, 2009). Recientemente Sivaramasamy *et al.* 2016 reportaron un incremento en el número de hemocitos totales, ganancia en peso, y la expresión de genes relacionados al sistema inmune en camarones suplementados con nanopartículas de plata (AgNPs) de 5-25 nm biosintetizadas por la bacteria *Bacillus subtilis*. El tratamiento con AgNPs también aumentó la resistencia ante un reto infeccioso con *V. parahaemolyticus*.

1.4.1.1 Nanopartículas metálicas

1.4.1.2 Nanopartículas de oro (AuNP)

Las nanopartículas de oro (AuNPs) u oro coloidal son de las partículas metálicas más estables. Debido a su inercia y nuevas propiedades a nivel nanométrico hoy en día tienen potenciales aplicaciones en catálisis, imagenología celular, sensores, tratamientos, entrega de fármacos y diagnóstico de cáncer (Daniel y Astruc, 2004; Eustis, 2006; Sperling, 2008).

1.4.1.3 Biocompatibilidad y baja toxicidad de AuNPs

En 2005 Connor *et al.* estudiaron la captación y toxicidad de AuNPs en células de leucemia humanas, encontrando que algunos compuestos precursores de AuNPs pueden ser tóxicos; sin embargo, las nanopartículas *per se* no perjudicaron las funciones celulares. Las AuNPs de 18 nm preparadas con citrato no parecen ser tóxicas en concentraciones de hasta 250µM (átomos de oro) (Connor *et al.*, 2005). En 2007 Sadauskas *et al.* evaluaron la distribución *in vivo de* AuNPs inyectadas por vía intravenosa (2 y 40 nm) o intraperitonealmente (40 nm) en ratones revelando que estas nanopartículas son captadas principalmente mediante endocitosis por las células de Kupffer y macrófagos sin atravesar la barrera encefálica. Además los autores demostraron que una parte de esas nanopartículas pueden ser secretadas por la orina como resultado de filtración simple en el glomérulo renal (Sadauskas *et al.*, 2007).

1.4.1.4 Interacción y mecanismo de acción de nanopartículas

En los sistemas de mamíferos, una vez dentro del tracto gastrointestinal (GI), las nanopartículas interactúan con los enterocitos de la mucosa y los componentes del sistema inmune intestinal. Independientemente de la ruta de entrada, las nanopartículas metálicas son en su mayoría transportadas vía endosomas a

lisosomas. Por ejemplo, las nanopartículas de plata no funcionalizadas se captan principalmente por endocitosis mediada por clatrina (Mohanraj y Chen, 2006; Petrarca *et al.*, 2015). En invertebrados acuáticos, las nanopartículas son predominantemente almacenadas en el hepatopáncreas (Jovanović y Palić, 2012).

Evidencias experimentales sugieren que las células del sistema inmune innato interactúan con las nanopartículas metálicas a través de algunos mecanismos relacionados a la eliminación de patógenos, tales como los receptores tipo Toll (TLRs) que funcionan como moléculas sensoras que detectan patrones conservados de microorganismos y virus presentes tanto en vertebrados mamíferos como invertebrados crustáceos, iniciando una respuesta inmune (Kawai y Akira., 2010; Li *et al.*, 2013, Luo *et al.*, 2015; Takeda *et al.*, 2003). En particular el TLR-4 parece ser el sensor y transductor de señales de nanopartículas de cobalto que finalizan con la activación de la respuesta inmune innata (Potnis *et al.*, 2013).

2. ANTECEDENTES

En vista de que las AuNPs se consideran biocompatibles y pueden ser fácilmente funcionalizadas con antígenos, estos nanomateriales se han aplicado como vehículos de entrega de vacunas. La conjugación de antígenos (proteínas, péptidos o polisacáridos) o bien vacunas de ADN a las AuNPs permiten la generación de complejos que son captados eficientemente por el sistema inmune dando lugar a una inmunogenicidad alta. Se ha reportado la funcionalización de AuNPs con el toxoide tetánico, proteínas de la envoltura del virus del Nilo Occidental, así como antígenos asociados a tumores. Induciendo títulos específicos de inmunoglobulina A (IgA) en mucosa intestinal de ratones; IgG específicos en ratón así como la producción de distintas interleucinas tales como IL-6, IL-12 provocando respuestas específicas de antígeno (Salazar-González *et al.*, 2015).

Dykman *et al.* propusieron una tecnología para la preparación de anticuerpos contra varios antígenos utilizando oro coloidal como adyuvante, encontrando que la inmunización animal con oro coloidal-antígeno conjugado (con o sin el uso del Adyuvante de Freud completo) produjo anticuerpos específicos en una gran variedad de antígenos. Las AuNPs pueden estimular la síntesis de anticuerpos en conejos, ratas y ratones, reduciendo la cantidad de Antígeno necesario en comparación con algún adyuvante convencional. Incluso obtuvo una respuesta inmune sin el uso de otros adyuvantes y estimulando la actividad fagocítica de células linfoides e induciendo la liberación de mediadores inflamatorios (Dykman *et al.*, 2004, 2009, 2017). Las AuNPs actúan como adyuvantes y acarreadores siendo el aspecto más importante la manifestación de las propiedades inmunogénicas del oro coloidal.

Por otra parte se ha investigado el efecto de las nanopartículas de oro desnudas en proliferación celular, citotoxicidad y respuesta inmune. Lu *et al.* en 2010 analizaron *in vitro* el efecto de AuNPs de 34 nm a diferentes concentraciones en queratinocitos de ratón encontrando que a la concentración de 5ppm se induce su proliferación (Lu *et al.*, 2010). Kim *et al.* en el 2012 estudiaron los cambios morfológicos *in vitro* de células mononucleares de sangre periférica y la expresión de genes en células 293T con AuNPs acopladas a oligonucleótidos y a la proteína verde fluorescente (EGFP por sus siglas en inglés) dando como resultado que el EGFP-oligonucleótido por sí solo no fue responsable de desencadenar una respuesta celular (Kim *et al.*, 2012). Yen *et al.* (2009) describen la activación de fagocitos por la administración de AuNPs *in-vitro* de distintos tamaños, reportando cambios morfológicos que indican la activación de macrófagos y la expresión de las citocinas IL-1, IL-6, TNF- α , moléculas relacionadas con la activación, proliferación y maduración de neutrófilos en mamíferos (Abbas *et al.*, 2008; Yen *et al.*, 2009). Malaczewska en 2015 realizó estudios *in vivo* administrando AuNPs en ratones vía oral; mostrando los diferentes efectos en el sistema inmune, tales

como un incremento en la proliferación celular y en la secreción de citocinas pro-inflamatorias como IL-1 β , IL-6, TNF- α (Małaczewska, 2015; 2015(2)).

Sivaramasy *et al.* (2016) reportaron un incremento en el número de hemocitos totales, ganancia en peso, y la expresión de genes relacionados al sistema inmune en varios tejidos de camarones tratados con nanopartículas de plata (5-25 nm AgNPs) biosintetizadas por la bacteria *Bacillus subtilis*. Un hallazgo de gran relevancia fue un incremento en la resistencia al reto infeccioso con *V. parahaemolyticus* en el grupo tratado con AgNPs, con una tasa de supervivencia del $90.66 \pm 0.523\%$, mientras que el control mostró una tasa del $10 \pm 0.321\%$ y el grupo tratado con el lisado *Bacillus subtilis* que mostró una tasa del $71 \pm 0.577\%$ (Sivaramasamy *et al.*, 2016).

Dentro del panorama general, el sistema inmune innato es una eficiente primera línea de defensa contra microorganismos invasores siendo considerada la forma más antigua y universal de defensa entre vertebrados e invertebrados (Stokes *et al.*, 2015). Basándonos en los modelos de investigación de NPs, existen moléculas del SI que se encuentran presentes en ambos organismos, ejerciendo funciones similares en la defensa contra organismos patógenos (Tabla I).

Tabla I. Similitudes en mecanismos del SI en mamíferos y crustáceos

| MODELO (Especie) | Receptor | Efector | Referencia |
|---|--|--|------------------------------|
| Mamífero <i>Mus musculus</i> | Receptores tipo Toll (1-10), Lectina tipo c, Receptor de manosa. | SOD, Peroxidasa, Catepsinas, antimicrobianos | Catalasa, Lisozima, Péptidos |
| Crustáceo <i>Litopenaeus vannamei</i> | Receptores tipo Toll (LvToll1-3), Lectina tipo c, receptor de manosa | SOD, Peroxidasa, Catepsinas, antimicrobianos | Catalasa, Lisozima, Péptidos |

Estos antecedentes nos muestran la posibilidad de un efecto inmunoestimulante de las AuNPs. En el contexto de la acuicultura, de los diversos métodos de estimulación en camarones (inmersión, inyección, alimentación), el método más práctico utilizado es incorporando la sustancia inmunoestimulante en el alimento (Apines y Amar, 2015).

Una parte fundamental al momento de evaluar la protección inducida al administrar las AuNPs además de analizar parámetros fisiológicos, capacidad antioxidante, expresión génica y supervivencia es el diagnóstico mediante histología. La histología es un método estándar para las investigaciones patológicas y el diagnóstico de enfermedades (Cervellione *et al.*, 2017).

En este estudio se evaluará en camarones el efecto de las AuNPs administradas oralmente en la respuesta inmune y en la protección frente a una infección experimental con *V. parahaemolyticus*.

3. JUSTIFICACIÓN

La salud de especies acuáticas está influenciada por la triada epidemiológica, la cual establece que una enfermedad se establece como consecuencia de las interacciones entre el patógeno, huésped y medio ambiente. El uso inapropiado de antibióticos para la prevención y el tratamiento de enfermedades ha dado lugar a la generación de cepas resistentes, evento asociado a la transferencia horizontal de genes, lo que constituye una problemática para la industria porque estos tratamientos tienden a ser ineficaces.

Actualmente el cultivo del camarón blanco (*L. vannamei*) es afectado por *V. parahaemolyticus*, agente causal de la enfermedad de la Necrosis Aguda del Hepatopáncreas (AHPND, por sus siglas en inglés). Como alternativa al uso de antibióticos para combatir el desarrollo de esta enfermedad existe el

fortalecimiento del sistema inmune a través de la administración de inmunoestimulantes.

Diversos estudios en animales indican que las nanopartículas de oro, además de las diversas propiedades atractivas generadas por su reducido tamaño, son capaces de ejercer una actividad inmunomoduladora asociada a la protección contra algunas patologías.

4. HIPÓTESIS

Si los estudios realizados en modelos animales indican que la administración de nanopartículas de oro ejerce actividad inmunomoduladora, entonces la administración de nanopartículas de oro a través del alimento estimulará el sistema inmune del camarón con capacidad de generar una respuesta protectora contra la infección por *V. parahaemolyticus*.

5. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de nanopartículas de oro sobre la respuesta inmune e inmunoprotección del camarón blanco infectado experimentalmente con *V. parahaemolyticus*.

5.1 Objetivos particulares

1. Determinar la respuesta inmune en juveniles de camarón blanco expuestos a diferentes concentraciones de nanopartículas de oro incluidas en la dieta.
2. Evaluar en hemocitos e intestino la expresión de genes relacionados al sistema inmune en camarones tratados con nanopartículas de oro.
3. Determinar si el tratamiento con AuNPs induce en camarones protección ante la infección con *V. parahaemolyticus*.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Obtención y caracterización de AuNPs

Las nanopartículas de oro se sintetizaron en la Universidad Autónoma de San Luis Potosí mediante el método de Turkevich (1951). Se encuentran estabilizadas en una solución con iones citrato en agua desionizada estéril. El stock tiene una concentración 9.96 mM a pH de 7.5.

Se realizó la caracterización de las nanopartículas de oro analizando las 3 concentraciones de nanopartículas utilizadas (0.2 μg , 2 μg y 20 μg de AuNPs por gramo de alimento). Se analizaron mediante Espectroscopia Ultravioleta-Visible (Uv-Vis), Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM), Dispersión de Luz y Potencial Z para evaluar la forma, tamaño y estabilidad de las partículas en suspensión.

6.1.1 Espectrofotometría Ultravioleta –Visible

La técnica se llevó a cabo en el laboratorio de Biopolímeros y nanoestructuras de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, en la Facultad de Ciencias Químicas con el espectrofotómetro Ultravioleta-Visible Cary 60 (Agilent Technologies). En una celda de poliestireno se añadieron 100 microlitros de cada muestra con las distintas concentraciones de AuNPs. Se realizó el protocolo de mediciones calibrando con la solución de dilución de las nanopartículas. Se hizo un barrido espectral de 400 a 700 nm de longitud de onda con el modo corrección de línea base por triplicado para cada muestra.

6.1.2 Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM)

Las partículas se examinaron con el Microscopio Electrónico de Transmisión (Joel Joem 1230) para visualizar el tamaño y forma de la suspensión coloidal. Cada

muestra se prepara mediante el protocolo estandarizado del laboratorio de Microscopía del Instituto de Metalurgia de la UASLP. Se utilizó una gota de cada solución sobre una rejilla de cobre con sustrato de carbono, donde las nanopartículas quedan adheridas una vez evaporado el disolvente.

6.1.3 Dispersión de luz dinámica (DLS)

Al pasar un haz de luz en la muestra se dispersa en varias direcciones. Los haces de luz que son dispersados por distintas partículas interfieren entre sí. Partículas pequeñas acelerarán la variación de intensidad debido a que su movimiento es más rápido en comparación a partículas grandes, cuyo movimiento es más lento, Obteniéndose una intensidad de dispersión determinada. Esta técnica permite conocer el tamaño de partícula dependiendo de la dispersión de luz que éstas produzcan.

El uso de surfactantes para la síntesis de nanopartículas implica un aumento del diámetro efectivo el cual en dispersión incluye también a las moléculas de disolvente. Éste diámetro se conoce como diámetro hidrodinámico y se puede caracterizar por DLS. Se utilizó el equipo DLS-Malvern instruments (Zetasizer nano) para las mediciones en ésta técnica. Se añadió 1 mL de volumen de las muestras de AuNPs en una celda de poliestireno, temperatura 24 °C, con 3 repeticiones por medición.

6.1.4 Potencial Z

Dependiendo de sus características, las nanopartículas metálicas poseen cargas negativas o positivas y estas son moduladas por el pH del medio en el cual se encuentran dispersas. Esto provoca que las partículas atraigan iones con carga opuesta formando una capa de iones en la superficie. Dentro de ésta capa existe

un límite de capa teórico en el cual los iones y partículas forman una entidad estable (capa interna). Al moverse una partícula (por ejemplo) por efecto de la gravedad, los iones dentro de la capa límite se mueven, y aquellos que se encuentren más alejados de esta capa (capa externa) permanecerán en el dispersante. En este estudio se determinó el potencial Z de las nanopartículas empleando soluciones a las 3 concentraciones elegidas así como 5 diferentes pH (1, 3, 5, 7, 9). El análisis se realizó por triplicado utilizando el equipo DLS-Malvern instruments (Zetasizer nano).

6.2 Preparación de los tratamientos

6.2.1 Concentración de nanopartículas

Las dosis a utilizar en los bioensayos se establecieron en base a los antecedentes de estudios *in vivo* encontrados en la literatura, las cuales no resultaron en efectos citotóxicos. Las dosis elegidas fueron: 0.2, 2 y 20 μg por gramo de alimento.

Para conocer la cantidad de nanopartículas presentes en la solución madre se procedió a realizar los cálculos partiendo de un volumen de 300 μL con una concentración 9.96 mM.

En base a la fórmula de Molaridad se realizaron los siguientes cálculos:

$$M = \frac{n}{L} = \frac{g}{P.M * L} \quad g = M * L * PM \quad (1)$$

Partiendo de 1 g = $1 \times 10^6 \mu\text{g}$ y Peso Molecular del oro de $196.967 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

$$g = \left(9.96 \text{ mM} \left| \frac{1 \times 10^{-3} \text{ M}}{1 \text{ mM}} \right. \right) * \left(196.967 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \right) * \left(300 \mu\text{L} \left| \frac{1 \text{ mL}}{1000 \mu\text{L}} \right| \left| \frac{1 \text{ L}}{100 \text{ mL}} \right. \right)$$

$$= 5.885 \times 10^{-4} \text{ g}$$

$$g = 588.53 \mu\text{g AuNPs}$$

Al aplicar la ecuación (1) se obtuvo la relación mostrada en la tabla II:

Tabla II. Relación del volumen necesario para obtener las distintas concentraciones de Nanopartículas utilizadas en los experimentos empleando una solución madre a 9.96 mM

| Vol (μL) | Cantidad AuNPs (μg) |
|---------------------------------------|--|
| 300 | 588.53 |
| X | Y |

Dosis ($\mu\text{g g}^{-1}$) = 0.2, 2, 20; Volumen (μL) = 1.0, 9.8, 98.0, respectivamente. Los volúmenes calculados de solución madre se llevaron a un volumen final de 600 μL con agua desionizada estéril, el cual permitió una dispersión homogénea de las nanopartículas en el alimento.

6.2.2 Incorporación de las AuNPs al alimento

La solución de AuNPs a diferentes concentraciones se dispersó en el alimento comercial Camaronina® por medio de aspersión, secándose a temperatura ambiente durante 5 min y almacenando a 4 °C hasta a su administración.

6.3 Animales

Los animales utilizados durante los bioensayos se aclimataron en tanques 600 L con 500 L de agua de mar, a una salinidad 40 unidades porcentuales (ups), una temperatura de $25\pm 1^\circ\text{C}$, niveles de oxígeno disuelto >6 mg/L. La alimentación se realizó a una tasa de 10% de biomasa total, con una frecuencia de 2 veces por día hasta el inicio de los tratamientos.

6.4 Diseño experimental dosis-respuesta de las AuNP

El experimento tuvo una duración de 6 días. Se establecieron 4 grupos ($n= 15$) de camarones con un peso vivo promedio de 7.05 ± 0.5 g. Los animales se colocaron en tanques de 60 L con 40 L agua de mar, una salinidad de 40 ups, y una temperatura de $25\pm 1^\circ\text{C}$ con recambios de agua del 40% cada 48 h. La

aclimatación tuvo una duración de 4 días, con una alimentación del 5% de la biomasa total, siendo alimentados 2 veces al día hasta el bioensayo. El experimento se realizó por triplicado. Se utilizaron 3 concentraciones de nanopartículas (0.2, 2, 20 $\mu\text{g g}^{-1}$) en el alimento y un control (alimento sin AuNPs). Este bioensayo consistió en una sola administración (pulso) con muestreos a las 0, 24, 48, 72, 96 y 120 h y tuvo por objetivo observar la respuesta a corto plazo, la intensidad y el tiempo de respuesta al administrar AuNPs en el alimento.

Los muestreos fueron de 3 camarones por tanque. Se tomaron muestras de hemolinfa para Conteo de hemocitos totales (CTH), actividad superóxido dismutasa, peroxidasa y catalasa además de extracción de ARN. De la misma manera se tomaron muestras de intestino para extracción de ARN y de hepatopáncreas para histología. Se evaluó la mortalidad de los organismos a lo largo de todo el experimento.

6.4.1 Extracción de hemolinfa

Para evaluar los parámetros de conteo total de hemocitos (CTH), peroxidasa, catalasa y actividad SOD se realizó la extracción de hemolinfa por medio de la punción del primer segmento abdominal con la ayuda de una jeringa con anticoagulante (450 mM NaCl, 10 mM KCl, 10 mM EDTA- Na_2 , 10 mM HEPES, pH 7.3, 850 mOsm kg^{-1}) (Anexo A) (Campa-Córdova *et al.*, 2002a).

6.4.2 Conteo de hemocitos circulantes (CTH)

El CTH se realizó conforme a lo descrito por Campa-Córdova *et al.* en 2002. Se llevó a cabo en la cámara de conteo Petroff-Hausser Scientific®. Se tomaron 30 μL de hemolinfa con anticoagulante a los cuales se añadieron 150 μL de formaldehído al 4%. Los conteos se realizaron utilizando un microscopio de campo claro. Se realizaron los cálculos del factor de dilución en cada muestra para calcular el número de células por mililitro. Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente por el programa R, plataforma RStudio®, para evaluar si existen diferencias significativas respecto a los distintos tratamientos (Campa *et al.*, 2002)

6.4.3 Actividad de enzimas antioxidantes

6.4.3.1 Actividad Superóxido dismutasa

La superóxido dismutasa (SOD) cataliza la dismutación del anión superóxido (O_2^-) en peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular. Existe una forma indirecta de la medición de la actividad de esta enzima utilizando una sal de tetrazolium (WST-1) que produce un colorante de formazán soluble en agua tras la reducción con el anión superóxido.

Para elaborar el extracto las muestras de hemolinfa se centrifugaron a 800 x g por 15 min. $-4^{\circ}C$ separando y almacenando el sobrenadante a $-20^{\circ}C$. Para la técnica se utilizó el kit SOD (Sigma-Aldrich ®) en microplaca. Se realizaron los cálculos para obtener el porcentaje de inhibición enzimática siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

6.4.3.2 Actividad Peroxidasa

La actividad peroxidasa fue medida en sobrenadante de hemolinfa por un método colorimétrico en microplaca de 96 pozos (Reyes-Becerril *et al.*, 2017). Se mezclaron 20 μ L de sobrenadante con el sustrato de peroxidasa (80 μ M 3,3',5,5'-clorhidrato de tetrametilbencidina; TMB, Sigma ®; conteniendo 2.5 mM de H_2O_2). El cambio en la coloración se paró a los 5 min, agregando 50 μ L de H_2SO_4 2M. La reacción fue detenida a los 5 min agregando 50 μ L de H_2SO_4 2M. La densidad óptica se midió a $\lambda=450$ nm en el lector de microplacas. Se utilizó agua destilada como blanco. La actividad peroxidasa se determinó definiendo como una unidad en términos de un cambio de absorbancia de 1.

6.4.3.3 Actividad Catalasa

La actividad catalasa se llevó a cabo acorde Weimer *et al.* (2014), con algunas modificaciones (Weimer *et al.*, 2014).

La muestra se mezcló con buffer de ensayo (buffer de fosfatos pH 7) y metanol. Se añadió H₂O₂ (Applichem, 30%) diluido y se incubó por 20 minutos en agitación continua a temperatura ambiente. La reacción se paró mediante la adición de Hidróxido de potasio (Sigma-Aldrich ®) y Purpald (Sigma-Aldrich ®, St. Louis, MO, USA; en HCl). Se incubó por 35 min a temperatura ambiente con agitación continua. Se agregó peryodato de potasio (Sigma-Aldrich ®; en KOH) para oxidar el complejo formaldehído-purpald y se incubó por otros 5 min antes de medir la absorbancia a 595 nm.

6.4.4 Histología

Para el análisis histológico del bioensayo dosis-respuesta de las AuNPs, los organismos fueron fijados en Solución de Davidson modificada, sin ácido acético glacial (Anexo C). Se tomó un organismo por tanque al inicio (0 h) y al final del experimento (120 h) inyectando 1mL de la solución fijadora de manera lateral en el hepatopáncreas (Bell y Lightner, 1988). Los organismos fueron disectados y se recuperó el hepatopáncreas para su análisis en el laboratorio de Histología del CIBNOR. Las muestras se deshidrataron, incluyeron en parafina y se cortaron secciones de 4 µm de grosor con el microtomo Leica RM 2155. Se realizó la tinción de hematoxilina y eosina para las muestras y los tejidos fueron observados en un microscopio electrónico BX41 con cámara integrada NIKON®. En el bioensayo- reto, los organismos fueron fijados en Solución de Davidson. Se tomó un organismo por tanque al final del experimento, inyectando 1mL de Solución Fijadora lateralmente en el hepatopáncreas. Las muestras se procesaron de la misma manera en el laboratorio de Histología del CIBNOR.

6.4.5 Extracción de ARN total y síntesis de ADN complementario

Se realizó la extracción de ARN en hemocitos para el tiempo de acuerdo al protocolo de Trizol Reagent (Sigma-Aldrich ®) con algunas modificaciones. Los hemocitos se lisaron con perlas de vidrio en vórtex. Posteriormente se centrifugaron para recuperar el ARN y eliminar los residuos celulares (12 000 x g, 10min. 4°C). El sobrenadante se colocó a temperatura ambiente por 5 minutos; después se añadió cloroformo agitándose varias veces. Las muestras se centrifugaron (12 000 x g, 15 min. 4°C) y al sobrenadante se le agregó 2-propanol, dejando precipitar toda la noche a -20°C para recuperar la mayor cantidad de ARN. Las muestras se centrifugaron (12 000 x g, 10 min. 4°C) descartando el sobrenadante. El pellet se lavó 2 veces con etanol al 70%, dejando secar de 10-15 min a temperatura ambiente. EL pellet de ARN fue resuspendido en agua miliQ estéril.

Para la extracción de ARN en intestino se realizó el protocolo de acuerdo a Trizol Reagent (Sigma-Aldrich ®). Las muestras se lisaron con POLYTRON, centrifugando a 12000 x g por 10 min a 4°C para eliminar los residuos celulares. Al sobrenadante se le adicionó cloroformo centrifugando a 12 000 x g por 15 min a 4°C, separando la fase acuosa. Posteriormente se agregó 2-propanol, precipitando a Temperatura Ambiente. Las muestras se centrifugaron a 12000 x g por 10 min. 4°C. Se realizaron lavados al pellet con etanol al 75%, secando y resuspendiendo en agua miliQ. El ARN obtenido se cuantificó a $\lambda=260$ y 280 nm usando Nano Drop (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE). Sólo el ARN con un ratio de absorbancia ($A_{260}:A_{280}$) mayor a 1.8 fue utilizado para los posteriores experimentos. En todas las muestras se utilizó 1 μ g de ARN total para los posteriores pasos. Las muestras de ARN fueron tratadas con DNasa I (Sigma-Aldrich®) para eliminar el ADN genómico residual. Las muestras se almacenaron a -60°C para la posterior síntesis de ADN complementario (ADNc). La síntesis de ADNc se realizó acorde al protocolo Improm II Promega ®.

6.4.6 Expresión de genes en PCR tiempo real (qPCR)

El ADNc se utilizó como templado para analizar la expresión de los genes diana. Se utilizó una dilución 1:50 del ADNc para la técnica de qPCR. Se midió la expresión de 3 genes: TLR3, profenoloxidasa y RFLP7 como control endógeno. Se utilizaron los cebadores (primers) de la tabla III.

Tabla III. Genes relacionados con el sistema inmune del camarón blanco (*L. vannamei*) y primers utilizados para la técnica de PCR en tiempo real.

| Gen diana | #Gen Bank | Secuencia Forward (F) /Reverse (R) | Producto (Pb) |
|--------------------------------------|------------------|---|--------------------------|
| Receptor Tipo Toll-3 (TLR3) | JN180638.1 | 5'-CTT TTG GAC CCT GTA ATT TCT CAC-3 5'-CCC CAC TCA ACA TCA AAC C-3' | 244 |
| Profenoloxidasa (ProPO) | AY723296 | 5'-CGG TGA CAA AGT TCC TCT TC-3' 5'-GCA GGT CGC CGT AGT AAG-3' | 241 |
| Proteína ribosomal L7 (RFLP7) | AFU93449.1 | 5'-GCACTGTTTTGGTTCCTG-3' 5'-TGATGGTCTTCAGGTTGG-3' | 210 |

La qPCR se llevó a cabo en el Sistema de PCR tiempo real Rotor gene 6000 (Qiagen ®) utilizando SSOfast Eva Green Bio-Rad ®. Las amplificaciones se llevaron a cabo en un volumen de reacción de 15 µL con 7.5 µL de la mezcla, 10 mM de cada cebador específico (Forward/Reverse) y 5µL de ADNc dilución 1:50. El perfil térmico para la qPCR fue: 95°C por 5 min. seguido de 40 ciclos de 95 °C por 15 s, 60°C por 20 s y 72°C por 25 s. Después de la amplificación, se llevó a cabo un análisis de la curva de fusión (melt curve) para confirmar que sólo había un producto de amplificación.

Cada muestra se corrió por triplicado para cada gen. Se incluyeron controles negativos de las reacciones para cada set de primers omitiendo el ADNc modelo. Las cantidades relativas de todos los genes diana y del ARN de RFLP7 en los

ADNc se calcularon acorde al método $2^{\Delta\Delta CT}$ (Livak y Schmittgen, 2001). Los niveles de ARNm fueron normalizados respecto a los niveles de RFLP7 y expresados como nivel relativo:

$$\frac{ARNm\ diana}{ARNm\ control} \quad (2)$$

Los resultados son presentados como la media y el error estándar.

6.5 Diseño experimental para el reto con *V. parahaemolyticus*

Este bioensayo se realizó en el Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR) en Sinaloa, Guasave. Se realizó un bioensayo previo con 3 concentraciones de *V. parahaemolyticus* para determinar la dosis óptima (1×10^5 , 5×10^5 y 1×10^6 Unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL) utilizando 8 organismos por dosis, con un peso promedio de 7.21 ± 1.16 g (n=8, triplicado), los cuales fueron inoculados con las diferentes dosis. Se analizó la dosis por la mortalidad que presentaron dentro de las primeras 72 h, utilizando el software Statplus v6.2.2.0., mediante el análisis Probit por el método de Finney (Finney, 1952). Una vez obtenida la dosis letal media (LD₅₀), se realizó el bioensayo-reto.

El reto fue conducido como el descrito por Campa *et al.* (Campa-Córdova *et al.*, 2017) con algunas modificaciones. Se tienen 5 grupos de 30 camarones por grupo (n=10, triplicado) con un peso promedio de 7.02 ± 1.127 g, los cuales fueron inoculados con la suspensión bacteriana: (1) Grupo control sin suspensión bacteriana SB, (2) Grupo control con SB, (3, 4 y 5) Grupos alimentados con AuNPs (0.2 , 2 y $20 \mu\text{g g}^{-1}$) + suspensión bacteriana.

Los organismos se alimentaron con las AuNPs y a las 24 h post-alimentación se realizó la infección con la bacteria. Se evaluó la mortalidad en el experimento dentro de las primeras 36 h.

6.5.1 Identificación de la cepa de *V. parahaemolyticus* asociada a AHPND

Se empleó la cepa Cepa IPNGVE16, la cual fue aislada de un brote en las granjas camaronícolas de Sinaloa a partir de muestras de tejidos de camarones con los signos clásicos de AHPND, que por dilución fueron sembrados en medio TSA y TSB con NaCl al 2.5%.

Se tomó mediante asa microbiológica una muestra del cultivo en placa sembrando por estría cruzada en CHROMagar® específico para *Vibrio*. Paralelamente la cepa se sembró en agar TCBS selectivo para *Vibrio*, cultivándose por 18 h a 35°C. Adicionalmente se realizó una tinción Gram para visualizar la morfología celular bacteriana característica de *V. parahaemolyticus*.

Para corroborar la presencia de la toxina Pir-AB en la bacteria se realizó la extracción de ADN genómico de la muestra mediante el kit FAST DNA® Spin Kit. La muestra se cuantificó en nanodrop (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE), para posteriormente correr en un gel de agarosa al 1% para evaluar la calidad del ADN genómico. Se realizó una PCR anidada para la detección de las toxinas Pir-AB (Dangtip *et al.*, 2015) (Tabla IV).

Se programó el termociclador de la siguiente manera, para la primera amplificación se corrió 1:45 min a 94°C, seguido de 30 ciclos de 30 s de desnaturalización a 94°C, una temperatura de alineamiento de 55°C por 30 s y la elongación a 72°C durante 30 s, para finalmente una extensión de 2 min a 72°C.

En la segunda PCR, se utilizó el producto de la primera como templado para las reacciones, el termociclador se programó de la siguiente manera: amplificación de 2:00 min a 94°C, 25 ciclos de 20 s de desnaturalización a 94°C, una temperatura de alineamiento de 55°C por 20 s y la elongación a 72°C durante 20 s, para finalmente una extensión de 2 min a 72°C. Se observaron los productos de amplificación en un gel de agarosa al 1.5% en TAE1X. Como control negativo se utilizó ADN de una cepa Vp16 que no contiene el vector asociado-AHPND. Otro

control comprendió una reacción sin templado (NTC) conteniendo solamente agua grado PCR.

Tabla IV. Reactivos PCR anidada.

| Reactivo | Concentración Final |
|-----------------------------|----------------------------|
| <i>PCR1</i> | |
| Buffer | 1X |
| MgCl ₂ | 3.0 mM |
| dNTPs | 0.2 μM |
| Primer F | 0.2 μM |
| Primer R | 0.2 μM |
| Polimerasa (Go-Taq Flexi ®) | 0.5 u |
| Agua grado PCR | X |
| Templado | 70 ng |
| <i>PCR2</i> | |
| Buffer | 1X |
| MgCl ₂ | 2.5 mM |
| dNTPs | 0.2 μM |
| Primer F | 0.163 μM |
| Primer R | 0.163 μM |
| Polimerasa (Go-Taq Flexi ®) | 0.5 u |
| Agua grado PCR | X |
| Templado | 2μL |

6.5.2 Cultivo de *V. parahaemolyticus*- AHPND

Esto se realizó en el laboratorio de Bioquímica y biología molecular, CIIDIR, Sinaloa. Se tomó la cepa de *V. parahaemolyticus* de un Stock en glicerol (15%) y se cultivó la bacteria en TSB 2.5% a 30°C 18h.

El cultivo se centrifugó a 2 379 x g durante 20 min. Se hicieron lavados al pellet con agua salina (2.5 % NaCl) y se resuspendió en un volumen de la misma. De esta solución se midió la absorbancia a $\lambda=595\text{nm}$ ajustando a DO de 1.0.

6.5.3 Histología

Para los análisis histológicos del bioensayo-reto con las AuNPs, los organismos fueron fijados en Solución de Davidson (Anexo C). Se tomó un organismo por

tanque por replica para cada tratamiento a las 36 h (n=3, 5 tratamientos) inyectando 1mL de la solución fijadora de manera lateral en el hepatopáncreas. (Bell y Lightner, 1988). Los organismos fueron disectados y se recuperó el hepatopáncreas para su análisis en el laboratorio de Histología del CIBNOR. Las muestras se deshidrataron, incluyeron en parafina y se cortaron secciones de 4 μm de grosor con el microtomo Leica RM 2155. Se realizó la tinción de hematoxilina y eosina para las muestras y los tejidos fueron observados en un microscopio electrónico BX41 con cámara integrada NIKON ®.

6.6 Análisis Estadísticos

Los datos obtenidos durante la realización de los bioensayos fueron analizados por ANOVA 1 vía o Kruskal-Wallis para los datos que no cumplen con los supuestos de normalidad y homocedasticidad. Si hubo diferencias, se analizaron con una prueba post-hoc de Tuckey o Dunn test mediante el uso del software RStudio. Versión (1.0.44). Un valor de $p < 0.05$ se consideró significativo.

7. RESULTADOS

7.1 Obtención y caracterización de AuNPs

En la figura 1 A se observa el espectro UV-Vis de las AuNPs. El pico de máxima absorción se presenta a 526 nm. La figura 1 B muestra imágenes TEM de las nanopartículas de oro sintetizadas. En general, las nanopartículas de oro presentaron formas ovoides y los tamaños estimados estaban en el rango de 10 a 32 nm, siendo la mayoría de las nanopartículas de 18.57 ± 4.37 nm en promedio (II). La figura 1 C muestra el espectro de dispersión de rayos X en el cual las nanopartículas de oro tienen dos picos representativos de 2,2 y 9,7 KeV. El pico observado a 8KeV representa el espectro de Cu utilizado para las mediciones. En la figura 1 D se observa el diámetro hidrodinámico de las nanopartículas de oro.

Hay una dispersión de 3 tamaños, cuya mayor intensidad está en el diámetro de 54.82 nm.

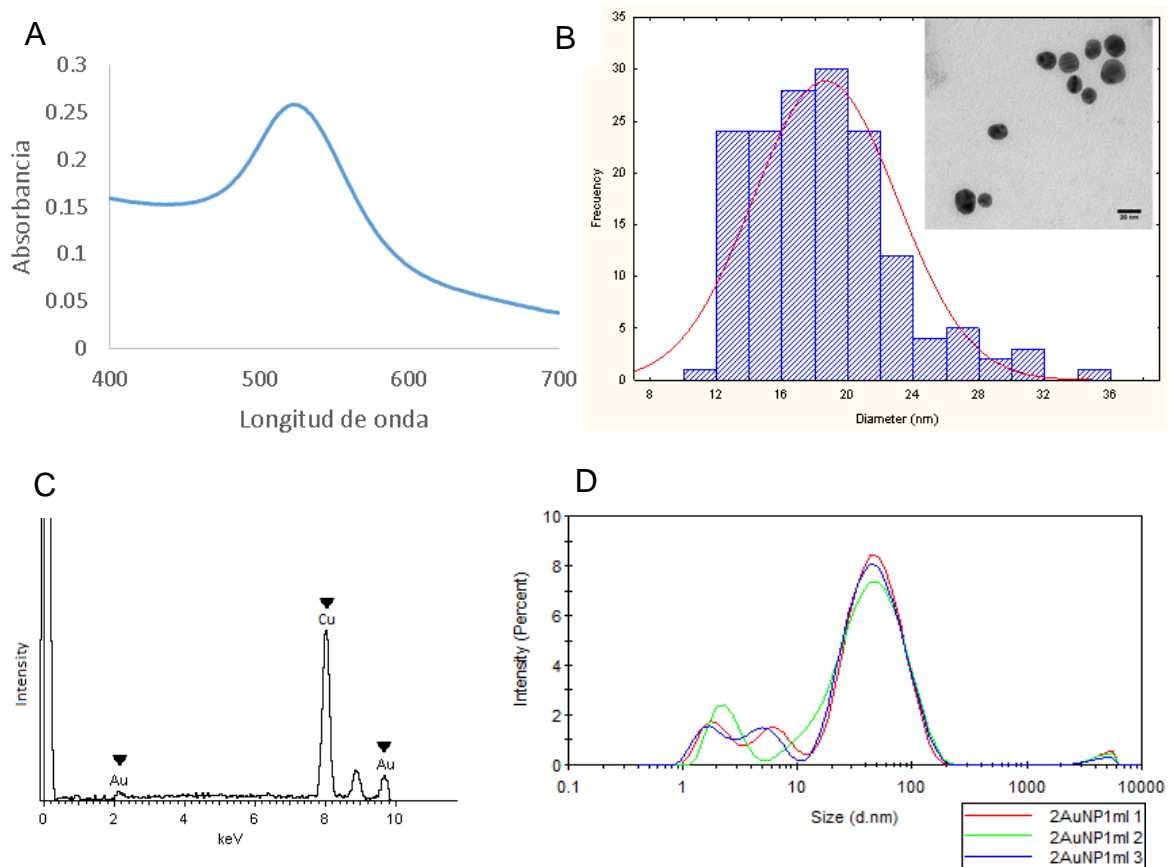


Figura 1. Caracterización de nanopartículas de oro a concentración de $2 \mu\text{g g}^{-1}$ de alimento. (A) Espectro UV-Visible de nanopartículas de oro. (B) Análisis morfológico de AuNPs: Derecha: TEM de nanopartículas de oro sintetizadas por el método de Turkevich. Se observa forma ovoide de estas nanopartículas. Izquierda: Histograma de distribución de tamaños de AuNPs. El software ImageJ se utilizó para el análisis de las imágenes TEM. (C) Espectro EDS de Nanopartículas de oro. Los picos en las posiciones de oro elemental están indicados por \blacktriangledown . (D) DLS de AuNPs el cual muestra el diámetro hidrodinámico de la solución, análisis por triplicado.

El potencial ζ se determinó a diferentes pH para evaluar la estabilidad de las nanopartículas de oro. Se encontró que el ζ -potencial casi todos los casos fue negativo a excepción del pH =1. El valor más alto se presentó en el pH 5.0 (Tabla V).

Tabla V. Potencial ζ de nanopartículas de oro en función del pH.

| pH | mV | SD |
|----|-------|-------|
| 1 | 3.58 | 1.7 |
| 3 | -4.32 | 0.118 |
| 5 | -14.7 | 0.954 |
| 7 | -10.3 | 0.208 |
| 9 | -7.07 | 0.408 |

7.2 Dosis-respuesta de las AuNPs

7.2.1 Supervivencia

Durante el transcurso del bioensayo no se presentó mortalidad en ninguno de los tratamientos ni en el tiempo 0.

7.2.2 Conteo de hemocitos circulantes

Se realizaron análisis de normalidad y homocedasticidad para los datos de CTH con la prueba de Shapiro y la prueba de Fligner (p-valor = 0.0007031, p-valor = 0.3971, respectivamente). Los datos no presentaron normalidad. (Pvalor < 0.05), por lo que se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis. Los resultados indican que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tratamientos utilizados (p-valor = 0.9489).

La figura 2 muestra la variación en el conteo de hemocitos totales. En éste gráfico no se aprecia un patrón constante en los distintos tratamientos. A las 24 y 48 h se observa un aumento del número de células dependiente de la concentración, es decir, a mayor concentración de AuNPs existe un aumento del número de hemocitos.

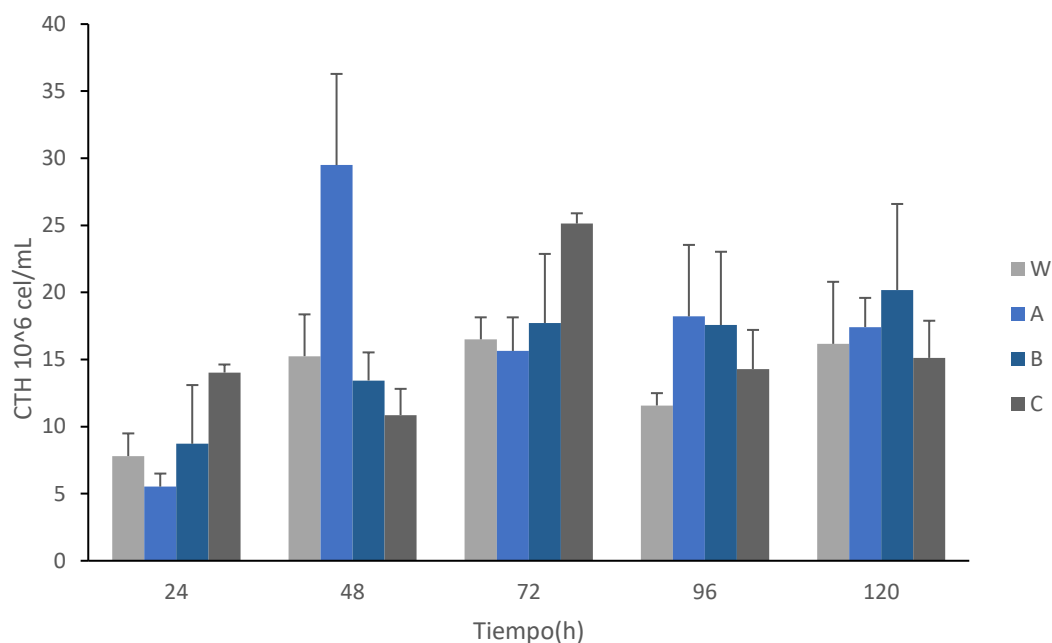


Figura 2. Conteo de hemocitos totales de *L. vannamei* expuesto a AuNPs vía oral por 6 días. (A) 0.2 $\mu\text{g g}^{-1}$ alimento, (B) 2 $\mu\text{g g}^{-1}$ alimento, (C) 20 $\mu\text{g g}^{-1}$ alimento, (T0) Tiempo 0, (W) Control sin AuNPs.

7.2.3 Actividad Superóxido dismutasa

Se realizaron análisis de normalidad y homocedasticidad para la actividad SOD en el sobrenadante mediante la prueba de Shapiro y la prueba de Fligner (p -valor = 0.9202, p -valor = 0.3971, respectivamente). Los datos presentaron normalidad y homocedasticidad por lo que se utilizó la prueba ANOVA 2 vías que dio diferencias significativas entre tratamientos ($p=0.047$). En la figura 3 se presenta la tasa de inhibición de la enzima superóxido dismutasa en sobrenadante de camarón blanco para los distintos tratamientos en los muestreos. Existen diferencias significativas

a las 48, 96 y 120 h. A las 48 h se observa un aumento de la actividad en los grupos administrados con nanopartículas de oro respecto al control, con el valor más alto en la dosis de $0,2 \mu\text{g g}^{-1}$. Se observa un patrón característico en todas las dosis, similar a una ola, con un descenso-aumento de la actividad SOD para todos los tratamientos.

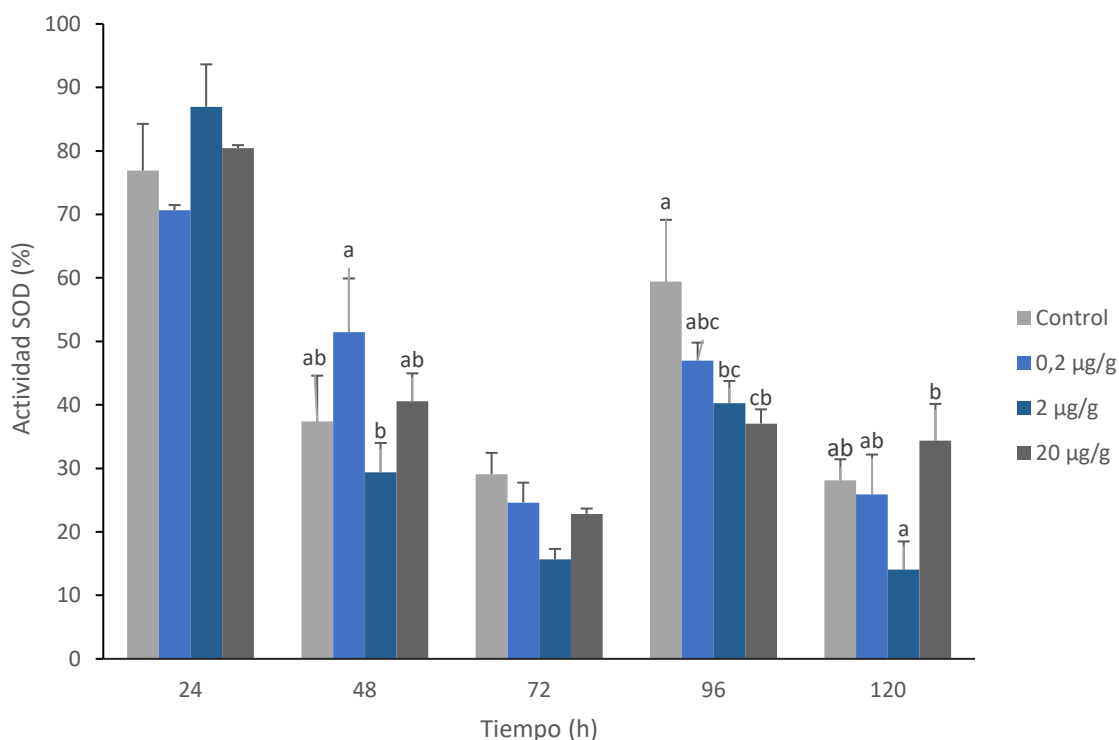


Figura 3. Tasa de inhibición de la enzima Superóxido dismutasa en sobrenadante de hemolinfa de camarón blanco (*L. vannamei*) alimentados con dieta control o dieta con AuNPs a distintas concentraciones. Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$). Los datos se presentan como la media \pm S.E.

7.2.4 Actividad Peroxidasa

En la figura 4 se presenta la actividad Peroxidasa en sobrenadante de hemolinfa de camarón. Se puede visualizar un patrón en el cual la actividad de dicha enzima disminuye y/o aumenta entre tratamientos respecto del tiempo.

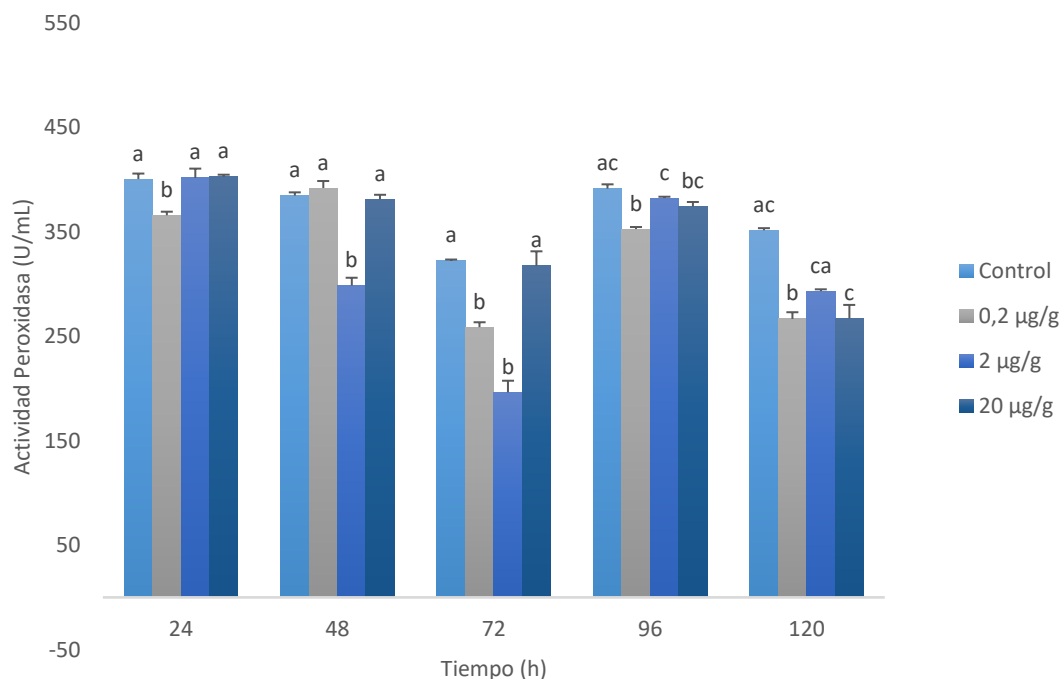


Figura 4. Actividad peroxidasa en sobrenadante de hemolinfa de camarón alimentado con distintas concentraciones de nanopartículas de oro en la dieta. Los resultados son presentados como la media \pm S.E. Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) se muestran con letras diferentes entre los tratamientos de cada tiempo.

7.2.5 Actividad Catalasa

En la figura 5 se observa la actividad enzimática de catalasa en sobrenadante, cuyos valores más altos respecto al control se encontraron a las 24 h para la dosis de $0,2 \mu\text{g g}^{-1}$. Sin embargo estos valores disminuyeron en los tiempos posteriores y se mantuvieron de manera oscilante con incrementos y decrementos hasta las 120h.

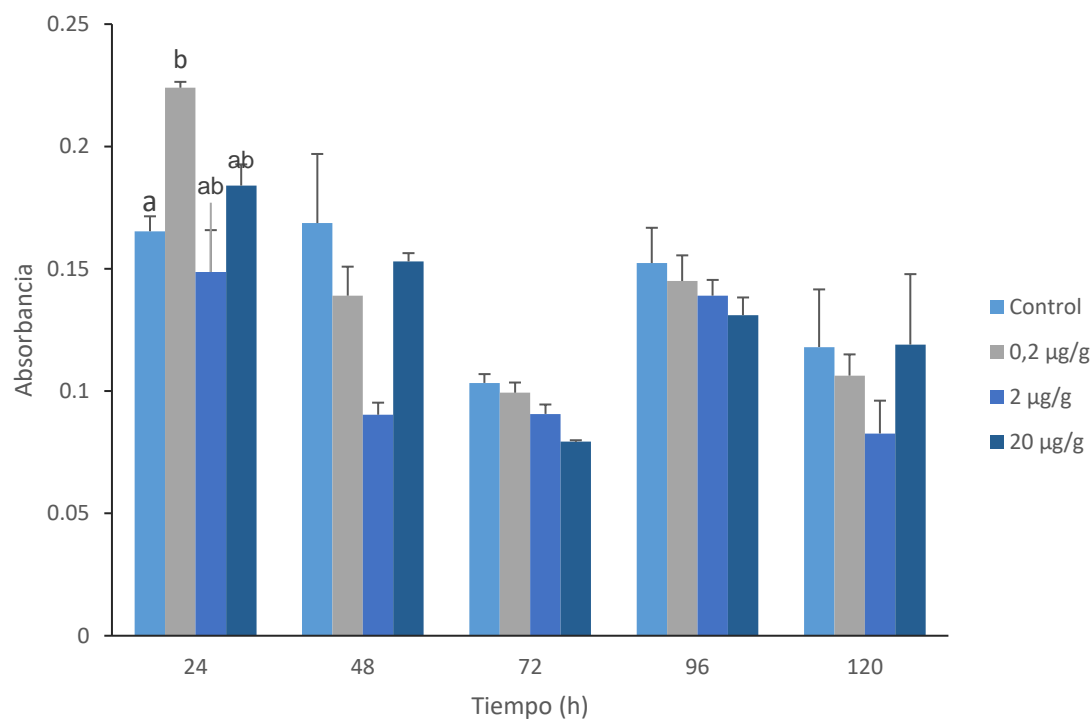


Figura 5. Actividad catalasa en sobrenadante de hemolinfa de camarón alimentado con distintas concentraciones de nanopartículas de oro en la dieta. Los resultados son presentados como la media \pm S.E.

7.2.6 Histología

Los resultados de los análisis histológicos para hepatopáncreas se muestran en la figura 6.

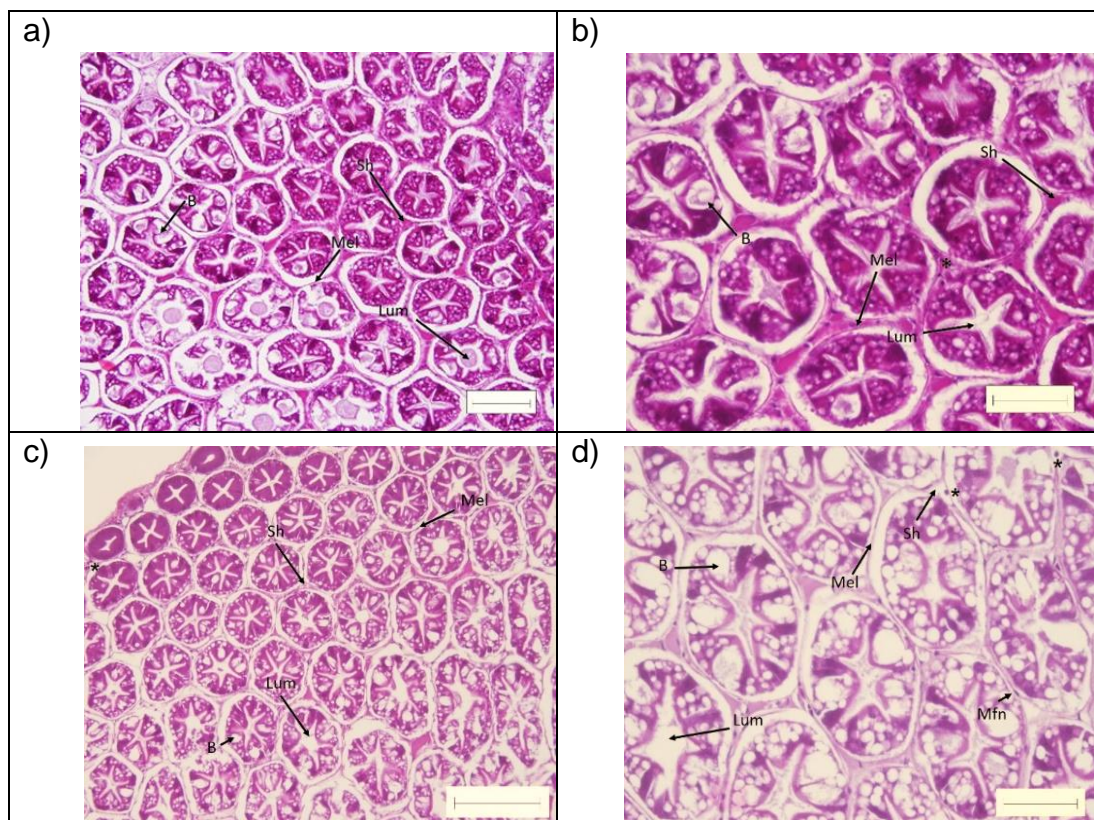


Figura 6 a-d. Vista del corte transversal del hepatopáncreas de *L.vannamei*. Túbulo (T); Capa mioepitelial (Mel); Lumen (Lum); Células B (B); Células mioepiteliales (Mfn); Seno hemal (Sh); hemocitos (*). Sección en parafina de 4 μ m, tinción H&E. Longitud de la barra en a, c, e, g, i =150 micras; b, d, f, h, j =200 micras.

En la figura 6 a-d se observan cortes transversales del hepatopáncreas con las distintas estructuras celulares. Las figuras a-b corresponden a un corte del hepatopáncreas de *L.vannamei* en el tiempo 0. Se observan los túbulos (T) delimitados por la capa mioepitelial (Mel) y un lumen (Lum) en forma de estrella, así como un gran número de células B (B) y algunas células mioepiteliales (Mfn). Existe una separación entre el túbulo y la capa mioepitelial. La figura 6 (c-d) muestra el tratamiento control a las 120 h. Se observa el lumen en forma de estrella, células B en los túbulos del hepatopáncreas, y la presencia de algunos hemocitos (asterisco) en el tejido así como una separación del túbulo respecto a la capa mioepitelial.

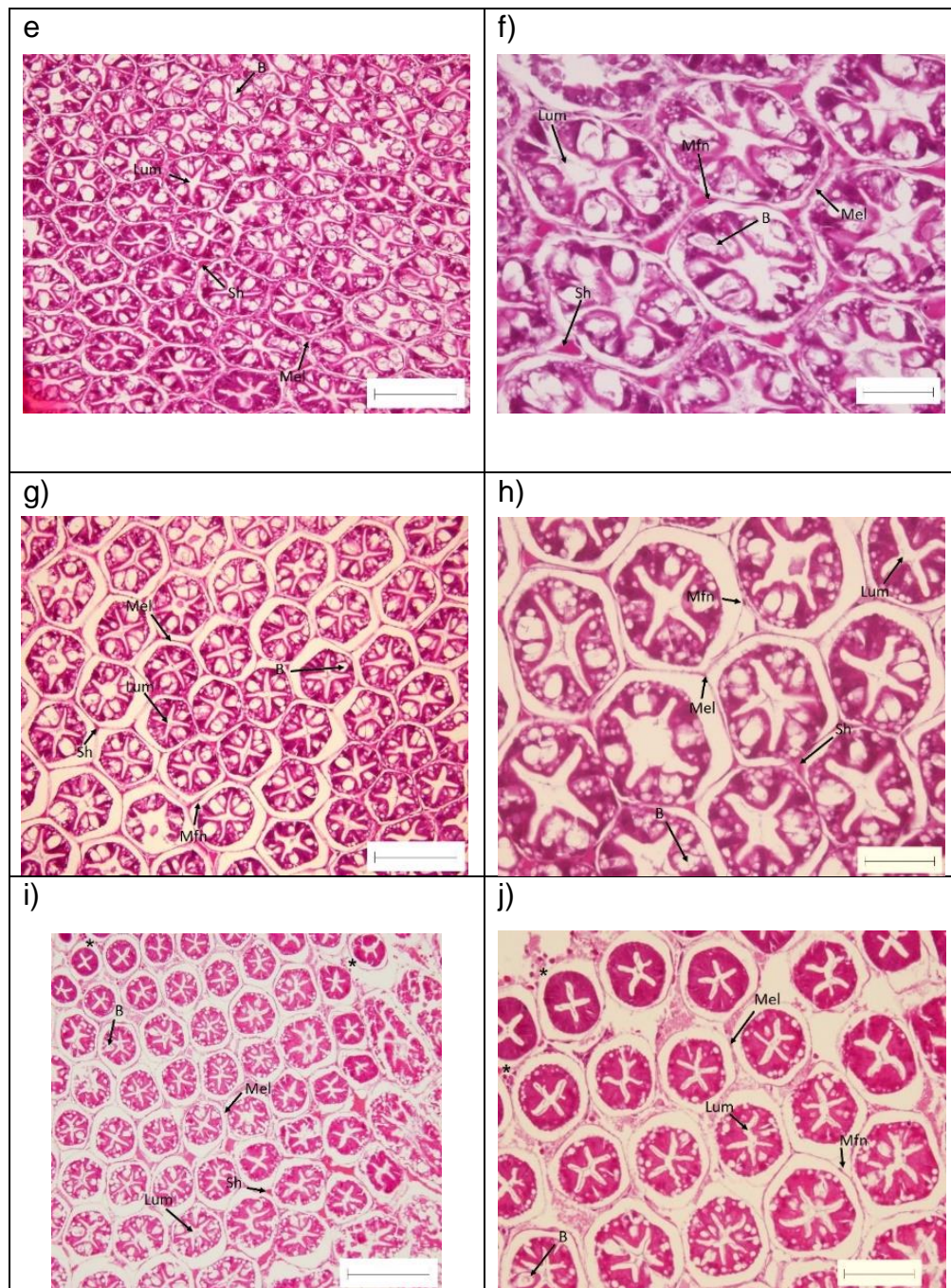


Figura 6 e-j. Vista del corte transversal del hepatopáncreas de *L.vannamei*. Túbulo (T); Capa mioepitelial (Mel); Lumen (Lum); Células B (B); Células mioepiteliales (Mfn); Seno hemal (Sh); hemocitos (*). Sección en parafina de 4 μ m, tinción H&E. Longitud de la barra en a, c, e, g, i =150 micras; b, d, f, h, j =200 micras.

Las figuras 6 e-f; g-h e i-j corresponden a los tratamientos con 0,2, 2 y 20 $\mu\text{g g}^{-1}$ de AuNPs, respectivamente. En las imágenes (i, j) se observan algunas infiltraciones de hemocitos (*).

7.2.7 Análisis de la expresión de genes en PCR tiempo real

El análisis de la expresión del gen TLR3 en hemocitos alimentados con diferentes concentraciones de AuNPs muestra diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) a las 24 h con una sobreexpresión dosis-dependiente. El tratamiento con la dosis de 20 $\mu\text{g g}^{-1}$ presenta el valor más alto con una expresión 100 veces superior al control. Este valor se reduce con respecto del tiempo (Fig. 7).

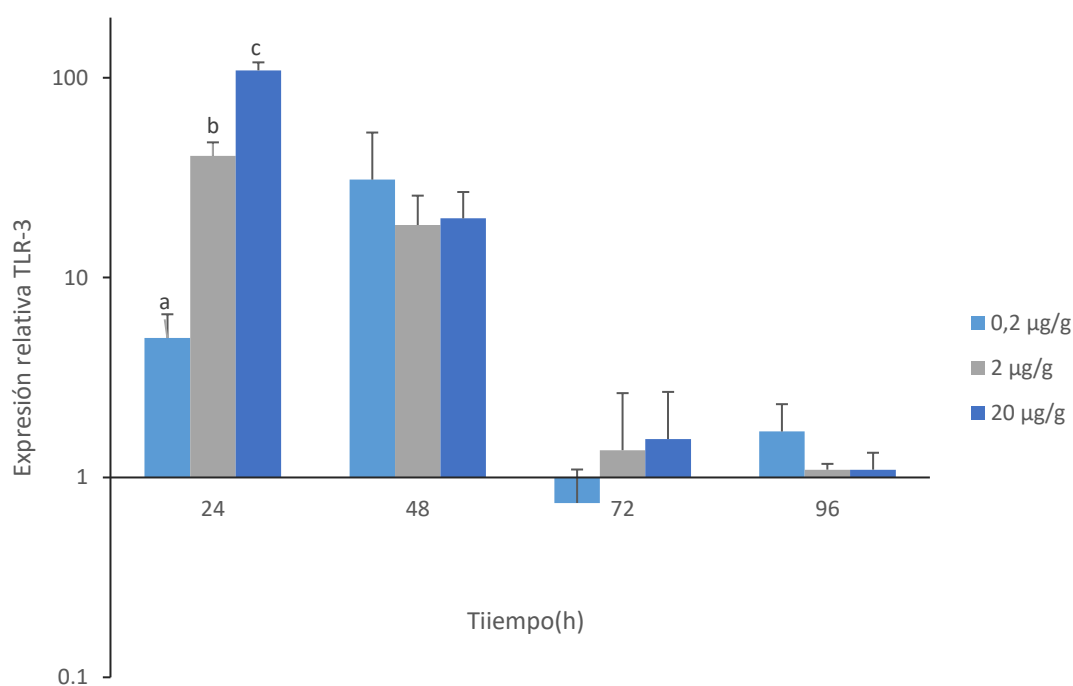


Figura 7. Análisis de la expresión de TLR en hemocitos de camarón blanco en respuesta a la administración de AuNPs a concentraciones de 0,2; 2 y 20 $\mu\text{g g}^{-1}$. Los datos se presentan como la media \pm S.E

Los valores de expresión a las 48 h disminuyen para las dosis de 2 y 20 $\mu\text{g g}^{-1}$ a excepción de la dosis más baja, que incrementa su expresión 30 veces con respecto al control. Para las 72 y 96 horas la expresión del gen disminuye en todas las concentraciones.

La figura 8 muestra la expresión del gen profenoloxidasa en hemocitos. Se observan diferencias estadísticamente significativas respecto a los tratamientos a las 24 y 48 h ($p < 0.05$). A las 24 h el gen se sobre-expresa 49 veces en el tratamiento con la dosis de 0,2 $\mu\text{g g}^{-1}$ respecto a la expresión del control endógeno, mientras que una subexpresión del gen a la dosis de 20 $\mu\text{g g}^{-1}$ se da a las 24 h; de manera interesante a las 48 horas su expresión se incrementa considerablemente 50 veces para después disminuir en todos los tratamientos a las 72 y 96 h.

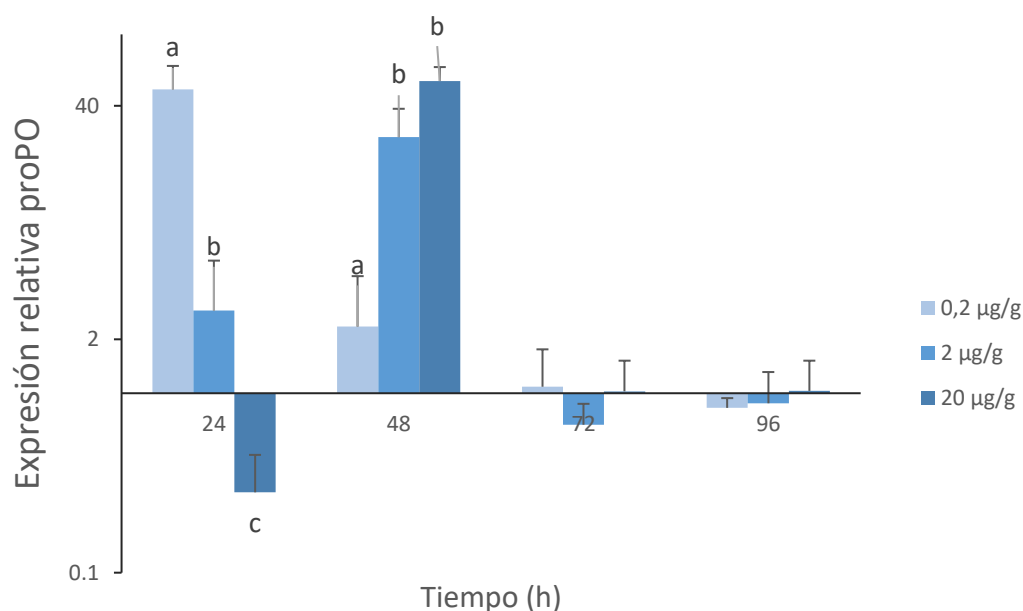


Figura 8. Análisis de la expresión de proPO en hemocitos de camarón blanco en respuesta a la administración de AuNPs a concentraciones de 0,2; 2 y 20 $\mu\text{g g}^{-1}$. Los datos se presentan como la media \pm S.E. Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

En la figura 9 se observa la expresión del gen TLR3 en intestino de camarón blanco. Los valores de expresión varían entre las distintas dosis siendo la concentración media la que posee un comportamiento de sobreexpresión constante. El valor más alto de expresión se observó a las 72 h con la dosis de 0.2 $\mu\text{g g}^{-1}$. Cabe mencionar que no se detectaron niveles de expresión para proPO en las muestras de intestino.

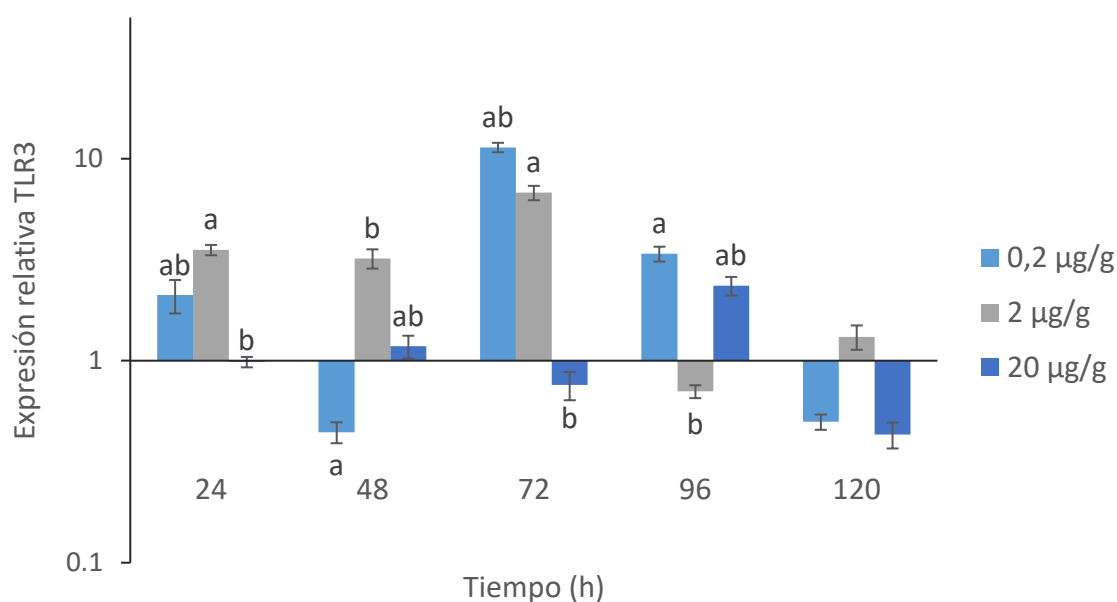


Figura 9. Análisis de la expresión de TLR en intestino de camarón blanco en respuesta a la administración de AuNPs a concentraciones de 0,2; 2 y 20 $\mu\text{g g}^{-1}$. Los datos se presentan como la media \pm S.E. Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

7.3 Reto con *V. parahaemolyticus*

7.3.1 Identificación de la cepa de *V. parahaemolyticus* asociada a AHPND

La cepa bacteriana de estudio se cultivó por 18 h en los distintos medios diferenciales. El cultivo en estría de la cepa utilizada en medio cromogénico CHROMagar® se muestra en la figura 10A. En esta figura se observan colonias circulares color malva. En la figura 10 B se muestra el cultivo en placa con medio selectivo TCBS (Agar tiosulfato-citrato-bilis-sacarosa) con colonias circulares color verde.

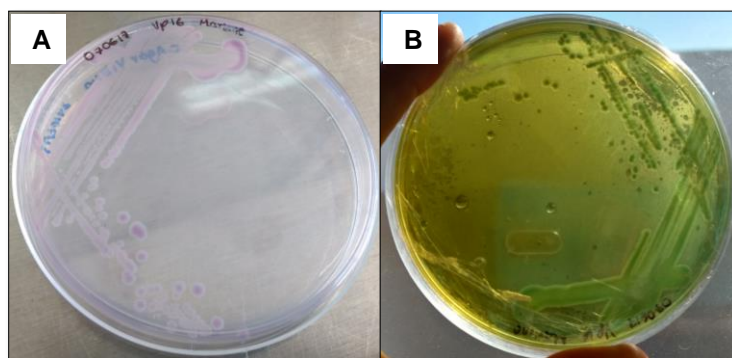


Figura 10. Cultivo en placa: A) CHROMagar y B) Agar TCBS para la identificación de *V. parahaemolyticus*.

Por otra parte, en la figura 11 se muestra una imagen de tinción Gram de la cepa utilizada; en este caso se observan microorganismos en forma de bacilos pequeños Gram negativos.

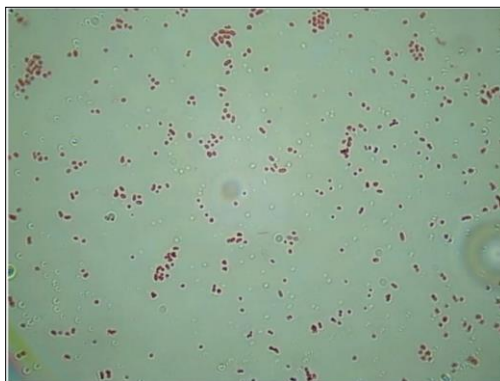


Figura 11. Cultivo de la cepa IPNGEV16, tinción Gram. Objetivo 100X.

En la figura 12 se muestra el gel de electroforesis de la extracción de ADN genómico de la cepa de *V. parahaemolyticus* IPNGEV16. En ambas muestras se observa una banda alrededor de los 12000 pares de bases (pb). En la línea 2, la muestra obtuvo una relación 260/280 de 2.01 mientras que la muestra de la línea 3 obtuvo una relación 260/280 de 2.16.

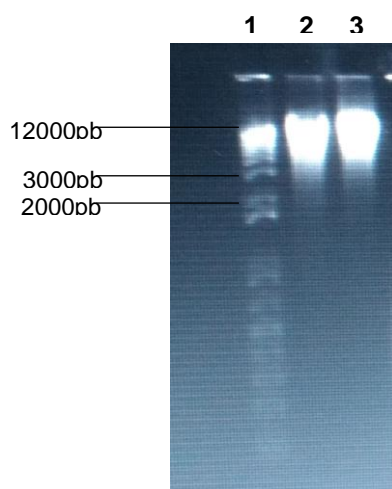


Figura 12. Gel de electroforesis de la extracción de ADN genómico. Cepa IPNGEV16. Línea 1, Marcador de peso molecular (1Kbplus, Invitrogen®); Línea 2, Cepa IPNGEV16 (Cultivo directo); Línea 3, Cepa IPNGEV16 (Resiembra en placa).

Después de la extracción de ADN se procedió a realizar una PCR anidada para identificar la presencia del plásmido PirAB presente en *V. parahaemolyticus*-AHPND. En el gel de electroforesis se observa una banda de 200pb aproximadamente en la línea 2 y 3, respectivamente (Fig.13)

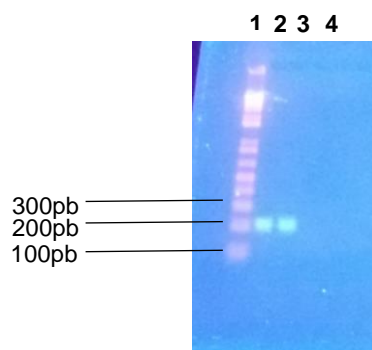


Figura 13. Electroforesis del producto de PCR anidada en gel de agarosa al 1.5% de la cepa IPNGEV16. Línea 1, Control negativo; Línea 2, Cepa IPNGEV16 (Cultivo directo); Línea 3, Cepa IPNGEV16 (Resiembra en placa); Línea 4, Marcador de peso molecular (1Kbplus, Invitrogen®).

7.3.2 Ensayo dosis letal media (LD₅₀)

El resultado del bioensayo dosis letal media reveló una LD₅₀ de 920 000 UFC/mL aproximadamente en un periodo de 48 h (Tabla VI).

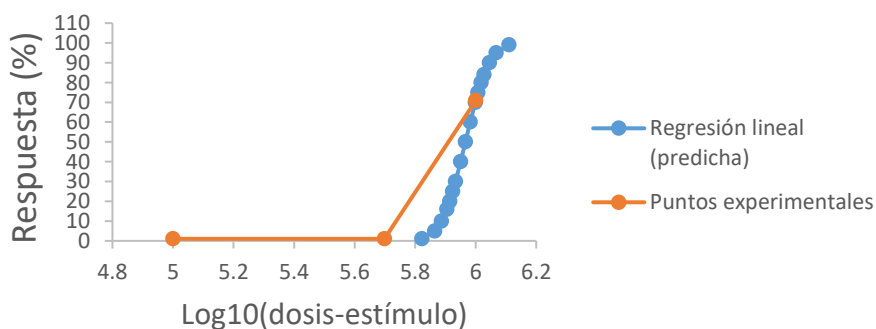


Figura 14. Regresión lineal por el método de Finney para el cálculo de la dosis letal media (LD₅₀) en camarones infectados con 3 concentraciones de *V. parahaemolyticus*-AHPND.

Tabla VI. Dosis letal media software Statplus v6.2.2.0.

| | | |
|--|--|-------------|
| LD₅₀ | | 924764.6343 |
| Log₁₀(LD₅₀) | | 5.9660 |

7.3.3 Supervivencia Bioensayo-reto

Con base a estos resultados se realizó el bioensayo-reto con nuestros tratamientos y controles. Existen diferencias en la supervivencia en los diferentes tratamientos (p valor=0.01194). En la figura 15 se muestra el 100% de supervivencia en el control negativo sin infección. Por otra parte el control positivo presentó una baja supervivencia (10%). Se presenta un aumento de la tasa de supervivencia en los tratamientos respecto al control positivo. El tratamiento con AuNPs que tuvo un mayor efecto fue el de la dosis media con una supervivencia del 80% de nuestros tanques.

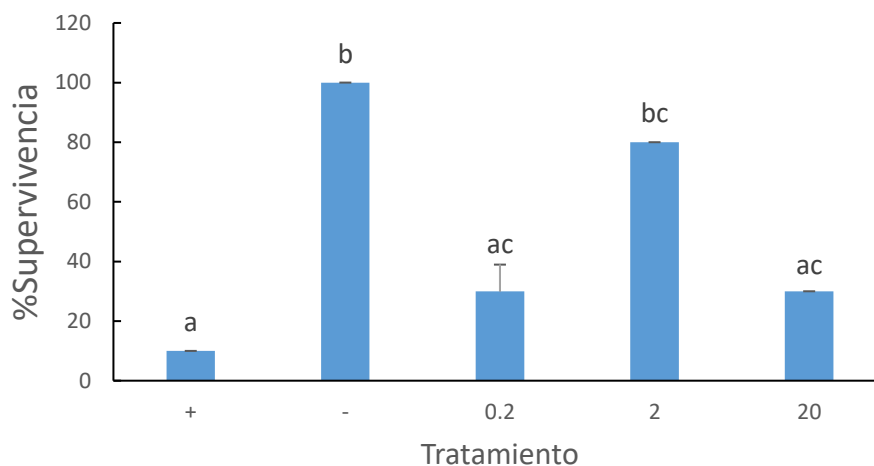


Figura 15. Gráfico de supervivencia en camarones infectados con *V. parahaemolyticus*. (+) Control positivo, bacteria + alimento comercial; (-) Control negativo, sin bacteria+ alimento comercial; 0.2, 2, 20, concentraciones ($\mu\text{g g}^{-1}$) de AuNPs utilizadas para el bioensayo-reto + infección con bacteria, respectivamente. Los resultados se presentan como la media \pm S.E.

7.3.4 Histología

Tras el análisis histológico, el hepatopáncreas del camarón blanco alimentado con dieta normal sin inóculo de la bacteria (control negativo) mostró una estructura normal de los túbulos y células epiteliales, como se observa en la figura 16A.

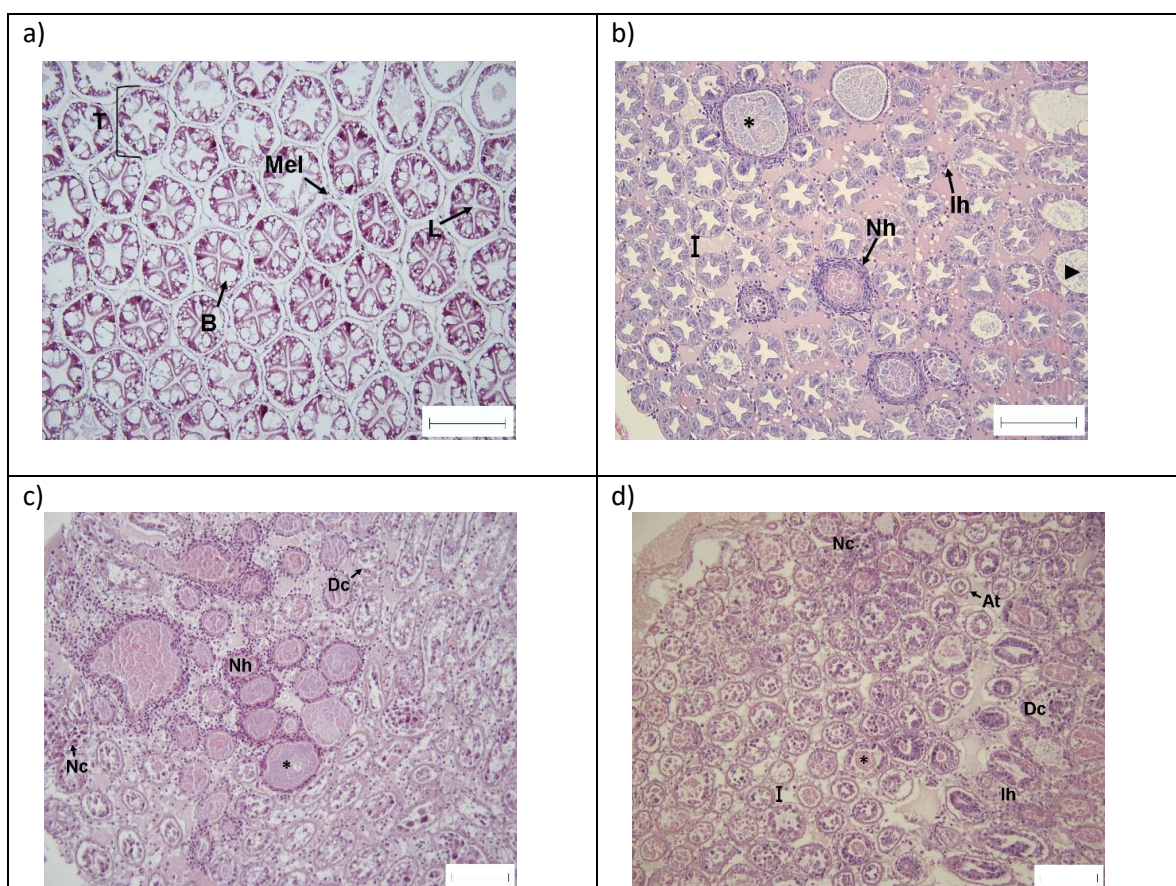


Figura 16 a-d. Análisis histopatológico del hepatopáncreas de camarones infectados por inmersión con *V. parahaemolyticus* (Tiempo 36h, dosis= 9×10^5 UFC/mL). Infiltración hemocítica (ih), nódulos hemocíticos (nh), bacterias (*), desprendimiento de células epiteliales (Dc), hipertrofia del lumen (▼), atrofia tubular (At), pérdida estructura tubular (I). a), grupo control: alimento comercial sin suspensión bacteriana; b-c-d, Control positivo: alimento comercial + suspensión bacteriana; e-f, g-h, i-j, Grupos alimentados con AuNPs (0.2 , 2 y $20 \mu\text{g g}^{-1}$) + suspensión bacteriana, respectivamente. Sección en parafina de $4 \mu\text{m}$, tinción H&E. Longitud de la barra = $100 \mu\text{m}$.

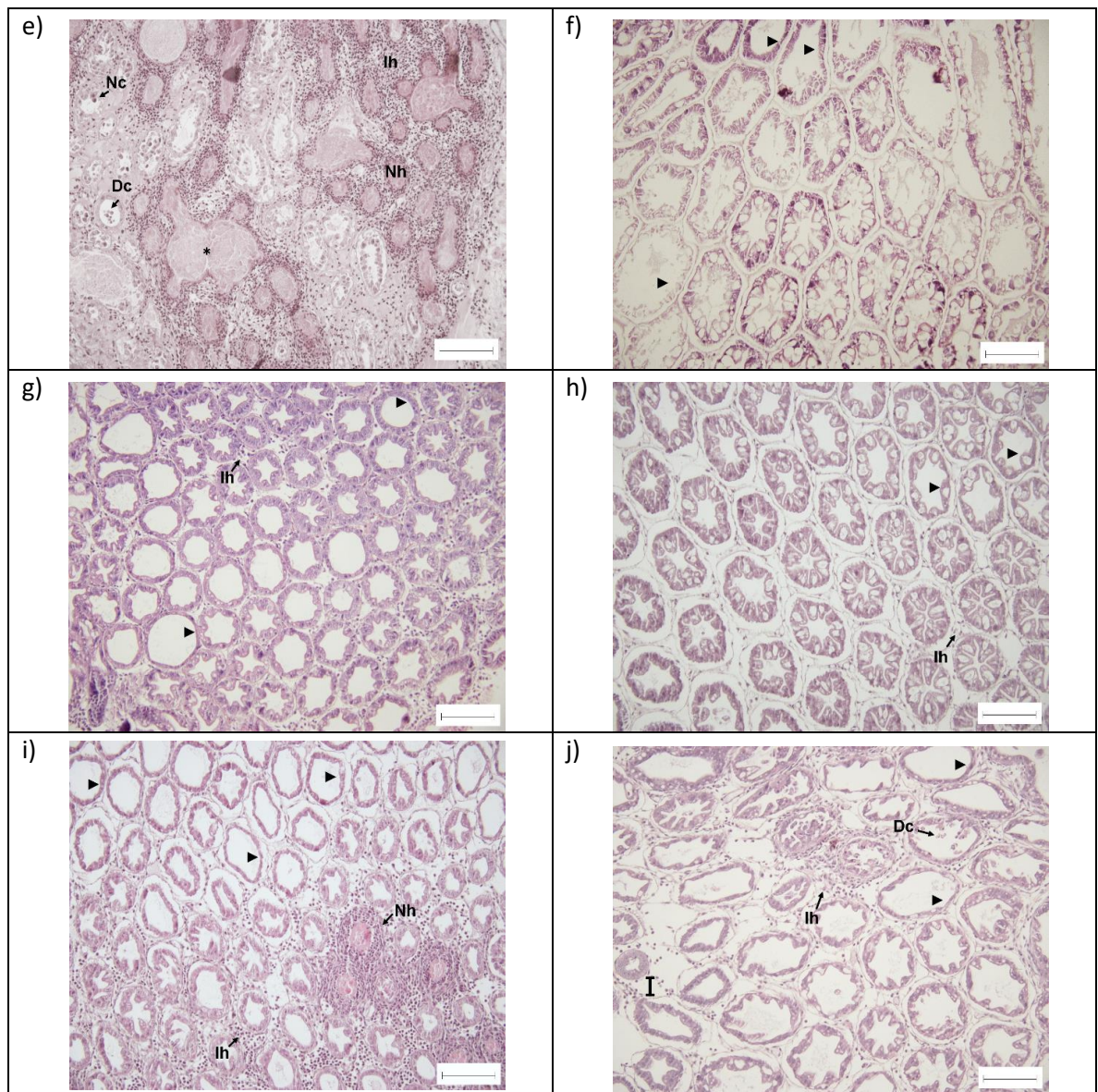


Figura 16 e-j. Análisis histopatológico del hepatopáncreas de camarones infectados por inmersión con *V. parahaemolyticus* (Tiempo 36h, dosis= 9×10^5 UFC/mL). Infiltración hemocítica (ih), nódulos hemocíticos (nh), bacterias (*), desprendimiento de células epiteliales (Dc), hipertrofia del lumen (▼), atrofia tubular (At), pérdida estructura tubular (I). a), grupo control: alimento comercial sin suspensión bacteriana; b-c-d, Control positivo: alimento comercial + suspensión bacteriana; e-f, g-h, i-j, Grupos alimentados con AuNPs (0.2 , 2 y $20 \mu\text{g g}^{-1}$) + suspensión bacteriana, respectivamente. Sección en parafina de $4 \mu\text{m}$, tinción H&E. Longitud de la barra = $100 \mu\text{m}$.

En contraste, después de las 36h post-infección con la cepa de *V. parahaemolyticus*, el hepatopáncreas de los camarones (control positivo) mostró un severo daño histopatológico, con infiltraciones hemocíticas (ih), la formación de nódulos hemocíticos (nh), presencia de bacterias (*), desprendimiento de células epiteliales de los túbulos con la pérdida de la estructura del tejido (I), así como hipertrofia del lumen (Fig.16 b-c-d). En los tratamientos con la dosis de $0.2 \mu\text{g}^* \text{g}^{-1}$ se observó el desprendimiento de células epiteliales, infiltración de hemocitos e hipertrofia del lumen (Fig.16 e-f). En la dosis media (Fig.16 g-h), se observó un menor grado de daño en los tejidos respecto al control positivo; así como infiltración de hemocitos e hipertrofia del lumen en algunos túbulos del hepatopáncreas. En la concentración más alta se presentó formación de nódulos hemocíticos, desprendimiento de células epiteliales y pérdida de la estructura del tejido a causa de la infección con la bacteria (Fig.16 i-j).

8. DISCUSIÓN

Recientemente, la Enfermedad de la Necrosis Aguda del Hepatopáncreas (AHPND) causada por *V. parahaemolyticus* ha provocado enormes pérdidas económicas en el cultivo de camarón. Los inmunoestimulantes son una alternativa para el combate de la AHPND. En este sentido las nanopartículas presentan potencial inmunoestimulante en otros organismos ya que modulan la inmunidad innata o adaptativa (Dobrovolskaia y McNeil 2007; Dykman *et al.*, 2017; Kim *et al.*, 2012; Sivaramasamy *et al.*, 2016; Sun *et al.*, 2016). En este trabajo se evaluó el potencial de AuNPs desnudas en el alimento como potenciales inmunoestimulantes en camarones, evaluando el de conteo de hemocitos, la respuesta antioxidante y la expresión de genes relacionados al sistema inmune; así como la inmunoprotección ante el reto con *V. parahaemolyticus*-AHPND.

8.1 Obtención y caracterización de AuNPs

Las nanopartículas de oro se sintetizaron mediante el método de Turkevich. Este método está basado en la reducción de ácido tetracloroáurico (precursor) con citrato de sodio (agente reductor y surfactante) en agua a una temperatura de 90-100 °C (Turkevich, 1951). Este proceso es el más utilizado para la síntesis debido a su simplicidad y el control de la nucleación y crecimiento se realiza mediante cambios en las concentraciones de los reactivos y la temperatura de reacción (Alex *et al.*, 2015). Esto permite un control estricto de la composición en su superficie para su posterior recubrimiento lo que tiene un efecto en la biotoxicidad y estabilidad coloidal de la misma (Voliani *et al.*, 2013). Posteriormente se realizó la caracterización de las AuNPs obtenidas para determinar sus propiedades morfo-fisicoquímicas y estabilidad en la solución.

8.1.1 Espectrofotometría Ultravioleta –Visible

Para corroborar la presencia de AuNPs esféricas en la suspensión se empleó la técnica de espectrofotometría UV-visible. Se conoce que las AuNPs presentan resonancia de plasmón de superficie debido a su confinamiento electrónico. El plasmón se refiere a la vibración de los electrones al ser iluminados con luz a una longitud de onda apropiada (Eustis *et al.*, 2006). Como su nombre lo indica, esta resonancia se encuentra asociada a la superficie del metal en las nanopartículas y dicha vibración suele darse en una longitud de onda definida. Lo anterior se manifiesta por una banda de absorción en el espectro óptico visible (Lasagna-Reeves *et al.*, 2010). Para nanopartículas de oro esféricas la banda de absorción presenta un pico de absorbancia en la longitud de onda alrededor de 520 nm (Haiss *et al.*, 2007; Njoki *et al.*, 2007). En este trabajo, el pico de absorción que se presenta a la longitud de 526 nm concuerda con la presencia de AuNPs. Este resultado a su vez se complementó con análisis de microscopía electrónica de transmisión para determinar el tamaño real de las AuNPs.

8.1.2 Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM)

La TEM permite determinar la forma y distribución de tamaño de las nanopartículas, y es posible observar si se encuentran aglomeradas o dispersas. Para ello, el microscopio utiliza un haz que acelera los electrones y los focaliza atravesando la muestra y proyectando su imagen (Egerton, 2005). Además, se puede determinar la naturaleza química de la muestra utilizando un sistema de espectroscopia de rayos X (Ernst y Rühle, 2013). Las AuNPs de este estudio presentaron forma ovoide, encontrándose ligeramente dispersas y con un tamaño promedio de 18.57 ± 4.37 nm (Fig. 1). Es importante el conocimiento de estos parámetros debido a que la influencia del tamaño en la nanopartícula se encuentra relacionada con su biodistribución y permanencia de éstas en el organismo (Talamini *et al.*, 2017). Este proceso puede estar asociado a la capacidad de internalización de las células en NP más grandes y el escape de NP pequeñas de los órganos a través de células endoteliales.

8.1.3 Dispersión de luz dinámica (DLS)

Mediante Dispersión de Luz dinámica se observó el tamaño hidrodinámico de las AuNPs. Una nanopartícula dispersa interacciona con el medio en el que se encuentra formando una capa eléctrica dipolar en su superficie. A esta capa se le conoce como diámetro hidrodinámico y puede ser medido por DLS. Éste método determina como se encuentra la interacción con las moléculas donde se encuentran dispersas en solución (Casals *et al.*, 2010). En la síntesis de AuNPs el uso de distintos surfactantes modifica el diámetro hidrodinámico, que particularmente suele ser mayor que el diámetro de la partícula. En el presente estudio, las AuNPs presentaron un diámetro hidrodinámico de 54.82 nm correspondiente a las AuNPs disueltas en agua desionizada. Este valor que es mayor al obtenido en TEM puede deberse a la existencia de aglomeración, lo cual se observa en las imágenes TEM. Una alta aglomeración puede derivar en 2

posibilidades: que las partículas en la solución sedimenten (mecanismo irreversible) o que floculen (mecanismo reversible) a la superficie. Sin embargo cabe destacar que este efecto no se ve reflejado visualmente en las soluciones utilizadas en la elaboración de los tratamientos.

8.1.4 Potencial ζ (zeta)

La magnitud del potencial ζ predice la dispersión coloidal en la solución. El potencial ζ es referido al potencial eléctrico que se genera en la capa iónica que existe entre la nanopartícula y el medio en el que se encuentra disuelta. Este valor es dependiente del pH del dispersante y puede ser positivo o negativo, con valores típicos van de -100 mV a +100mV. Particularmente, para las AuNPs un valor ζ mayor que +25mV o menor que -25mV indica alta dispersión coloidal debido a la repulsión de cargas entre las nanopartículas (Singh, 2015). En el presente estudio en casi todos los pH analizados el valor del potencial ζ fue negativo (a excepción del pH=1). El valor más alto de potencial ζ se presentó al pH de 5 con un valor de -14.7 ± 0.954 mV, indicando que las nanopartículas se encuentran medianamente dispersas, lo cual se confirma con la imagen obtenida previamente en el análisis de TEM y en el valor obtenido del diámetro hidrodinámico (54.82 nm) pudiendo ser este valor la medición de AuNPs aglomeradas.

El conocimiento del potencial zeta es de importancia biológica debido a que influye en la absorción de proteínas e interacción de las nanopartículas con células del sistema inmune (Patil *et al.*, 2007). Las nanopartículas de oro sintetizadas por el método de Turkevich en el presente trabajo y disueltas en agua miliQ poseen dispersión moderada, lo cual es deseable porque se mantienen dispersas en la solución y favorecen la interacción con células del sistema inmune. También es importante el valor ζ en éstas AuNPs en la estabilidad porque permitirían la conjugación con proteínas de interés biofarmacéutico como vacunas recombinantes.

8.2 Dosis-respuesta de las AuNPs

8.2.1 Conteo de hemocitos circulantes

Los hemocitos circulantes en crustáceos juegan un importante rol en inmunidad, realizando funciones de fagocitosis, encapsulación y lisis de partículas y células extrañas (Johansson *et al.*, 2000; Soderhall y Serenius, 1992). Su número, puede variar y decrecer dramáticamente durante una infección o inmunoestimulación (Lightner, 1996). Por ello, los hemocitos deben ser producidos continuamente a diferentes proporciones en tejidos hematopoyéticos especializados (Zhang *et al.*, 2006). Sivaramasamy *et al.* 2016 reportaron un aumento en el conteo de hemocitos totales en el camarón blanco *L. vannamei* (6.82 ±2.16 g) suplementado con nanopartículas de plata (AgNPs) (0.1 mg por 10 mg alimento) respecto al grupo control (Sivaramasamy *et al.*, 2016). En el presente trabajo se observó que la administración oral de AuNPs en el alimento aumentó el número de hemocitos circulantes en al menos una dosis respecto al grupo control, con el valor más alto a las 48 h en la concentración de 2 µg.g⁻¹. Sin embargo, este aumento no fue estadísticamente significativo.

8.2.2 Actividad de Enzimas Antioxidantes

Cuando una partícula extraña entra al organismo y es reconocida por el sistema inmune es fagocitada iniciando el mecanismo de explosión respiratoria. Este mecanismo produce especies reactivas de oxígeno (ROS) como anión superóxido (O₂⁻), peróxido de hidrógeno (H₂O₂), iones hidróxido (OH⁻) y oxígeno molecular singlete (O₂^{*}) que dañan a los patógenos fagocitados o partículas extrañas permitiendo la destrucción de manera eficiente de ellos; sin embargo, el exceso de las ROS pueden dañar también a las células del hospedero (Ji *et al.*, 2011). El sistema de defensa celular en contra de las ROS comprende actividades

enzimáticas de Superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y mieloperoxidasa, entre otras (Gonçalves *et al.*, 2012). Por ejemplo, la SOD dismuta el O_2^- en H_2O_2 que a su vez es convertido por la catalasa en oxígeno y H_2O (McCord y Fridovich, 1969). Adicionalmente, el H_2O_2 junto con el ácido clorhídrico también es utilizado por la mieloperoxidasa para generar ácido hipocloroso, un compuesto altamente tóxico para los patógenos fagocitados. Por lo tanto, un aumento en la actividad de estas enzimas se asocia a la estimulación de las células del sistema inmune del camarón. De hecho, se reconoce el papel de la SOD en camarón como un modulador de la respuesta inmune, ofreciendo protección al hospedero contra agentes patógenos (Campa *et al.*, 2005). En otro estudio, Muralisankar *et al.* (2016) reportan un incremento en los niveles de catalasa en postlarvas del camarón gigante *Macrobrachium rosenbergii* suplementado con nanopartículas de cobre en el alimento (Muralisankar *et al.*, 2016). Malaczewska *et al.* en 2015 reportan un aumento en la explosión respiratoria de granulocitos y monocitos en ratones administrados vía oral diariamente a diferentes dosis con una suspensión coloidal de AuNPs a la dosis de 0.25 ppm (equivalentes a $0,25 \mu g g^{-1}$) respecto al grupo control. El mayor efecto se observó en la fase temprana de administración (Malaczewska *et al.*, 2015). En este trabajo hubo un incremento de las actividades SOD, catalasa y mieloperoxidasa en el tiempo y entre tratamientos. Interesantemente, se observó un patrón de actividad variable dependiendo del tiempo de medición que pudiera relacionarse con la fisiología o el metabolismo del camarón. Esto puede explicarse debido a que solamente se administró una dosis de la nanopartícula inmunoestimulante para observar el patrón de activación y el tiempo de duración de la respuesta tanto antioxidante como de expresión génica. A las 24 h se observa el valor más alto de la actividad de la Superóxido dismutasa respecto a los demás tiempos. De la misma manera en la actividad peroxidasa el valor más alto se encuentra a las 24 h, sin embargo estos valores se ven reducidos respecto al control a lo largo del bioensayo. Para la actividad catalasa se observa el valor más alto de la actividad de esta enzima dentro de las primeras 24 h. La mayoría de las actividades a excepción de la actividad mieloperoxidasa

tienen el pico más alto de actividad en un plazo de 24- 48 h, lo cual plantea una estimulación durante este intervalo.

8.2.3 Histología

La glándula digestiva o hepatopáncreas es un órgano muy importante en los camarones peneidos; éste cumple con las funciones de hígado, páncreas e intestino y otros órganos en vertebrados (Hu y Leung, 2007). Actúa en la absorción y almacenamiento de nutrientes, síntesis de enzimas digestivas o desintoxicación de xenobióticos (Gibson y Barker, 1979; Vogt, 1994).

Se ha reportado previamente que la exposición a metales pesados como el cobre induce cambios histológicos en el hepatopáncreas de *L. vannamei*. Frias-Espericueta *et al.* (2008a, 2008b) han reportado daños como reducción de células R y células B, desprendimientos de células epiteliales e infiltración de hemocitos (Frias-Espericueta *et al.*, 2008a, 2008b). Li *et al.* (2006) reportaron además el adelgazamiento de la lámina basal.

Los resultados de las imágenes obtenidas en histología del hepatopáncreas de *L. vannamei* muestran que el tratamiento en el que se le administró $20 \mu\text{g g}^{-1}$ presenta algunas infiltraciones de hemocitos; sin embargo, éste también se observa en uno de los controles. Además, la cantidad de los mismos en comparación a las reportadas por estos autores es menor.

En el caso de la separación de los túbulos de la capa mioepitelial, éste efecto es frecuente y se debe principalmente a que el proceso de degradación del hepatopáncreas se inicia inmediatamente después del deceso del organismo y en organismos de más de 5 gramos, la solución fijadora no alcanza a penetrar todo el tejido, por lo que éste sufre una degradación parcial. Este efecto se ve reflejado también en el tiempo 0 y en el control (Fig.-1 a-b, c-d; respectivamente). En base a estos resultados se sugiere que no existe toxicidad en hepatopáncreas por la administración de AuNPs a las 3 concentraciones utilizadas durante el bioensayo.

Por otra parte, Zhang *et al.* (2010) analizaron los efectos toxicológicos *in-vivo* de AuNPs de 13.5 nm mediante diferentes rutas de administración en las concentraciones que van desde 137.5–2200 µg/kg. Se encontró que a bajas concentraciones no causan toxicidad apreciable incluso en una administración prolongada (Zhang *et al.*, 2010). Aunado a esto y con base a los resultados obtenidos en los análisis histológicos, no existe toxicidad con respecto del tiempo ni en las distintas concentraciones para la administración única de AuNPs vía oral en el alimento con un diámetro promedio 18.57 nm.

8.2.4 Análisis de la expresión de genes en PCR tiempo real

La respuesta inmune innata desencadena respuestas humorales y celulares mediante vías de señalización para el combate de patógenos (Hoffman *et al.*, 1999). El inicio de la transducción de señales involucra la unión de moléculas del patógeno (Patrones Moleculares Asociados a Patógenos, PAMPs) con receptores de superficie que se encuentran en la célula del hospedero (Receptores de reconocimiento de patrones, PRRs) (Akira *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2012; Wang y Wang, 2013). Esta interacción causa un cambio en la conformación del receptor, activándolo y desencadenando una cascada de señalización que culmina con una respuesta inmune efectora. Los receptores tipo Toll (TLRs) son un tipo de receptores que se han reportado en vertebrados e invertebrados y que reconocen diferentes tipos de moléculas o partículas (Kawai y Akira, 2010; Leclerc *et al.*, 2004; Palti, 2011). En invertebrados, la vía Toll desempeña un papel clave en la respuesta contra bacterias Gram positivas, Gram negativas y virus (Li y Xiang *et al.*, 2013; Rubio *et al.*, 2016). En *L. vannamei* se han reportado hasta la fecha 3 receptores tipo Toll (LvToll1, LvToll2 y LvToll-3) (Wang *et al.*, 2012). Los receptores LvToll1 y LvToll-3 están presentes tanto en membrana como en citoplasma, mientras que LvToll2 se encuentra restringido al citoplasma. En vista de que se ha reportado que existe una interacción entre TLRs y nanopartículas (Chen *et al.*, 2013; Luo *et al.*, 2015), en el presente trabajo se analizó la expresión del receptor LvToll-3 en hemocitos e intestino de camarón, encontrando un

aumento dentro de las primeras 24 h. En hemocitos la expresión relativa del LvToll-3 aumentó de manera dosis dependiente con un valor mayor a 100 veces su expresión relativa a la dosis de 20 $\mu\text{g g}^{-1}$ respecto al tratamiento control; manteniéndose alrededor de este rango hasta las 48 h. De manera interesante, la expresión relativa del LvToll-3 en intestino fue más alta hasta las 72 h e inversamente proporcional a la concentración de AuNPs administradas. Sin embargo la expresión relativa en este tejido fue menor que en hemocitos a las 24 h. Estas diferencias en los tiempos de respuesta y niveles de expresión nos indican la activación inmediata del LvToll-3 en los hemocitos.

Los antecedentes sugieren que las células del sistema inmune innato interactúan con las nanopartículas metálicas a través de PRPs para eliminar patógenos como los receptores tipo Toll (TLRs). Por ejemplo; Potnis *et al.* en 2013 reportan la activación del TLR4 en monocitos humanos tratados con nanopartículas de cobalto desnudas (Potnis *et al.*, 2013). Con base a los antecedentes y resultados obtenidos en la expresión del gen TLR3 en hemocitos de camarón, el TLR3 es activado en presencia de AuNPs de 18 nm aproximadamente. Por lo tanto, la vía Toll es una de las vías de señalización que se activan en presencia de las nanopartículas metálicas en camarón.

También se analizó la expresión de proPO en hemocitos de camarón. La melanización es una respuesta efectora que se lleva a cabo mediante el sistema proPO, que inicia por el reconocimiento y unión de PAMPs a receptores de las células del hospedero (Smith y Söderhäll, 1983; Tassanakajon *et al.*, 2013; Vazquez *et al.*, 2009). El complejo formado desencadena la activación de la cascada serin proteasa que activa a la profenoloxidasa en fenoloxidasa (PO) mediante proteólisis. La enzima PO activa oxida los fenoles en quinones para la formación de melanina y la producción de radicales libres de oxígeno que matan a los patógenos (Amparyup *et al.*, 2013). Se ha reportado que el silenciamiento de ProPO genera un aumento en la carga bacteriana del camarón *Marsupenaeus japonicus*, incluso en ausencia de un reto bacteriano o viral, y conduce a un fuerte

aumento en la mortalidad del camarón (Charoensapsri *et al.*, 2009). Sivaramasamy *et al.* reportaron la sobreexpresión del transcrito de la enzima ProPO en diferentes tejidos en camarones suplementados con nanopartículas de plata de 5-25 nm (AgNPs) biosintetizadas por *Bacillus subtilis* (Sivaramasamy *et al.*, 2016). En el presente trabajo, la expresión del ARNm de la proPO en hemocitos de camarón aumentó respecto al control, observándose un efecto dosis dependiente en un periodo de 48 h. Cabe destacar que también existe expresión génica durante las primeras 24 h en una cantidad menor para el ARNm ProPO. Este aumento en la expresión génica sugiere un reconocimiento y expresión del ARNm de la proPO, la cual en su forma activa produciría compuestos e intermediarios de oxígeno que se encuentran estrechamente relacionados con las actividades antioxidantes, lo cual explicaría el pico de actividad más alto dentro de este intervalo de tiempo.

Respecto al distinto comportamiento en las dosis de AuNPs administradas en la respuesta inmune. La captación celular de las nanopartículas se ve influida por las propiedades de ésta tales como la carga en su superficie (Albanese *et al.*, 2010). Al encontrarse las nanopartículas diluidas a distintas concentraciones, cada una interacciona de forma determinada con el solvente, por lo que los cambios generados en estas propiedades al momento de interaccionar con otros disolventes, en este caso hemolinfa pudieran dar como resultado distintas cinéticas fagocíticas variando con ello los tiempos de respuesta. Resultados similares respecto al tiempo se han reportado en el estudio de Malaczewska *et al.* (2015). Yen *et al.* (2009), por su parte reportaron en un estudio *in-vitro* con macrófagos murinos J774 A1 que la mayor actividad en la expresión génica al administrar AuNPs ocurre en la fase inicial de administración regresando después de determinado tiempo a niveles basales de los grupos control para las 72 h (Malaczewska *et al.*, 2015; Yen *et al.*, 2009). En nuestra investigación, este efecto se observa claramente en la expresión génica de hemocitos; sugiriendo una regulación por parte del sistema inmune por la presencia de las nanopartículas.

8.3 Reto infeccioso con *V. parahaemolyticus*

Las bacterias en el ecosistema marino y en los estanques de cultivo son necesarias para el mantenimiento del suelo y agua en óptimas condiciones. Las bacterias Gram negativas predominan en el medio marino y generalmente son las que se encuentran en mayor proporción en la microflora asociada a camarones silvestres y de cultivo (Morales, 2010). *Vibrio* sp. forma parte de la microbiota del camarón, de manera particular en estómago, branquias y cutícula, causando mortandad cuando se rompe el equilibrio o cuando el sistema inmune de los camarones está suprimido (Thompson *et al.*, 2004). Dentro del género *Vibrio* se encuentra *V. parahaemolyticus*, un bacilo Gram negativo, halotolerante y anaerobio facultativo (Luna *et al.*, 2016). Recientemente esta bacteria adquirió el plásmido pVA que cuenta con un tamaño aproximado de 69 kb, causante de la enfermedad de la necrosis aguda del hepatopáncreas.

Para el bioensayo-reto se realizó la confirmación de la cepa bacteriana IPNGEV16 utilizada en la infección experimental. La presencia de *V. parahaemolyticus* se identificó morfológicamente sembrando la cepa en agar TCBS, un agar selectivo, el cual posee los requerimientos nutricionales para las especies de *Vibrio*. Las colonias observadas (Fig.10B) sugieren que se trata de dicha especie (Kobayashi *et al.*, 1963). Por otra parte, la confirmación de *V. parahaemolyticus* se realizó en agar cromogénico. Este medio es capaz de diferenciar especies de *Vibrio* debido a los agentes cromógenos presentes y por la hidrólisis de sustratos en dicho medio que es variable entre cada especie de *Vibrio*. El crecimiento de colonias color malva (Fig.10A) es característico para *V. parahaemolyticus*. Además mediante tinción Gram (Fig.11) se confirmó la presencia de bacterias Gram negativas en forma de bacilos pequeños, que son las características microscópicas reportadas para *Vibrio* (Broberg *et al.*, 2011). Una vez confirmada la cepa de *V. parahaemolyticus* se analizó la presencia del plásmido pVA mediante una PCR anidada. Los genes que codifican para las toxinas son cercanos entre sí dentro del plásmido pVA, separados por una región de 12 pb entre ellos. Los

primers internos de la segunda PCR amplifican una sección de 209 pb de la Tox A, 12 pb del espaciador y 9 pb de la Tox B. La presencia de una banda en el gel de electroforesis (Fig.-13) concuerda con los resultados de amplificación en las cepas de *V. parahaemolyticus*- AHPND con el plásmido pVA (Dangtip *et al.*, 2015). Por lo que la cepa bacteriana IPNGEV16 corresponde a *V. parahaemolyticus* conteniendo el plásmido pVA.

Esta cepa fue utilizada para la obtención de la LD₅₀ cuyo valor fue de aproximadamente 920 000 UFC/mL en un periodo de 48 h para la cepa de *V. parahaemolyticus* IPNGEV16 en organismos de 7.2 ± 1.16 g. Esta cepa fue una de las cepas con mayor virulencia aisladas (Luna-González *et al.*, 2016).

Dentro de las estrategias utilizadas para aumentar la supervivencia y combatir las enfermedades en el camarón se encuentra el uso de los inmunoestimulantes. Se sabe que inmunoestimulantes tales como bacterias, fracciones de toxinas de bacterias, levaduras marinas y sus β -glucanos, compuestos de algas marinas, cianobacterias y lipopolisacáridos bacterianos aumentan la tasa de supervivencia en camarones retados con patógenos incluido *Vibrio* sp. (Campa *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2016; Rungrassamee *et al.*, 2013; Sajeevan *et al.*, 2009). Hou y Chen en 2005 reportaron un aumento en la supervivencia de *L. vanamei* inyectado con el extracto en agua caliente del alga roja (*Gracilaria tenuistipitata*) a 2 concentraciones (4 y $6 \mu\text{g g}^{-1}$) en una infección con *Vibrio alginolyticus*, patógeno oportunista que causa mortalidades en condiciones ambientales pobres. En dicho estudio se obtuvo una supervivencia de $63.3 \pm 3.3\%$ en comparación a $43.3 \pm 3.3\%$ de la concentración $6 \mu\text{g g}^{-1}$ y el grupo control infectado, respectivamente (Hou y Chen, 2005). En el caso de nanopartículas metálicas los estudios realizados hasta la fecha como inmunoestimulantes son escasos. En este sentido, Sivaramasami *et al.* reportan la síntesis química de AgNPs y biosíntesis de AgNPs utilizando *B. subtilis*. Se administraron a una dosis de 0.1 mg por 10 mg alimento en camarones durante 15 días una vez al día. En este estudio se obtuvo una supervivencia del 90.66 ± 0.523 y $71 \pm 0.577\%$ dentro de este periodo de tiempo

en los grupos inmunoestimulados con AgNPs y retados con *V. parahaemolyticus*, respectivamente, en comparación al grupo control infectado ($10 \pm 0.321\%$) (Sivaramasami *et al.*, 2016). En la presente investigación para el bioensayo-reto se obtuvo una supervivencia del 80% en los organismos alimentados con AuNPs a una concentración de $2 \mu\text{g g}^{-1}$ durante la infección con *V. parahaemolyticus*-AHPND. Cabe destacar que la bacteria utilizada en este estudio contiene el plásmido pVA, causante de AHPND, en comparación a los resultados de Sivaramasami que utilizan una cepa de *V. parahaemolyticus* sin el plásmido. De manera interesante, se observa que las concentraciones de $0.2 \mu\text{g g}^{-1}$ y $20 \mu\text{g g}^{-1}$ presentan una supervivencia del 30 %. Estas variaciones de supervivencia en las concentraciones pueden deberse a cambios presentes en el área específica de superficie, el movimiento de los iones, las configuraciones electrónicas y cristalinas de la partícula, relacionadas de manera directa con las fuerzas de Van der Waals, electrostáticas, entre otras que operan en la interfaz que existe en la superficie de la partícula en el momento de contacto con el medio (Nel *et al.*, 2009). Esto tiene influencia de manera importante en su captación, acumulación y eliminación en el organismo. Las AuNPs utilizadas en este estudio están propensas a interactuar con proteínas presentes en el medio en el cual se encuentren dispersas, como alimento, agua y hemolinfa. Las AuNPs sintetizadas con Citrato como agente reductor son rápidamente recubiertas con proteínas del suero sanguíneo (Dobrovolskaia *et al.*, 2009). Dichas interacciones con el medio pueden inducir cambios a gran escala, tales como lixiviación de iones y aglomeraciones modificando así la cinética, biodistribución y tiempo de acción de las AuNPs (Deng *et al.*, 2009; Nel *et al.*, 2009).

8.3.1 Histopatología

En el camarón blanco, los patólogos buscan rutinariamente la glándula digestiva (hepatopáncreas) para evaluar los signos de una enfermedad. Estas observaciones son realizadas a posteriori de la fijación, preservación,

microsección y tinción del tejido. Las alteraciones morfológicas del hepatopáncreas, como la reducción del área tubular, la ampliación del área del lumen, la variación en el número de los distintos tipos celulares y la infiltración de hemocitos en los espacios intertubulares, se han descrito por distintos autores en el caso de infecciones, privación de alimentos y cambios en la salinidad del agua de cultivo (Díaz *et al.*, 2010; Esteve *et al.*, 2010; Sánchez *et al.*, 2007). La infiltración de hemocitos es reportada como una respuesta inicial al daño tisular, ya sea por toxicidad, traumatismo, estrés ambiental e infecciones (Cervellione *et al.*, 2017).

V. parahaemolyticus-AHPND genera una atrofia severa del hepatopáncreas con un desprendimiento masivo de las células epiteliales en dicho órgano, presencia de infiltración hemocítica, necrosis (De Schryver *et al.*, 2014; Joshi *et al.*, 2014; Lai *et al.*, 2015; Nunan *et al.*, 2014), provocando altas mortalidades (FAO, 2013).

A pesar de que actualmente se desarrollan nuevos métodos moleculares en patología, la histología continúa siendo un método estándar para las investigaciones patológicas y diagnóstico de enfermedades (Cervellione *et al.*, 2017). Sin embargo, son pocos los estudios que complementan la supervivencia y el nivel de daño histopatológico frente a un reto infeccioso con el uso de inmunoestimulantes. Romano *et al.* (2015) reportan una disminución del daño histopatológico en camarones retados por 10 días con *V. harveyi* utilizando diferentes concentraciones de ácidos orgánicos microencapsulados en la dieta (Romano *et al.*, 2015). Recientemente Rudtanatip *et al.* reportaron mediante la administración oral de ácidos orgánicos en la dieta (0.5, 1 y 2 % w/w), en un esquema de 3 administraciones por día durante 7 días, un aumento en la supervivencia y disminución del daño histopatológico del camarón blanco en una infección experimental con *V. parahaemolyticus* para la dosis de 2% w/w (Rudtanatip *et al.*, 2017).

En el análisis histológico con la infección experimental de este trabajo se observó un daño producido en el tejido, característico en presencia de la toxina binaria de

V. parahaemolyticus en camarones (Joshi *et al.*, 2014; Lai *et al.*, 2015; Nunan *et al.*, 2014). Comparado con el control positivo, la dosis media de AuNPs en la dieta presenta una menor infiltración de hemocitos y daño histopatológico; de manera interesante, este efecto no es tan notorio en las dosis de 0.2 y 20 $\mu\text{g g}^{-1}$. Esta disminución del nivel de daño histopatológico en la dosis media concuerda con una mayor supervivencia de los camarones a esta dosis (Fig.15). Cabe destacar que es posible observar algunos signos característicos de la AHPND a esta concentración, sin embargo, no se observa la presencia de bacterias. Además, los daños encontrados en la dosis de 20 $\mu\text{g g}^{-1}$ son menores a los observados en el control solo infectado con *V. parahaemolyticus*. Lo anterior sugiere un efecto protector en la histopatología de la infección por la administración oral de las AuNPs en camarones, principalmente a la dosis media; siendo estos resultados el primer reporte del efecto protector de AuNPs administradas oralmente en camarones frente a una infección experimental con *V. parahaemolyticus*-AHPND.

9. CONCLUSIONES

Los estudios realizados indican que la administración de nanopartículas de oro a través del alimento ejercen una actividad inmunomoduladora. Las nanopartículas de oro sintetizadas presentaron forma ovoide, con un tamaño hidrodinámico (teórico) de 54.82 nm y un tamaño real de 18.57 ± 4.37 nm, medianamente dispersas. La caracterización de las nanopartículas es importante debido a la influencia de sus características morfofísicoquímicas en la respuesta inmune. La administración única de nanopartículas desnudas vía oral en camarones no presenta toxicidad y no causa daño a nivel histológico en ninguna de las tres concentraciones.

Las 3 concentraciones presentaron cambios en la respuesta inmune de los organismos. Se observó una respuesta inmunológica temprana en camarones alimentados con AuNPs en la dieta a nivel de expresión de las moléculas receptoras (TLR3) y efectoras (proPO) en hemocitos; así como de TLR3 en

intestino. Lo anterior implica que los camarones son estimulados por las AuNPs mediante la participación del receptor TLR3 y que la regulación del sistema inmune puede ocurrir a través de la vía Toll. Sin embargo, se requieren estudios más detallados para determinar cuáles son las moléculas que intervienen en este mecanismo.

La dosis media de AuNPs en la dieta disminuye el daño histopatológico de los camarones frente al reto infeccioso con *V. parahaemolyticus*-AHPND, viéndose reflejado en una supervivencia del 80% de los camarones a esa dosis respecto al control positivo (10%).

Las diferencias observadas en la respuesta inmune entre las concentraciones probablemente están relacionadas con el destino de las nanopartículas, al número de las mismas y las interacciones presentes en el medio que las rodea. Por ello se manifiestan diversas respuestas de las AuNPs en las distintas dosis.

10. PERSPECTIVAS

En esta rama de la nanotecnología, los estudios de toxicidad de las NPs en sistemas biológicos son fundamentales en vista de que proporcionan una pauta importante al momento de evaluar los parámetros de la partícula que influyen en los mecanismos de interacción, internalización, biodistribución, asimilación y/o eliminación en el organismo. También se tiene proyectado realizar estudios de frecuencia de administración y los efectos a largo plazo tras la administración de nanopartículas en acuicultura. El éxito de dicho esfuerzo a gran escala será beneficioso para el campo de la nanotecnología en la industria acuícola.

Con base a los resultados obtenidos, se propone a las AuNPs como una alternativa en el control de patógenos en la industria camaronícola, particularmente en el control de la enfermedad AHPND causada por *V. parahaemolyticus*.

11. ANEXOS

Anexo A. Solución Anticoagulante

Reactivos solución Anticoagulante (SIC- EDTA) 850 mOsm/Kg pH= 7.3

| Reactivo | Fórmula | Peso molecular (g/mol) | mM |
|--|--|------------------------|-----|
| Cloruro de Sodio (Fermont ®) | NaCl | 58.44 | 450 |
| Cloruro de Potasio | KCl | 74.55 | 10 |
| Ácido etilendiamino tetraacético (Sigma-Aldrich ®) | HO ₂ CCH ₂) ₂ NCH ₂ CH ₂ N(CH ₂ CO ₂ H) ₂ | 292.24 | 10 |
| HEPES (Sigma-Aldrich ®) | C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S | 238.30 | 10 |

Anexo B. Buffer de fosfatos

Reactivos Buffer de fosfatos 50 mM pH 7.8

| Reactivo | Fórmula | Peso molecular (g/mol) |
|---|---------------------------------|------------------------|
| Fosfato de potasio monobásico (Sigma-Aldrich ®) | KH ₂ PO ₄ | 136.09 |
| Fosfato de potasio dibásico (Sigma-Aldrich ®) | K ₂ HPO ₄ | 174.18 |

Se utilizó la ecuación de Henderson-Hasselbalch (3) para elaborar una solución de pH= 7.8 utilizando el pKa: 7.2 para fosfato de potasio. Tomando en cuenta que la suma de ambas concentraciones es igual a 50mM.

$$pH = pK_a + \log \left(\frac{[Base]}{[Ácido]} \right) \quad (3)$$

Anexo C. Solución de Davidson.

Reactivos que componen la solución de Davidson

| Reactivo | Fórmula | Volumen para 1L |
|-----------------------------------|----------------|------------------------|
| Alcohol etílico 95% | C_2H_6O | 330 mL |
| Formaldehído 100% | CH_2O | 220 mL |
| (Solución acuosa saturada 37-39%) | | |
| Ácido acético glacial | CH_3COOH | 115 mL |
| Agua destilada | H_2O | 335 mL |

12. LITERATURA CITADA

Abbas, A.K., A.H. Lichtman, J.S. Pober. 2008. *Inmunología Molecular y Celular*. S.A. Elsevier. 6ª edición. España. 576p

Aguirre-Guzmán, G., J.G., Sánchez-Martínez, A.I., Campa-Córdova, A., Luna-González, F., Ascencio. 2009. Penaeid shrimp immune system. *Thai J. Vet. Med.* 39:205-215.

Akhter, N., B., Wu, A. M., Memon, M., Mohsin. 2015. Probiotics and prebiotics associated with aquaculture: a review. *Fish Shellfish Immunol.* 45:733-741.

Akira, S., Uematsu, S., & Takeuchi, O. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell.* 124:783-801.

Albanese, A., E. A., Sykes, W. C., Chan. 2010. Rough around the edges: the inflammatory response of microglial cells to spiky nanoparticles. *ACS nano*,4:2490-2493.

Alex, S., A., Tiwari. 2015. Functionalized gold nanoparticles: Synthesis, properties and applications—A review. *J. Nanosci. Nanotechno.* 15: 1869-1894.

Amparyup, P., W., Charoensapsri, A., Tassanakajon. 2013. Prophenoloxidase system and its role in shrimp immune responses against major pathogens. *Fish Shellfish Immunol.*34:990-1001.

Apines-Amar, M.J.S., E.C., Amar. 2015. Use of immunostimulants in shrimp culture: An update. In. Caipang, C. M. A., M. B. I. Bacano-Maningas, F. F. Fagutao (Eds.), *Biotechnological Advances in Shrimp Health Management in the Philippines* (pp. 45-71). Kerala, India. pp 45-71.

Bachère, E., D., Destoumieux, P., Bulet. 2000. Penaeidins, antimicrobial peptides of shrimp: a comparison with other effectors of innate immunity. *Aquaculture.* 191:71-88.

Bell, T. A., D.V., Lightner. 1988. *A handbook of normal penaeid shrimp histology*. World Aquaculture Society. 114p.

Bowie, A., A.J., O'Neill. 2000. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: Signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *J. Leukoc. Biol.*, 67: 508– 514.

Broberg, C.A., T.J., Calder, K. Orth. 2011. *Vibrio parahaemolyticus* cell biology and pathogenicity determinants. *Microbes Infect.*13:992-1001.

Campa-Córdova, A. I., N.Y., Hernández-Saavedra, R., De Philippis, F., Ascencio. 2002a. Generation of superoxide anion and SOD activity in haemocytes and muscle of American white shrimp (*L. vannamei*) as a response to β -glucan and sulphated polysaccharide. *Fish Shellfish Immunol.*12: 353-366.

Campa-Córdova, A. I., N.Y., Hernández-Saavedra, R., De Philippis, F., Ascencio. 2002b. Superoxide dismutase as modulator of immune function in American white shrimp (*L. vannamei*). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 133:557-565.

Campa-Córdova, A. I., A.F., León-Gallo, A., Romero-Maldonado, A. C., Ibarra-Serrano, S., Rosales-Mendoza, I., Hirono, C., Angulo. 2017. Recombinant PirA-like toxin protects shrimp against challenge with *V. parahaemolyticus*, the aetiological agent of acute hepatopancreatic necrosis disease. *J Fish Dis.* *In press*

Campa-Córdova, A.I., N.Y., Hernández-Saavedra, R., De Philippis, F., Ascencio. 2002. Generation of superoxide anion and SOD activity in haemocytes and muscle of American white shrimp (*L. vannamei*) as a response to β -glucan and sulfated polysaccharide. *Fish Shellfish Immunol.* 12:353–366.

Campa-Córdova, A.I., N.Y., Hernández-Saavedra, G., Aguirre-Guzmán, F., Ascencio, C., Victoria. 2005. Respuesta inmunomoduladora de la superóxido dismutasa en juveniles de camarón blanco (*L. vannamei*) expuestos a inmunoestimulantes. *Ciencias Marinas.*31: 661-669.

Casals, E., T., Pfaller, A., Duschl, G.J., Oostingh, V., Puntès. 2010. Time evolution of the nanoparticle protein corona. *ACS nano.*4:3623-3632.

CDC- Centers for disease, control and prevention URL: <http://www.cdc.gov/Vibrio/Vibriop.html>. Fecha de último acceso: 20/07/17.

Cervellione, F., C., McGurk, T., Berger Eriksen, W., Van den Broeck. 2017. Use of computer-assisted image analysis for semi-quantitative histology of the hepatopancreas in whiteleg shrimp *Penaeus vannamei* (Boone). *J Fish Dis.* 40:1223-1234.

Charoensapsri, W., P., Amparyup, I., Hirono, T., Aoki, A., Tassanakajon. 2009. Gene silencing of a prophenoloxidase activating enzyme in the shrimp, *Penaeus monodon*, increases susceptibility to *Vibrio harveyi* infection. *Dev. Comp. Immunol.* 33:811-820.

Chen, Y. Y., J. C., Chen, C. M., Tayag, H. F., Li, D. F., Putra, Y. H Kuo, Y. H., Chang. 2016. Spirulina elicits the activation of innate immunity and increases resistance against *Vibrio alginolyticus* in shrimp. *Fish Shellfish Immunol.* 55:690-698.

- Chen, P., K., Kanehira, A., Taniguchi. 2013. Role of toll-like receptors 3, 4 and 7 in cellular uptake and response to titanium dioxide nanoparticles. *Sci. Tech. Adv. Mater.* 14:015008.
- Connor, E. E., J., Mwamuka, A., Gole, C.J., Murphy, M. D., Wyatt. 2005. Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity. *Small.* 1:325-327.
- Dangtip, S., R., Sirikharin, P., Sanguanrut, S., Thitamadee, K., Sritunyalucksana, S., Taengchaiyaphum, T. W., Flegel. 2015. AP4 method for two-tube nested PCR detection of AHPND isolates of *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture Reports.* 2:158-162.
- Daniel, M. C., D., Astruc. 2004. Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chem. Rev.* 104:293-346.
- De Schryver, P., T., Defoirdt, P., Sorgeloos. 2014. Early mortality syndrome outbreaks: a microbial management issue in shrimp farming?. *PLoS Pathog.* 10: e1003919.
- Defoirdt, T., P., Sorgeloos, P., Bossier. 2011. Alternatives to antibiotics for the control of bacterial disease in aquaculture. *Curr Opin Microbiol.* 14:251-258.
- Deng, Z. J., G., Mortimer, T., Schiller, A., Musumeci, D., Martin, R. F., Minchin. 2009. Differential plasma protein binding to metal oxide nanoparticles. *Nanotechnology.* 20:455101.
- Díaz, A. C., L. G., Sousa, A. M., Petriella. 2010. Functional cytology of the hepatopancreas of *Palaemonetes argentinus* (Crustacea, Decapoda, Caridea) under osmotic stress. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 53:599-608.
- Dobrovolskaia, M.A., S.E., McNeil. 2007. Immunological properties of engineered nanomaterials. *Nat. Nanotechnol.* 2: 469-478.
- Dobrovolskaia, M. A., A. K., Patri, J., Zheng, J. D., Clogston, N., Ayub, P., Aggarwal, S. E., McNeil. 2009. Interaction of colloidal gold nanoparticles with human blood: effects on particle size and analysis of plasma protein binding profiles. *Nanomed Nanotech Biol Med.* 5:106-117.
- Dykman, L.A., V.A., Bogatyrev, S.A., Staroverov, D.V., Pristensky, S.Y., Shchyogolev, N.G., Khlebtsov. 2009. The adjuvanticity of gold nanoparticles. DOI: 10.1117/12.695006.
- Dykman, L.A., N.G., Khlebtsov. 2017. Immunological properties of gold nanoparticles. *Chem. Sci.* 8:1719-1735.
- Dykman, L.A., M.V., Sumaroka, S.A., Staroverov, I.S., Zaitseva, V.A., Bogatyrev, 2004. Immunogenic properties of colloidal gold. *Biol. Bull.* 31:75-79.

Egerton, R. F. 2005. Physical principles of electron microscopy (p. 41). Springer. 1a Edición. New York. 202p

Ernst, F., M., Rühle. 2013. High-resolution imaging and spectrometry of materials.1. Springer Science & Business Media. 442p.

Esteve, M., F. C., Herrera. 2000. Hepatopancreatic alterations in *L. vannamei* (Boone, 1939)(Crustacea: Decapoda: Penaeidae) experimentally infected with a *Vibrio alginolyticus* strain. J Invertebr Pathol. 76:1-5.

Eustis, S., M. A., El-Sayed. 2006. Why gold nanoparticles are more precious than pretty gold: noble metal surface plasmon resonance and its enhancement of the radiative and nonradiative properties of nanocrystals of different shapes. Chem. Soc. Rev. 35:209-217.

Fagutao, F. F., T., Koyama, A., Kaizu, T., H., Saito-TakiKondo, T., Aoki, I., Hirono. 2009. Increased bacterial load in shrimp hemolymph in the absence of prophenoloxidase. FEBS journal. 276:5298-5306.

FAO. 2004. URL: http://coin.fao.org/coin-static/cms/media/9/13170351604740/2004_10.pdf. Fecha de último acceso: 18/07/17.

FAO. 2013. URL:<http://www.fao.org/docrep/018/i3422e/i3422e.pdf>. Fecha de último acceso: 7/10/2017.

FAO. 2016. URL: <http://www.fao.org/aquaculture/> <http://www.fao.org/aquaculture/es/es/>. Fecha de último acceso: 05/03/17.

Finney, D. J., F., Tattersfield. 1952. Probit analysis. Cambridge University Press; Cambridge. 334p.

Frías-Espericueta, M.G., S., Abad-Rosales, A.C., Nevárez-Velázquez, I., Osuna-López, F., Páez-Osuna, R., Lozano-Olvera, D. Voltolina. 2008a. Histological effects of a combination of heavy metals on Pacific white shrimp *L. vannamei* juveniles. *Aquat. Toxicol.* 89:152-157.

Frías-Espericueta, M.G., R., Castro-Longoria, G.J., Barrón-Gallardo, J.I., Osuna-López, S.M., Abad-Rosales, F., Páez-Osuna, D., Voltolina. 2008b. Histological changes and survival of *L. vannamei* juveniles with different copper concentrations. *Aquaculture*, 278:97-100.

Flegel T.W., C.F., Lo. 2014. Announcement regarding free release of primers for specific detection of bacterial isolates that cause acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). *Aquacult. Asia*.1-7

Gibson R., P.L., Barker. 1979. The decapod hepatopancreas. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.* 17:285-346.

- Gonçalves-Soares, D., J., Zanette, J. S., Yunes, G. M., Yepiz-Plascencia, A. C., Bairy. 2012. Expression and activity of glutathione S-transferases and catalase in the shrimp *L. vannamei* inoculated with a toxic *Microcystis aeruginosa* strain. Mar. Environ. Res. 75:54-61.
- Hai, N. V. 2015. The use of probiotics in aquaculture. J. Appl. Microbiol. 119:917-935.
- Haiss, W., N.T., Thanh, J., Aveyard, D.G. Fernig. 2007. Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV- Vis spectra. Anal. Chem. 79:4215-4221.
- Hoffmann, J.A., F.C., Kafatos, C.A., Janeway, R.A.B., Ezekowitz. 1999. Phylogenetic perspectives in innate immunity. Science. 284:1313-1318.
- Hoffmann, J. A., J. M., Reichhart. 2002. Drosophila innate immunity: an evolutionary perspective. Nat. Immunol. 3:121-126.
- Hou, W.Y., J.C., Chen. 2005. The immunostimulatory effect of hot-water extract of *Gracilaria tenuistipitata* on the white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. Fish Shellfish Immunol. 19:127-138.
- Hu, K. J., P. C., Leung. 2007. Food digestion by cathepsin L and digestion-related rapid cell differentiation in shrimp hepatopancreas. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. 146:69-80.
- Ji, P.F., C.L., Yao, Z.Y., Wang. 2009. Immune response and gene expression in shrimp (*L. vannamei*) hemocytes and hepatopancreas against some pathogen-associated molecular patterns. Fish Shellfish Immunol. 27:563-570.
- Ji, P.F., C.L., Yao, Z.Y. Wang. 2011. Reactive oxygen system plays an important role in shrimp *L. vannamei* defense against *V. parahaemolyticus* and WSSV infection. Dis. Aquat. Org. 96:9-20.
- Johansson, M.W., P., Keyser, K., Sritunyalucksana, K., Söderhäll. 2000. Crustacean haemocytes and haematopoiesis. Aquaculture. 191:45-52.
- Johansson, M.W., K. Soderhall. 1989. Cellular immunity in crustaceans and the proPO system. Parasitology Today. 5:171-176.
- Johnson, S. K. 1989. Handbook of shrimp diseases. ECOSUR. Texas A. and M. University. 24p.
- Joshi, J., J., Srisala, V.H., Truong, I.T., Chen, B., Nuangsaeng, O., Suthienkul, S. Thitamadee. 2014. Variation in *V. parahaemolyticus* isolates from a single Thai shrimp farm experiencing an outbreak of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). Aquaculture. 428:297-302.

- Jovanović, B., D., Palić. 2012. Immunotoxicology of non-functionalized engineered nanoparticles in aquatic organisms with special emphasis on fish—Review of current knowledge, gap identification, and call for further research. *Aquat. Toxicol.* 118:141-151.
- Kawai, T., S., Akira. 2010. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol.* 11:373-384.
- Kawai, T., S., Akira. 2011. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity.* 34:637-650.
- Kim, E.Y., R., Schulz, P., Swantek, K., Kunstman, M.H., Malim, S.M., Wolinsky. 2012. Gold nanoparticle-mediated gene delivery induces widespread changes in the expression of innate immunity genes. *Gene Ther.* 19:347-353.
- Kobayashi, T., S., Enomoto, R., Sakazaki, S., Kuwahara. 1963. A new selective isolation medium for the *Vibrio* group; on a modified Nakanishi's medium (TCBS agar medium). *Nihon saikingaku zasshi. Jpn. J. Microbiol.* 18:387.
- Kreyling, W. G., M., Semmler-Behnke, Q., Chaudhry. 2010. A complementary definition of nanomaterial. *Nano today.* 5:165-168.
- Lai, H.C., T.H., Ng, M., Ando, C.T., Lee, I.T., Chen, J.C., Chuang, H., Takeyama. 2015. Pathogenesis of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp. *Fish Shellfish Immunol.* 47:1006-1014.
- Lasagna-Reeves, C., D., Gonzalez-Romero, M. A., Barria, I., Olmedo, A., Clos, V. S Ramanujam, C., Soto. 2010. Bioaccumulation and toxicity of gold nanoparticles after repeated administration in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 393:649-655.
- Leclerc, V., J.M., Reichhart. 2004. The immune response of *Drosophila melanogaster*. *Immunol Rev.* 198:59-71.
- Li, Y., X., Hu, X., Zhang, Z., Liu, X., Ding, L., Xia, S., Hu. 2014. *Photobacterium luminescens* PirAB-fusion protein exhibits both cytotoxicity and insecticidal activity. *FEMS Microbiol Lett.* 356:23-31.
- Li, F., J., Xiang. 2013. Recent advances in researches on the innate immunity of shrimp in China. *Dev Comp Immunol.* 39:11-26.
- Li, F., J., Xiang. 2013b. Signaling pathways regulating innate immune responses in shrimp. *Fish Shellfish Immunol.* 34:973-980.

- Li, N., Y., Zhao, J., Yang. 2007. Impact of waterborne copper on the structure of gills and hepatopancreas and its impact on the content of metallothionein in juvenile giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (Crustacea: Decapoda). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 52:73-79.
- Lightner, D.V. 1996. Disease of cultured penaeid shrimp. In: Mcvey JP. Handbook of mariculture. Crustacean Aquaculture, 2nd edn. CRC Press, Boca Raton.544p
- Lightner, D. V., R. M., Redman. 1998. Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture.* 164:201-220.
- Lightner, D.V. 2011. Virus diseases of farmed shrimp in the Western Hemisphere (the Americas): a review. *J Invertebr Pathol.* 106:110-130.
- Lin, Y.C., F.F., Lee, C.L., Wu, J.C., Chen. 2010. Molecular cloning and characterization of a cytosolic manganese superoxide dismutase (cytMnSOD) and mitochondrial manganese superoxide dismutase (mtMnSOD) from the kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*. *Fish Shellfish Immunol.* 28:143-150.
- Livak, K.J., T.D., Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods.* 25:402-408.
- Lu, S., D., Xia, G., Huang, H., Jing, Y., Wang, H., Gu. 2010. Concentration effect of gold nanoparticles on proliferation of keratinocytes. *Colloids Surf. B.* 81:406-411.
- Luna González, A., P., López León, R., Escamilla Montes, M. D. C., Flores Miranda, J. A., Fierro Coronado, P., Álvarez Ruiz, , G. Diarte Plata (2016). Isolation and characterization of infectious *V. parahaemolyticus*, the causative agent of AHPND, from the whiteleg shrimp (*L. vannamei*). *Lat. Am. J. Aquat. Res.* 44:470-479.
- Luo, Y.H., L.W., Chang, P., Lin. 2015. Metal-based nanoparticles and the immune system: activation, inflammation, and potential applications. *Biomed Res Int.* 2015. DOI: 10.1155/2015/143720.
- Małaczewska, J. 2015. The splenocyte proliferative response and cytokine secretion in mice after oral administration of commercial gold nanocolloid. *Pol J Vet Sci.*18:181-189.
- Małaczewska, J. 2015 (2). Effect of oral administration of commercial gold nanocolloid on peripheral blood leukocytes in mice. . *Pol J Vet Sci.* 18:273-282.
- McCord, J.M., I., Fridovich. 1969. Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244:6049-6055.

Mohanraj, V.J., Y., Chen. 2006. Nanoparticles—a review. Trop J Pharm Res. 5:561-573.

Morales, M. S. 2010. Enfermedades del camarón: detección mediante análisis en fresco e histopatología. Trillas. 2ª edición . CIAD. 180p.

Morales, V., J., Cuéllar-Anjel. 2014. Guía técnica: patología e inmunología de camarones peneidos. Panamá. 2. República de Panamá. 382p.

Muralisankar, T., P. S., Bhavan, S., Radhakrishnan, C., Seenivasan, V., Srinivasan. 2016. The effect of copper nanoparticles supplementation on freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* post larvae. J Trace Elem Med Biol. 34:39-49.

Murugan, K., G., Benelli, C., Panneerselvam, J., Subramaniam, T., Jeyalalitha, D., Dines, P., Madhiyazhagan. 2015. Cymbopogon citratus-synthesized gold nanoparticles boost the predation efficiency of copepod *Mesocyclops aspericornis* against malaria and dengue mosquitoes. Exp. Parasitol. 153:129-138.

NCI National Cancer Institute, URL: <http://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms?cdrid=285968>. Fecha de último acceso: 10/04/2016.

Nel, A. E., L., Mädler, D., Velegol, T., Xia, E. M., Hoek, P., Somasundaran, M., Thompson. 2009. Understanding biophysicochemical interactions at the nano–bio interface. Nat. Mater. 8:543-557.

NIAID- National Institute of Allergy and Infectious Diseases URL: <https://www.niaid.nih.gov/topics/immunesystem/Pages/default.aspx>. Fecha de último acceso: 10/04/2016.

Njoki, P.N., I. I. S., Lim, D., Mott, H.Y., Park, B., Khan, S., Mishra, C.J., Zhong. 2007. Size correlation of optical and spectroscopic properties for gold nanoparticles. J. Phys. Chem. C. 111:14664-14669.

Nunan, L., D., Lightner, C., Pantoja, S., Gomez-Jimenez. 2014. Detection of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in Mexico. Dis. Aquat. Org. 111:81-86.

Palti, Y. 2011. Toll-like receptors in bony fish: from genomics to function. Dev Comp Immunol. 35:1263-1272.

Patil, S., A., Sandberg, E., Heckert, W., Self, S., Seal. 2007. Protein adsorption and cellular uptake of cerium oxide nanoparticles as a function of zeta potential. Biomaterials. 28:4600-4607.

Petrarca, C., E., Clemente, V., Amato, P., Pedata, E., Sabbioni, G., Bernardini, R., Paganelli. 2015. Engineered metal based nanoparticles and innate immunity. *Clin Mol Allergy*. 13:1.

Potnis, P.A., D.K., Dutta, S.C., Wood. 2013. Toll-like receptor 4 signaling pathway mediates proinflammatory immune response to cobalt-alloy particles. *Cell. Immunol*. 282:53-65.

Rajeshkumar, S., C., Venkatesan, M., Sarathi, V., Sarathbabu, J., Thomas, K.A., Basha, A.S., Hameed. 2009. Oral delivery of DNA construct using chitosan nanoparticles to protect the shrimp from white spot syndrome virus (WSSV). *Fish Shellfish Immunol*. 26:429-437.

Reyes-Becerril, M., C., Guluarte, D., Ceballos-Francisco, C., Angulo, M.Á. Esteban. 2017. Enhancing gilthead seabream immune status and protection against bacterial challenge by means of antigens derived from *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish Shellfish Immunol*. 60:205-218.

Reyes-Becerril, M., D., Tovar-Ramírez, F., Ascencio-Valle, R., Civera-Cerecedo, V., Gracia-López, V. Barbosa-Solomieu. 2008. Effects of dietary live yeast *Debaryomyces hansenii* on the immune and antioxidant system in juvenile leopard grouper *Mycteroperca rosacea* exposed to stress. *Aquaculture*. 280:39-44.

Robalino, J., J. S., Almeida, D., McKillen, J., Colglazier, H. F., Trent, Y. A., Chen, P. S., Gross. 2007. Insights into the immune transcriptome of the shrimp *L. vannamei*: tissue-specific expression profiles and transcriptomic responses to immune challenge. *Physiol Genomics*. 29:44-56.

Rodríguez, J. 1996. Estado del arte de la investigación científica en inmunología de Penaeidos". *La investigación científica en Penaeidos de Iberoamérica*. San Pedro de Manglaralto-Ecuador, 37-45.

Romano, N., C. B., Koh, W. K., Ng. 2015. Dietary microencapsulated organic acids blend enhances growth, phosphorus utilization, immune response, hepatopancreatic integrity and resistance against *Vibrio harveyi* in white shrimp, *L. vannamei*. *Aquaculture*. 435:228-236.

Rubio-Castro, A., A., Luna-González, P., Álvarez-Ruiz, R., Escamilla-Montes, J. A., Fierro-Coronado, P., López-León, G., Diarte-Plata. 2016. Survival and immune-related gene expression in *L. vannamei* co-infected with WSSV and *V. parahaemolyticus*. *Aquaculture*. 464:692-698.

Rudtanatip, T., N., Boonsri, S., Asuvapongpatana, B., Withyachumnarnkul, K., Wongprasert. 2017. A sulfated galactans supplemented diet enhances the expression of immune genes and protects against *Vibrio parahaemolyticus* infection in shrimp. *Fish Shellfish Immunol.*65:186-197.

Rungrassamee, W., S., Maibunkaew, N., Karoonuthaisiri, P., Jiravanichpaisal. 2013. Application of bacterial lipopolysaccharide to improve survival of the black tiger shrimp after *Vibrio harveyi* exposure. *Dev Comp Immunol.* 41:257-262.

Sadauskas, E., H., Wallin, M., Stoltenberg, U., Vogel, P., Doering, A., Larsen, G., Danscher. 2007. Kupffer cells are central in the removal of nanoparticles from the organism. *Part Fibre Toxicol.* 4:1.

Sajeevan, T. P., D. W., Lowman, D. L., Williams, S., Selven, A., Anas, P., Rosamma. 2009. Marine yeast diet confers better protection than its cell wall component (1-3)- β -d-glucan as an immunostimulant in *Fenneropenaeus indicus*. *Aquacult. Res.* 40:1723-1730.

Salazar-González, J. A., O., Gonzalez-Ortega, S., Rosales-Mendoza. 2015. Gold nanoparticles and vaccine development. *Expert Rev Vaccines.* 14:1197-1211.

Sánchez-Paz, A., F., García-Carreño, J., Hernández-López, A., Muhlia-Almazán, G., Yepiz-Plascencia. 2007. Effect of short-term starvation on hepatopancreas and plasma energy reserves of the Pacific white shrimp (*L. vannamei*). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 340:184-193.

Shaalán, M., M., Saleh, M., El-Mahdy, M., El-Matbouli. 2015. Recent progress in applications of nanoparticles in fish medicine: A review. *Nanomedicine: NBM.* 12:701-710.

Singh, O.V. 2015. Bio-nanoparticles: biosynthesis and sustainable biotechnological implications. John Wiley & Sons. U.S. 384p.

Sivaramasamy, E., W., Zhiwei, F., Li, J., Xiang. 2016. Enhancement of *Vibriosis* Resistance in *L. vannamei* by Supplementation of Biomastered Silver Nanoparticles by *Bacillus subtilis*. *J Nanomed Nanotechnol.* 7:2.

Smith, V.J., K. Söderhäll. 1983. Induction of degranulation and lysis of hemocytes in the freshwater crayfish *Astacus* by components of the prophenoloxidase activating system *in vitro*. *Cell Tissue Res.* 233:295-303

Söderhäll, K., L., Cerenius. 1992. Crustacean immunity. *Annu. Rev. Fish Dis.* 2:3-23.

Söderhäll, K., L., Cerenius. 1998. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 10:23-28.

- Soto-Rodríguez, S.A., B., Gómez-Gil, R., Lozano-Olvera, M., Betancourt-Lozano, M.S., Morales-Covarrubias. 2015. Field and experimental evidence of *V. parahaemolyticus* as the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease of cultured shrimp (*L. vannamei*) in Northwestern Mexico. *Appl Environ Microbiol.* 81:1689-1699.
- Sperling, R. A., P. R., Gil, F., Zhang, M., Zanella, W. J., Parak. 2008. Biological applications of gold nanoparticles. *Chem. Soc. Rev.* 37:1896-1908.
- Stokes, B.A., S., Yadav, U., Shokal, L.C., Smith, I., Eleftherianos. 2015. Bacterial and fungal pattern recognition receptors in homologous innate signaling pathways of insects and mammals. *Front Microbiol.* 6.
- Sun, B., H., Quan, F., Zhu. 2016. Dietary chitosan nanoparticles protect crayfish *Procambarus clarkii* against white spot syndrome virus (WSSV) infection. *Fish Shellfish Immunol.* 54:241-246.
- Swain, P., Nayak, S. K., Sasmal, A., Behera, T., Barik, S. K., Swain, S. K., ... & Jayasankar, P. 2014. Antimicrobial activity of metal based nanoparticles against microbes associated with diseases in aquaculture. *World J Microbiol Biotechnol.* 30:2491-2502.
- Talamini, L., M. B., Violatto, Q., Cai, M. P., Monopoli, K., Kantner, Z., Krpetic, L., Boselli. 2017. Influence of size and shape on the anatomical distribution of endotoxin-free gold nanoparticles. *ACS nano.* 11:5519–5529.
- Takeda, K., T., Kaisho, S., Akira. 2003. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol.* 21:335-376.
- Tassanakajon, A., K., Somboonwiwat, P., Supungul, S., Tang. 2013. Discovery of immune molecules and their crucial functions in shrimp immunity. *Fish Shellfish Immunol.* 34:954-967.
- Thompson, F. L., T., Iida, J., Swings. 2004. Biodiversity of vibrios. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68:403-431.
- Tran, L., L., Nunan, R. M., Redman, L. L., Mohney, C. R., Pantoja, K., Fitzsimmons, D. V., Lightner. 2013. Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Dis. Aquat. Org.* 105:45-55.
- Turkevich, J., P. C., Stevenson, J., Hillier. 1951. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discuss Faraday Soc.* 11:55-75.

- Vazquez, L., J., Alpuche, G., Maldonado, C., Agundis, A., Pereyra-Morales, E., Zenteno. 2009. Review: immunity mechanisms in crustaceans. *Innate Immun.* 15:179-188.
- Vimal, S., S.A., Majeed, K.S.N., Nambi, N., Madan, M.A., Farook, C., Venkatesan, A.S., Hameed. 2014. Delivery of DNA vaccine using chitosan–tripolyphosphate (CS/TPP) nanoparticles in Asian sea bass, *Lates calcarifer* (Bloch, 1790) for protection against nodavirus infection. *Aquaculture.* 420:240-246.
- Vogt, G. 1994. Life-cycle and functional cytology of the hepatopancreatic cells of *Astacus* (Crustacea, Decapoda). *Zoomorphology.* 114:83-101.
- Voliani, V. 2013. Update on gold nanoparticles. *Smithers Rapra.* U.K. 132p
- Walker, P.J., J.R., Winton. 2010. Emerging viral diseases of fish and shrimp. *Veterinary research.* 41:51.
- WHO- World Health Organization URL: <http://www.who.int/es/>. Fecha de último acceso: 10/09/2016.
- Wang, Y.C., P.S., Chang, H.Y., Chen. 2006. Tissue distribution of prophenoloxidase transcript in the Pacific white shrimp *L. vannamei*. *Fish Shellfish Immunol.* 20: 414-418.
- Wang, Y.C., P.S., Chang, H.Y., Chen. 2007. Tissue expressions of nine genes important to immune defence of the Pacific white shrimp *L. vannamei*. *Fish Shellfish Immunol.* 23:1161-1177.
- Wang, P.H., J.P., Liang, Z.H., Gu, D.H., Wan, S.P., Weng, X.Q., Yu, J.G., He. 2012. Molecular cloning, characterization and expression analysis of two novel Tolls (LvToll2 and LvToll-3) and three putative Spätzle-like Toll ligands (LvSpz1–3) from *L. vannamei*. *Dev. Comp. Immunol.* 36:359-371.
- Wang, X. W., J. X., Wang. 2013. Pattern recognition receptors acting in innate immune system of shrimp against pathogen infections. *Fish Shellfish Immunol.* 34:981-989.
- Wei, X., X., Liu, J., Yang, J., Fang, H., Qiao, Y., Zhang, J., Yang. 2012. Two C-type lectins from shrimp *L. vannamei* that might be involved in immune response against bacteria and virus. *Fish Shellfish Immunol.* 32:132-140.
- Weimer, S., J., Prieb, D., Kuhlow, M., Groth, S., Prieb, J., Mansfeld, T.J., Schulz, (2014). D-Glucosamine supplementation extends life span of nematodes and of ageing mice. *Nat. Commun.* 5.
- Yen, H. J., S. H., Hsu, C. L., Tsai. 2009. Cytotoxicity and immunological response of gold and silver nanoparticles of different sizes. *Small.* 5:1553-1561.

Zhang, X. D., H. Y., Wu, D., Wu, Y.Y., Wang, J.H., Chang, Z.B., Zhai, F.Y., Fan. 2010. Toxicologic effects of gold nanoparticles in vivo by different administration routes. *Int. J. Nanomedicine*. 5:771-781.

Zhang, Y., L., Qiu, L., Song, H., Zhang, J., Zhao, L., Wang, B., Huang. 2009. Cloning and characterization of a novel C-type lectin gene from shrimp *L. vannamei*. *Fish Shellfish Immunol*. 26:183-192.

Zhang, Z. F., M., Shao, K. H., Kang.2006. Classification of haematopoietic cells and haemocytes in Chinese prawn *Fenneropenaeus chinensis*. *Fish Shellfish Immunol*. 21:159-169.