



# UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y  
TECNOLÓGICAS

---

POSGRADO EN BIOCIENCIAS

APLICACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA  
PARA COMBATIR LA HEPATOPANCREATITIS  
NECROTIZANTE (NHPB) EN EL CAMARÓN  
BLANCO DEL PACÍFICO, *Litopenaeus vannamei*

TESIS

Para obtener el grado de:

MAESTRO EN BIOCIENCIAS

Presenta:

MARTÍN RODRIGO ACEDO VALDEZ

Hermosillo, Sonora, México

25 de enero de 2013

# Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess



**UNIVERSIDAD DE SONORA**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y  
TECNOLÓGICAS**

**POSGRADO EN BIOCENCIAS**

**APLICACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA PARA  
COMBATIR LA HEPATOPANCREATITIS NECROTIZANTE  
(NHPB) EN EL CAMARÓN BLANCO DEL PACÍFICO,  
*Litopenaeus vannamei***

**TESIS**

**que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de  
MAESTRO EN BIOCENCIAS**

**Presenta:**

**MARTÍN RODRIGO ACEDO VALDEZ**

**Hermosillo, Sonora, México.**

**25 de enero del 2013.**

APLICACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA PARA COMBATIR LA  
HEPATOPANCREATITIS NECROTIZANTE (NHPB) EN EL CAMARÓN BLANCO DEL  
PACÍFICO, *Litopenaeus vannamei*

TESIS

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de MAESTRO EN  
BIOCIENCIAS

Presenta:

MARTÍN RODRIGO ACEDO VALDEZ

Hermosillo, Sonora, México.

25 de enero del 2013.

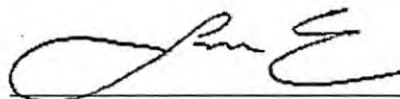
Los miembros del Comité designado para revisar la tesis intitulada APLICACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA PARA COMBATIR LA HEPATOPANCREATITIS NECROTIZANTE (NHP-B) EN EL CAMARÓN BLANCO DEL PACÍFICO, *Litopenaeus vannamei*, presentada por **Martín Rodrigo Acedo Valdez**, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Biociencias con especialidad en acuicultura.



Dra. Reina Castro Longoria  
Director de tesis



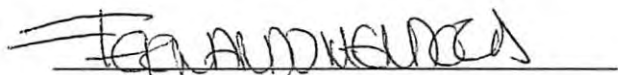
Dr. José Manuel Grijalva Chon  
Sinodal



Dr. Eduardo Larios Rodríguez  
Sinodal



Dr. Amir Darío Maldonado Arce  
Sinodal



M.C. José Fernando Mendoza Cano  
Sinodal

## **DEDICATORIA**

A mis padres José Alfredo Acedo Félix y Ana Lidia Valdez

A mis hermanos José Alfredo Acedo Valdez, Ana Guadalupe Acedo Valdez y David Fernando  
Acedo Valdez.

A mi abuela Cayetana Valdez Madrid

A Angélica Moreno Arias

Que siempre me brindaron apoyo durante la realización de esta Tesis.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco al CONACYT por la beca brindada durante mis estudios de maestría así como a la Universidad de Sonora a través del DICTUS, al programa en Biociencias por aceptarme en su posgrado y darme esta valiosa oportunidad de estudiar.

A mi comité de Tesis conformado por la Dra. Reina Castro Longoria, Dr. José Manuel Grijalva Chon, Dr. Eduardo Larios Rodríguez, Dr. Amir Darío Maldonado Arce y M. en C. José Fernando Mendoza Cano por todo el apoyo brindado en la revisión y sugerencias para el fortalecimiento de esta Tesis.

A mi directora de tesis, Dra. Reina Castro Longoria por confiar en mi propuesta de investigación y todo el apoyo brindado en la realización de esta tesis tanto en las salidas de campo como el material requerido. También su confianza y su amistad que me han motivado a seguir adelante tanto en mis estudios como en mi vida personal. Mil gracias a usted “profe” por su apoyo durante mi desarrollo educativo y en mis aspiraciones de llegar a ser un gran profesionalista, espero seguir siendo parte de ese orgullo.

Al Dr. José Manuel Grijalva Chon por su gran participación y paciencia en la elaboración de esta tesis sin duda saco brillo a esta tesis.

Al Dr. Eduardo Larios Rodríguez por su disponibilidad y su apoyo desinteresado en la realización de los experimentales con nanopartículas. Así como también su experiencia brindada en el área de la nanotecnología.

Al MC Fernando Mendoza Cano por su disponibilidad y la ayuda brindada durante los periodos experimentales de infectividad de camarón. También por la realización de los análisis de metabolitos en este trabajo. Así como también a la ayuda brindada por Diego Galván en los análisis bioquímicos.

Gracias a las facilidades otorgadas en el CIBNOR para el uso de equipo, por parte del Dr. Arturo Sánchez Paz.

Al Dr. Amir Darío Maldonado Arce por su participación y sus opiniones en esta tesis. También al Dr. Luis Rafael Martínez Córdova por la donación de los organismos utilizados en este experimental y al Dr. José Antonio López Elías por facilitar el espacio para el montaje de este experimental.

A los biólogos encargados de la Acuícola Biotecnológica y los Remanentes por las muestras bridadas para la búsqueda de la bacteria.

A mi gran amigo Jesús Francisco Ramírez Villa por su gran apoyo en el diseño e instalación del sistema de circulación cerrada en el laboratorio para el experimental de esta tesis.

A los estudiantes de la Licenciatura en Biología, Antonio Corral Hernández, Víctor Eduardo Téllez Palomares, Leonardo Luken Vega, Génesis Quintero y Enrique Sastré Velásquez por el apoyo en las actividades realizadas durante la realización del bioensayo y el procesamiento de muestras.

También agradezco a mis amigos y compañeros Christian Minjarez Osorio por su apoyo y sus valiosos comentarios que me ayudaron durante el curso de mi posgrado, Martha María del Rio Salas, Ángel Martínez Durazo, Manuel Adolfo Lastra Encinas y José Manuel Ayala Galaz y por su gran amistad. También mi agradecimiento al Dr. Enrique de la Re Vega por sus consejos y amistad. Agradezco también por el apoyo brindado por Angélica Moreno Arias drante todo mi posgrado.

A Javier Quintero y Abelardo Martínez por el apoyo en las salidas a Bahía de Kino, Sonora, para transportar agua de mar.



<b>ÍNDICE GENERAL</b>	<b>PÁGINA</b>
RESUMEN	3
ABSTRACT	4
ÍNDICE DE FIGURAS	5
ÍNDICE DE TABLAS	8
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	
<b>II. ANTECEDENTES</b>	11
II.1. Enfermedades en camarones de Sonora	11
II.2. Hepatopancreatitis Necrotizante, NHPB	12
II.2.1. Patología de la enfermedad	13
II.2.2. Signos clínicos	13
II.3. Prevención y tratamiento de enfermedades	14
<b>III. HIPÓTESIS</b>	16
<b>IV. OBJETIVO</b>	17
IV.1. Objetivos particulares	17
<b>V. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	18
V.1. Diseño experimental	18
V.2. Búsqueda y aislamiento de la bacteria NHPB	18
V.2.1. Análisis Molecular	19
V.2.1.1. Extracción de ADN	19
V.2.1.2. Cuantificación de ADN	20
V.2.1.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa	20
V.2.1.4. Electroforesis	21
V.2.2. Análisis Histológico	21
V.2.3. Reactivación del inóculo	21
V.2.4. Preparación del extracto de vegetales	23
V.2.5. Síntesis de nanopartículas	23
V.2.6. Caracterización de nanopartículas de plata	23
V.3. Experimental	25
V.3.1. Acondicionamiento de organismos	25
V.3.2. Infección experimental	25
V.3.3. Administración de tratamientos	28
V.3.4. Análisis Histológico y PCR	28
V.3.5. Determinación de metabolitos hepatopancreáticos	28
<b>VI. RESULTADOS</b>	
VI.1. Caracterización de Nanopartículas	31
VI.2. Microscopía electrónica de transmisión	34
VI.2.1. Caracterización de nanopartículas mediante <i>Camelia sinensis</i>	36
VI.2.2. Caracterización de nanopartículas mediante <i>Azadirachta indica</i>	36

VI.3. Detección de NHPB mediante PCR	38
VI.4. Análisis Histológico	40
VI.5. Reactivación del inóculo	41
VI.6. Experimental	41
VI.7. Análisis Histológico	43
VI.8. Determinación de metabolitos en hepatopancreas	47
<b>VII. DISCUSIÓN</b>	54
<b>VIII. CONCLUSIÓN</b>	60
<b>IX. RECOMENDACIONES</b>	62
<b>X. LITERATURA CITADA</b>	63
ANEXO I	69
ANEXO II	72
ANEXO III	74
ANEXO IV	75

## RESUMEN

La hepatopancreatitis necrotizante, NHPB es causada por una bacteria tipo Rickettsia, Gram-negativa, pleomórfica que afecta principalmente a los camarones en cultivo de la especie *Litopenaeus vannamei*. Vive intracelularmente en las células del hepatopáncreas hasta ocasionar la muerte de los organismos. Se ha reconocido que la plata es un bactericida efectivo, pero la experimentación en los organismos acuáticos es escasa más aun a nivel de nanopartículas. La hipótesis de este trabajo es que la administración de nanopartículas alcanzará las células huésped actuando como bactericida en esta bacteria intracelular de camarones infectados. Para este experimento para la síntesis de nanopartículas de plata se usó AgNO<sub>3</sub> y extracto de hojas secas del té verde *Camellia sinensis* y del árbol de neem *Azadirachta indica*. El óptimo tiempo de reacción fue 120 minutos para *C. sinensis* y *A. indica*, estimado por medio de espectroscopía UV-vis a una absorbancia de 370 nm y 440 nm. Por medio de microscopía electrónica de transmisión se encontró que las nanopartículas de *C. sinensis* fue de 7 – 47 nm de diámetro y de 9 – 19 nm para *A. indica*. La bacteria, NHPB se aisló de camarones cultivados infectados, para infectar camarones libres de dicha bacteria en laboratorio. A los 50 días post infección, los camarones fueron separados en tres lotes: los que recibieron 5 µg de nanopartículas por medio de alimentación forzada, un segundo lote recibieron 35 µg y el tercero fue mantenido como control sin nanopartículas. En el curso del tratamiento por 24 días se demostró por medio de la reacción en cadena de la polimerasa, PCR, que la bacteria estuvo presente sin importar las concentraciones administradas, y presentando daño severo y nódulos bacterianos en las células epiteliales a 5 µg, con una mortalidad del 40%. Sin embargo a 35 µg no se observó mortalidad y se observaron pocos nódulos bacterianos, pero persistió el daño severo en los tejidos epiteliales del hepatopáncreas. En el tratamiento con 0 µg, de nanopartículas de camarones infectados existió el 41% de la mortalidad. En este experimento se concluye que las nanopartículas de plata son efectivas para disminuir la infección bacteriana; pero el daño observado en las células podría ser una combinación de la invasión de la bacteria y un efecto secundario de la presencia de las nanopartículas de plata.

## ABSTRACT

Necrotising hepatopancreatitis, NHPB, is caused by a small, Gram-negative, and highly pleomorphic Rickettsia-like bacterium. It mainly affects the farmed shrimp species, *Litopenaeus vannamei*, by living as an intracellular host in the hepatopancreatic organ, and killing the shrimp. It has been recognized that silver is an effective antibacterial, but experimentation in aquatic living organisms are scarce even more at the nanoparticle level. We hypothesized that administration of silver nanoparticles will reach host cells acting as bactericide on this intracellular bacterium in infected shrimp. In this study we used  $\text{AgNO}_3$  and dry leaves extracts of green tea *Camellia sinensis* and neem *Azadirachta indica* for silver nanoparticle synthesis. The optimum time reaction was 120 minutes for both *C. sinensis* and *A. indica*, estimated with UV-vis spectroscopy at 370 nm and 440 nm absorbance respectively. The transmission electron microscopy revealed nanoparticles of 7 - 47 nm diameters for *C. sinensis* and 9 - 19 nm diameters for *A. indica*. The NHPB was isolated from farmed shrimp to challenge certified NHPB-free shrimp in the laboratory. Fifty days post infection, the shrimp were separated in three lots: the shrimp in one lot received 5  $\mu\text{g}$  of silver nanoparticles by forced feeding; in the second lot the shrimp received 35  $\mu\text{g}$ ; and the third lot was maintained as a control with no nanoparticles administered. In the course of the treatment of 24 days it was demonstrated by Polymerase Chain Reaction analysis that the bacteria were present no matter the administrated concentrations, having severe damage and bacterial nodules on the epithelial cells at 5  $\mu\text{g}$ , also an observed mortality of 40 %. However at 35  $\mu\text{g}$  no mortality was present and fewer nodules of bacteria were observed but severe damage on the epithelial tissue of hepatopancreas persisted. In treatment with 0  $\mu\text{g}$  of nanoparticles in infected shrimps there was a 41 % of mortality. In this experiment we concluded that silver nanoparticles are effective to diminish the bacterial infection but the damage observed in cells could be a combination of the bacteria invasion and a secondary effect of the silver nanoparticles.

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1	Diseño experimental para producir nanopartículas de plata, aislar la bacteria NHPB, infectar camarones, valorar las nanopartículas y probar su acción en camarones infectados experimentalmente.	18
2	Disección de camarón, <i>Litopenaeus vannamei</i> , que para ser analizados por PCR para la detección de NHPB.	19
3	Camarones experimentales infectados para propagar la bacteria NHPB.	22
4	A) Extracto de hepatopáncreas positivo a NHPB y B) Inoculación de NHPB mediante alimentación forzada para la infección bacteriana en camarones, para ser sometidos al tratamiento con nanopartículas de plata.	22
5	Mediciones de la formación de las nanopartículas de plata en el espectrofotómetro y en el Microscopio Electrónico de Transmisión.	24
6	Fases del centrifugado de hepatopáncreas de camarón en fase acuosa donde se encuentra la glucosa y la proteína total y fase de solventes donde se encuentran los lípidos totales, acilglicéridos y esteroleos.	29
7	A) Coloración de la reacción de la solución de Nitrato de plata. B), después de 60 min de reacción con extracto de <i>Azadirachta indica</i> (neem) e igual con C) de <i>Camellia sinensis</i> (té verde).	32
8	Espectro de absorción de Ag en reducción mediante extracto de <i>Camellia sinensis</i> (té verde).	32
9	Espectro de absorción de Ag en reducción mediante <i>Azadirachta indica</i> (neem).	33
10	Nanopartículas de Ag caracterizadas al Microscopio Electrónico de Transmisión a los 120 min sintetizadas mediante <i>Camellia sinensis</i> (té verde) a partir de AgNO <sub>3</sub> . (A, B y C).	34
11	Histograma de frecuencias de tamaño de las nanopartículas de Ag sintetizadas mediante infusión de <i>Camellia sinensis</i> (té verde) a los 120 min de reacción (n = 220).	35

12	Nanopartículas de Ag caracterizadas al Microscopio Electrónico de Transmisión a los 120 min (A y B). Sintetizadas mediante <i>Azadiractha indica</i> (neem) a partir de AgNO <sub>3</sub> .	36
13	Histograma de frecuencias relativas de nanopartículas de Ag sintetizadas mediante infusión <i>Azadiractha indica</i> (neem) a los 120 min de reacción. (n = 189).	37
14	Electroforesis de gel de agarosa con productos de PCR, 5 individuos positivos a NHPB en la granja A muestran la banda esperada de 440 pb. M = escalera de 100 bases.	38
15	Electroforesis de gel de agarosa con productos de PCR positivo a WSSV, tres individuos infectados en la granja A, y 20 en la granja B. Ambos mostraron un tamaño de banda de 701 pb. M =	39
16	Corte histológico de hepatopáncreas, H&E. (A) aumento a 10X de hepatopáncreas sano; (B) aumento 40 X de los túbulos con células hipertrofiadas de camarón con NHPB; (C) aumento a 100 x de células hepatopancreáticas atrofiadas y núcleos expandidos. D) camarón infectado con WSSV. Las flechas indican las zonas necrosadas e hipertrofiadas.	40
17	A) Electroforesis de gel de agarosa con productos de PCR positivo a NHPB en la región de 441 pb. El signo + se refiere al control positivo. M = escalera de 100 bases. B) apreciación en el camarón con infección severa de NHPB (izquierdo) y NHPB leve (derecho).	41
18	Organismos infectados con NHPB. Los camarones individuales sin nanopartículas de plata se encuentran en el carril 1-7; los tratados con 5 µg se encuentran en el carril del 8-16 y los tratados con 35 µg de nanopartículas se encuentran en el carril 17-24. M = escalera de 100 pb. + = control positivo de NHPB.	43
19	Cortes histológicos de hepatopáncreas para el tratamiento de 5 µg, 10X. A) Tejido con severa necrosis en los túbulos. A los 12 días post-tratamiento. B y C) Túbulos severamente hipertrofiados con numerosos nódulos bacterianos a los 24 días post-tratamiento. En el recuadro se muestra el nódulo bacteriano a 40 X y D) Tejido sano a 40 X.	44
20	Cortes histológicos de hepatopáncreas para el tratamiento de 35 µg. A) tejido con ligero adelgazamiento de los tubos a los 12 días	45

post-tratamiento. Aumento 10X. B) Tejido con pérdida de estructura a los 24 días post-tratamiento. Aumento 40X. C) tejido sano. Aumento 40 X.

21	Corte histológico de hepatopáncreas para los organismos positivos a NHPB, sin ningún tratamiento (0 $\mu\text{g}$ de nanopartículas). A) y B) Tejido con severa necrosis. A los 12 días de muestreo. Aumento 10 X. B) nódulo bacteriano. Aumento 40 X. C) células hepatopancreáticas atrofiadas e infiltración hemocitaria. A los 24 días de muestreo. Aumento 40 X. D) Tejido sano. Aumento 10X.	46
22	Concentración promedio de proteína total en hepatopáncreas de camarón a diferentes concentraciones de nanopartículas. Blanco representa a camarones sanos.	48
23	Concentración promedio de acilglicéridos en hepatopáncreas de camarón a diferentes concentraciones de nanopartículas. Blanco representa a camarones sanos.	49
24	Concentración promedio de lípidos totales en hepatopáncreas de camarón a diferentes concentraciones de nanopartículas. Blanco representan a organismos sanos.	50
25	Concentración promedio de glucosa en hepatopáncreas de camarón a diferentes concentraciones de nanopartículas. Blanco representan a organismos sanos.	51
26	Concentración promedio de glucógeno en hepatopáncreas de camarón a diferentes concentraciones de nanopartículas. Blanco representan a organismos sanos.	52
27	Concentración promedio de esteroides en hepatopáncreas de camarón a diferentes concentraciones de nanopartículas. Blanco representan a organismos sanos.	53

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA		PÁGINA
1	Concentraciones de nitrato de plata por volumen de la solución y la concentración correspondiente de la plata en dicha solución.	26
2	Solución de trabajo, administrada a los camarones en g y $\mu\text{g}$ por volumen de la solución de nitrato de plata 0.01 M.	26
3	Camarones infectados con NHPB y esquema de muestreo de organismos del bioensayo con nanopartículas de plata. Cinco camarones de 35 $\mu\text{g}$ permanecieron vivos al final de los 24 días, seis camarones de 5 $\mu\text{g}$ murieron al igual que cinco de los de 0 $\mu\text{g}$ . n = 42.	27
4	Relación de longitudes de onda (nm) y coloración resultante de la reacción colorimétrica para la evaluación de la concentración de cada metabolito (Sánchez-Paz et al., 2007).	30
5	Supervivencia y mortalidad de camarones con 0, 5 y 35 $\mu\text{g}$ de nanopartículas de plata.	42
6	Severidad histológica de la infección en los organismos sometidos al bioensayo con dos concentraciones de nanopartículas de plata. El Nivel de daño estructural y presencia de nódulos bacterianos en el hepatopáncreas se encuentra representado como daño moderado ++ y severo +++.	47



## I. INTRODUCCIÓN

En sus inicios, la producción camaronícola en México estuvo sustentada en el cultivo del camarón azul (*Litopenaeus stylirostris*) y después, debido a las grandes epizootias en la especie, los productores decidieron cultivar preferentemente camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) (Ruíz-Luna y Berlanga-Robles, 2001). Globalmente, con el cultivo del camarón blanco, se han presentado diversos problemas derivados principalmente por la presencia de enfermedades de diferente origen, que han afectado la producción y a la industria del camarón en diversos países productores importantes como China, Tailandia, Taiwán y Ecuador (Jory, 1999; Figueras-Gil, 2000). En México, la presencia de enfermedades de etiología infecciosa y no infecciosa en los cultivos de camarón, han ocasionado un impacto económico negativo. Las enfermedades de etiología infecciosa, son aquellas ocasionadas por bacterias, hongos, protozoarios, metazoarios y virus. Las no infecciosas son debidas a cambios ambientales en la columna de agua, sustancias tóxicas, desequilibrios nutricionales y factores genéticos (Zarain-Herzberg, 2000). Los cultivos de camarón enfrentan problemas con los patógenos como virus, Rickettsias, clamidias, hongos, protozoarios y bacterias Gram negativas y positivas (Lightner y Pantoja, 2003). Las bacterias patógenas en ambientes naturales, causan menores daños que las bacterias quitinivoras, localizadas en ambientes artificiales como la acuicultura.

Hoy en día, el crecimiento de la acuicultura en México se ha logrado en pocas décadas y el manejo de esta industria a gran escala, con el camarón, demanda la búsqueda de soluciones a los aspectos sanitarios para poder lograr una producción sostenida. Por esto, es muy importante la aplicación y la investigación de técnicas y métodos eficientes que permitan la detección temprana de enfermedades.

Las enfermedades bacterianas del camarón y de un gran número de decápodos marinos, afectan sus estructuras como la cutícula y se conocen como “*Shell disease*”, “*Rust disease*”, “*Black spot*” y “*Brown spot*” por sus nombres en inglés. Algunas bacterias del género *Vibrio*, *Beneckea* y *Pseudomonas* se encuentran asociadas con estas lesiones; algunas Myxobacterias, bacterias psicofílicas luminiscentes y *Photobacterium* sp., también se encuentran asociadas a estas lesiones (Bliss, 1983; Zarain-Herzberg, 2000). Las bacterias epibiontes involucran a Cianobacterias: Cyanophyceae y Schizophyceae, un ejemplo de estos sería *Leucothrix mucor* un epibionte común entre los crustáceos marinos. Se pueden encontrar algunas bacterias Gram

negativas como especies halofílicas de *Vibrio* y *Pseudomonas*, relacionadas con enfermedades hemocelícas de langostas, cangrejos y camarones (Bliss, 1983).

Por más de 20 años la industria acuícola ha enfrentado catástrofes y grandes pérdidas económicas debido a las enfermedades, causadas principalmente por virus y bacterias. Los camarones que se encuentran bajo situaciones de estrés debido a las condiciones intensivas de cultivo o incluso por administración de alimento de bajo perfil nutricional, sucumben ante la invasión de microorganismos patógenos. El control de enfermedades es más eficiente en la producción de larvas, sin embargo durante su pre-engorda, es mucho más difícil de ser implementado, por lo que se tiene que optar por la prevención de estas enfermedades.

Las bacterias del género *Vibrio* son patógenos muy importantes en la larvicultura y engorda de camarón, las enfermedades del género *Vibrio* son conocidas como bacterias luminiscentes, Bolitas blancas y Síndrome Zoa II. Por otro lado, las enfermedades virales más importantes son el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV), síndrome de Taura (TSV), Baculovirus penaei (BP) y Necrosis infecciosa hipodérmica y hematopoyética (IHHNV) por mencionar algunos. También podemos encontrar enfermedades producidas por protozoarios conocidas por su nombre común como el camarón de leche o enfermedades por gregarinas. Dentro de las enfermedades fúngicas tenemos a *Lagenidium*, el cual se puede encontrar en el estadio larval y el género que ocasiona mayores estragos en los juveniles y adultos es *Fusarium*.

Actualmente el WSSV se ha convertido en una problemática para la camaronicultura mexicana, principalmente para Sonora y Sinaloa (Esparza-Leal, 2010). El cuadro se complica cuando se establecen las enfermedades de origen viral con las bacterianas. Por ejemplo, recientemente se ha visto el impacto en los cultivos por la bacteria de la hepatopancreatitis necrotizante (por sus siglas en inglés NHPB), la cual es una Gram negativa (-) del grupo de las rickettsias, patógena intracelular, que se aloja en el hepatopáncreas del camarón (Krol *et al.*, 1991).

## II. ANTECEDENTES

### II.1. Enfermedades en camarones de Sonora

La primera defensa de los crustáceos para evitar la invasión de patógenos potenciales es la cutícula, actuando como barrera física y barrera bioquímica debido a que existen inhibidores enzimáticos. Los hemocitos son los encargados de atrapar agentes extraños para prevenir infección en el organismo. Debido a que los hemocitos no tienen memoria inmune, actúan mediante fagocitosis y agentes citotóxicos provocando inflamaciones como mecanismo de respuesta ante patógenos (Wickins, 2002). Estas células actúan ante moléculas específicas constituidas por proteínas y carbohidratos como lipopolisacáridos, peptidoglicanos, glicanos y maninas (Wickins, 2002).

Actualmente se trata de comprender mejor el mecanismo de resistencia en crustáceos, además de desarrollar técnicas y fármacos que permitan un mejor combate a las enfermedades. Los compuestos que son utilizados para control de la proliferación de organismos patógenos son el oxilato verde de malaquita, cobre hidrosoluble, formalina, trifuralina y dentro del grupo de los antibióticos están: la oxitetraciclina, enroflaxacina, fluorfenicol, entre otros (Bell y Lightner, 1987).

Los antibióticos al consumirse pueden llegar a producir efectos secundarios en humanos, es por esto que es necesario llevar un control sobre la dosis y el tiempo del tratamiento. Estos pueden llegar a tener efectos tales como los producidos por el cloranfenicol que causa anemia aplásica, además produce resistencia a organismos patógenos siendo esto de riesgo para la salud humana (FAO, 2005).

Ningún antibiótico se encuentra aceptado por la FAO ya que no prometen bajos o nulos riesgos para el consumidor, en México no se encuentra regulado el uso de antibióticos, aunque el PROY-NOM-059-PESC-2004 pretende dar un seguimiento y asegurar el uso adecuado de los antibióticos. Actualmente su administración se realiza de manera inapropiada, ya que las dosis y tiempos de los tratamientos implementados no se encuentran regulados, esto es debido al nulo conocimiento sobre los fármacos y los efectos que lleva el abuso de estos. Estos abusos dan como resultado varios aspectos negativos y pueden acarrear efectos secundarios y riesgos a la salud, así como contaminación de efluentes acuícolas y resistencia de bacterias presentes en las zonas de descargas (Santiago *et al.*, 2009).

En Sonora el uso de antibióticos se encuentra actualmente vigilado por el Comité de Sanidad Acuícola del Estado de Sonora (COSAES). En el estado, los antibióticos utilizados en las granjas de camarón son la oxitetraciclina, enroflaxina y el fluorfenicol. De acuerdo a lo reportado por COSAES (2011), entre los años 2007 al 2011, del 12 al 38 % de las granjas camaroneras utilizaron los citados antibióticos.

En Sonora el registro de enfermedades virales indica el 32% de granjas afectadas, por los virus del síndrome de Taura (TSV), virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) y el de la Necrosis Infecciosa Hipodérmica y Hematopoyética (IHHNV). Las enfermedades de origen bacteriano afectaron alrededor del 43 % de las granjas de camarón, las cuales presentaron problemas con NHPB. Esta bacteria puede causar altas mortalidades en los cultivos de camarón, por lo que esta disminución en la producción se traduce en altas pérdidas económicas. Debido a que esta enfermedad es la que más se reporta para el estado de Sonora, esto valida el interés por generar mayor conocimiento sobre la enfermedad (COSAES, 2009).

## **II.2. Hepatopancreatitis Necrotizante, NHPB**

La bacteria causante de la Hepatopancreatitis Necrotizante actúa infectando de manera intracelular y durante la fase aguda los organismos presentan melanización y necrosis tubular en el hepatopáncreas; mientras que durante la fase crónica, puede apreciarse atrofia en dicho órgano. Esta enfermedad causa mortalidades del 10 al 40 %, su diagnóstico se basa en la utilización de herramientas histológicas y moleculares (Morales-Covarrubias, 2004).

La primera infección por NHPB en camarón de cultivo se reportó en una granja del estado de Texas en el año de 1985, posteriormente se presentaron casos en Perú, Ecuador, Venezuela, Brasil, Panamá, Costa Rica y México, con altas mortalidades en granjas camaronícolas. Esta enfermedad es también conocida como hepatopancreatitis necrotizante de Texas; síndrome de la mortalidad en estanques de Texas y hepatopancreatitis necrotizante de Perú. La infección ha sido identificada en las especies de *Litopenaeus vannamei*, *L. setiferus*, *L. stylirostris*, *Farfantapenaeus aztecus* y *F. californiensis* (Morales-Covarrubias, 2004).

La bacteria causante del NHPB es una Gram negativa del grupo de las Rickettsias, patógena intracelular, su morfología es pleomórfica aunque predominantemente es redonda no flagelada (Krol *et al.*, 1991). Su reproducción es mediante fisión binaria en la célula huésped, esta característica confiere que no pueda cultivarse en medios de cultivo convencionales. Su modo de

transmisión es desconocido. Sin embargo, se cree que la transmisión de esta bacteria intracelular implica un huésped reservorio que requiere condiciones ambientales específicas (Frelier *et al.*, 1993).

La clasificación de NHPB se basa en la secuencia del 16S rDNA que la cataloga como una  $\alpha$ -Proteobacteria. Análisis filogenéticos indican que se encuentra estrechamente relacionada con bacterias endosimbiontes de protozoarios como *Caedibacter caryophila* y *Holospora obtusa*. La enfermedad se asocia a condiciones de salinidad elevada y aparentemente no se manifiesta en salinidades menores de 10 ups (Gómez-Gill y Guerra-Flores, 2001).

### **II.2.1. Patología de la enfermedad**

La bacteria del NHPB ataca el epitelio del hepatopáncreas, el cual toma una coloración pálida y se reduce en tamaño, las células afectadas presentan hipertrofia con aglomeraciones bacterianas en el citoplasma. Se forman lesiones granulomatosas, las cuales afectan las funciones del hepatopáncreas como la digestiva, la absorción y el almacenamiento de nutrientes. NHPB se presenta en camarones juveniles y subadultos (Morales-Covarrubias, 2004).

### **II.2.2. Signos clínicos**

Se puede observar una reducción drástica en el consumo de alimento y el crecimiento, cutícula blanda, branquias obscurecidas, coloración oscura debido a la expansión de los cromatóforos en los bordes de los urópodos o pleópodos, debilidad y letargia hasta llevar a la muerte al organismo infectado (Morales-Covarrubias, 2004). Esto puede conducir a cambios en su metabolismo y por lo tanto, en presencia de la enfermedad y los tratamientos para combatirla es necesario conocer que sucede con indicadores bioquímicos.

El perfil bioquímico en camarón es una herramienta que indica los niveles de metabolitos tales como lípidos, proteína y glucosa. Dichos niveles pueden indicar el efecto de una respuesta fisiológica o ambiental sobre un parámetro (Bonilla-Gómez *et al.* 2012). Por ejemplo, Arcos *et al.* (2003) encontraron disminución significativa en los niveles de hemocianina, proteína, lípidos totales, colesterol y triglicéridos en hemolinfa de camarones con ablación del pedúnculo ocular, concluyendo que estos niveles se relacionaron con el proceso de maduración.

La utilidad de estos metabolitos es fundamental en la comprensión de los efectos que puedan tener en organismos afectados por agentes patógenos. En organismos afectados por virus

como el WSSV los efectos pueden observarse en tejido del hepatopáncreas, hemolinfa y músculo donde los valores de glucosa, carbohidratos, proteína y ácidos grasos se ven afectados por el desarrollo de la enfermedad (Yoganandhan *et al.*, 2003). Por otro lado, estudios realizados en el virus IHHNV, demostraron influir en los niveles de lípidos totales, colesterol y triglicéridos en hepatopáncreas de camarón (Galván-Álvarez *et al.*, 2012). También, se reportó que existe un efecto de la enfermedad sobre los niveles de lactato y urea en hemolinfa de camarones infectados con NHPB (Ávila-Villa *et al.*, 2012). Sin embargo, no se ha establecido como influye NHPB en el órgano blanco de la enfermedad.

Para el control de la NHPB en los cultivos de camarón se utilizan antibióticos, en Sonora el más utilizado es la oxitetraciclina, esto debido a que este antibiótico ha sido demostrado como el más eficaz en el control de la enfermedad. Las rickettsias son un complejo de bacterias con potencial patogénico en organismos como el ser humano y existen numerosos tratamientos por medio de antibióticos para su combate, pero se ha enfatizado que estas son altamente resistentes a la mayoría de ellos (Kenneth, 2005). Actualmente se han empleado nuevas herramientas para combatir patógenos, como prevención se utilizan organismos libres de patógenos (SPF) así como también la selección de especímenes (Maldonado *et al.*, 2004).

### **II.3. Prevención y tratamiento de enfermedades**

Actualmente la herramienta de la nanotecnología ha ido en marcado desarrollo con enfoques hacia la industria, pero también se puede considerar novedosa aplicada a la medicina y a otras áreas como la acuicultura. Por ejemplo, en acuicultura un compuesto de nanopartículas con base de lantano, denominado “Nano Check” absorbe los iones fosfato en el agua e impide el crecimiento de algas. También se han utilizado cadenas cortas de ADN encapsulado, como un tipo de vacuna y ha sido administrado a peces con resultados alentadores. Además se han utilizado nanopartículas de hierro en peces para acelerar su crecimiento hasta en un 30 % (Pagé, 2004). La plata, por su parte es un agente antimicrobiano. Kim *et al.* (2007) reportan el potencial agente antimicrobiano de las nanopartículas en levaduras, *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus*.

Es importante considerar el tamaño y la forma de las nanopartículas cuando estas serán empleadas en sistemas biológicos, ya que estos parámetros determinan su utilidad, pues un menor tamaño implica mayor número de átomos en la superficie de la nanopartícula, es decir, mayor porcentaje de átomos presentes en la partícula que interactúan con el medio, mientras que la forma

indica su aplicación. La plata es un ejemplo de las múltiples aplicaciones para el combate y resistencia a las bacterias. Ejemplos de la respuesta a la presencia de metales como la plata se pueden encontrar en *Pseudomonas stutzeri* de linaje bacteriano AG259, la cual puede acumular la plata y ser capaz de producir cristales de tamaños de 200 nm y para proteger las células de las consecuencias tóxicas, tiene un mecanismo de detoxificación que precipita la plata en el espacio periplásmico y se reduce a su estado elemental (Klaus *et al.*, 2001). No obstante, la interacción de la plata en bacterias como NHPB en camarón, puede ser compleja debido a que es una bacteria intracelular y el efecto y modo de actuar de la plata a través del organismo y su llegada al hepatopáncreas, es desconocido.

Los mecanismos sobre la acción biocida de la plata están relacionados con los grupos sulfhidrilos (-SH) de las enzimas y proteínas. La plata interfiere con las funciones que la proteína normalmente realiza cuando se encuentra un ligando. La respiración celular y el transporte de electrones a través de la membrana, son ejemplos de funciones soportadas por las enzimas con grupos sulfhidrilos (Luoma, 2008). La plata también inhibe la replicación del DNA. En las bacterias induce estrés oxidativo en la pared celular, donde ocurren funciones celulares importantes, lo cual les afecta para mantener el balance de iones internamente. Por tanto, las bacterias expuestas a la plata muestran inhibición de crecimiento, pierden potasio y suprimen el transporte de químicos dentro y fuera de la membrana (Hwang *et al.*, 2007; Luoma, 2008).

La producción de nanopartículas de plata está basada en métodos químicos, físicos y biosíntesis. En los métodos químicos se incluyen técnicas electroquímicas, síntesis de plasma de microondas, deposición de vapores de metal. Los métodos físicos son por medio de fotólisis de UV, descomposición térmica y ablación laser (Fabrega, 2009). Los métodos de biosíntesis se prefieren porque no causan impacto a la naturaleza, algunos trabajos señalan que los vegetales han sido usados como reductores efectivos en la producción de nanopartículas (Nadagouda *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2009; Njagi *et al.*, 2010; Vaseeharan *et al.*, 2010). En particular lo anterior se refiere al uso de extractos e infusiones como agentes reductores rápidos, baratos, sencillos y ecoamigables. El uso de nanopartículas de plata como antimicrobiano está demostrado por lo que el utilizarlas podría ofrecer una herramienta para combatir la bacteria causante de la hepatopancreatitis necrotizante.

### III. HIPÓTESIS

La bacteria de la Hepatopancreatitis necrotizante NHPB es una Gram neativa del grupo de las Rickettsias que vive intracelularmente como huésped dentro del hepatopáncreas, causándole necrosis y matando al camarón. Por ser intracelular, actualmente no es posible su cultivo y por lo tanto es difícil la experimentación en el laboratorio para la búsqueda de métodos efectivos para su combate. Se reconoce la efectividad de la plata en las bacterias, pero poco se ha experimentado en organismos acuáticos mediante el uso de nanopartículas. Por lo tanto se partió de la hipótesis de que al administrarlas al camarón éstas llegarán a las células huésped para ejercer efecto bactericida sobre la  $\alpha$ -proteobacteria intracelular, causante de la NHPB en el camarón, *Litopenaeus vannamei*.



## IV. OBJETIVO

Determinar en el camarón blanco del Pacífico, *Litopenaeus vannamei*, el efecto antibacterial de las nanopartículas de plata sobre la bacteria causante de la necrosis hepatopancreática (NHPB).

### IV.1. Objetivos particulares

- Promover la síntesis de nanopartículas de plata a partir de Nitrato de Plata por medio de biosíntesis con extracto de los vegetales *Camellia sinensis* y *Azadirachta indica* como precursores.
- Determinar los tiempos óptimos de reacción para la formación de nanopartículas monodispersas y su valoración mediante microscopía electrónica de transmisión, MET.
- Detectar NHPB en camarones infectados de granjas acuícolas, mediante métodos histopatológicos y moleculares para obtener una cepa para los bioenayos de infección.
- Infectar los organismos con el aislado de NHPB y valorar la aplicación de las nanopartículas de plata obtenidas de la síntesis biológica.
- Evaluar cambios en la concentración de metabolitos hepatopancreáticos en organismos infectados con NHPB y administrados con las diferentes dosis de nanopartículas.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### V.1. Diseño experimental

Se realizaron tres etapas de experimentación que consistieron en la búsqueda de la bacteria, aclimatación de organismos, desde juveniles de 4 - 16 g, así como la síntesis de las nanopartículas de plata y su aplicación a camarones llevados a infección inducida. De ahí se derivaron las diferentes acciones del experimental que se detallan a continuación y por separado (Fig. 1).

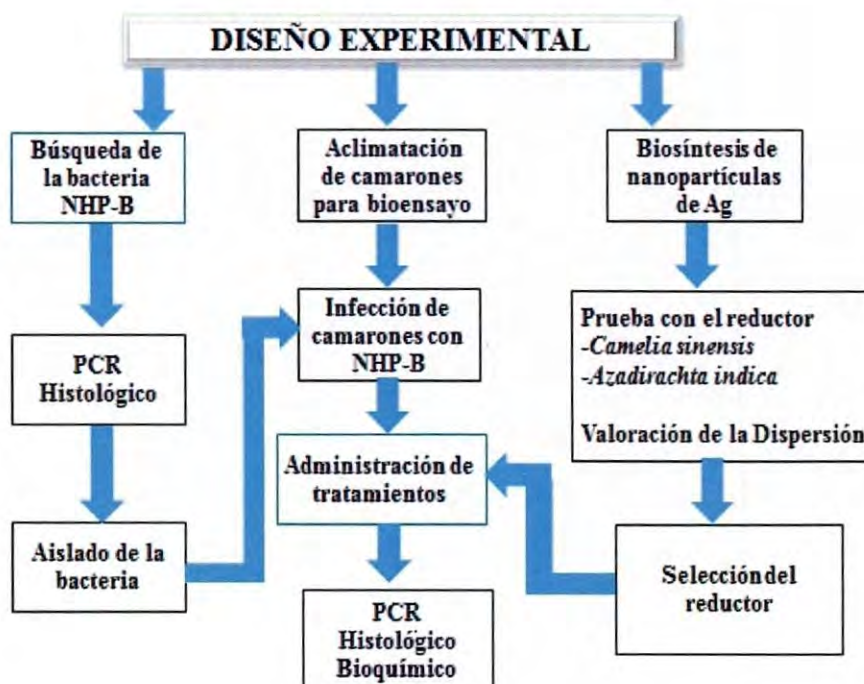


Figura 1. Diseño experimental para producir nanopartículas de plata, aislar la bacteria NHPB, infectar camarones, valorar las nanopartículas y probar su acción en camarones infectados experimentalmente.

### V.2. Búsqueda y aislamiento de la bacteria NHPB

Se colectaron 60 camarones vivos al sur de Sonora en granjas camaronícolas del ejido La Atanasia, de los cuales 30 fueron de la granja camaronícola Los Remanentes (Granja A) y 30 de Acuícola Biotecnológica (Granja B), los cuales se transportaron en hieleras para su procesamiento

en el laboratorio donde se realizaron mediciones del peso y longitud de cada camarón. Posteriormente se disectaron y se extrajeron los hepatopáncreas, branquias y pleópodos (Fig. 2).

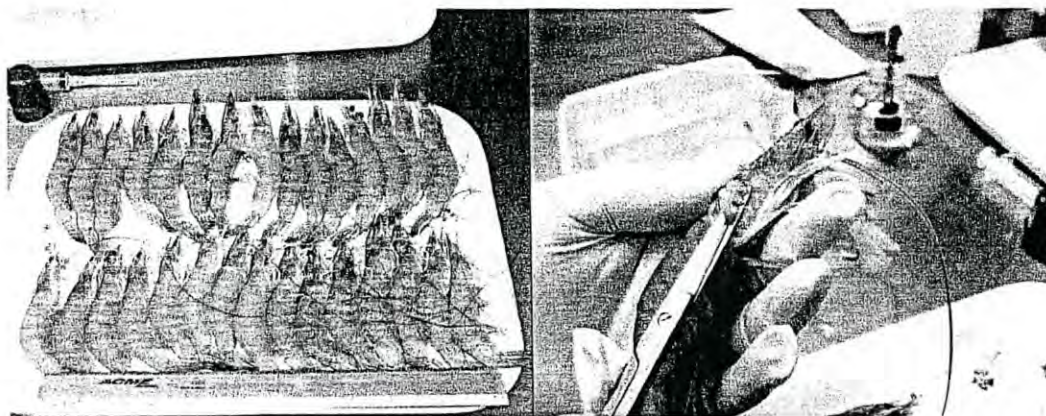


Figura 2. Disección de branquias de camarón, *Litopenaeus vannamei*, para ser analizados por PCR para la detección de NHPB.

Secciones individuales de las muestras de tejido de cada camarón disectado fueron distribuidas en tubos de 1.5 mL con alcohol etílico absoluto para análisis de la PCR y en solución Davidson dentro de casetes para análisis histológico, todo debidamente etiquetados. De todos los camarones se tomó también una sección de hepatopáncreas y se colocó en glicerol con agua en una proporción 1:1 para preservar y propagar la bacteria viva. Las muestras en glicerol y alcohol fueron almacenadas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  y las muestras en Davidson fueron colocadas en alcohol al 70 % para el análisis histológico (Gracia-Valenzuela *et al.*, 2010).

## V.2.1. Análisis Molecular

### V.2.1.1. Extracción de ADN

De los camarones aclimatados en el laboratorio y de los colectados en las granjas se efectuaron todas las pruebas moleculares correspondientes para determinar su condición sanitaria y para la búsqueda de la cepa de NHPB. Se realizó un barrido en cada uno de los camarones para la identificación de NHPB y del virus del Síndrome de la mancha blanca, WSSV para detectar aquellos individuos que solo estuvieran infectados con NHPB. Para la extracción de ADN, se

colocó una porción de hepatopáncreas y de branquia o pleópodos de cada uno de los camarones muestreados en microtubos de 1.5 mL, estériles y etiquetados. Posteriormente se siguió el protocolo de extracción de ADN mediante el juego de reactivos QIAmpDNA Mini Kit, (Anexo 1) de acuerdo al fabricante (QIAGEN).

#### **V.2.1.2. Cuantificación de ADN**

La cuantificación de ADN se llevó a cabo en un espectrofotómetro NanoDrop 1000. Primeramente se realizó la línea base colocando 2  $\mu$ L de agua para PCR en el detector del espectrofotómetro, después se cuantificó cada muestra de ADN extraído colocando el mismo volumen en el detector y se procedió al registro de las concentraciones de ADN y el coeficiente  $A_{260}/A_{280}$ .

#### **V.2.1.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa**

La reacción de PCR se realizó mediante el juego de reactivos Illusta PuRe Taq *Ready-To-Go* (GE Healthcare). De acuerdo con los resultados obtenidos de la cuantificación de ADN, a la reacción de PCR se le agregó 1  $\mu$ L de ADN si la concentración era mayor que 100 ng/ $\mu$ L y 2  $\mu$ L si la concentración era menor que 100 ng/ $\mu$ L; también se añadió 1  $\mu$ L de cada oligonucleótido específicos para NHPB (Loy *et al.*, 1996) cuyas secuencias son:

PF-1: 5'-ACG TTG GAG GTT CGT CCT TCA G-3'

PR-1: 5'-TCA CCC CCT TGC TTC TCATTG T-3'

Las condiciones de PCR para detectar NHPB comenzaron con la desnaturalización inicial a 94 °C por 5 min, 35 ciclos de 94 °C por 30 s, 58 °C por 30 s, 72 °C por 60 s y una extensión final a 72 °C por 5 min (Loy *et al.*, 1996). Se realizó también la detección de WSSV con los oligos reportados por (Ramos-Paredes *et al.*, 2011):

WSSVVP28-F1: 5'-CTCGCTTGCCAATTGTCCTGTTA-3'

WSSVVP28-R1 5'-ATTTCCACCGGCGGTAGCTGC-3'

Las condiciones fueron una desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min, 35 ciclos a 95 °C por 50 s, 60°C por 50 s, 72 ° C por 1 min y una extensión final a 72 °C por 7 min (Ramos-Paredes *et al.*, 2011). Se añadió un control negativo para corroborar la reacción de PCR en NHPB y WSSV.

#### **V.2.1.4. Electroforesis**

Los productos de PCR fueron examinados en gel de agarosa al 2 % con 2.5 µL de Bromuro de Etidio (BrEt) siguiendo el protocolo de electroforesis (Anexo 1). Los geles se observaron en luz ultravioleta mediante un fotodocumentador Bio-Imaging Systems modelo Mini Bis Pro. Las muestras positivas para NHPB tuvieron un tamaño esperado de banda de 441 pb para NHPB y 702 pb para WSSV y se corroboró con un control positivo para cada patógeno.

#### **V.2.2. Análisis Histológico**

Las muestras para el análisis histológico fueron deshidratadas mediante alcoholes graduales del 70-100% y Xileno. Después los tejidos se incluyeron en parafina y mediante un micrótopo rotatorio se realizaron cortes histológicos a 5 µm de espesor y se realizó la tinción Hematoxilina Eosina (Anexo II). Se valoró la infección del tejido hepatopáncreático de acuerdo con del Río-Rodríguez *et al.* (2006).

#### **V.2.3. Reactivación del inóculo**

Se obtuvieron diez camarones provenientes de un cultivo experimental en la Unidad Experimental Kino y se colocaron en una pecera de 30 L con 15 L de agua de mar filtrada, se mantuvieron durante 24 h en ayuno y posteriormente se alimentaron con una dieta comercial para camarón dos veces al día *ad libitum* durante 5 días (Fig. 3).

Al quinto día se les administró mediante alimentación forzada un macerado de los hepatopáncreas almacenados en glicerol (Fig. 4A) de los organismos de las granjas que resultaron positivos a NHPB y negativos a WSSV. Para esta alimentación forzada se utilizó una sonda para catéter adaptada a una pipeta eppendorf de 20-100 µL (Fig. 4B).



Figura 3. Camarones experimentales infectados para propagar la bacteria NHPB.

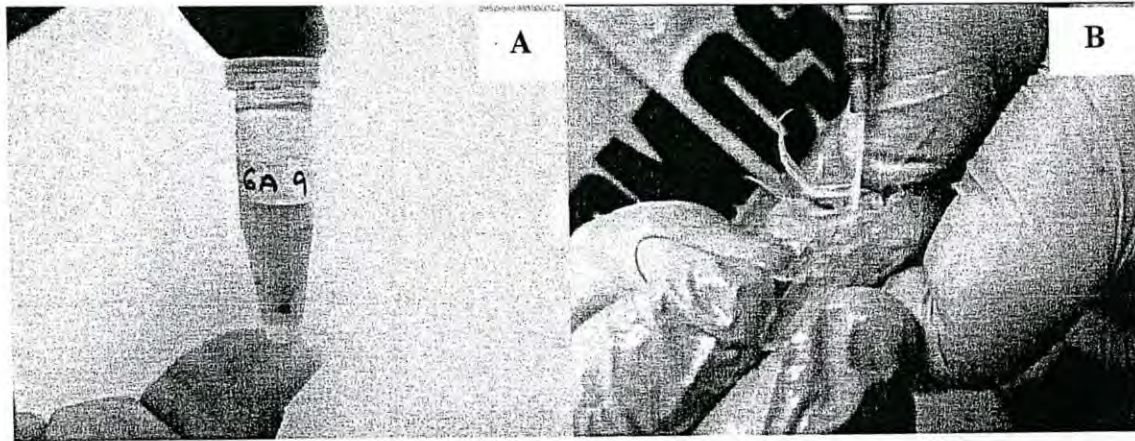


Figura 4. A) Extracto de hepatopáncreas positivo a NHPB y B) Inoculación de NHPB mediante alimentación forzada para la infección bacteriana en camarones, para ser sometidos al tratamiento con nanopartículas de plata.

La sonda se introdujo por la boca y se vació cuidadosamente el contenido, los camarones se mantuvieron en observación. Esta alimentación forzada se volvió a repetir en los camarones cada tres días y durante nueve días. Después la bacteria se dejó incubar en los camarones por un período de 30 días.

Los organismos sometidos al bioensayo fueron analizados mediante PCR y electroforesis. Se realizó un resguardo de hepatopáncreas en glicerol, de la manera descrita anteriormente. Los organismos que resultaron positivos se sumaron al banco de tejidos infectados para llevar a cabo el bioensayo de infección y tratamiento con nanopartículas de plata.

#### **V.2.4. Preparación del extracto de vegetales**

Se utilizaron extractos secos de té verde *Camellia sinensis* (Vaseeharan *et al.*, 2010) y hojas frescas de *Azadirachta indica* (neem) como agentes reductores. Las hojas de *A. indica* se secaron en condiciones de oscuridad a temperatura ambiente y se almacenaron en papel periódico. Para ambos vegetales, se calentaron 60 mL de agua desionizada hasta alcanzar el punto de ebullición, después se agregaron 6 g de hojas secas y se dejó hervir durante 2 minutos, mezclando ocasionalmente. Después de 5 minutos, se filtró tres veces con papel filtro para separar los sólidos suspendidos. La infusión se realizó justo antes de comenzar la síntesis de las nanopartículas. Se obtuvieron infusiones de cada especie vegetal por separado.

#### **V.2.5. Síntesis de nanopartículas**

El método de síntesis de las nanopartículas se realizó basado en la metodología de Vaseeharan *et al.* (2010) y modificada para este estudio. Para llevar a cabo la reacción, en un tubo de ensayo de 100 mL se agregaron 1.0 mL de nitrato de plata al 0.01 M como precursor, 3.0 mL de agua desionizada y 30  $\mu$ L de la infusión vegetal. Se leyó en espectrofotómetro cada 5 minutos para caracterizar la síntesis de nanopartículas que se llevó a cabo en la reacción y con esto establecer el tiempo donde disminuye esta. Con esto, se determinó el criterio a seguir en la observación al microscopio electrónico para posteriormente administrar a los camarones.

#### **V.2.6. Caracterización de nanopartículas de plata**

Se tomó una alícuota de 0.5 mL de la sustancia en reacción y se agregó en una celda de cuarzo de 1.0 mL, posteriormente se valoró la absorbancia de los componentes mediante un

espectrofotómetro UV-vis SHIMADZU modelo UV-2450. La absorbancia en la reacción fue medida aproximadamente cada 5 min durante una hora y a las 2 h de reacción se observaron en microscopía electrónica de transmisión, MET (Fig. 5) en un microscopio JEOL modelo 2000. Después de la reacción y para valorar la forma y dispersión de las nanopartículas en el MET, se tomó una muestra de 3  $\mu\text{L}$  de la solución en reacción a los 15 y 120 min; se depositaron sobre una rejilla de cobre de 200 *mesh* y se dejó secar a temperatura ambiente entre 6 y 12 h.

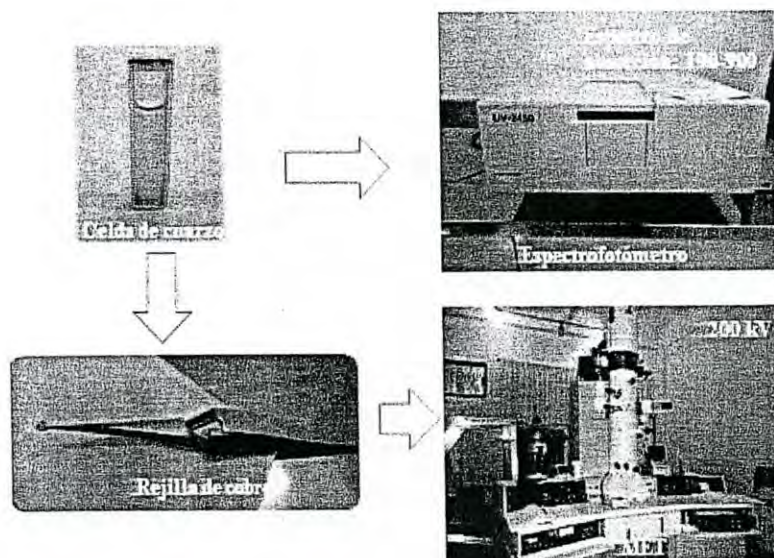


Figura 5. Mediciones de la formación de las nanopartículas de plata en el espectrofotómetro y en el Microscopio Electrónico de Transmisión.

Posteriormente se colocó la rejilla sobre el brazo porta-muestras del MET y se capturaron imágenes. Las imágenes generadas fueron digitalizadas y se registraron las distintas formas, para ser analizadas mediante el *software image J* versión 1.44p. Se midieron los diámetros de las nanopartículas encontradas. Después con el *software Microsoft Excel 2007*, se realizó un histograma de frecuencias para determinar los rangos de tamaño de las nanopartículas, para determinar su dispersión (Poole y Owens, 2007).



### **V.3. Experimental**

#### **V.3.1. Acondicionamiento de organismos**

Se acondicionaron 190 organismos de 6 g de un cultivo de camarón de la Unidad Experimental Kino (UEK) de la Universidad de Sonora, los cuales fueron transportados al laboratorio húmedo del DICTUS en Hermosillo en contenedores de 250 L. Se distribuyeron en 16 acuarios de 100 L y se seleccionaron 11 organismos al azar para constatar que se encontraban libres de NHPB y WSSV, mediante la técnica de PCR ya descrita previamente. En cada acuario se colocaron de 10-12 organismos en un volumen de agua de mar de 40 L, a temperatura de 28-29 °C. Los camarones se mantuvieron bajo observación durante tres meses con aireación constante y alimento comercial peletizado, al 5 % de su biomasa proporcionado dos veces al día. Se realizaron recambios de agua del 80 % cada 3-4 días con agua de mar filtrada y esterilizada con luz UV.

#### **V.3.2. Infección experimental**

Después de tres meses de acondicionamiento se obtuvo un total de 120 camarones de 16 g, para el experimento, que fueron infectados con la bacteria NHPB mediante alimentación forzada, descrita previamente. Para asegurar la infección, se dejaron los camarones por un período de 50 días con la finalidad de tener un estado avanzado de la enfermedad. Esto se hizo debido a que en la propagación previa del NHPB, los signos clínicos de los camarones se observaron hasta 50 días después.

Para detectar la infección de NHPB en los camarones por PCR se colectaron las heces. Para esto, en cada acuario se colocaron redes cilíndricas donde se distribuyeron los camarones y se dejó pasar un lapso de tiempo de 30-40 min con la finalidad de que depositaran las heces. Después se sacó cada camarón del contenedor y se regresó de nuevo al acuario, posteriormente con ayuda de unas pinzas de disección se tomaron las heces de cada camarón y se colocaron en tubos de 1.5 mL con alcohol al 96 %. Para la recolección se utilizaron pinzas desinfectadas con un mechero del alcohol. Una vez establecida la infección en todos los camarones, se procedió a aplicar los tratamientos a base de nanopartículas de plata.

#### **V.3.3. Administración de tratamientos**

La administración de nanopartículas de plata (NpAg) en solución acuosa vía alimentación forzada (anexo III) fue de 5 y 35 µg y estuvo basada en las concentraciones

extremas que utilizó Vaseeharan *et al.* (2010) para el combate a colonias de *Vibrio harveyi*. Se administraron a 5 organismos por acuario por triplicado. Un grupo de camarones fueron inoculados solamente con solución acuosa sin nanopartículas. Los cálculos de las concentraciones fueron como sigue: El peso molecular del  $\text{AgNO}_3$  es de 169.8749, de los cuales el 63.5 % corresponde a la plata (Anexo 4). Una solución de un litro de  $\text{AgNO}_3$  al 0.01 M tiene 1.698749 g de reactivo, del cual 1.0787056 g corresponden a la plata (Tabla 1).

Tabla 1. Concentraciones de nitrato de plata por volumen de la solución y la concentración correspondiente de la plata en dicha solución.

mL de $\text{AgNO}_3$ 0.01 M	g de $\text{AgNO}_3$	g de Ag	$\mu\text{g}$ de Ag
1000.0	1.698749	1.0787	1078700
1.0	0.00169875	0.0010787	1078.7

Para obtener los 35  $\mu\text{g}$  de nanopartículas en un volumen de 50  $\mu\text{L}$ , se hicieron los siguientes cálculos: La solución de síntesis estuvo compuesta por un volumen de 32.4462  $\mu\text{L}$  de nitrato de plata al 0.01M que contuvo 35  $\mu\text{g}$  de plata; un volumen de 0.37  $\mu\text{L}$  de infusión de neem y 17.183706  $\mu\text{L}$  de agua desionizada. Al final se obtienen 35  $\mu\text{g}$  de nanopartículas en un volumen total de 50  $\mu\text{L}$ , por camarón. Para administrar a todos los camarones y de acuerdo con los cálculos realizados, a una solución de trabajo de 100 mL se agregaron 64.893 mL de nitrato de plata 0.01 M; 0.74 mL de extracto de neem y se aforó con 34.367 mL con agua desionizada a un volumen de 100 mL y se dejó por 2 h a temperatura ambiente (Tabla 2).

Tabla 2. Solución de trabajo, administrada a los camarones en g y  $\mu\text{g}$  por volumen de la solución de nitrato de plata 0.01 M.

mL de $\text{AgNO}_3$ 0.01 M	g de Ag	$\mu\text{g}$ de Ag
1.0	0.0010787	1078.7
64.8929267	0.07	70000

La solución de trabajo se tomó como referencia para realizar las soluciones para el tratamiento de 5  $\mu\text{g}$  y sin nanopartículas. Se tomaron 7.15  $\mu\text{L}$  y se aforó a 100 mL para tener una concentración de 5  $\mu\text{g}$  de nanopartículas por cada 50  $\mu\text{L}$ , para administrar a los camarones. Se obtuvo una solución sin nanopartículas a 0  $\mu\text{g}$ , tomando 0.74 mL de infusión de té en 100 mL de agua desionizada. La administración de tratamientos fue mediante una micropipeta y una sonda para catéter. Se colocó la sonda en la cavidad bucal, localizada en el cefalotórax del camarón y se administró lentamente el tratamiento. Cuidadosamente se devolvió cada camarón inoculado a su correspondiente acuario.

Cada tratamiento contó con un control negativo, libre de NHPB y otro solo con nanopartículas. El experimento se siguió por un periodo de 24 días a partir de la administración de los tratamientos y se realizaron muestreos de dos camarones por acuario a los 12 y 24 días (Tabla 3). Los camarones se sacrificaron mediante hipotermia para reducir su metabolismo e inmediatamente después fueron procesados. Los tratamientos de 35 y 0 solo representan dos acuarios, debido a fallas técnicas con la electricidad, murieron los animales de dos acuarios.

Tabla 3. Camarones infectados con NHPB y con nanopartículas de plata, NpAg. Siete camarones de 35  $\mu\text{g}$  permanecieron vivos al final de los 24 días, n = 55.

Concentración de nanopartículas ( $\mu\text{g}$ )	Camarones NHPB por acuario	Muestreo 12 días PCR e histológico	Muestreo a 24 días PCR e histológico	Camarones testigos NpAg
	7	2	2	
35	8	2	2	6
	-	-	-	
	4	2	1	
5	5	2	1	4
	6	2	1	
	6	2	1	
0	6	2	2	3
	-	-	-	
Total	42	14	10	13

#### **V.3.4. Análisis Histológico y PCR**

Se disectaron los organismos muestreados realizando un corte en la primera espina rostral y después se tomó una sección de 3 y 5 mm de grosor y se colocó en casetes para histología en solución Davidson. Alternamente se tomó una pequeña sección del hepatopáncreas y se colocó en tubos de 1.5 mL con alcohol al 96 % para PCR con la metodología ya descrita anteriormente. El organismo disectado restante fue almacenado a -20 °C. Posteriormente se realizó la deshidratación de la muestra mediante alcoholes graduales 70% a 96%, xileno:alcohol y parafina; se realizaron cortes histológicos a 5 µm de espesor y se realizó la tinción Hematoxilina Eosina (Anexo II). Se valoró la infección del tejido del hepatopáncreas basándose en Lightner y Pantoja (2003) y del Río-Rodríguez *et al.* (2006), la cual consistió en cuatro tipos de severidad en el epitelio del hepatopáncreas: sin daño; daño ligero (+); moderado (++) y daño severo (+++).

#### **V.3.5. Determinación de metabolitos hepatopancreáticos**

Para la evaluación de la concentración de los metabolitos se siguió el protocolo de Galvan-Alvarez *et al.* (2012) a los camarones infectados con NHPB y los tratados con 5 y 35 µg de NpAg y se contrastaron con un blanco. Para el análisis, una porción del hepatopáncreas se pesó en una balanza analítica, posteriormente se colocó el tejido en un tubo de 1.5 mL debidamente etiquetado. Después, de acuerdo al peso del hepatopáncreas se agregó su equivalente en µL de solución A (100 mM Buffer PBS, pH 7.2, 0.5 mM EDTA) y dos volúmenes (p/v) de cloroformo-metanol (1:1) y se centrifugó a 15,000 x g por 15 minutos.

Mediante el centrifugado se identificó la fase acuosa (Fig. 6) la cual se utilizó para cuantificar los niveles de glucosa, glucógeno y proteína total. La fase de solventes conteniendo el cloroformo se recolectó y se secó al aire durante 12 h en condiciones de obscuridad total a temperatura ambiente (25 °C), posteriormente se homogenizó con un volumen correspondiente con agua destilada y se utilizó para la cuantificación de lípidos totales, acilglicéridos y esteroides.



Figura 6.- Fases del centrifugado de hepatopáncreas de camarón en fase acuosa donde se encuentra la glucosa y la proteína total y fase de solventes donde se encuentran los lípidos totales, acilglicéridos y esteroides.

La determinación de lípidos totales se realizó mediante la adición de 10  $\mu\text{L}$  de cada muestra en un tubo de 0.7 mL y se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ). Las muestras se

incubaron a 95  $^\circ\text{C}$  durante 5 minutos. Finalmente, el volumen total de cada tubo se transfirió a una microplaca de 96 pozos de 300  $\mu\text{L}$  y se les adicionaron 150  $\mu\text{L}$  de reactivo RANDOX, se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente y se utilizaron para la cuantificación. Por otra parte para cuantificar el glucógeno se realizó una hidrólisis ácida, homogenizando la muestra de hepatopáncreas en agua destilada (1:1), posteriormente a la mezcla se le agregó HCl 2M (2:1) y se mantuvo 2 h a 95  $^\circ\text{C}$ , después se ajustó el pH a 7.0 con NaOH.

Las reacciones para la cuantificación de cada uno de los metabolitos se realizaron transfiriendo 10  $\mu\text{L}$  de cada muestra al fondo del pozo de una microplaca de 96 pozos de 300  $\mu\text{L}$ , y se agregaron 250  $\mu\text{L}$  del reactivo correspondiente RANDOX para cada metabolito. A continuación, las muestras se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se analizaron a la longitud de onda recomendada de cada metabolito (Tabla 2) en

un lector de microplacas Synergy (Bio-Tek Instruments) de acuerdo a la metodología propuesta por Sánchez-Paz *et al.* (2007).

Tabla 4.- Relación de longitudes de onda (nm) y coloración resultante de la reacción colorimétrica para la evaluación de la concentración de cada metabolito (Sánchez-Paz *et al.*, 2007).

<b>Metabolito</b>	<b>Longitud de onda (nm)</b>	<b>Coloración resultante</b>
Glucosa	500	Rojo-Violeta
Lactato	505	Violeta
Acilglicéridos	500	Violeta
Esteroles	500	Rosa
Proteínas totales	550	Violeta
Lípidos totales	540	Rosa

Los datos fueron analizados mediante un paquete estadístico Sigma-Plot V.12.0. A las concentraciones de metabolitos registradas se les aplicó análisis de varianza de una vía, en caso de no cumplir con normalidad y varianzas iguales se realizó el análisis de Kruskal-Wallis además también se realizaron análisis *a posteriori* de Tukey. Los datos con valores de  $P < 0.05$  fueron considerados con diferencias estadísticamente significativas.

## VI. RESULTADOS

### VI.1. Caracterización de Nanopartículas

Al entrar en contacto el extracto de los vegetales con el nitrato de plata, se observó rápidamente un cambio en la coloración, de tal manera que al cabo de una hora el color de la solución cambió de transparente a color amarillo oscuro con cada solución, lo cual indicó una reacción positiva (Fig.7).

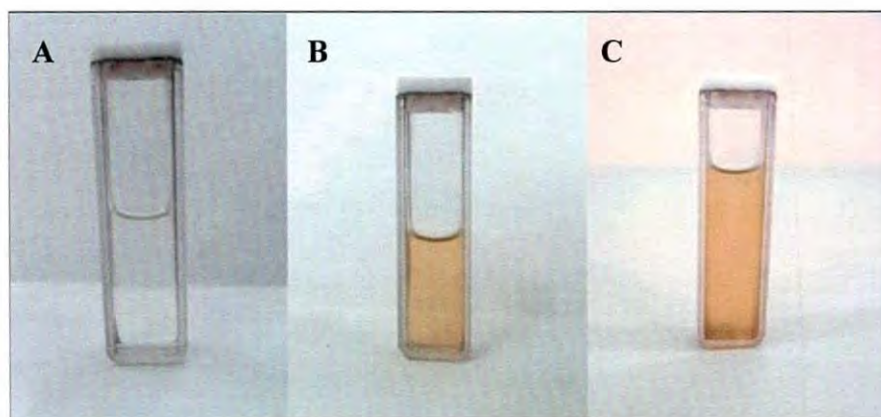


Figura 7.- A) Coloración de la reacción de la solución de Nitrato de plata. B), después de 60 min de reacción con extracto de *Azadirachta indica* (neem) e igual con C) *Camellia sinensis* (té verde).

La solución de reacción de *Camellia sinensis* en contacto con el nitrato de plata registró, mediante espectrofotometría UV-vis, un pico de absorción de 390 nm entre 5 a 55 min y otro pico más pronunciado para el mismo tiempo a los 440 nm. En contraste, el control de  $\text{AgNO}_3$  no presentó ningún pico de absorción (Fig. 8).

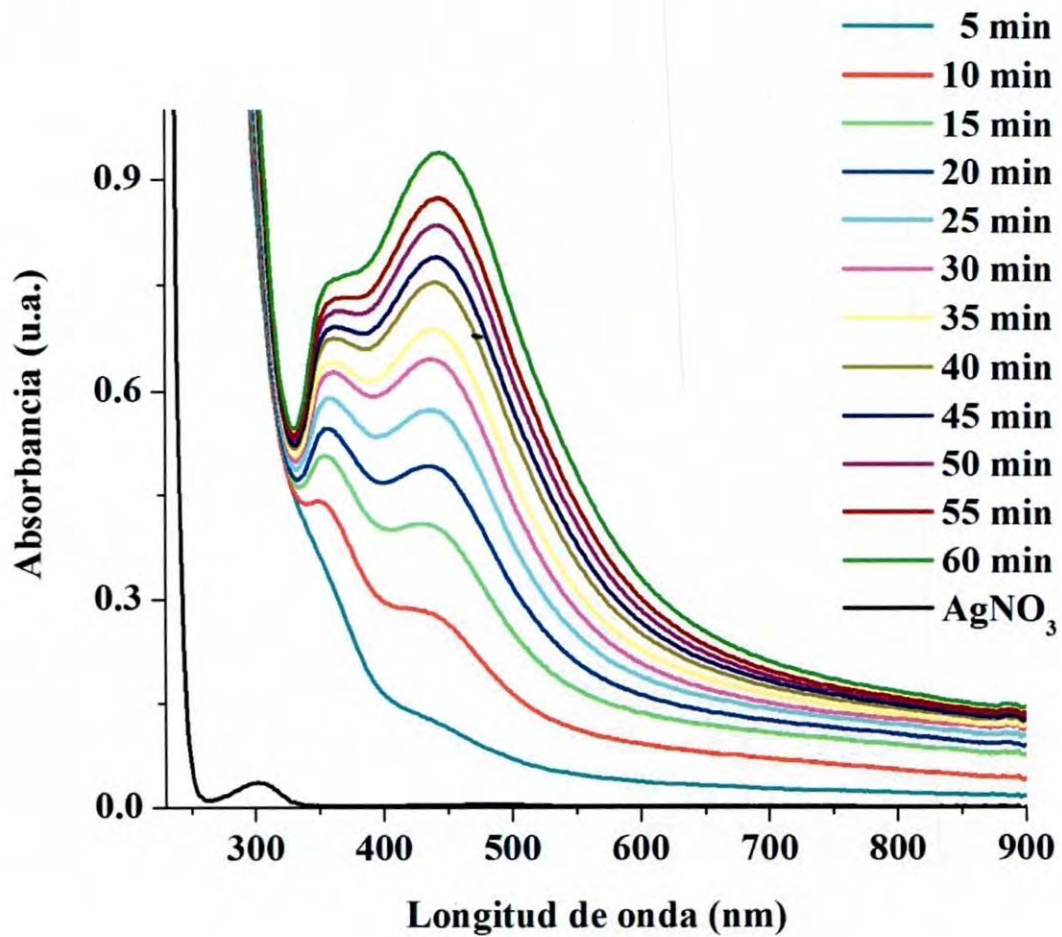


Figura 8. Espectro de absorción de Ag en reducción mediante extracto de *Camellia sinensis* (té verde).

La solución de reacción de *Azadiractha indica* en contacto con el nitrato de plata, registró mediante espectrofotometría UV-vis, un pico de absorción de 440 nm entre 5 a 55 min. El control de AgNO<sub>3</sub> no presentó ningún pico de absorción (Fig. 9).



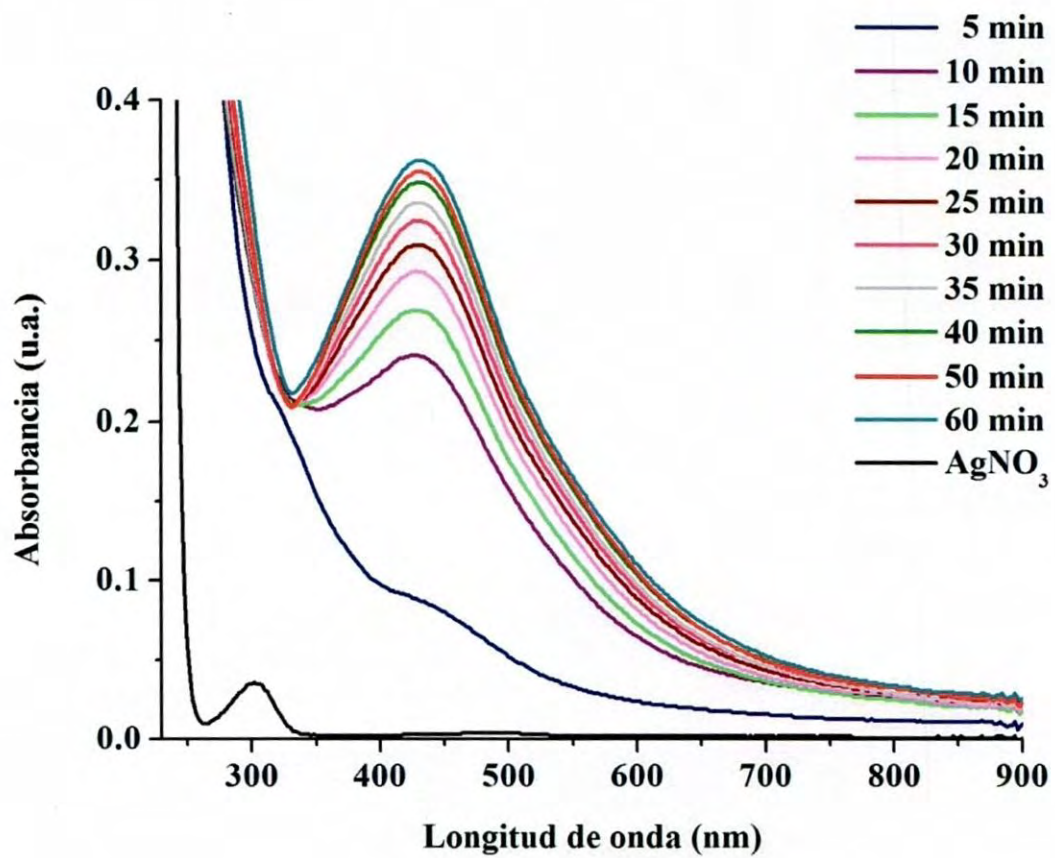


Figura 9. Espectro de absorción de Ag en reducción mediante *Azadiractha indica* (neem).

## VI.2. Microscopía electrónica de transmisión

### VI.2.1. Caracterización de nanopartículas mediante *Camellia sinensis*

De la lectura en el SEM, a los 120 min de reacción, se observaron formas principalmente polihédricas, semiesféricas, aplanadas y algunas formas de nanoalambres (Fig. 10).

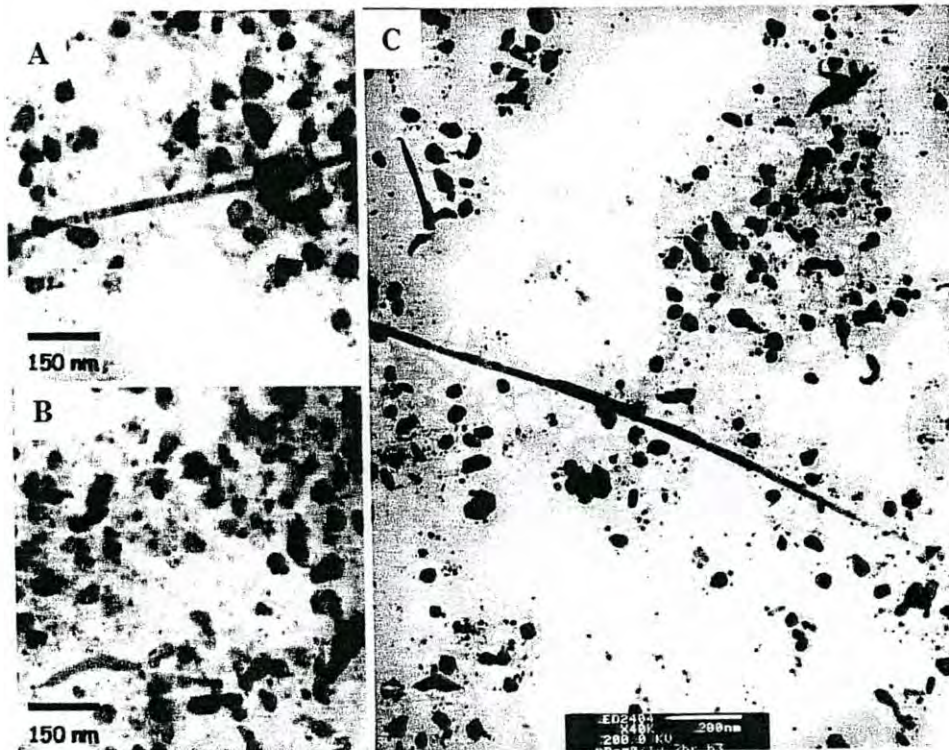


Figura 10.- Nanopartículas de Ag caracterizadas al Microscopio Electrónico de Transmisión a los 120 min sintetizadas mediante *Camellia sinensis* (té verde) a partir de  $\text{AgNO}_3$ . (A, B y C).

A los 120 min, el tamaño de las nanopartículas estuvo entre 7.4 y 68.8 nm con promedio de  $29.67 \pm 14.17$  nm, el 29 % fue de 13.1 a 20.8 con promedio de  $16.60 \pm 2.02$  nm y el 20 % fue de 37.05 a 44.03 con promedio de  $40.56 \pm 1.88$  (Fig. 11). Estos resultados indicaron que a los 120 minutos se observaron tamaños distribuidos entre el rango detectado.

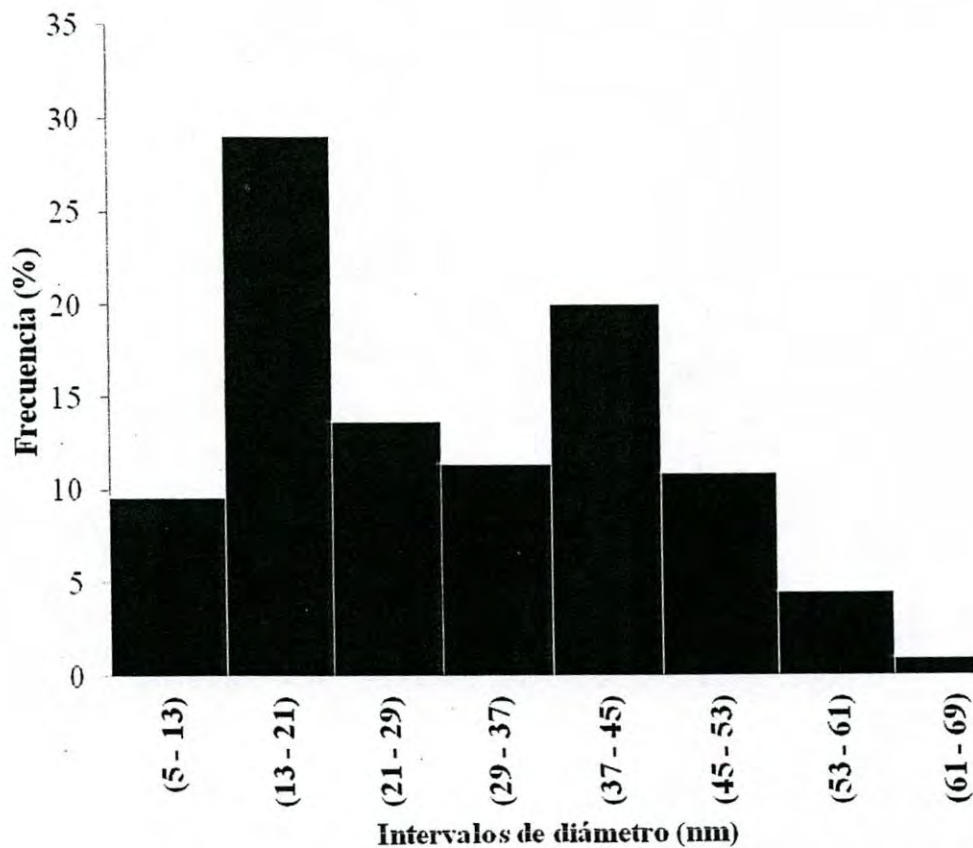


Figura 11.- Histograma de frecuencias de tamaño de las nanopartículas de Ag sintetizadas mediante infusión de *Camellia sinensis* (té verde) a los 120 min de reacción (n = 220).

### VI.2.2. Caracterización de nanopartículas de *Azadirachta indica*

Las nanopartículas de plata mediante microscopía electrónica, mostraron formas polihédricas semiesféricas y aplanadas a los 120 min de reacción (Fig. 12).

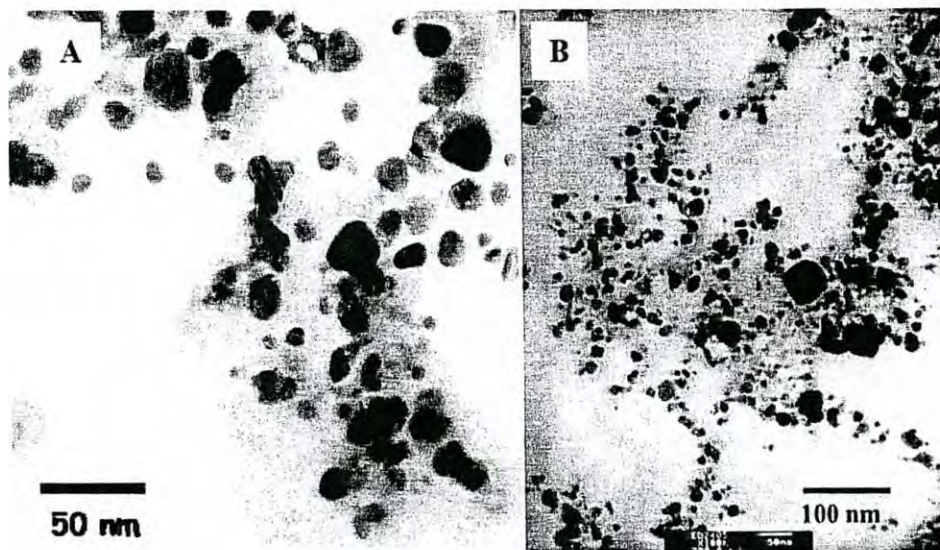


Figura 12.- Nanopartículas de Ag caracterizadas al Microscopio Electrónico de Transmisión a los 120 min (A y B). Sintetizadas mediante *Azadirachta indica* (neem) a partir de  $\text{AgNO}_3$ .

El tamaño de nanopartículas se encontró entre 5 y 45 nm con un promedio de  $14.84 \pm 5.81$  nm, mientras que el 84.65 % de las nanopartículas se encontró entre los 5 y 21 nm con promedio de  $13.01 \pm 3.71$  nm, las nanopartículas presentaron una forma monodispersa por el alto porcentaje del mismo tamaño (Fig. 13).

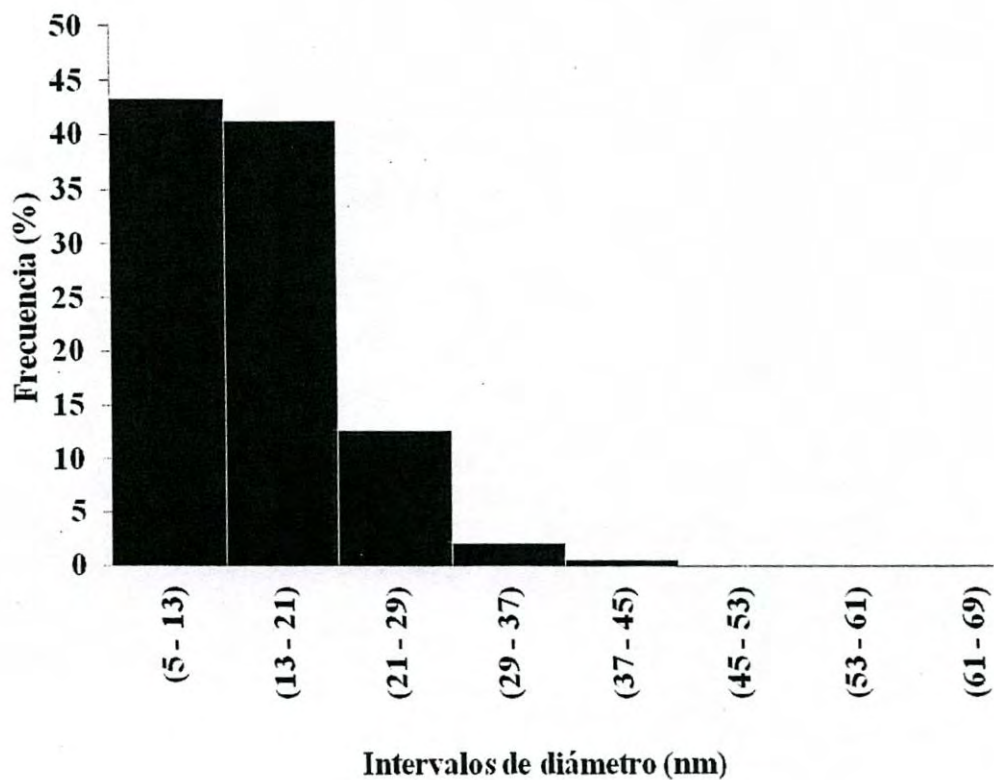


Figura 13.- Histograma de frecuencias relativas de nanopartículas de Ag sintetizadas mediante infusión *Azadiractha indica* (neem) a los 120 min de reacción. (n = 189).

### VI.3. Detección de NHPB mediante PCR

Los organismos analizados en la granja A indicaron una prevalencia del 17 % a Hepatopancreatitis necrotizante (NHPB) con un total de 5 camarones infectados de 30 en la muestra. Por otra parte la granja B Resultó negativa para NHPB. En la imagen de la electroforesis se amplificó un producto de PCR de 440 pb correspondiente al producto esperado de NHPB (Fig. 14).

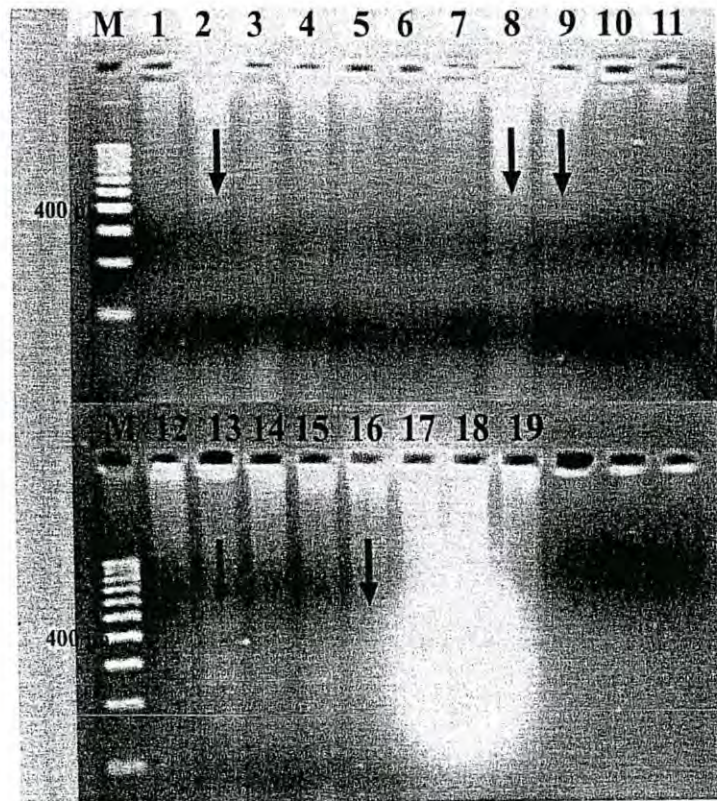


Figura 14.- Electroforesis de gel de agarosa con productos de PCR, 5 individuos positivos a NHPB en la granja A muestran la banda esperada de 440 pb. M= esala de 100 bases

Los organismos de cada granja analizados para detectar la presencia del virus de la mancha blanca (WSSV) demostraron una prevalencia del 23 % en la granja A mientras que en la B hubo 62 % de prevalencia (Fig. 15).

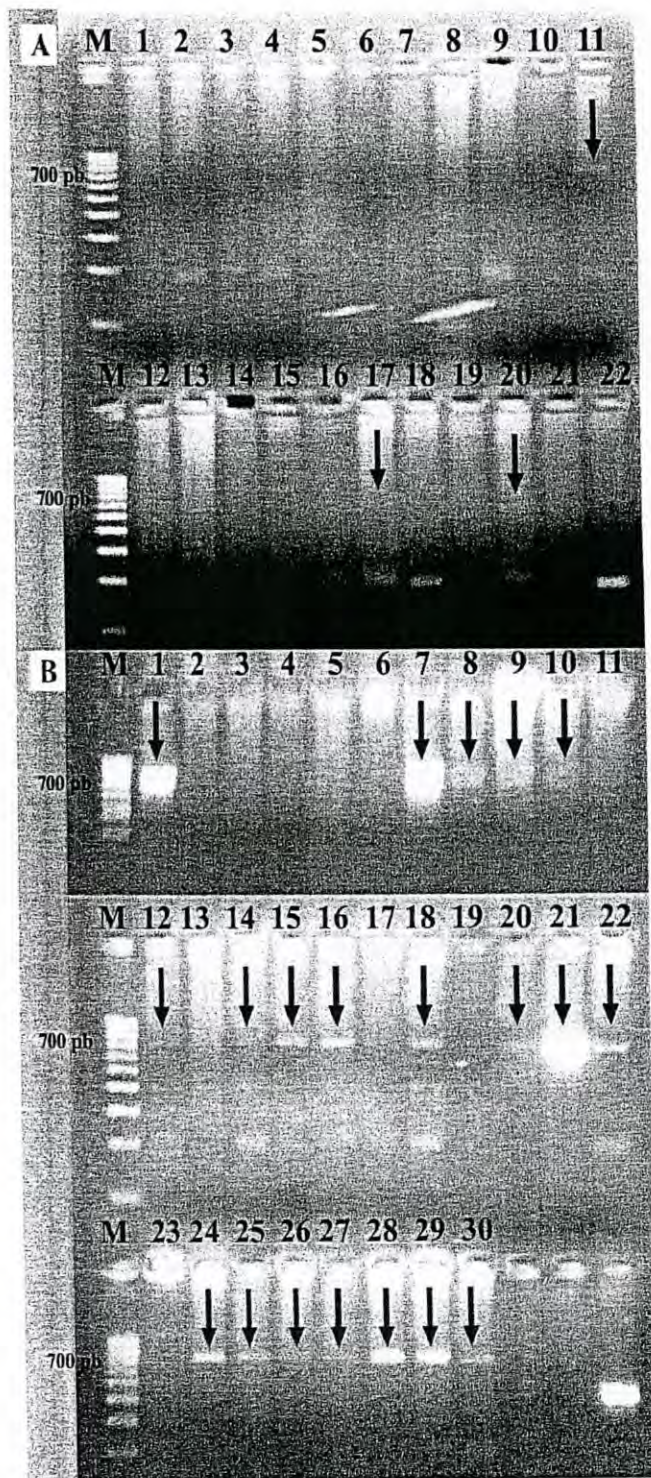


Figura 15.- Electroforesis de gel de agarosa con productos de PCR positivo a WSSV, tres individuos infectados en la granja A, y 20 en la granja B. Ambos mostraron un tamaño de banda de 701 pb. M = escalera de 100 bases

#### VI.4. Análisis Histológico

Los cortes histológicos de los camarones de las granjas A y B mostraron tener las características típicas de lesión en el tejido del hepatopáncreas. Los túbulos del hepatopáncreas se encontraron adelgazados con hipertrofia y constricciones. También se identificaron inclusiones de hemocitos y nódulos bacterianos (Fig. 16).

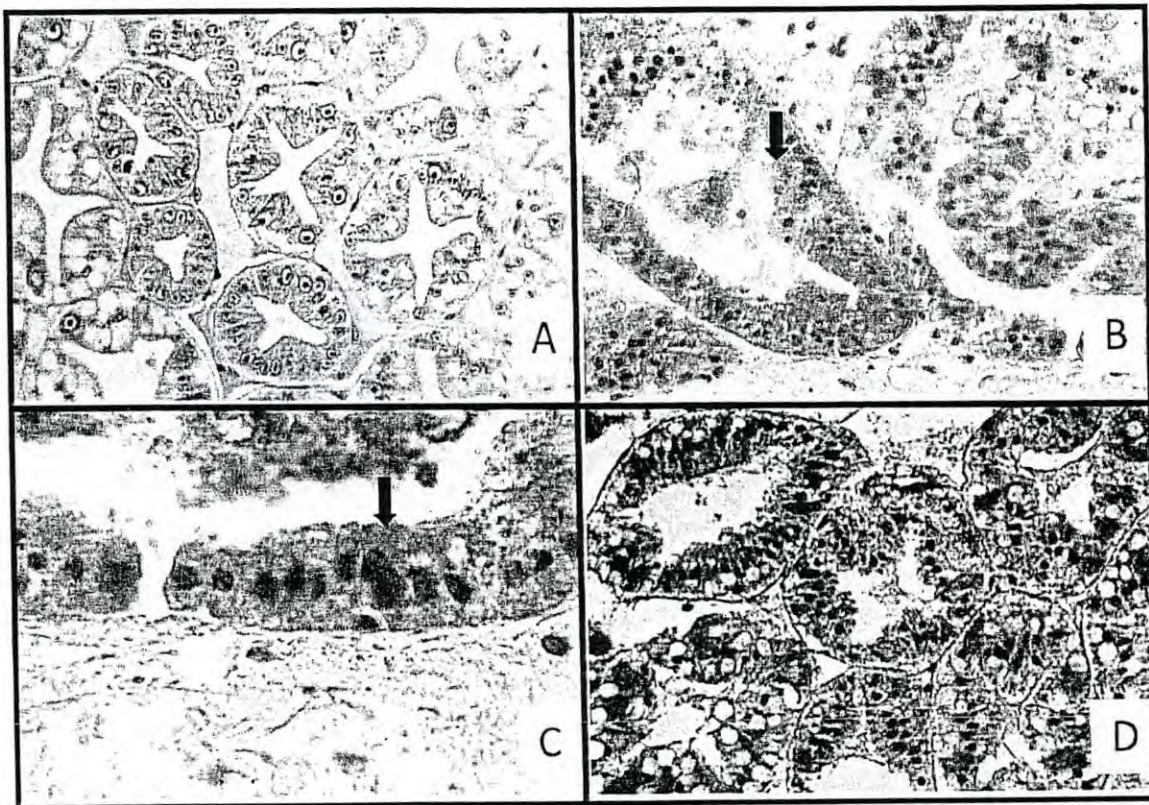


Figura 16.- Corte histológico de hepatopáncreas, H&E. (A) aumento a 10X de hepatopáncreas sano; (B) aumento 40 X de los túbulos con células hipertrofiadas de camarón con NHPB; (C) aumento a 100 x de células hepatopancreáticas atrofiadas y núcleos expandidos. D) camarón infectado con WSSV. Las flechas indican las zonas necrosadas e hipertrofiadas.



### VI.5. Reactivación del inóculo

El análisis molecular de los organismos infectados ( $n = 8$ ) con fines para la reactivación del inóculo fue positivo presentando una banda en 440 pb de acuerdo con el control positivo (Fig. 17). Además, los camarones infectados con NHPB presentaron una mortalidad del 50 % a los 30 días de post-infección.

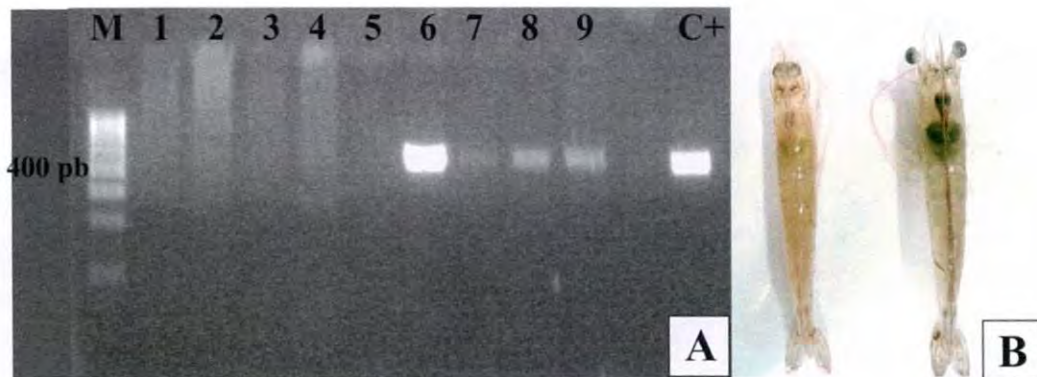


Figura 17.- A) Electroforesis de gel de agarosa con productos de PCR positivo a NHPB en la región de 440 pb. El signo + se refiere al control positivo. M = escalera de 100 bases. B) apreciación en el camarón con infección severa de NHPB (izquierdo) y NHPB leve (derecho).

### VI.6. Experimental

La mortalidad de los organismos infectados con NHPB, sometidos al tratamiento con 35  $\mu\text{g}$  de nanopartículas de Ag fue del 0 %, mientras que los camarones con el tratamiento de 5  $\mu\text{g}$  de Np de Ag presentaron mortalidad del 40 %. Los organismos sin nanopartículas, pero con la infección tuvieron mortalidad del 41 % (Tabla 3).

Tabla 5. Supervivencia y mortalidad de camarones con 0, 5 y 35  $\mu\text{g}$  de nanopartículas de plata.

Tratamiento ( $\mu\text{g}$ )	Réplica	Organismos experimentales	Organismos muertos	Porcentaje de organismos muertos
35	1	7	0	0
	2	8	0	
	<b>total</b>	<b>15</b>	<b>0</b>	
5	1	5	2	40
	2	6	3	
	3	4	1	
	<b>total</b>	<b>15</b>	<b>6</b>	
0	1	6	3	42
	2	6	2	
	<b>total</b>	<b>12</b>	<b>5</b>	

Los camarones del bioensayo y que fueron infectados con NHPB tuvieron un éxito de infección del 100 %, lo cual se observó mediante el análisis molecular y el tamaño de banda de 440 pb y el control positivo en NHPB (Fig. 18). Todos los camarones sin nanopartículas de plata e infectados con la bacteria se muestran en el carril 1 - 7 y fueron positivos. Los camarones tratados con 5  $\mu\text{g}$  se encuentran en el carril del 8-16, también fueron positivos a la bacteria así como los tratados con 35  $\mu\text{g}$  en el carril 17 - 24.



Figura 18.- Organismos infectados con NHPB. Los camarones individuales sin nanopartículas de plata se encuentran en el carril 1-7; los tratados con 5  $\mu$ g se encuentran en el carril del 8-16 y los tratados con 35  $\mu$ g de nanopartículas se encuentran en el carril 17-24. M = escalera de 100 pb. + = control positivo de NHPB.

### VI.7. Análisis Histológico

A los 12 días de tratamiento se observaron numerosos nódulos bacterianos en el tejido hepatopancreático en los camarones del tratamiento de 5  $\mu$ g, lo cual coincide con los resultados positivos a la bacteria, analizados por la PCR. Los túbulos se encontraron ligeramente retraídos y con aparentes inclusiones bacterianas (Figura 19 A). Por otra parte a los 24 días de tratamiento se observó hipertrofia severa del tejido del hepatopáncreas y presencia de nódulos bacterianos (Fig. 19 B, C), lo cual coincidió con los resultados positivos de la PCR. El tejido epitelial de los túbulos del órgano, se observó severamente afectado si se compara con una imagen de tejido sano (Fig. 19D).

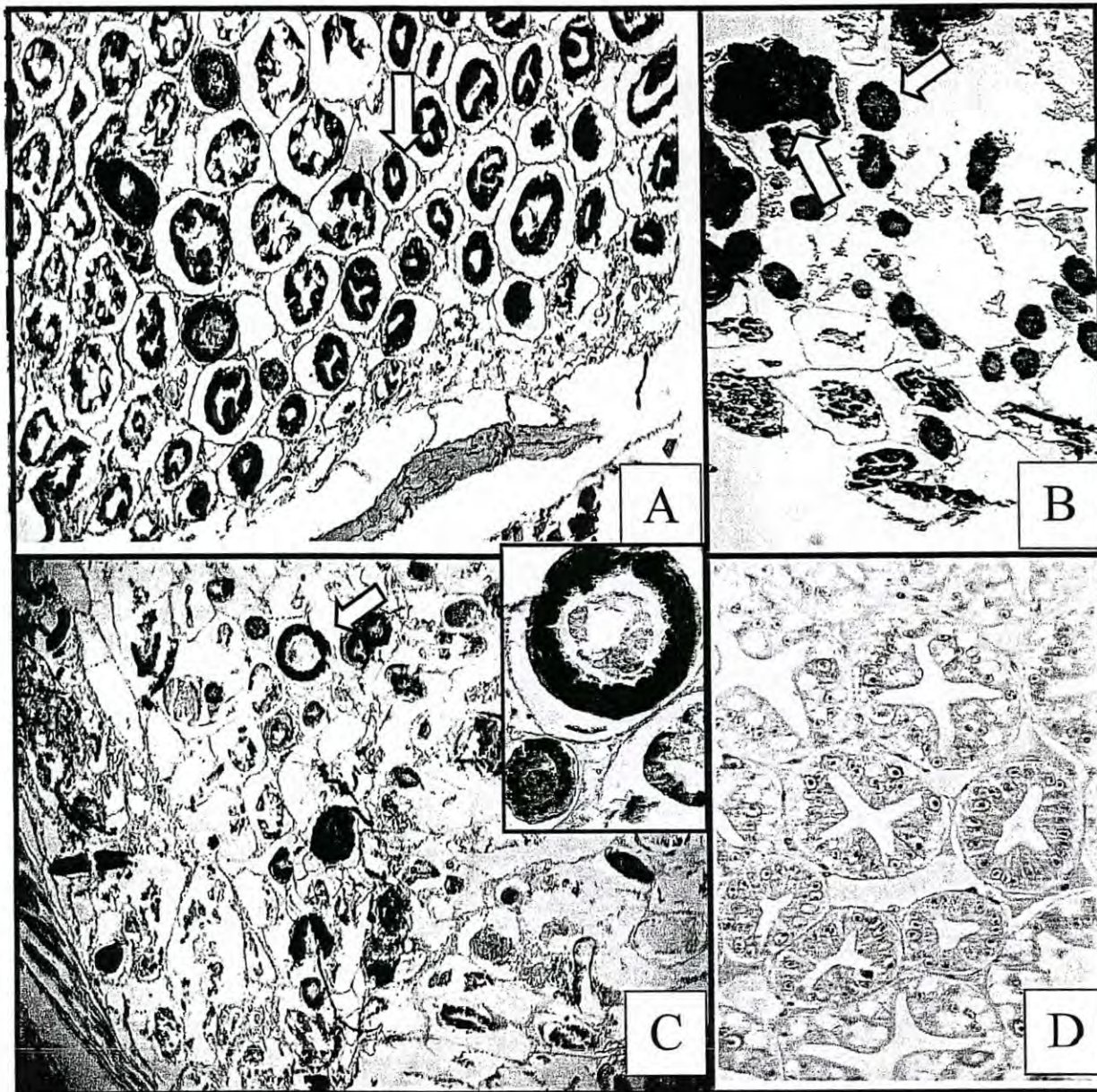


Figura 19. Cortes histológicos de hepatopáncreas para el tratamiento de 5  $\mu$ g, 10X. A) Tejido con severa necrosis en los túbulos. A los 12 días post-tratamiento. B y C) Túbulos severamente hipertrofiados con numerosos nódulos bacterianos a los 24 días post-tratamiento. Aumento. En el recuadro se muestra el nódulo bacteriano a 40 X y D) Tejido sano a 40 X.

En el tratamiento de 35  $\mu\text{g}$  de nanopartículas de plata a los 12 y 24 días post-tratamiento, el tejido de hepatopáncreas de los camarones se observó dañado con severa vacuolización en el epitelio y con indicios de infección (Fig. 20 A y B). Los tejidos del hepatopáncreas correspondientes a camarones con 0  $\mu\text{g}$  de Nanopartículas, demostraron una severa infección a los 12 y 24 días post-tratamiento. Se observaron gran cantidad de nódulos bacterianos en el tejido, además los túbulos del hepatopáncreas se encontraron severamente atrofiados (Fig. 21).

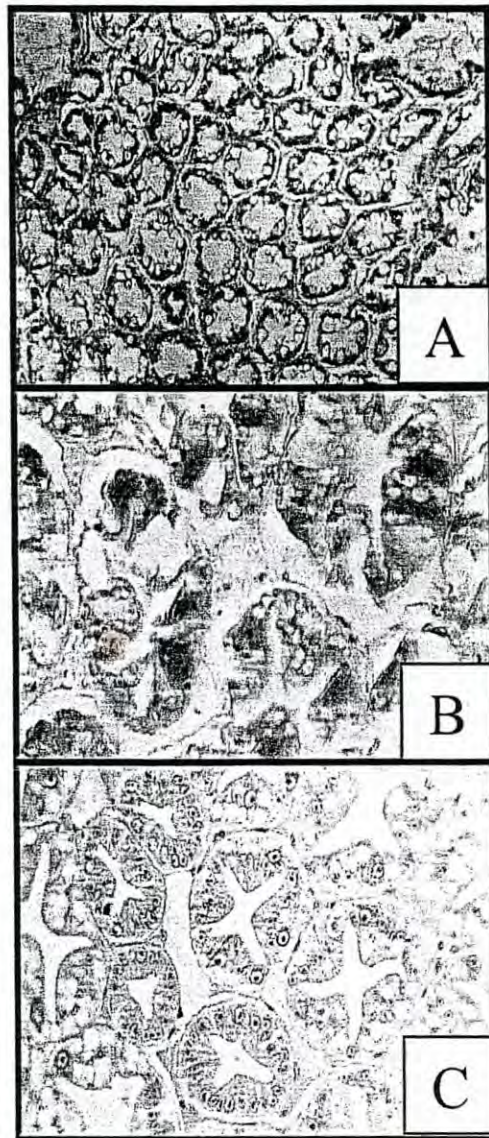


Figura 20.- Cortes histológicos de hepatopáncreas para el tratamiento de 35  $\mu\text{g}$ . A) tejido con ligero adelgazamiento de los túbulos a los 12 días post-tratamiento. Aumento 10X. B) Tejido con pérdida de estructura a los 24 días post-tratamiento. Aumento 40X. C) tejido sano. Aumento 40 X.

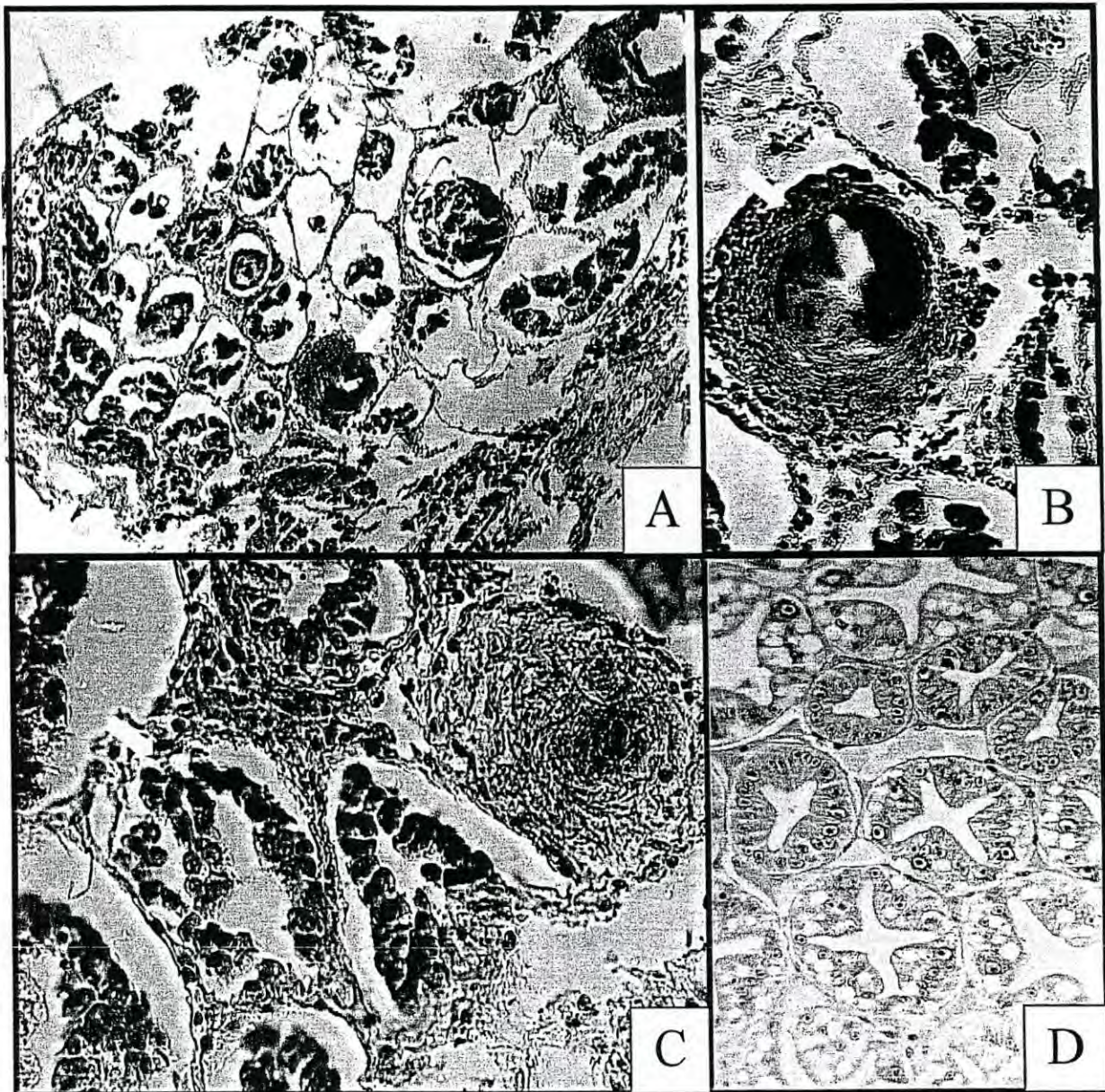


Figura 21.- Corte histológico de hepatopáncreas para los organismos positivos a NHPB sin ningún tratamiento ( $0 \mu\text{g}$  de nanopartículas). A) y B) Tejido con severa necrosis. A los 12 días de muestreo. Aumento 10 X. B) nódulo bacteriano. Aumento 40 X. C) células hepatopancreáticas atrofiadas e infiltración hemocitaria. A los 24 días de muestreo. Aumento 40 X. D) Tejido sano. Aumento 10X.

El tratamiento de 5  $\mu\text{g}$  de nanopartículas de plata, presentó lesiones severas en el tejido a los 12 y 24 días. El tratamiento de 35  $\mu\text{g}$  demostró que la infección a partir de los 12 días de tratamiento fue ligera con pocos nódulos bacterianos. En los organismos con 0  $\mu\text{g}$  y los tratados con 5  $\mu\text{g}$  de nanopartículas se observó infección severa en el hepatopáncreas a los 12 y 24 días post-infección (Tabla 6). El resultado del análisis indicó necrosis severa y presencia de bacterias en el tejido para los organismos sin nanopartículas y los tratados con 5  $\mu\text{g}$  Np de Ag. Mientras que los tratados con 35  $\mu\text{g}$  NP de Ag presentaron solamente lesiones estructurales en el tejido y leve presencia de bacterias.

Tabla 6.- Severidad histológica de la infección en los organismos sometidos al bioensayo con dos concentraciones de nanopartículas de plata. El nivel de daño estructural y presencia de nódulos bacterianos en el hepatopáncreas se encuentra representado como daño moderado ++ y severo +++.

Días post-tratamiento	Concentración de nanopartículas		
	NHPB	NHPB	NHPB
	0 ( $\mu\text{g}$ )	5 ( $\mu\text{g}$ )	35 ( $\mu\text{g}$ )
12	+++	+++	++
24	+++	+++	++

#### VI.8. Determinación de metabolitos en hepatopaneas

Entre los organismos sujetos al experimento durante 12 y 24 días post-tratamiento, el análisis estadístico de los componentes bioquímicos analizados no presentaron diferencias significativas en proteína total ( $p = 0.225$ ), acilglicéridos ( $p = 0.174$ ), lípidos totales ( $p = 0.166$ ), glucosa ( $p = 0.225$ ) y glucógeno ( $p = 0.270$ ). Esto indicó que no hubo evidencia suficiente para comprobar que los niveles de los componentes bioquímicos se vieron afectados por el efecto de la infección y de las diferentes concentraciones de nanopartículas en camarones infectados y sanos (Figs. 22-26).

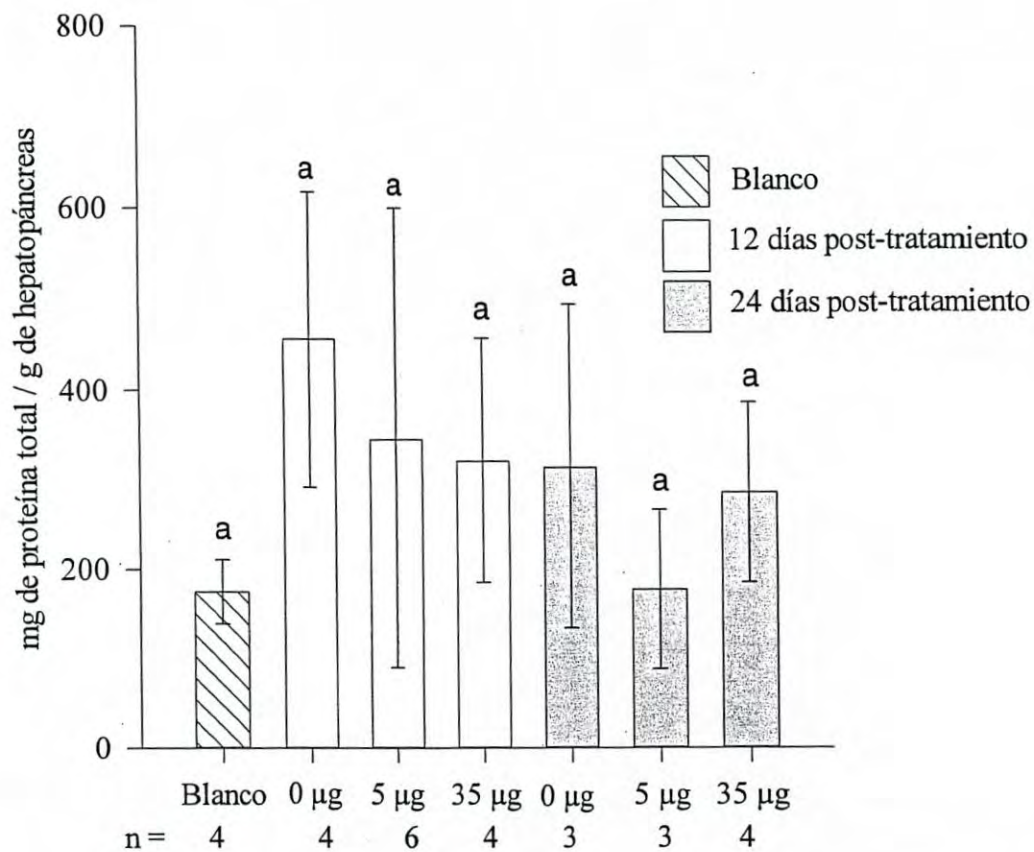


Figura 22.- Concentración promedio de proteína total en hepatopáncreas de camarón a diferentes concentraciones de nanopartículas. Blanco representan a camarones sanos.



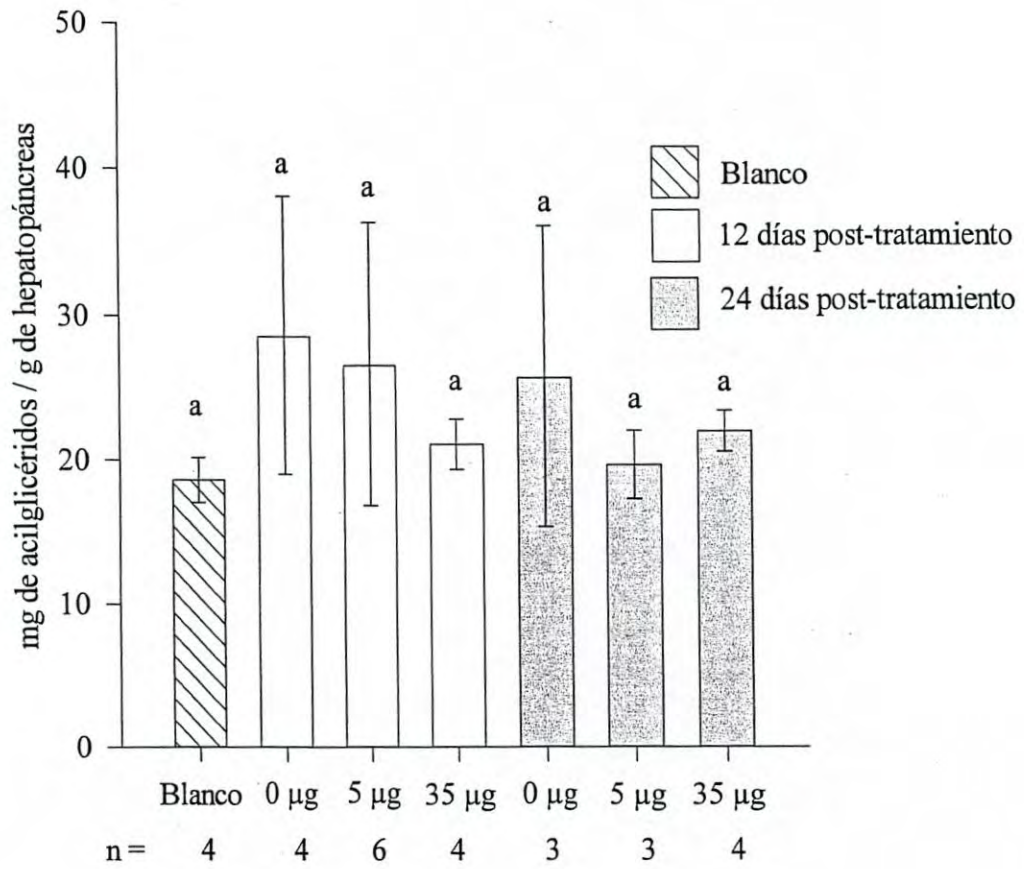


Figura 23.- Concentración promedio de acilglicéridos en hepatopáncreas de camarón a diferentes concentraciones de nanopartículas. Blanco representa a los camarones sanos.

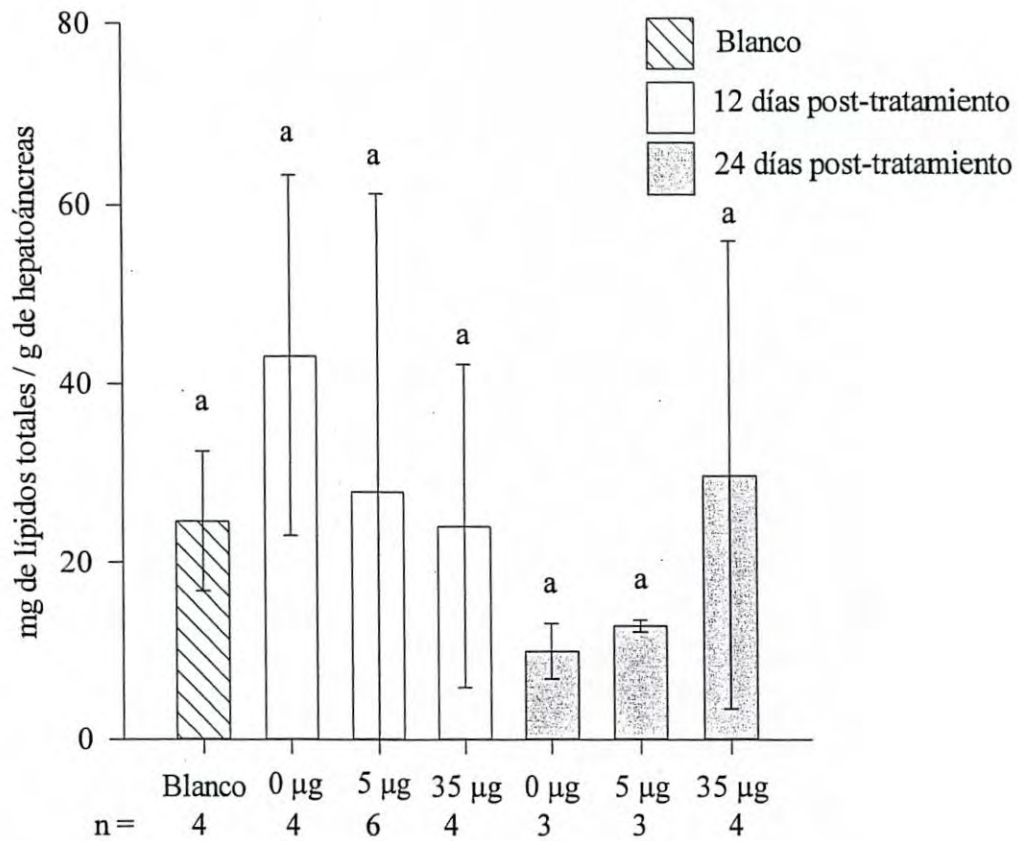


Figura 24.- Concentración promedio de lípidos totales en hepatopáncreas de camarón a diferentes concentraciones de nanopartículas. Blanco representan a organismos sanos.

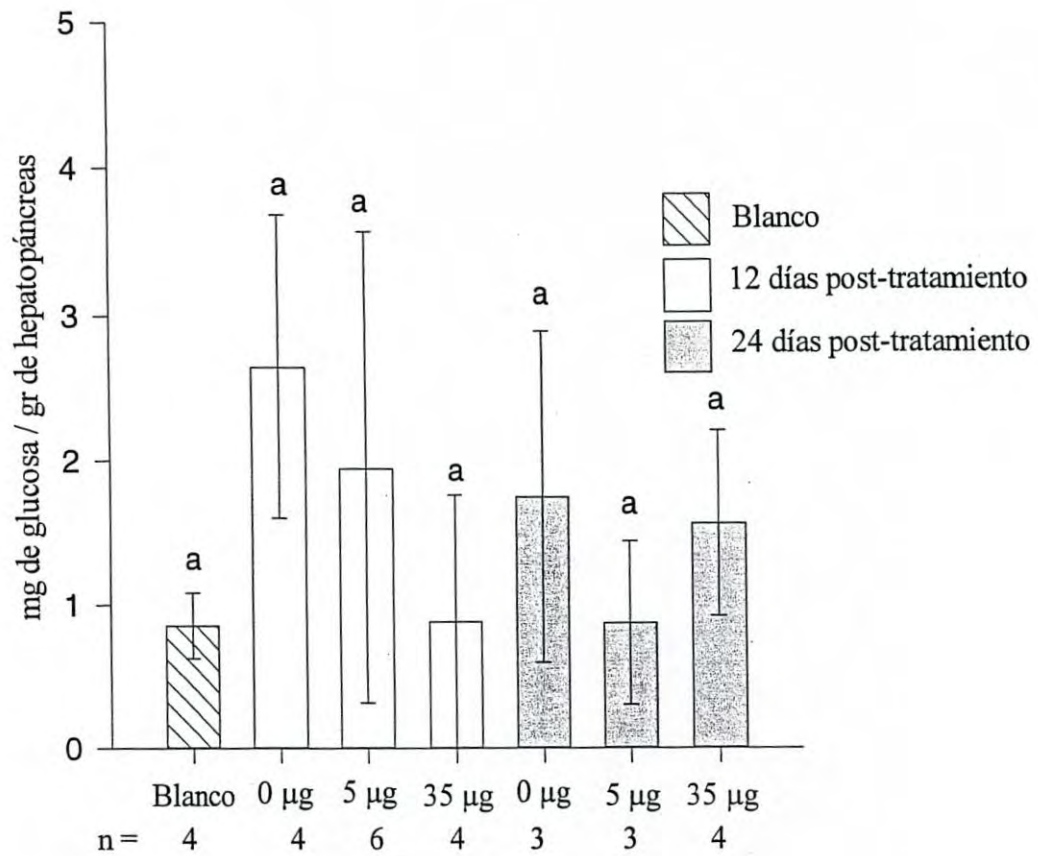


Figura 25.- Concentración promedio de glucosa en hepatopáncreas de camarón a diferentes concentraciones de nanopartículas. Blanco representan a organismos sanos.

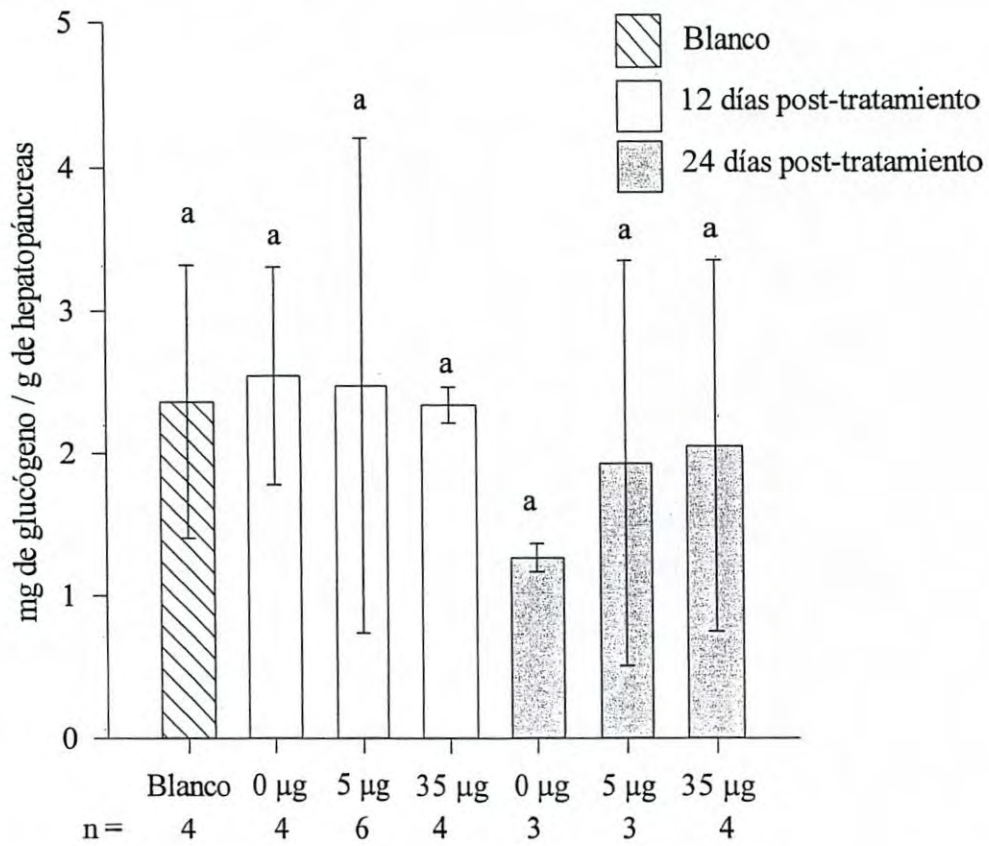


Figura 26.- Concentración promedio de glucógeno en hepatopáncreas de camarón a diferentes concentraciones de nanopartículas. Blanco representan a organismos sanos.

Sin embargo, la concentración de esteroides indicó que a los 12 y 24 días post-tratamiento se encontraron diferencias significativas ( $p = 0.017$ ). Esta diferencia se vio reflejada entre los organismos con 0  $\mu\text{g}$  y los tratados con 35  $\mu\text{g}$  a los 12 y 24 días post-tratamiento (Fig. 27). Los camarones del grupo blanco no mostraron diferencias con los correspondientes a los tratamientos de 5 y 35  $\mu\text{g}$  durante todo el experimento.

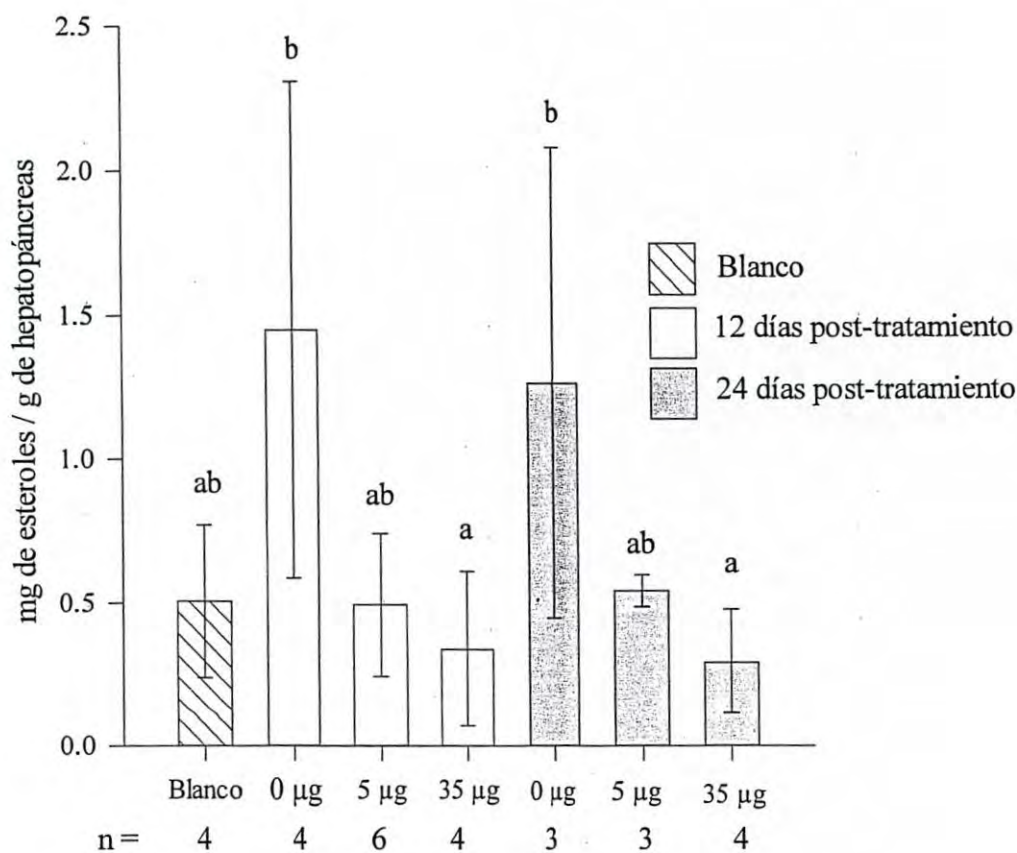


Figura 27.- Concentración promedio de esteroides en hepatopáncreas de camarón a diferentes concentraciones de nanopartículas. Blanco representan a organismos sanos.

## VII. DISCUSIÓN

Se sintetizaron exitosamente nanopartículas de plata a partir de extracto de hojas de té verde y de neem. La síntesis fue de manera rápida, práctica y económica en comparación de otras técnicas tales como químicas y físicas (Guzmán *et al.*, 2009; Poole y Owens, 2007). Sin embargo, se obtuvieron diferencias en cuanto a la forma y la dispersión en comparación con lo obtenido por Vasseharan *et al.*, (2010) y Gavhane *et al.*, (2012). Además, los tiempos de síntesis fueron de dos horas disminuyendo el tiempo de reacción. La plata, al igual que otros metales, posee características ópticas diferentes. Al encontrarse en tamaño nanométrico y entrar en contacto con las hojas de té, la reacción de la síntesis comienza, debido a eso la coloración de la solución cambia por la presencia de nanopartículas (Ankanaa *et al.*, 2010). Al implementar el extracto de té verde como agente reductor arrojó en el espectro de absorción dos picos, el de 390 y el de 440 nm. La amplitud del pico de absorción (SPR) fue muy marcada, esto debido a que los picos inespecíficos pueden indicar un incremento en la polidispersión (Chung y Tarng; 2010. Kamal *et al.*, 2010). Dicha polidispersión se confirmó con lo obtenido en el microscopio electrónico de transmisión donde las tallas de nanopartículas de plata fueron muy dispersas entre sí. En contraste, Chung y Tarng (2010) encontraron un comportamiento similar al sintetizar nanopartículas de plata con altas concentraciones del agente precursor.

El espectro de absorción obtenido al utilizar extracto de neem como agente reductor arrojó un solo pico de absorción a los 440 nm, se cotejó lo obtenido con Thirumurugan *et al.* (2011) y se obtuvo una absorción similar en 445 nm. Por otra parte, a diferencia de Gavhane *et al.* (2012) el plasmón de resonancia fue más definido y estrecho indicando mayor monodispersión. Al comparar lo obtenido con las imágenes al microscopio electrónico (MET) se comprobó dicha especulación sobre la dispersión de las nanopartículas de plata. El resultado de espectro en esta reacción demostró un crecimiento a través del tiempo de reacción lo que indicó la formación de nuevas nanopartículas y no el aumento de su tamaño (Kamal *et al.*, 2010).

El MET comprobó la formación de nanopartículas. El rango de tamaño utilizando extracto de té verde se encontró entre 7.4 y 68.8 nm  $\pm$  14.17 nm, por otra parte al emplear extracto de neem el rango estuvo entre 4.7 y 37.4  $\pm$  5.84 nm, simplemente comparando los rangos entre sí se pudo deducir que el tamaño de nanopartículas sintetizadas mediante neem fue más reducido que el de té verde. La clasificación de tamaños indicó lo mismo teniendo el 64 % de las nanopartículas en el

rango de 9 a 19 nm en el extracto de neem mientras que en el de té verde fue de 7 a 68 nm con el 87 % de las nanopartículas dentro de este rango. Podemos asumir entonces que con el MET se demostró que mediante el extracto de neem se sintetizaron nanopartículas mayormente monodispersas en tamaño, en contraste con las sintetizadas utilizando extracto de té verde. En comparación con otros trabajos, la polidispersión en los tamaños puede ser un problema que se presenta al aplicar extractos como agentes reductores ya que la aplicación de estos puede llevar a presentar dicha polidispersión (Gavhane *et al.*, 2012; Silva de Hoyos *et al.*, 2012). Sin embargo, es fundamental establecer metodologías más finas para obtener la monodispersión.

Es un hecho que las nanopartículas se sintetizan debido a los agentes reductores presentes en el extracto, como las amina y alcaloides en el extracto de neem (Shukla *et al.*, 2010) y proteínas reductoras y en el té verde (Loo *et al.*, 2012), aunque se desconoce el mecanismo de reducción así como las biomoléculas que actúan en la reducción de la plata, la participación de los grupos amino interactúan con los iones de plata y los reducen (Shukla *et al.*, 2010; Loo *et al.*, 2012).

Ambos extractos de plantas sintetizaron mismas formas de nanopartículas, donde se encontraron partículas esféricas y anisotrópicas; triangulares y aplanadas, semiesféricas y nanoalambres. Aunque no se sabe con certeza las sustancias específicas que dan forma a las nanopartículas se cree que los grupos amino en proteínas participan en la síntesis, por lo que corroborado con lo dicho anteriormente las síntesis pudo llevarse a cabo mediante la acción de dichas biomoléculas reductoras (Shukla *et al.*, 2010; Nagajyoti *et al.*, 2011; Loo *et al.*, 2012).

Aunque no está bien determinado si la actividad antibacteriana depende de la forma de la nanopartícula, se sabe que según ésta tendrá un mecanismo antibacteriano específico, es decir, que las diferentes formas de nanopartículas podrán actuar de manera diferente en las bacterias, pero su el efecto antimicrobiano se dará de cualquier forma (Pal *et al.*, 2007). En este trabajo se encontraron diferentes formas de nanopartículas y se sugiere que en conjunto las formas encontradas podrían propiciar un efecto antibacteriano.

El efecto que tienen las nanopartículas a nivel celular no se encuentra bien dilucidado, sin embargo en bacterias se ha comprobado que los iones de plata afectan sitios sensibles en la reacción de la cadena respiratoria en *Escherichia coli* (Bragg y Rainnie, 1974). Además, se sabe que los iones de plata afectan la membrana celular de bacterias desestabilizándola y comprometiendo su pared celular, de esta manera las nanopartículas pueden entrar al interior de la célula e interactuar con los grupos thiol y fosfato presentes en aminoácidos y ácido nucleicos,

además suprimen la subunidad ribosomal impidiendo la expresión de enzimas útiles en la producción de ATP (Morones *et al.*, 2005; Yamanaka *et al.*, 2005). Todo esto puede explicar el mecanismo de acción de las nanopartículas ya que su efectividad es mayor en comparación con las iones de plata, su superficie de contacto de átomos por unidad de área es mucho más efectiva y al entrar en contacto con NHPB de igual manera podrían haber desestabilizado su membrana y desactivado ciertas reacciones metabólicas y fisiológicas.

Se observó que los camarones utilizados para la propagación de la bacteria presentaron signos clínicos de fácil percepción tales como exoesqueleto blando, reducción en el tamaño del hepatopáncreas y coloración amarillenta de este. También pudieron observarse comportamientos distintos como estado aletargado y nado errático de acuerdo con Morales-Covarrubias (2004), estos signos encajan perfectamente dentro del cuadro de signos de la enfermedad causada por NHPB.

El análisis molecular realizado a los camarones en granja indicó la presencia de la bacteria, sin embargo al discernir entre camarones infectados con NHPB y WSSV se pudo apreciar que algunos poseían ambas enfermedades. Es bien sabido que WSSV es una enfermedad de impactos altamente negativos para la industria acuícola, ya que reduce considerablemente el rendimiento del cultivo, el crecimiento y la sobrevivencia (Esparza-Leal *et al.*, 2007). Sin embargo, estos efectos se pueden ver comprometidos cuando una enfermedad como NHPB afecta el cultivo infectado con WSSV. Estas desventajas ocurren ya que WSVV es un virus que compromete el sistema de respuesta del camarón y da pauta a que bacterias como la causante de la NHPB infecten a los organismos (Maldonado *et al.*, 2004).

Los cortes histológicos de los organismos con NHPB presentaron necrosis severa en el tejido hepatopancreático, los túbulos se encontraron constreñidos y su pared interior adelgazada, se observaron una gran cantidad de nódulos bacterianos e infiltración hemocitaria en el tejido. Estos resultados se comprueban con lo obtenido por del Río-Rodríguez *et al.* (2006). Los camarones tratados con 5 µg nanopartículas de plata reflejaron un daño en el tejido similar a los camarones infectados y sin nanopartículas, donde de igual manera se apreció la necrosis del tejido así como también la presencia de nódulos bacterianos e infiltración hemocitaria. Por otra parte, en los organismos tratados con 35 µg de nanopartículas de plata, se observaron lesiones en el tejido, sin embargo no se detectaron bacterias ni hemocitos que evidenciaran la infección producida por NHPB. Además, el borde de los túbulos se encontró ligeramente adelgazada y la arquitectura del



tejido dañada. Esto nos puede indicar que el tratamiento suprime las bacterias aunque no fue posible saber si lo fueron totalmente.

Aunque los análisis histológicos indicaron que el tratamiento de 35  $\mu\text{g}$  de nanopartículas, mostraron la aparente eliminación de las bacterias, el análisis molecular demostró su presencia. Esto puede deberse a que la bacteria se encontró en cantidades bajas incapaz de infringir daño o estaba muerta y el ADN bacteriano aun presente. La probabilidad de que la plata siga presente en el tejido es amplia. Bianchini *et al.* (2007) reportaron que en *Penaeus duorarum* la acumulación de plata principalmente sucede en el hepatopáncreas y en segundo lugar en hemolinfa, sin embargo en branquias, músculo y pedúnculos oculares, es muy poca la plata que se acumula. En el presente trabajo resulta de gran beneficio que la plata se acumule en el hepatopáncreas ya que es el órgano de ataque de esta bacteria (Lightner *et al.*, 1992), por lo que la mayoría de la plata se encontrará disponible como agente antibacteriano contra de NHPB.

De acuerdo con lo propuesto por Vincent *et al.* (2004) el curso de la enfermedad hipotético de NHPB indica que durante los primeros 20 días la enfermedad se encuentra en desarrollo. En este trabajo se observó un comportamiento normal dentro de los signos clínicos de los camarones cerca de esos días. Después de estos días, la enfermedad entra en un estado de fase aguda y sobreviene con el tiempo la mortalidad y es a partir de los 35 días post infección que la fase crónica comienza. Sin embargo, en los camarones infectados en este experimental la mortalidad natural ocurrió a lo largo del proceso. Además se observó que la fase aguda ocurrió a los 23 días y posteriormente, la crónica a los 56 días de infección.

Los organismos sin nanopartículas presentaron una mortalidad del 41 %, mientras que en los tratados con 5  $\mu\text{g}$  fue similar con 40 % de mortalidad. Esto puede indicar que la concentración de nanopartículas de plata no fue suficiente para contrarrestar la enfermedad, además esto se vio reflejado con lo encontrado en el histológico. Por otra parte a los organismos que se les administraron 35  $\mu\text{g}$  de nanopartículas tuvieron una supervivencia del 100 %, de igual manera este resultado se constató con lo observado en el histológico y que a pesar de que el análisis molecular dio positivo al final del experimental, el tejido se mostró mayormente recuperado en comparación con el primer muestreo. En contraste, Morales-Covarrubias *et al.* (2012) probaron florfenicol y oxitetraciclina en camarones infectados con NHPB, y se observaron una supervivencia desde el 56 al 83 %, con una permanencia de residuos de antibiótico hasta de 10 días en el músculo del camarón. Es muy importante remarcar que el uso de antibióticos de

manera inadecuada en acuicultura implica generación de resistencia en bacterias. Existen bacterias capaces de soportar ciertas concentraciones de plata y reducirlas para formar nanocristales en el espacio periplásmico como método de defensa (Klaus *et al.*, 2001), sin embargo gran mayoría de las bacterias patógenas sucumben ante las nanopartículas de plata (Saxena *et al.*, 2010; Vaseeharan *et al.*, 2010; Parameswari *et al.*, 2010).

Además, se ha comprobado que organismos resistentes a antibióticos son igualmente susceptibles a las nanopartículas de plata en comparación con los no resistentes, por ejemplo Lara *et al.* (2010) comprobó que una cepa de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a antibióticos resultaron susceptibles a las nanopartículas de plata. Por estas razones las nanopartículas proveen un gran beneficio como agente antibacteriano. Sin embargo, el mecanismo de acción de las nanopartículas presenta una dificultad que es traspasar la barrera de la membrana de la bacteria. Como se mencionó anteriormente, los iones de plata tienen la capacidad de desestabilizarla, pero para nanopartículas no está reportado en organismos más complejos como los multicelulares.

Las bacterias pueden causar huecos en la membrana celular de hospederos para entrar o salir de estos, y también afectar el transporte intracelular (van der Meer *et al.*, 2010) por lo que asumiendo que NHPB causa dichas alteraciones podrían propiciar la entrada de las nanopartículas. NHPB es una bacteria Gram negativa y de acuerdo con lo propuesto por Sondi *et al.* (2004) esta bacteria posee mayor susceptibilidad a las nanopartículas de plata ya que estas tienen mayor efecto sobre bacterias Gram negativas, esta efectividad de las nanopartículas de plata las hace un gran candidato como agente antimicrobiano en contra de NHPB.

Se ha determinado que algunas células bacterianas tienen receptores y transmisores proteicos ligados a estructuras de locomoción como los flagelos (Shaer, 2002). Se sabe que bacterias pueden producir ciertas sustancias y permiten que sean detectadas por los hemocitos y producir una reacción antibacteriana (Yip *et al.*, 2001). Además, los hemocitos son sensibles a lipopolisacáridos producidos por bacterias y esto promueve la movilización hemocitaria a áreas afectadas por estas bacterias, esta reacción promueve la degranulación promoviendo el encapsulamiento de las regiones afectadas con las bacterias (Iwanaga y Lee, 2005). En este trabajo se encontraron niveles elevados de proteína en los organismos tratados con las nanopartículas de plata y los organismos control, esto puede indicar que las respuestas celulares hacia la quimiotaxis es una posible explicación de los niveles de proteína detectados en los organismos enfermos.

Dichas observaciones se pueden corroborar con lo detectado en el análisis histológico donde se observaron grandes encapsulamientos de hemocitos e infiltración hemocitaria en el tejido de los camarones infectados.

El colesterol es uno de los compuestos más importantes en la interacción de bacterias patógenas y las células huésped ya que participa en la formación de poros en la membrana del huésped de manera que la bacteria patógena puede ingresar al interior de la célula (van der Meer *et al.*, 2010). Los patógenos al interactuar con la membrana del huésped, afectan estabilizando, deformando o afectándola. Esta capacidad permite en un tiempo determinado entrar o salir de la célula así como también, afecta el transporte intracelular y las señales celulares (van der Meer *et al.*, 2010; Lossi *et al.*, 2008).

Se pudo observar que los niveles de colesterol estuvieron muy altos en los organismos con 0 µg de nanopartículas, en contraste los tratados y el grupo blanco se encontraron en niveles más bajos, esto puede responder a los comportamientos biológicos de NHPB que por ser intracelular requiere de una estrategia para entrar y salir de la célula.

Aunque el análisis estadístico no reveló diferencias entre las concentraciones de lípidos totales, el análisis histológico demostró baja cantidad de reservas lipídicas en el tejido hepatopancreático, esto puede deberse a la naturaleza de la enfermedad la cual afecta seriamente las funciones del hepatopáncreas y puede llevar a la implementación de lípidos como fuente de energía. Es necesario también recalcar que el análisis estadístico no comprobó diferencias en los niveles de proteína total, acilglicéridos, lípidos totales, glucosa y glucógeno, quizá debió al bajo número de muestra, lo que pudo haber influido en los resultados obtenidos.

## VIII. CONCLUSIÓN

La implementación de té verde como agente reductor resultó en la síntesis de nanopartículas de plata mayormente polidispersas en cuanto al tamaño, y se obtuvieron formas aplanadas, semiesféricas y nanoalambres. Por otra parte, utilizando extracto de neem como agente reductor resultó en la síntesis de nanopartículas mayormente monodispersas en tamaños de 5 a 21 nm. La caracterización de las Np mediante espectrofotometría UV-vis indicó que utilizando los extractos de té verde y de neem la síntesis se llevó a cabo desde el inicio el contacto del nitrato e plata y el extracto y comenzó a disminuir alrededor de los 45 min.

Los organismos infectados y sin nanopartículas presentaron mortalidad del 41 % mientras que los sometidos a los tratamientos con 5 y 35  $\mu\text{g}$  tuvieron una mortalidad del 41 y 0 %. Dichas mortalidades fueron registradas dentro de los 24 días del experimental.

El análisis histológico reveló severa necrosis en los camarones sin nanopartículas y los tratados con 5  $\mu\text{g}$ , además también pudieron observarse inclusión de hemocitos en el tejido hepatopancreático así como también gran número de nódulos bacterianos. Además se pudo observar adelgazamiento de las paredes de los túbulos del hepatopáncreas y pérdida de la estructura de la red de estos túbulos en camarones sin nanopartículas y los tratados con ambas concentraciones. Por otro lado, los organismos sometidos al tratamiento de 35  $\mu\text{g}$  no presentaron nódulos bacterianos ni infiltración de hemocitos que indicaran infección en el tejido hepatopancreático. Sin embargo, tanto en los camarones sin nanopartículas como en los tratados con ellas resultaron positivos a NHPB en el análisis molecular.

En el análisis bioquímico se encontró que la concentración de colesterol en hepatopáncreas de camarón reveló altas concentraciones de este metabolito en organismos sin nanopartículas y niveles bajos en camarones con 35  $\mu\text{g}$  de nanopartículas.

Las nanopartículas de plata sintetizadas pueden ser un potencial agente antimicrobiano contra la bacteria intracelular causante de la Hepatopancreatitis necrotizante. En este trabajo se encontró que dicho efecto se vio reflejado en mayor manera en los camarones tratados con 35  $\mu\text{g}$ . Sin embargo, se observó un alto daño en el tejido hepatopancreático, el cual puede estar asociado al daño efectuado por las nanopartículas como por la bacteria NHPB en su conjunto.

La aplicación de nanopartículas sintetizadas mediante estos extractos de té implica ingredientes baratos y de fácil disponibilidad, en comparación con otros agentes reductores. Esto

implica una reducción considerable en el costo de elaboración de nanopartículas mediante la utilización de este tipo de extractos, así como también la aplicación de metodologías simples. Además la redituabilidad de la aplicación de nanopartículas sintetizadas de manera eco amigable y el bajo volumen de la dosis puede ser un gran candidato como agente antibacteriano en ciertas ramas de la acuicultura.

## **IX. RECOMENDACIONES**

Aunque se comprobó que las nanopartículas tuvieron un efecto antibacteriano contra la bacteria intracelular causante de NHPB es necesario comprender y estudiar los mecanismos de acción de la nanopartícula para con la bacteria.

También es importante investigar con más concentraciones de nanopartículas y poder probar la viabilidad en la aplicación de las nanopartículas en sistemas de cultivo.

Se sugiere estudiar también el impacto de la aplicación de las nanopartículas en la actividad de la acuicultura y la aplicación de estrategias para mitigar este impacto para poder así desarrollar una acuicultura sustentable y responsable.

## X. LITERATURA CITADA

- Ankanna, S., T.N.V.K.V. Prasada, E.K. Elumalai y N. Savithramma. 2010. Production of biogenic silver nanoparticles using *Boswellia ovalifoliolata* stem bark. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 5: 369 – 372.
- Arcos, G.F., A.M. Ibarra, C. Vazquez-Boucard, E. Palacios e I.S. Racotta. 2003. Haemolymph metabolic variables in relation to eyestalk ablation and gonad development of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* Boone. *Aquaculture Research*, 34: 749-755.
- Ávila-Villa, L.A., D. Fimbres-Olivarria, G. García-Sánchez, T. Gollas-Galván, J. Hernández-López y M. Martínez-Porchas. 2012. Physiological and immune responses of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) infected with necrotizing hepatopancreatitis bacterium. *Aquaculture*, 324: 14-19.
- Bell, T.A. y D.V. Lightner. 1987. An outline of penaeid shrimp culture methods including infectious disease problems and priority drug treatments. *Veterinary and Human Toxicology*, 29: 37-43.
- Bianchini, A., R. C. Playle, C. M. Wood y P. J. Walsh. 2007. Short-term silver accumulation in tissues of three marine invertebrates: Shrimp *Penaeus duorarum*, sea hare *Aplysia californica*, and sea urchin *Diadema antillarum*. *Aquatic Toxicology*, 84:182–189.
- Bliss, D. E. 1983. The biology of crustacea: pathobiology. New York: Academic Press, Inc. Volumen 6. 290 p.
- Bonilla-Gómez J.L., X. Chiappa-Carrara, C. Galindo, G. Jeronimo, G. Cuzon y G. Gaxiola. 2012. Physiological and biochemical changes of wild and cultivated juvenile pink shrimp *Farfantepenaeus duorarum* (crustacea: penaeidae) during molt cycle. *Journal of Crustacean Biology*, 32: 597-606.
- Bragg, P. D. y D. J. Rainnie. 1974. The effect of silver ions on the respiratory chain of *Escherichia coli*. *Canadian Journal of Microbiology*, 20: 883-889.
- COSAES. 2009. Informe final del ciclo 2009. Programa de trabajo de Sanidad acuícola del programa de soporte para camarón
- Chung, H. y W. Tarnng. 2010. Preparation of silver nanoparticles with different particle size for lower temperature sintering. *International conference on Nanotechnology and Bioscience*, 2: 55-58.
- del Río-Rodríguez, R.E., S. Soto-Rodríguez, M. Lara-Flores, A.D. Cu-Escamilla y M.I. Gómez-Solano. 2006. A necrotizing hepatopancreatitis (NHP) outbreak in a shrimp farm in Campeche, Mexico: A first case report. *Aquaculture*, 255: 606–609.

- Esparza-Leal, H. M., J. T. Ponce-Palafox., H. Cabanillas-Beltran y F. Flores-Verdusco 2007. Effect of White spot syndrome virus (WSSV) and water exchange on survival and production of *Litopenaeus vannamei* under semi-intensive culture conditions. *Hidrobiológica*, 17: 35-40.
- Esparza-Leal, H.M. 2010. Región epidémica, régimen de infección y evaluación de la vía acuática como mecanismo de dispersión del virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) en granjas camaronícolas del noroeste de México. Tesis de doctorado. Instituto Tecnológico de Sonora.
- Fábrega, C. J. 2009. The impacts of silver nanoparticles on planktonic and biofilm bacteria. Tesis de doctorado. School of Geography and Environmental Science. University of Birmingham. 267pp.
- FAO. 2005. Hernández Serrano, P. Responsible use of antibiotics in aquaculture. FAO Fisheries Technical Paper. Roma. No. 469, 97p.
- Figueras-Gil, E. 2000. Problemática actual de los patógenos que inciden en los sistemas acuícolas. En: Memorias del III Simposium Internacional de Acuicultura. Culiacán, Sinaloa, México. 5-7 de octubre de 2000. p: 185-203
- Frelier, P.F., J.K. Loy y B. Kruppenbach. 1993. Transmission of necrotizing Hepatopancreatitis in *Penaeus vannamei*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 61:44-48.
- Galván-Álvarez, D., F. Mendoza-Cano, J. Hernández-López y A. Sánchez-Paz. 2012. Experimental evidence of metabolic disturbance in the white shrimp *Penaeus vannamei* induced by the infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV). *Journal of Invertebrate Pathology*, 111: 60-67
- Gavhane, A. J., P. Padmanabhan, S. P. Kamble y S. N. Jangle. 2012. Synthesis of silver nanoparticles using extract of neem leaf and triphala and evaluation of their antimicrobial activities. *International Journal of Pharmaceutical and Bio Sciences*, 3: 88-100.
- Gómez-Gill, B., A. Roque y A. Guerra-Flores. 2001. Enfermedades Infecciosas más Comunes en la Camaronicultura en México y el Impacto del Uso de Antimicrobianos. *Camaronicultura y Medio Ambiente*, UNAM, 14: 315-343.
- Gracia-Valenzuela, M. H., L. Ávila-Villa, G. Yepiz-Plascencia, J. Hernández-López, F. Mendoza-Cano, G. García-Sánchez y T. Gollas-Galván. 2010. Assessing the viability of necrotizing hepatopancreatitis bacterium (NHPB) stored at -20 °C for use in forced-feeding infection of *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. *Aquaculture*, 311: 105-109.
- Guzmán, M., J. Dille y S. Godet. 2009. Synthesis of silver nanoparticles by chemical reduction method and their antibacterial activity. *International Journal of Chemical and Biological Engineering*, 2: 104-111.



- Hwang, M. G., H. Katayama y S. Ohgaki. 2007. Inactivation of *Legionella pneumophila* and *Pseudomonas aeruginosa*: Evaluation of the bactericidal ability of silver cations. *Water Research*, 41: 4097-4104.
- Iwanaga, S. y B. L. Lee 2005. Recent Advances in the Innate Immunity of Invertebrate Animals. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. 38: 128-150.
- Jory, D. E. 1999. Biomodulation of the non-specific immune response in marine shrimp whit beta-glucan. *Aquaculture Magazine*, 25: 81-86.
- Kamal, S., K. Prasanta, V. Johnson, P. Manda, R. Shanker y D. Loganathan. 2010. A Novel Green Chemical Route for Synthesis of Silver Nanoparticles Using *Camellia sinensis*. *Acta chimica slovenica* 57, 808-812.
- Kenneth, T. 2005. The Rickettsiae. University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology's website: <http://textbookofbacteriology.net/Rickettsia.html>. November 26, 2012.
- Kim, J.S., E. Kuk, K.N. Yu, J.H. Kim, S.J. Park, H.J. Lee, S.H. Kim, Y.K. Park, Y.H. Park, y C.Y. Hwang. 2007. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 3, 95-101.
- Klaus, J. T., R. Olsson Joerger, E. y G. Claes Göran. 2001. Bacteria as workers in the living factory: metal-accumulating bacteria and their potential for materials science. *Trends in Biotechnology*, 19: 15-20.
- Krol, R.M., W.E. Hawkins y R.M. Overstreet. 1991. Rickettsial and mollicute infections in hepatopancreatic cells of cultured Pacific white shrimp *Penaeus vannamei*. *Journal of invertebrate pathology*, 57: 362-370.
- Lara, H. H., N. V. Ayala-Núñez, L. Ixtepan-Turrent y C. Rodríguez-Padilla. 2010. Bactericidal effect of silver nanoparticles against multidrug-resistant bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26: 615-621.
- Lightner, D. V., R. M. Redman y J. R. Bonami. 1992. Morphological evidence for a single bacterial etiology in Texas necrotizing hepatopancreatitis in *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda). *Disease of Aquatic Organisms*, 13: 235-239.
- Lightner, D. V. y C. R. Pantoja. 2003. Manual para el diagnóstico de enfermedades de camarón. United States Department of Agriculture, 92 p.
- Loo, B., C.M. Nishibuchi y S. Radu. 2012. Synthesis of silver nanoparticles by using tea leaf extract from *Camellia sinensis*. *International Journal of Nanomedicine*, 7: 4263-4267.

- Lossi, N. S., N. Rolhion, A. I. Magee, C. Boyle D. y W. Holden. 2008. The *Salmonella* SPI-2 effector SeJ exhibits eukaryotic activator-dependent phospholipase A and glycerophospholipid : cholesterol acyltransferase activity. *Microbiology*, 154: 2680–2688.
- Loy, JK, P.F. Frelier, P. Varner y J.W. Templeton. 1996. Detection of the etiologic agent of necrotizing hepatopancreatitis in cultured *Penaeus vannamei* from Texas and Peru by polymerase chain reaction. *Disease of Aquatic Organisms*, 25:117–122.
- Luoma, S.N. 2008. *Silver nanotechnologies and the Environment*. Woodrow Wilson International Center for Scholars. Washington, DC, USA, 72 P.
- Maldonado, M., J. Rodríguez y I. Blas. 2004. El camarón de cultivo frente al WSSV, su principal patógeno. *Revista Aquatic*, 21:78-91.
- Morales-Covarrubias, M. S. 2004. Enfermedades del camarón. Detección mediante análisis en fresco e histopatología. Editorial Trillas, México, D.F., México. 1-122.
- Morales-Covarrubias, M.S., L. Tlahuel-Vargas, I.E. Martínez-Rodríguez, R. Lozano-Olvera, y J.M. Palacios-Arriaga. 2012. Necrotising hepatobacterium (NHPB) infection in *Penaeus vannamei* with florfenicol and oxytetracycline: a comparative experimental study. *Revista Científica*, 22: 72-80.
- Morones, J., J. J. Elechiguerra, A. Camacho, K. Holt, J. Kouri, J. Tapia Ramírez y M. Yacaman. 2005. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 16: 2346–2353.
- Nadagouda, M.N. y R.S. Varma. 2008. Green synthesis of silver and palladium nanoparticles at room temperature using coffee and tea extract. *Green Chemistry*, 10: 859-862.
- Nagajyoti, P.C, T.N.V.K.V Prasa D, T.V.M. Sreekanth y K. D. LEE. 2011. Bio-fabrication of silver nanoparticles using leaf extract of *Saururus chinensis*. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*. 6: 121-133.
- Njagi, E.C., H. Huang, L. Stafford, H. Genuino, H.M. Galindo, J.B. Collins, G.E. Hoag y S.L. Suib. 2010. Biosynthesis of iron and silver nanoparticles at room temperature using aqueous Sorghum Bran extracts. *Langmuir*, 27: 264-271.
- Pagé, R. 2004. *Extreme genetic engineering: an introduction to synthetic biology*. Action group on erosion, technology and concentration. Nano-aquaculture. United States. P.72
- Pal, S., Y. Tak y J. M. Song. 2007. Does antibacterial activity of silver 1 nanoparticle depend on shape of nanoparticle? A study on Gram-negative *E. coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 1712-1720.
- Parameswari, E., C. Udayasoorian, P. S. Sebastian y R.M. Jayabalakrishnan. 2010. The bactericidal potential of silver nanoparticles. *International Research Journal of Biotechnology*, 1: 044-049.
- Poole, C. y F. Owens. 2007. *Introducción a la nanotecnología*. Reverté. Barcelona, España, 417 p.

- Ramos Paredes, J., J. M. Grijalva Chon, J. de la Rosa Vélez, L. M. Enriquez Paredes. 2012. New genetic recombination in hypervariable regions of the white spot syndrome virus isolated from *Litopenaeus vannamei* (Boone) in northwest Mexico. *Aquaculture Research*. 43: 339-348.
- Ruíz-Luna, A. y C.R. Berlanga-Robles. 2001. El potencial de la camaronicultura para transformar el paisaje en la zona costera. El sur de Sinaloa como caso e estudio. Pp: 329-346. En: Páez-Osuna F. (Ed.), *Camaronicultura y Medio Ambiente*. Instituto de ciencias del Mar y Limnología, Estación Mazatlán, UNAM, Programa Universitario de Alimentos y El Colegio de Sinaloa. México D.F., 451 p.
- Sánchez-Paz, A., F. García-Carreño, J. Hernández-López, A. Muhlia-Almazán y G. Yepiz-Plascencia. 2007. Effect of short-term starvation on hepatopancreas and plasma energy reserves of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 340: 184-193.
- Santiago, H., M. L. A. Espinosa P. y M. del C. Bermúdez A. 2009. Uso de antibióticos en la camaronicultura. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 3: 22-32.
- Saxena, A., R.M. Tripathi y R.P. Singh. 2010. Biological synthesis of silver nanoparticles by using onion (*Allium cepa*) extract and their antibacterial activity. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 5: 427-432
- Schaer, A. 2002. Studies on the Chemotaxis Network in *Halobacterium salinarum* and *Helicobacter pylori*. Tesis de doctorado. Facultad de Química y Farmacia de la Universidad Ludwig-Maximilians-Universität München, 174 p.
- Shukla, V. K., S. Pandey y A. Pandey. 2010. Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Neem Leaf (*Azadirachta indica*) Extract. *International conference on advance nanomaterials and nanotechnology*, 1276: 43-49.
- Silva-de-Hoyos, L. E., V. Sánchez-Mendieta, A. Rico-Moctezuma, A. R. Vilchis-Néstor, M. A. Camacho-López y M. Avalos-Borja. 2012. Silver nanoparticles biosynthesized using *Opuntia ficus* aqueous extract. *Superficies y Vacío*, 25: 31-35.
- Sondi, I. y B. Salopek. 2004. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *Journal of Colloid and Interface Science*, 275:177-182.
- Thirumurugan, A., T. Neethu Anns, K. Hema Priyanka y P. Prakash. 2011. Biological synthesis of silver nanoparticles by *Lantana camara* leaf extracts *International Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 2: 22-24.

- van der Meer, J. Y.P.M., J. van Galen, J. J. Batenburg y J. Bernd Helms. 2010. Lipids in host-pathogen interactions: Pathogens exploit the complexity of the host cell lipidome. *Progress in Lipid Research*, 49:1-26.
- Vaseeharan, B., P. Ramasamy y J. C. Chen. 2010. Antibacterial activity of silver nanoparticles (AgNps) synthesized by tea leaf extracts against pathogenic *Vibrio harveyi* and its protective efficacy on juvenile *Fenneropenaeus indicus*, *Letters in Applied Microbiology*, 50: 352-356.
- Vincent, A. G., V. M. Breland y J. M. Lotz. 2004. Experimental infection of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* with Necrotizing Hepatopancreatitis (NHP) bacterium by per os exposure. *Disease of Aquatic Organisms*, 61: 227-233.
- Wickins, J.F., O. C. Lee. 2003. Crustacean Farming, Ranching and Culture. *Aquaculture Research*, 34: 269-270.
- Yamanaka, M., K. Hara y J. Kudo. 2005. Bactericidal Actions of a Silver Ion Solution on *Escherichia coli*, Studied by Energy-Filtering Transmission Electron Microscopy and Proteomic Analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 71:7589-7593.
- Yoganandhan, K., S. Thirupathi y A.S. Sahul Hameed. 2003. Biochemical, physiological and hematological changes in white spot syndrome virus-infected shrimp, *Penaeus indicus*. *Aquaculture*, 221: 1-11.
- Yip, E. C. H., Y. H. Wong y J. T. Y. Wong. 2001. Bacterial formyl peptide mediated chemotaxis and extracellular acidification in shrimp haemocytes. *Developmental & Comparative Immunology*, 25: 269-277.
- Zarain-Herzberg, M. 2000. Técnicas de diagnóstico de enfermedades en acuicultura. pp. 231-242. En: *Memorias del III Simposium Internacional de Acuicultura*. Culiacán, Sinaloa, México del 5 al 7 de octubre de 2000. 382 p.

## ANEXO I

### Protocolo de extracción de ADN QIAmp Mini Kit

- 1.- Se colocó el tejido en un microtubo de 1.5 mL con 80  $\mu$ L de PBS estéril. Se homogenizó la muestra y se agregaron 100  $\mu$ L de buffer ATL.
- 2.- Se agregaron 20  $\mu$ L de proteinasa K (peptidasa K; EC 3.4.21.64) y se mezcló unos segundos por vórtex.
- 3.- Se incubó a 56 °C en una microplaca.
- 4.- Se centrifugaron brevemente los tubos para concentrar las gotas de las paredes producto de la condensación.
- 5.- Se añadieron 200  $\mu$ L de buffer AL a la muestra y se mezcló por vórtex durante 15 segundos.
- 6.- Se incubó nuevamente a 70 °C por 10 minutos.
- 7.- Se centrifugó brevemente.
- 8.- Se agregaron 200  $\mu$ L de etanol absoluto y se mezcló por vórtex durante 15 segundos.
- 9.- Se centrifugó brevemente.
- 10.- Se transfirió la mezcla del paso 8 a la columna QIAmp spin a un tubo de colecta de 2 mL, teniendo cuidado de no humedecer los bordes.
- 11.- Se centrifugó a 6000 x g por 1 minuto en una centrifuga Hermle modelo Z216 MK.
- 12.- Se transfirió la columna QIAmp Spin a un tubo limpio de colecta de 2 mL y se descartó el tubo con el filtrado.
- 13.- Se agregaron 500  $\mu$ L de buffer AW1 a la columna QIAmp Spin.
- 14.- Se centrifugó a 6000 x g por 1 minuto.
- 15.- Se transfirió la columna QIAmp Spin a un tubo limpio de colecta de 2 mL y se descartó el tubo con el filtrado.

- 16.- Se agregaron 500  $\mu\text{L}$  de buffer AW2 a la columna QIAmp Spin.
- 17.- Se centrifugó a 10 000 x g por 3 minutos.
- 18.- Se colocó la columna QIAmp Spin en un microtubo de 1.5 mL estéril debidamente etiquetado y se descartó el tubo con el filtrado.
- 19.- Se agregaron 200  $\mu\text{L}$  de buffer AE.
- 20.- Se incubó a temperatura ambiente durante 1 minuto.
- 21.- Se centrifugó a 6000 x g por 1 minuto.
- 22.- Se descartó la columna QIAmp Spin y se tapó bien el microtubo con el filtrado con el ADN. Posteriormente se almacenó a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### **Oligonucleótidos**

#### **Solución Stock de oligonucleótidos**

Se agregó 1 mL de buffer TAE con los oligonucleótidos liofilizados, se homogenizó la solución y se centrifugó brevemente.

#### **Solución de trabajo de oligonucleótidos**

Se agregaron 900  $\mu\text{L}$  de agua estéril para PCR y 100  $\mu\text{L}$  de la solución stock de oligonucleótidos en un tubo de 1.5 mL debidamente etiquetado, después se homogenizó la solución y se centrifugó brevemente.

### **Protocolo de PCR**

- 1.- Se agregaron 10  $\mu\text{L}$  de agua estéril para PCR en microtubos Illustra PuReTaq Ready-To-Go (RTG) rotulados (correspondientes a la mitad del número de muestras). Después se transfirieron 5  $\mu\text{L}$  de cada tubo RTG a tubos de PCR de 0.2 mL etiquetados (correspondientes a la otra mitad del número de muestras).
- 2.- Se agregó 1  $\mu\text{L}$  oligonucleótido sentido en un borde del microtubo.
- 3.- Se agregó 1  $\mu\text{L}$  oligonucleótido anti sentido en un borde del microtubo.

4.- De acuerdo a la concentración de ADN medida, se separaron las muestras con una concentración mayor que 100 ng/  $\mu\text{L}$  de aquellas menores que 100 ng/  $\mu\text{L}$  y se les agregaron 4.5 y 3.5  $\mu\text{L}$  de agua estéril para PCR, respectivamente.

5.- Teniendo en cuenta lo anterior se agregaron 1  $\mu\text{L}$  de las muestras de mayor concentración de ADN y 2  $\mu\text{L}$  de las de menor concentración.

6.- Se centrifugo brevemente

7.- Se colocaron los tubos en un termociclador TECHNE modelo TC-412 y se ajustaron las condiciones de PCR.

8.- Se le agregó a cada microtubo 3  $\mu\text{L}$  de tinta y se almacenaron a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

### **Gel de agarosa**

1.- En 50 mL de TAE x1 se agregó 1 gr de agarosa (Sigma-Aldrich) se disolvió calentando periódicamente en un microondas y posteriormente ya que había enfriado al tacto, se le agregaron 2.5  $\mu\text{L}$  de bromuro de etidio y se mezcló ligeramente.

2.- Se encintaron los bordes del portagel de 7 x 8.5 cm para evitar derrames, se colocaron los peines de 1.5 mm y se vació con cuidado la agarosa.

3.- Se dejó solidificar la agarosa de 30-40 min y se retiraron los peines.

### **Electroforesis**

1.- Se llenó cámara de electroforesis con TAE x1 hasta desbordarlos y se agregaron en cada lado 7.5  $\mu\text{L}$  de BrEt, posteriormente se colocó el gel de agarosa y se llenó la cámara con TAE x1 hasta cubrir el gel.

2.- Se conectó el electrodo positivo y negativo en la cámara de electroforesis.

3.- Se colocaron en cada primer pozo del gel, 3  $\mu\text{L}$  del marcador molecular.

4.- Se colocaron en los pozos del gel 8  $\mu\text{L}$  del producto de PCR ya mezclado con la tinta de carga.

5.- se conectaron los electrodos a la fuente de poder y se corrió la electroforesis a 90 V de 30 a 40 min.

## **ANEXO II**

### **Protocolo de deshidratación de tejidos.**

Se colocaron los casetes con el tejido en una casta para histología, después la canasta se pasó por una hora en cada concentración de gradiente de alcohol al 75, 80, 80, 95, 95, 100, y 100%, xileno, xileno durante 30 – 60 min.

### **Protocolo de inclusión de tejido en parafina.**

Posterior a la deshidratación de tejidos después del último xileno, se colocaron los tejidos en parafina durante una hora. Para la preparación de los bloques de parafina, mediante un inclusor de parafina marca Leica modelo EG1160. Los casetes con tejido se pusieron en un baño de parafina a 40°C y se colocó cada tejido en un molde para bloques de parafina, posteriormente se rellenó con parafina. El bloque se puso un anillo histológico y se procedió a rellenarlo sin derramar parafina y se colocó la etiqueta, después los moldes se pusieron en una placa fría a -5°C, hasta solidificar.

### **Cortes histológicos**

Se colocaron los bloques en un micrótopo AO Scientific Instruments y se realizaron cortes a 5 µm de espesor, cada tira de corte se puso inmediatamente después en un baño de tejidos Tissue floath bath LAB-LINE, a 35 °C y se montó la muestra en un portaobjetos debidamente etiquetado.

### **Tinción Hematoxilina- Eosina modificada de Lightner**

Se colocaron las muestras montadas en los portaobjetos dentro en una estufa a 60°C, aproximadamente por una hora o hasta desparafinar parcialmente los portaobjetos. Después se inició con el protocolo de tinción y finalmente se montaron las muestras agregando resina y cubreobjetos para proteger los tejidos y se dejó polimerizar la resina.



Protocolo modificado de tinción de Hematoxilina -Eosina tomada de Lightner (1996)

<b>PASO</b>	<b>SOLUCIÓN</b>	<b>TIEMPO</b>
1	Xileno	5 min
2	Xileno	5 min
3	Etanol:Xileno	1 min
4	Etanol 100%	1 min
5	Etanol 100%	1 min
6	Etanol 95%	1 min
7	Etanol 95%	1 min
8	Agua corriente	3 min
9	Hematoxilina	12-16 min
10	Agua corriente	Enjuagar
11	Alcohol ácido	Cubrir portaobjetos
12	Agua amoniacal	Cubrir portaobjetos
13	Agua corriente	Enjuagar
14	Eosina	1-3 min
15	Etanol 95%	2 min
16	Etanol 95%	2 min
17	Etanol 100%	3 min
18	Etanol 100%	3 min
19	Etanol:Xileno	1 min
20	Xileno	2 min
21	Xileno	2 min

## ANEXO III

### Protocolo de infección de organismos

- 1.- Con la ayuda de una micro pipeta y una sonda para catéter, se tomaron 50  $\mu\text{L}$  de hepatopáncreas infectados con NHP y almacenados en agua y glicerol (1:1).
- 2.- Se colocó la sonda en la parte bucal, localizado en el cefalotórax, del camarón y se administró lentamente el hepatopáncreas infectado.
- 3.- Cuidadosamente se devolvió el camarón a su respectivo acuario.

### Diseño de muestreo

Los organismos experimentales se distribuyeron de la siguiente manera los acuarios con camarones control constaron de organismos con el tratamiento pero sanos. Por otra parte los demás tratamientos fueron de organismos infectados y con el tratamiento de 0  $\mu\text{g}$ , 5  $\mu\text{g}$  o 35  $\mu\text{g}$  de nanopartículas de plata.

0 $\mu\text{g}$	0 $\mu\text{g}$	35 $\mu\text{g}$	Vacío	5 $\mu\text{g}$	5 $\mu\text{g}$
Control (n = 4)	(n = 6)	Control (n = 5)		Control (n = 6)	(n = 4)
Vacío	0 $\mu\text{g}$ (n = 6)	35 $\mu\text{g}$ (n = 7)	35 $\mu\text{g}$ (n = 8)	5 $\mu\text{g}$ (n = 6)	5 $\mu\text{g}$ (n = 6)

### Muestreo a los 12 días post-infección

De los organismos sometidos al tratamiento con 0  $\mu\text{g}$  de nanopartículas se muestrearon 2 organismos por acuario excepto el acuario con los organismos control (n = 4).

De los organismos sometidos al tratamiento con 5  $\mu\text{g}$  de nanopartículas se tomaron 2 organismos por acuario excepto el acuario con los organismos control (n = 6).

De los organismos sometidos al tratamiento con 35  $\mu\text{g}$  de nanopartículas se tomaron 2 organismos por acuario excepto el acuario con los organismos control (n = 4)

## Muestreo a los 24 días post-infección

De los organismos sometidos al tratamiento con 0  $\mu\text{g}$  de nanopartículas se muestrearon 2 organismos por acuario excepto el acuario con los organismos control ( $n = 3$ ).

De los organismos sometidos al tratamiento con 5  $\mu\text{g}$  de nanopartículas se tomaron 2 organismos por acuario excepto el acuario con los organismos control ( $n = 3$ ).

De los organismos sometidos al tratamiento con 35  $\mu\text{g}$  de nanopartículas se tomaron 2 organismos por acuario excepto el acuario con los organismos control ( $n = 4$ ).

## ANEXO IV

### Cálculos de dosis para tratamiento con nanopartículas de plata

Para la preparación de 35 y 5  $\mu\text{g}$  de nanopartículas de plata se asumió una reducción completa de la plata en la reacción de síntesis de nanopartículas.

Pesos atómicos en relación al número de átomos que componen la molécula de nitrato de plata.

$\text{AgNO}_3$	No. de átomos	Peso atómico	Peso atómico	Peso molecular
Ag	1	107.87	107.87	
N	1	14.0067	14.0067	
O	3	15.9994	47.9982	
total			169.8749	169.8749