



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLAS DE HIDALGO**



**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS Y
FORESTALES**

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

ÁREA: PRODUCCIÓN Y SALUD ANIMAL

TESIS DE MAESTRÍA:

TOXICIDAD DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA EN EL PROTOZOARIO

Tetrahymena sp.

QUE PRESENTA:

MARÍA ANEL FUENTES VALENCIA

GRADO ACADÉMICO A OBTENER:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIRECTOR:

DR. CARLOS ANTONIO MARTÍNEZ PALACIOS

CODIRECTORA:

DRA. MARIA CRISTINA CHÁVEZ SÁNCHEZ

Morelia Michoacán, Marzo de 2017.

DEDICATORIA

A mi madre Guadalupe Valencia Robles

A mi padre Francisco Fuentes Anaya

Por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación, académica y de vida, por su apoyo incondicional perfectamente mantenido a través del tiempo.

Por los ejemplos de perseverancia y constancia que los caracterizan y que me han infundado siempre, por el valor mostrado para salir adelante y por su AMOR.

*No ha sido sencillo el camino hasta ahora, pero gracias a sus aportes, a su amor, a su inmensa bondad y apoyo, lo complicado de lograr esta anhelada meta se ha notado menos. Les agradezco y hago presente mi gran afecto hacia ustedes, a toda mi **HERMOSA FAMILIA**.*

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mis directores de tesis: *Dra. María Cristina Chávez* y *Dr. Carlos Antonio Martínez* por el gran soporte científico y humano durante mi maestría. Al comienzo tenía mucha incertidumbre por esta nueva experiencia anhelada, ustedes me brindaron mucha confianza de antemano les estaré infinitamente agradecida por su apoyo. Muchas gracias por brindarme su amistad e innumerables consejos, por su gran dedicación en este trabajo de investigación. Para mí fue un gran honor ser dirigida por ustedes.

De antemano también agradezco al comité tutorial: *Dra. Emma Fajer Ávila*, *M. en I. Sibila Santos*, *Dr. Carlos Cristian Martínez*, por sus valiosos comentarios y apoyos invaluable, los cuales coadyuvaron para la realización de la tesis. Sin duda alguna fui muy afortunada en mi comité tutorial para la mejora y oportuna terminación de la tesis de Maestría.

Especial reconocimiento para el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. Unidad Mazatlán ya que todo el personal me brindo las facilidades técnicas en la parte experimental, muchas gracias por su asesoría: Biól. Rosa Medina Guerrero, M.C. Ma. Del Carmen Bolán, Dr. Neptali Morales Serna, M.C. Selene Abad Rosales, Dr. Eric Bautista Guerrero, Dra. Alejandra García, Dr. Bruno Gómez Gil, M.C. Rubí Hernández Cornejo y Dr. Raúl Llera Hernández.

Al Laboratorio de Biotecnología Acuicola y Acuicultura del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales UMSNH, Dra. María Gisela Ríos y Dra. Pamela Navarrete quienes me apoyaron también para la mejora de mi tesis. A todos mis compañeros del Laboratorio, especial agradecimiento para Eugenio Arroyo, Guillermo Corona, Paola Navarro, Guadalupe Cortes, Sofía Andrade y Eduardo Martínez.

Al CONACYT por brindarme la oportunidad económica para continuar mis estudios de posgrado.

Sin duda alguna fui muy afortunada por el apoyo de muchas instituciones, a las cuales les agradezco el otorgamiento, quienes hicieron posible las valiosas estancias académicas para la colaboración en la investigación México y Estados Unidos:

- Proyecto 258607 CONACYT: Estudio del efecto de nanopartículas de plata en virus, bacterias y parásitos de organismos acuáticos en particular al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. Unidad Mazatlán a la Dra. María Cristina Chávez.
- Centro de Nanociencias y Nanotecnología UNAM especialmente a la Dra. Nina Bogdanchikova y Admón. Leticia García Flores.
- International Center for Nanotechnology and Advanced Materials (ICNAM) The University of Texas at San Antonio: Dr. Humberto Lara, Dr. José Yacamán y la Coordinadora Paloma Perry.

Todos fueron muy amables para apoyarme en las innumerables dudas que tenía, para mí fue una honorable experiencia colaborar con ustedes.

Gracias queridas tía Amelia, hermana Marbella Fuentes, sobrinas: Belén, Melissa Velázquez y Elizabeth Fuentes, quienes siempre me han brindado mucho apoyo y AMOR para conseguir mis metas.

A Jesús Mateo Amillano Cisneros, quien también me apoyo en la parte experimental cuando ya me sentía bastante agotada y tuvo mucha paciencia para las miles de preguntas que tenía en el área de molecular. Con quien he pasado momentos académicos y personales muy importantes, gracias por tu apoyo incondicional.

A mis amistades quienes siempre me alentaron en mi superación Familia Martínez Villafán, María Evangelina Noriega, José Luis Contreras y Eréndira Arciga.

A todos muchas gracias.

INDICE GENERAL

I.- RESUMEN GENERAL	1
II.- ABSTRACT.....	2
III.- INTRODUCCIÓN GENERAL.....	3
III.1 ACTIVIDAD ANTIPROTOZOARIA DE LAS NpsAg	5
IV.- HIPÓTESIS.....	9
V.- OBJETIVOS	10
V.1 OBJETIVO GENERAL	10
V.2 OBJETIVOS PARTICULARES	10
VI.- MATERIALES Y MÉTODOS	11
VI.1. Reactivos.....	11
VI.1.1 Nanopartículas utilizadas	11
VI.1.1.1 Características de las NpsAg Argovit™	11
VI.1.1.2 Características de las NpsAg de la Universidad de Texas (UTSA)	12
VI.1.1.3 Preparación de las concentraciones de NpsAg	13
VI.2. Obtención de material biológico	13
VI.3. Identificación Taxonómica de los ciliados	15
VI.4. Diseño experimental	15
VI.4.1. Evaluación <i>in vitro</i> de las diferentes concentraciones de nanopartículas de plata en <i>Tetrahymena</i> sp.	15
VI.4.2. Descripción del efecto de las NpsAg sobre <i>Tetrahymena</i> mediante microscopía óptica	16
VI.4.3 Descripción de la interacción de las nanopartículas de plata sobre <i>Tetrahymena</i> sp. mediante microscopía electrónica de barrido	16
VI.4.4 Análisis de datos	17

VII.- RESULTADOS	19
VII.1. Identificación taxonómica de los protozoarios	19
VII.1.1 Técnica de nitrato de plata Chatton-Lwoff (Foissner, 1992).....	19
VII.1.2 Programa informático de alineamiento de secuencias Basic local alignment (Blast) (Técnica molecular para determinación del género y especie)	19
VII.2. Actividad antiprotozoaria de las nanopartículas de plata (NpsAg)	20
VII.2.1 Evaluación <i>in vitro</i> de las NpsAg Argovit™	20
VII.2.2 Evaluación <i>in vitro</i> de las NpsAg UTSA.....	22
VII.2.3 Cálculo de la concentración letal media (LC ₅₀) y los tiempos letales medios (TL ₅₀) de las NpsAg Argovit™ Y UTSA	23
VII.3. Efectividad de las NpsAg en <i>Tetrahymena</i> sp.	25
VII.3.1. Efectividad de las NpsAg Argovit™	25
VII.3.2. Efectividad de las NpsAg de UTSA.	29
VII.4 Microscopia óptica y microscopía electrónica de barrido: interacción de las NpsAg sobre <i>Tetrahymena</i> sp.	31
VIII.- DISCUSIÓN.....	36
IX.- CONCLUSIONES.....	40
X.- PERSPECTIVAS	41
XI.- ANEXOS	42
XII. - BIBLIOGRAFÍA	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Morfología de <i>Tetrahymena</i>	19
Figura 2.- Secuencia de genes para el programa informático de alineamiento de secuencias Basic local alignment (Blast).....	20
Figura 3.- Porcentaje de mortalidad de <i>Tetrahymena</i> sp. a diferentes tiempos (min) y concentraciones de NpsAg Argovit™	21
Figura 4.- Porcentaje de mortalidad de <i>Tetrahymena</i> sp. a diferentes tiempos (min) y concentraciones de NpsAg UTSA	22
Figura 5.- Efectividad de las NpsAg Argovit™ en <i>Tetrahymena</i> sp. a los 15 min de exposición.....	26
Figura 6.- Efectividad de las NpsAg Argovit™ en <i>Tetrahymena</i> sp. a los 30 min de exposición.....	26
Figura. 7.- Efectividad de las NpsAg Argovit™ en <i>Tetrahymena</i> sp. a los 45 min de exposición.....	27
Figura 8.- Efectividad de las NpsAg Argovit™ en <i>Tetrahymena</i> sp. a los 60 min de exposición.....	28
Figura 9.- Efectividad de las NpsAg UTSA en <i>Tetrahymena</i> sp. a los 15 min de exposición.....	29
Figura 10.- Efectividad de las NpsAg UTSA en <i>Tetrahymena</i> sp. a los 30 min de exposición.....	30
Figura 11.- Efectividad de las NpsAg UTSA en <i>Tetrahymena</i> sp. a los 45 min de exposición.....	30

Figura 12.- Efectividad de las NpsAg UTSA en <i>Tetrahymena</i> sp. a los 60 min de exposición.....	31
Figura 13.- Microfotografías del ciliado <i>Tetrahymena</i> sp.: testigo negativo y expuesta a NpsAg Argovit™.....	32
Figura 14.- <i>Tetrahymena</i> sp. expuesta a NpsAg UTSA.....	33
Figura 15.- Microscopía electrónica de barrido (MEB) <i>Tetrahymena</i> sp. testigo negativo.....	34
Figura 16.- Resultados (MEB) <i>Tetrahymena</i> expuesta a NpsAg Argovit™.....	34
Figura 17.- Resultados (MEB) <i>Tetrahymena</i> expuesta a NpsAg UTSA.....	35

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Concentraciones de NpsAg con actividad antiprotozoaria.....	5
Cuadro 2. Características de las NpsAg.....	11
Cuadro 3. Resultados del Blast.....	20
Cuadro 4. Concentración letal media (LC_{50}) e intervalos de confianza (95%) para cada una de las concentraciones de las dos NpsAg evaluadas en <i>Tetrahymena</i> sp. durante 1 hora de tratamiento, utilizando el programa SPSS 15.0 ®	23
Cuadro 5. Tiempo letal medio (TL_{50}) de las dos nanopartículas para las concentraciones evaluadas utilizando el programa SPSS 15.0 ®.....	24
Cuadro 6.- Efecto de diferentes concentraciones de NpsAg Argovit™ en <i>Tetrahymena</i> sp.	42
Cuadro 7.- Efecto de diferentes concentraciones de NpsAg UTSA en <i>Tetrahymena</i> sp.	46
Cuadro 8.- Toxicidad de NpsAg en peces.....	49
Cuadro 9. Efectos del Nitrato de plata, Formalina y Cloruro de sodio en <i>Tetrahymena</i> sp.	52
Cuadro 10.- Descripción de la Formalina y Cloruro de sodio.....	53
Cuadro 11. - Diferentes formas de plata utilizadas como bactericidas en la industria médica y alimentaria	59
Cuadro 12.- Concentración letal LC_{50} de la Formalina (36-38% Formaldehído) para peces.....	63
Cuadro13.- Concentración letal LC_{50} del Cloruro de sodio para peces.....	64

I.- RESUMEN GENERAL

En acuicultura el problema de las enfermedades parasitarias constituye una de las principales causas de pérdidas económicas y dentro de éstas, el impacto de protozoarios parásitos a escala global en el cultivo de peces, juega un papel crítico en la productividad, ya que la mayoría de enfermedades no cuentan con medidas de control adecuadas. Una de las principales limitantes para la evaluación de antiprotozoarios en peces, es la dificultad para completar su ciclo de vida en el laboratorio. Sin embargo, el fácil cultivo del ciliado *Tetrahymena* posibilita su empleo como modelo biológico. La nanoterapéutica es una nueva disciplina que promete ser de amplio espectro para el desarrollo de fármacos “inteligentes” a patógenos específicos.

En el presente estudio se evaluó por primera vez la toxicidad de las nanopartículas de plata sintetizadas por Argovit™ y la Universidad de Texas (UTSA) sobre *Tetrahymena* sp. como potencial en el control de infestaciones por ectoparásitos ciliados en peces de cultivo. Con el presente trabajo, se obtuvo un cultivo aséptico de ciliados del género *Tetrahymena* identificado morfológicamente y confirmado molecularmente con el gen 18 s para un 95% de identidad. La concentración letal media (LC₅₀) de *Tetrahymena* sp. a las NpsAg Argovit™ fluctuó desde 2501 ng/L a los 15 min hasta 796 ng/L a los 60 min., mientras que para las NPsAg UTSA fue entre 4 y 1 ng/L a los 15 y 60 min respectivamente. Los tiempos letales medios (TL₅₀) variaron desde 54 a 8 min a 900 y 3000 ng/L respectivamente para las NpsAg Argovit™ y desde 55 a 2 min a 1 y 11 ng/L para las NpsAg UTSA. Las concentraciones letales (CL₁₀₀) fueron 3300 y 10.6 ng/L para las NpsAg Argovit™ y UTSA a los 15 y 60 min respectivamente. Ambas nanopartículas de plata ocasionaron ruptura de la membrana celular y apoptosis. Las NpsAg UTSA fueron 311 veces más tóxicas que las NpsAg Argovit™ sobre *Tetrahymena* sp. Las investigaciones deben continuar para conocer el efecto potencial de estas partículas sobre peces infectados con ciliados parásitos.

Palabras clave: nanopartículas, toxicidad, ectoparásitos, acuicultura, antiprotozoarios

II.- ABSTRACT

Diseases caused by parasites in aquaculture cause significant economic damage in this industry. In fact, the economic cost of protistan parasites to global fish culture plays a critical role in the aquaculture production, because there is a lack of control and management of infestations. The assessment *in vitro* of the effect of antiprotozoal compounds in fish is difficult, due to the life cycle of parasites in the laboratory is complicated. However, due to the easy culture of the ciliated protozoan *Tetrahymena*, this organism can be used like a biological model. Nanotherapy is a new discipline that promises to be broad-spectrum for the development of "smart" drugs to specific pathogens. In the present study, the *in vitro* toxicity of the silver nanoparticles synthesized by Argovit™ and the University of Texas at San Antonio (UTSA) were evaluated for the first time against *Tetrahymena* sp. like potential technology for the control of ectoparasite infestations caused by ciliated protozoan in fish culture. In this research, the aseptic culture of *Tetrahymena* sp. was obtained. The ciliate was isolated and the genus of the species confirmed by morphological and molecular methods, the later using the gen 18s with 95% accuracy. The median lethal concentration (LC₅₀) for NpsAg Argovit™ in *Tetrahymena* sp. was 2501 ng/L at 15 minutes until 796 ng/L at 60 minutes, while the LC₅₀ for NPsAg UTSA was 4 and 1 ng/L at the 15 min and 60 min respectively. The median lethal times were 54 and 8 min at 900 and 3000 ng/L respectively by the NpsAg Argovit™ and 55 and 2 min at 1 and 11 ng/L by the NpsAg UTSA. The lethal concentrations (CL₁₀₀) were 3300 y 10.6 ng/L for NpsAg Argovit™ and UTSA at 15 and 60 min respectively. The NpsAg caused rupture of membrane and apoptosis in the cell. The NpsAg UTSA were 311 times more toxic than NpsAg Argovit™ against *Tetrahymena* sp. It is necessary to continue investigating about the potential effect of this nanoparticles in infected fish with ciliates parasites.

III.- INTRODUCCIÓN GENERAL

La nanotecnología es la manipulación de la materia a escala nanométrica. La meta tecnológica particular es la de manipular en forma precisa los átomos y moléculas para la fabricación de productos a microescala (Drexler, 1986).

La nanotecnología abarca las tecnologías para fabricar materiales, incluyendo partículas en forma de esfera, cúbicas, aciculares y tubulares a nanoescala (de aproximadamente 5 a 100 nm) y dispositivos hasta de 500 nm (Allaker y Ren, 2008). Los nanomateriales pueden ser divididos en dos grandes grupos: nanopartículas ultra finas que están presentes de forma normal en la naturaleza y nanopartículas que produce el humano (Oberdörster *et al.*, 2005).

Debido a su escala similar a la mayoría de las moléculas y estructuras biológicas pueden ser útiles tanto *in vivo* como *in vitro* para la investigación y para aplicaciones biomédicas (Gherbawy *et al.*, 2013). El campo de la nanotecnología presenta un rápido crecimiento, con diversas aplicaciones potenciales, incluyendo el control de las enfermedades infecciosas (Allaker y Ren, 2008).

Las nanopartículas de plata (NpsAg) poseen propiedades únicas como su gran superficie y la gran capacidad de producir especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que les permite tener propiedades antimicrobianas eficaces (Elechiguerra *et al.*, 2005; Gherbawy *et al.*, 2013). Estas propiedades pueden ser antibacterianas, antifúngicas, antivirales, antiprotozoarias, acaricidas, larvicidas e incluso contra células cancerosas, por lo que han atraído recientemente la atención de un gran número de investigaciones (Raid *et al.*, 2014).

En acuicultura el problema de las enfermedades infecciosas ocasionadas por virus, bacterias y hongos, así como infestaciones por un número importante de parásitos, constituye una de las principales causas de pérdidas económicas (Meyer, 1991), dentro de éstas, el impacto económico de los parásitos protozoarios y metazoarios, en particular a escala global en el cultivo de peces, juegan un papel crítico y significativo en la productividad, ya que la mayoría de ellas no cuentan con medidas

de control adecuadas. Por ejemplo, un estudio demostró que las pérdidas anuales atribuidas a parásitos protozoarios y metazoarios corresponde entre 5.8 a 16.5% del valor de la acuicultura en el Reino Unido (Shinn *et al.*, 2015). En 2013 la producción global de peces por acuicultura fue de 47,071,000 toneladas (FAO, 2015) y se calculó un 10% de pérdidas ocasionadas por parásitos solamente en las salas de cría, dando una cifra de entre 103.55 a 129.44 billones de peces /año, si se asume el mismo porcentaje por cada estado del ciclo de vida de los peces, entonces las pérdidas calculadas se incrementan a \$ 107.31 millones y 134.14 millones de dólares por año en el Reino Unido (Shinn *et al.*, 2015). Dentro de los parásitos los protozoarios son capaces de terminar con los cultivos piscícolas debido a su fácil transmisión, por ejemplo se estima un impacto mundial económico ocasionado por *Ichthyophthirius multifiliis* de \$ 50 millones de dólares al año en los peces ornamentales y de consumo (American Chemical Society, 2010).

Debido a que no existen métodos terapéuticos efectivos para eliminar de manera efectiva a los parásitos protozoarios en peces y a que es complicado lograr el ciclo de vida de ellos en laboratorio, se eligió como organismo modelo al protista *Tetrahymena sp.* para evaluar como método alternativo de control a las NpsAg.

Los protistas tienen sistemas altamente desarrollados para la internalización de partículas de tamaño nanoescala (100 nm o menos) y microescala (100-100000 nm) (Frankel, 2000), por lo que son buenos modelos de organismos para la nanotoxicología (Holbrook *et al.*, 2008).

Otras ventajas del modelo *Tetrahymena sp.* es su fácil cultivo en un período corto de tiempo (Sauvant *et al.*, 1999) por lo cual se ha empleado para evaluar efectos toxicológicos de sustancias como insecticidas, fungicidas, micotoxinas y metales pesados (Uma *et al.*, 2008).

III.1 ACTIVIDAD ANTIPROTOZOARIA DE LAS NpsAg

En la Cuadro 1. Se enlistan los trabajos en donde se han evaluado NpsAg para comprobar su actividad antiprotozoaria en varios organismos.

Cuadro 1. Concentraciones de nanopartículas de plata con actividad antiprotozoaria

Ciliados				
Especies	Concentración empleadas*	Tamaño de nanopartícula (nm)	Concentración con mejores resultados*	Referencia
<i>Paramecium caudatum</i>	1-100 mg/L	30	LC ₅₀ (1h): 39 mg/L	Kvitek <i>et al.</i> , 2009
	10, 30 y 50 µg/mL µg	17, 21 y 28	30,50 µg/mL: 100% efectividad.	Abe <i>et al.</i> , 2014
<i>Tetrahymena pyriformis</i>	0.291, 0.583, .874, 1.165, 1.457, 1.748, 2.039, 2.331, 2.622, 2.913 y 3.205 mg/L.	10	2.913 mg/L: crecimiento poblacional reducido *LC : 1.457 mg/L	Shi <i>et al.</i> , 2012

	1.457 mg/L (oscuridad y luz)	a) 5-10 b) 15-25	Más tóxicas las Nps de 5-10 nm (oscuridad)	Shi <i>et al.</i> , 2013
--	---------------------------------	---------------------	--	-----------------------------

Flagelados				
Especies	Concentración empleadas	Tamaño de nanopartícula (nm)	Concentración con mejores resultados	Referencia
<i>Leishmania tropica</i>	25, 50, 100, 150, 200 µg/mL	10-40	200 µg/mL – actividad inhibitoria parcial	Allahverdiyev, <i>et al.</i> , 2011.
<i>Leishmania amazonensis</i>	0, 12.5, 25, 50, 100 and 200 µM (Químicas y Biológicas)	8-10	<i>In vitro</i> : *IC 50: Biológicas (25 µM) y Químicas (100 µM). <i>In vivo</i> : Químicas más efectivas	Bergmann <i>et al.</i> , 2012
<i>Giardia lamblia</i>	100 ppm	20-50	100 ppm :81.1 % reducción	Said <i>et al.</i> , 2012

*IC: Índice de citotoxicidad

Coccidios				
Especies	Concentración empleadas	Tamaño de nanopartícula (nm)	Concentración con mejores resultados	Referencia
<i>Eimeria tenella</i>	15 mg/L	DN	15mg/L : 50% reducción de oocistos en muestras fecales	Chauke y Siebrits, 2012
<i>Cryptosporidium parvum</i>	0.005 -500 µg/ml	7	500 µg/ml redujó el desenquiste	Cameron et al., 2016
<i>Toxoplasma gondii</i>	100, 200 µg/mL	93.65	100, 200 µg/mL causaron deformidad e inmovilización de los parásitos	Gaafar, 2014

DN: Dato no disponible

Existe evidencia de que las NpsAg pueden dañar las membranas celulares bacterianas por interacción con sus proteínas, afectando su permeabilidad y correcta función (Marambio y Hoek, 2010). En el 2008 en observaciones de *E. coli* con microscopia electrónica de transmisión, identificaron que las NpsAg se adhirieron y penetraron dentro de la célula y fueron capaces de inducir la formación de huecos en la membrana celular (Choi et al., 2008). También otro mecanismo de acción es la liberación de iones de plata y generación de especies reactivas de Oxígeno (ROS).

Las células eucariotas posiblemente podrían ser afectadas por la mayoría de estos mecanismos, sin embargo se han realizado muy pocas investigaciones (Marambio y Hoek, 2010). Recientemente se evaluaron los efectos inhibitorios de las NpsAg en el hongo *Candida albicans* y observaron diferencias ultraestructurales bajo microscopía electrónica de barrido. Tales cambios se localizaron en la superficie de la levadura, lo cual indicó daño en la pared celular (Lara *et al.*, 2015).

Se han identificado también alteraciones, ruptura y degradación de la pared celular por NpsAg en el alga verde *Pithophora oedogonia* (Dash *et al.*, 2012) y la microalga *Chlorella vulgaris* (Razack *et al.*, 2016) y mediante imágenes hiperespectrales en las células del protozooario *Cryptosporidium parvum* (Cameron *et al.*, 2016).

En el caso de los trabajos con los protozoarios *Paramecium* sp. y *Tetrahymena* sp., mencionados anteriormente, no se describe el modo de acción de las NpsAg sobre la membrana, por lo que uno de los objetivos del presente estudio es evaluar cómo actúan en la célula utilizando el modelo de *Tetrahymena* sp.

Esta es la primera vez que dos tipos de nanopartículas de plata Argovit™ y las sintetizadas en el Departamento de Física de la Universidad de Texas a la que en adelante denominaremos UTSA, se utilizarán para evaluar su efectividad en contra de protozoarios ciliados. El objetivo es determinar si las NpsAg tienen potencial para ser utilizadas para controlar infestaciones por parásitos ciliados en peces de cultivo.

IV.- HIPÓTESIS

Las nanopartículas de plata aplicadas al agua de cultivo afectan la supervivencia del ciliado de vida libre *Tetrahymena* sp.

V.- OBJETIVOS

V.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar los efectos tóxicos de dos nanopartículas de plata (sintetizadas física y químicamente) en el protozoo *Tetrahymena sp.*

V.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtener cultivo de *Tetrahymena sp.*
- Evaluar *in vitro* el efecto de diferentes concentraciones y períodos de exposición de dos tipos de NpsAg (Argovit™ y UTSA), sobre la supervivencia de *Tetrahymena sp.*
- Determinar mediante microscopia electrónica de barrido la interacción de las nanopartículas sobre el protozoo.

VI.- MATERIALES Y MÉTODOS

VI.1. Reactivos

VI.1.1 Nanopartículas utilizadas

La solución de Nanopartículas de la marca Argovit™ fue donada por la Dra. Nina Bogdanchikova de la Red de Bionanotecnología de la UNAM y las NpsAg sintetizadas en el Departamento de Física de la Universidad de Texas (UTSA), donadas por el Dr. Humberto Lara del Laboratorio de Astronomía y Física de la Universidad de Texas.

VI.1.1.1 Características de las NpsAg Argovit™

Las características de las nanopartículas Argovit™ tomadas de Melnik *et al.*, 2013, Vázquez *et al.*, 2014, Bogdanchikova *et al.*, 2015, Juárez *et al.*, 2016 y Juárez *et al.*, 2017 se observan en la Cuadro 2.

Cuadro 2. Características de las NpsAg

Propiedades	Argovit™	UTSA
Contenido de plata metálica (mg/ml)	12	0.032
Contenido de Polivinilpirrolidona (PVP) (mg/ml)	188	–
Tamaño de la partícula (nm)	35 ±15	1-3
Forma de nanopartícula	Esféricas	Esféricas
Diámetro hidrodinámico: plata metálica con PVP (nm)	70	–
Potencial Z (mV)	-15	-2.9 a 13.4
Superficie de resonancia del plasmón	420 nm	–

Estructura del PVP por transformada infrarroja de Fourier	Confirmado	—
Síntesis	Química	Física
Actividad	Antibacteriana, antimicótica, virucida	

Las NpsAg Argovit™ no son tóxicas ni genotóxicas en linfocitos humanos (Girón, 2014), además se ha probado que actúan en contra de bacterias, hongos (Vázquez *et al.*, 2014) y virus zoonóticos (Borrego *et al.*, 2016). Las NpsAg tiene certificados internacionales para uso en veterinaria y en humanos (Borrego *et al.*, 2016).

VI.1.1.2 Características de las NpsAg de la Universidad de Texas (UTSA)

Las características de las NpsAg sintetizadas en el Departamento de Física de la UTSA se resumen en la Cuadro 2 (Lara *et al.*, 2015, Romero *et al.*, 2015). Dichas nanopartículas son sintetizadas mediante técnicas asistidas por microondas que tienen la ventaja de conseguir un calentamiento rápido y terminación de la reacción para producir nanopartículas de metales a gran escala.

Esta técnica permite sintetizar nanopartículas metálicas con eficiente distribución del tamaño y lo más importante para propósitos biológicos no involucra el manejo de contaminantes potencialmente citotóxicos o agentes reductores (Zhu *et al.*, 2014).

A lo largo de la sinergia de la metodología del reactor de microondas aplicado al AgNO₃ en el proceso de reacción, la reducción se lleva a cabo produciendo especies reductoras eliminando otras fuentes de contaminación (Gutiérrez *et al.*, 2012).

Las características de tamaño y carga superficial de las nanopartículas resultantes se consideran ideales por sus potenciales aplicaciones terapéuticas (Lara *et al.*, 2011 y Desai, 2012).

VI.1.1.3 Preparación de las concentraciones de NpsAg

La concentración de las NpsAg Argovit™ y UTSA se calcularon en base al contenido de plata metálica. Las soluciones se prepararon en agua destilada y se mantuvieron en oscuridad a 4°C.

El resto de químicos fueron grado analítico y se obtuvieron de las siguientes fuentes comerciales:

- Medios de cultivo: Extracto de levadura (Dibico®), Bactopectona (Difco™), Antibiótico: Piperacilina-tazobactam (Pisa®).
- Tinción de nitrato de plata Chatton-Lwoff: Nitrato de plata y ácido acético (Faga lab®), Tetróxido de osmio (Sigma Aldrich®), Óxido de cromo VI (Meyer), Dicromato de potasio (J.T. Baker®).
- Solución Bouin: ácido acético (Faga lab®), Ácido pícrico (Hycel®), Solución de Formaldehído 37% (J.T. Baker®).
- Fijador microscopía electrónica: Glutaraldehído (J.T. Baker®).
- Controles positivos: Cloruro de sodio, Solución de Formaldehído 37% (J.T. Baker®), Nitrato de plata (J.T. Baker®).

VI.2 Obtención de material biológico

a) Colecta y cultivo de *Tetrahymena* sp.

Se obtuvo un cultivo madre de ciliados de vida libre, a partir de un cultivo orgánico a base de agua con *Lactuca sativa* (lechuga) después de 5 días a una temperatura de 20 °C (Comunicación personal Dr. Carlos Antonio Martínez Palacios).

Para eliminar la carga bacteriana presente en este cultivo, se filtró y lavó 5 veces en cajas de Petri por un tiempo de una hora, con agua destilada suplementada con 250 µg/ml de Estreptomicina/ penicilina G.

A las 24 horas se revisó en microscopio invertido Zeiss modelo AX10 y se seleccionaron las muestras con menor cantidad de células bacterianas. Posteriormente se realizó una siembra de 20 µl del cultivo de dichas muestras por estría en agar Soya Trypticaseína y se incubó a 30°C por 24 horas.

El cultivo con menor cantidad de células bacterianas se mantuvo en 0.1% de extracto de levadura y 1% bactopectona en agua destilada (Arany *et al.*, 2014) y suplementado por segunda ocasión con 250µg/ml de Estreptomicina/ penicilina G (Gallego *et al.*, 2007) e incubado a 30°C por 24 horas. Se realizó siembra por estría de 20 µl del cultivo en agar Soya Trypticaseína y se incubó a 30°C por 24 horas. Se realizó tinción Gram y antibiograma por difusión en placa a las colonias bacterianas desarrolladas, arrojando que las bacterias fueron resistentes a estos antibióticos.

En una tercera experiencia se trató con nuevos antibióticos, del cultivo filtrado y lavado del ciliado se tomaron 20 µl de inóculo y se sembraron en 0.1% de extracto de levadura y 1% bactopectona en agua destilada (Elbp) (Arany *et al.*, 2014) suplementado esta vez, con 8µl de Piperacilina – tazobactam por cada 200 µl del cultivo. Se incubó a 30°C para posteriormente realizar la prueba de esterilidad.

La prueba de esterilidad se realizó después de 24 horas, esparciendo una gota del cultivo en agar extracto de levadura y posterior a su incubación se observó finalmente una eliminación total de bacterias en el cultivo del protozoo. Posteriormente, las células del ciliado se mantuvieron en medio de cultivo Elbp, conforme Arany *et al.*, (2014) a 30°C. Al día siguiente células del ciliado cultivadas con éxito sin bacterias, fueron llevadas a la fase logarítmica y de éstas se tomaron las muestras de protozoarios para ser usados en los experimentos.

Las células se contaron bajo microscopio con un hemocitómetro. Para precisar el conteo, las células se inmovilizaron mediante la adición de 1 gota de solución Bouin (Miyoshi *et al.*, 2003).

VI.3. Identificación Taxonómica de los ciliados

La morfología de los ciliados se estudió primero en condiciones *in vivo* para lo cual las células fueron inmovilizadas con la adición de 1 gota de solución Bouin (Miyoshi *et al.*, 2003). El protozooario se fijó y tiñó por la técnica de nitrato de plata Chatton-Lwoff (Foissner, 1992) para su identificación a género según Lom y Dykova (1992).

Con el fin de corroborar el género del protozooario se llevaron a cabo estudios moleculares para lo cual, se realizó inicialmente la extracción de ADN a 1 ml del cultivo de ciliados (el cual se encontraba en fase logarítmica). La muestra del cultivo se centrifugó a 13,000 rpm durante 5 min y se desechó el sobrenadante. A continuación se siguió con el protocolo del DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen Cat 69504), posteriormente se realizó electroforesis en gel de agarosa al 2% a 90 voltios, 500 miliamperes durante 30 min para comprobar presencia de ADN. Posteriormente se amplificó mediante PCR la región V9 del gen ARNr con el primer diseñado por Amaral *et al.*, 2009. Asimismo se llevó a cabo la purificación de productos de PCR cortados del gel siguiendo instrucciones del Promega Wizard SV Gel y PCR clean-up system.

Las muestras fueron enviadas a MacroGen Korea (<http://www.macrogen.com/eng/>) para su secuenciación.

VI.4. Diseño experimental

VI.4.1. Evaluación *in vitro* de las diferentes concentraciones de nanopartículas de plata en *Tetrahymena* sp.

El trabajo experimental se realizó en el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD) Unidad Mazatlán. Se empleó el método de recuento en microplaca de 96 pozos, un volumen de 100 µl de diferentes concentraciones de las nanopartículas de plata se colocó en cada pozo de la microplaca (Xu *et al.*, 2015), posteriormente 20 células del protozooario en cultivo se agregaron a cada pozo que

contenía diferentes concentraciones de nanopartículas (por triplicado) (Abe *et al.*, 2014). Los valores de la Concentración letal 50 (LC₅₀) y Concentración letal 100 (LC₁₀₀) de las NpsAg se determinó por método estático.

Las concentraciones finales a evaluar se eligieron en base a 24 experimentos preliminares para cada nanopartícula, utilizándose finalmente las siguientes concentraciones para las NpsAg (Argovit™) (ng/L): 300, 600, 900, 1200, 1500, 1800, 2100, 2400, 2700, 3000 y 3300. Para las NpsAg (UTSA) se utilizaron las siguientes concentraciones (ng/L): 1.0, 2.2, 3.4, 4.6, 5.8, 7.0, 8.2, 9.4, 10.6. Para el control negativo se utilizó agua destilada.

Cada 15 min post-exposición se registró la mortalidad acumulada del protozooario hasta completar 1 hr en el microscopio invertido Zeiss modelo AX 10. El criterio de muerte de las células fue la ausencia de movimiento ciliar (Xu *et al.*, 2015).

Para comparar la toxicidad de las NpsAg (Argovit™ y UTSA) contra la plata iónica en el ciliado, se usó una solución de Nitrato de plata como referencia por representar la forma más tóxica de plata a una concentración de 0.4 mg/L (Kvitek *et al.*, 2009). Asimismo se evaluaron los controles positivos de formalina 1 ml/L y cloruro de sodio 30 g/L (FDA, 2016).

VI.4.2. Descripción del efecto de las NpsAg sobre *Tetrahymena* mediante microscopía óptica

Se obtuvieron imágenes de *Tetrahymena* sp. expuesta a las diferentes concentraciones de NpsAg en la microplaca de 96 pozos con el microscopio invertido Zeiss AX 10 a los 60 min de exposición para describir el efecto de las nanopartículas de plata sobre la morfología del ciliado.

VI.4.3 Descripción de la interacción de las nanopartículas de plata sobre *Tetrahymena* sp. mediante microscopía electrónica de barrido

Al tiempo de exposición total (1 hora) 60 protozoarios por tratamiento y por duplicado se fijaron en solución de Glutaraldehído al 2.5%. Posteriormente se evaluó el efecto

de las NpsAg sobre la morfología externa del ciliado por medio de microscopía electrónica de barrido de acuerdo a la metodología descrita por Romero *et al.*, (2015) en el laboratorio de la Universidad de Texas en San Antonio (UTSA) con un microscopio Hitachi 5500.

VI.4.4 Análisis de datos

Para el análisis *in vitro* de la mortalidad de *Tetrahymena* sp. durante los experimentos llevados a cabo, se calculó la concentración letal media (LC₅₀) y los tiempos letales medios (TL₅₀) de las NpsAg y sus intervalos de confianza mediante el modelo Probit (versión 15.0) del Programa SPSS®. De la misma manera se calculó la concentración letal (LC₁₀₀) la cual se define como la menor concentración que mató al 100% de los protozoarios.

Por otro lado se evaluó la mortalidad del protozoo *Tetrahymena* sp. a través del tiempo con las diferentes concentraciones de nanopartículas de plata (Argovit™ y UTSA) utilizadas.

Asimismo se determinó el porcentaje de eficacia de cada tratamiento por la comparación del número de protozoarios vivos encontrados en cada tratamiento contra los del grupo testigo negativo, de la siguiente manera:

$$\% \text{ Eficacia} = 100 - (100 \times \text{protozoarios vivos en los tratamientos} / \text{promedio de protozoario vivos en el testigo negativo}) \text{ (Onaka et al., 2003).}$$

Posteriormente se realizó el análisis estadístico de los porcentajes de efectividad encontrados para ambas nanopartículas de plata (Argovit™ y UTSA) sobre *Tetrahymena* sp., mediante el programa Statistica Ver. 7 (<http://statistica.io/>). Se realizaron pruebas de normalidad y homogeneidad de varianzas en los datos que se obtuvieron de las efectividades de cada una de las nanopartículas. Según fue el caso se utilizó un ANOVA con una prueba de Newman Keuls para datos paramétricos o

bien un análisis Kruskal Wallis para datos no paramétricos. El nivel de significancia que se usó fue de $P \leq 0.05$.

VII.- RESULTADOS

VII.1 Identificación taxonómica de los protozoarios

VII.1.1 Técnica de nitrato de plata Chatton-Lwoff (Foissner, 1992)

Con la técnica de Chatton-Lwoff en microscopio óptico se identificaron las tres membranelas adorales y una membrana oral correspondiente al género *Tetrahymena* sp (Fig. 1), de acuerdo a Lom y Dykova, (1992).

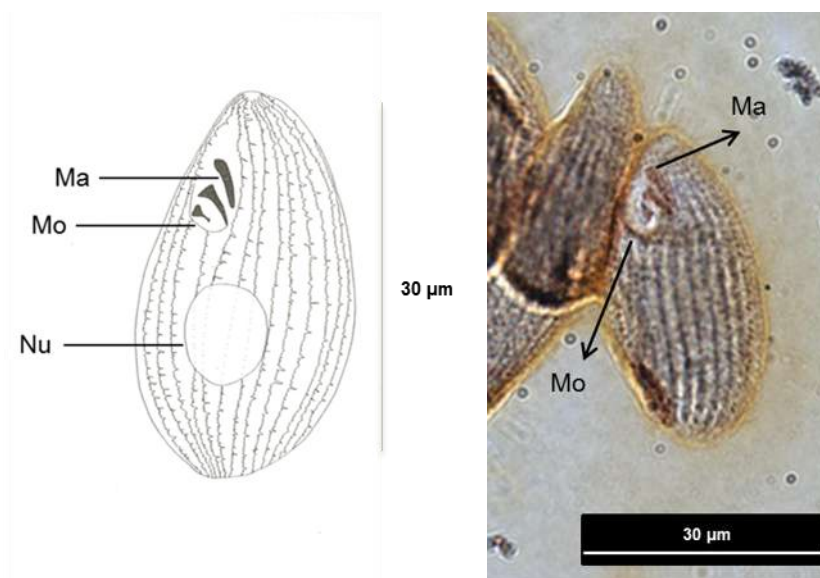


Figura 1.- Morfología de *Tetrahymena* sp.

Ma: membranelas adorales, Mo: membrana oral, Nu: Núcleo

VII.1.2 Programa informático de alineamiento de secuencias Basic local alignent (Blast) (Técnica molecular para determinación del género y especie)

La Figura 2 y el Cuadro 3 muestran el alineamiento de secuencias para la determinación del género y la búsqueda disponible en la base de datos moleculares con la herramienta BLAST del NCBI, 2015. La secuencia obtenida corresponde con un 95% de identidad con *Tetrahymena pigmentosa*, por lo que se concluye pertenece al género *Tetrahymena* sp.

GTCCCTTTTTCTATGTCTGGTGACCTTTC TGGACTGTGACACCAATGTTTCG GAA
AATTAAGTAAACCCTACCATTTTGGAAACAACAAGAAGTCGTAACAAGGTATCTGT
AGGTGAACCTGCAGAATGACTCCCCCCTTTTTCTTTTTTTCTTC TTTTTCTTTT
TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
TT
TT
TT
TT
TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
TT

Figura 2. Secuencia de genes para el programa informático de alineamiento de secuencias Basic local alignment (Blast)

Cuadro 3. Resultados del Blast

Descripción	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<i>Tetrahymena pigmentosa</i> strain HG2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, complete sequence; and 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	171	171	0.22	2E-38	95%	EF608221.1

VII.2 Actividad antiprotozoaria de las nanopartículas de plata (NpsAg)

VII.2.1 Evaluación *in vitro* de las NpsAg Argovit™

Las mortalidades registradas se graficaron cada 15 minutos durante 1 hora de exposición a diferentes concentraciones de NpsAg Argovit™ (Fig. 3).

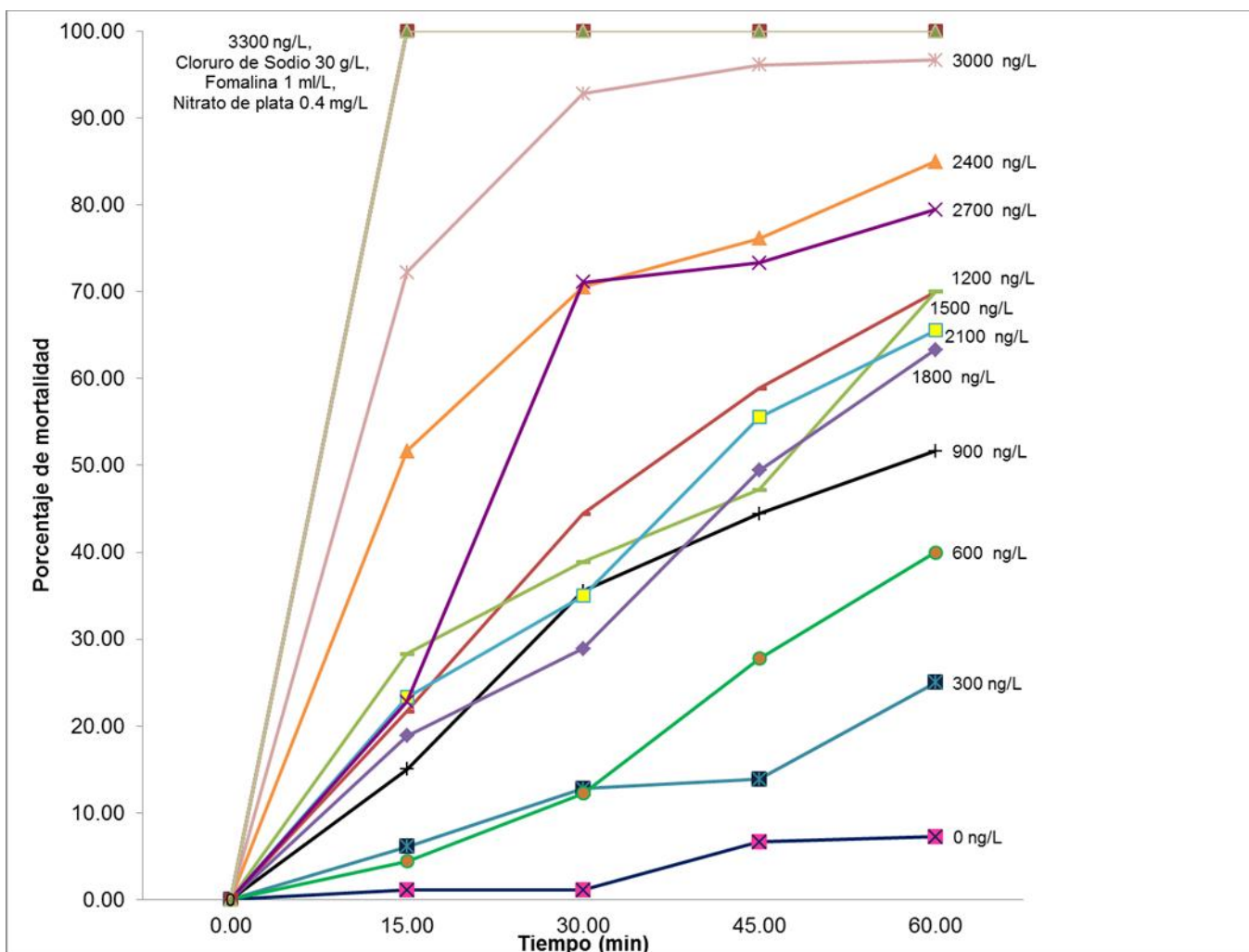


Figura 3.- Porcentaje de mortalidad de *Tetrahymena* sp. a diferentes tiempos (min) y concentraciones de NpsAg Argovit™. Testigos: negativo (0 ng/L) y positivos (formalina, cloruro de sodio y nitrato de plata).

La tendencia de la mortalidad se incrementó al aumentar la concentración de las NpsAg Argovit™ y el tiempo de exposición. En la gráfica se observan tres grupos, las concentraciones que no alcanzaron el 50% de mortalidad al final del bioensayo (0, 300 y 600 ng/L), las concentraciones que tuvieron de 50 a 70% de mortalidad (900 a 2100 ng/L) y las que alcanzaron mortalidades de más de 70 al 100% (2400 a 3300 ng/L) junto con los positivos de nitrato de plata, formalina y cloruro de sodio. El testigo negativo NpsAg Argovit™ mostró una mortalidad del 7% a los 60 min.

VII.2.2 Evaluación *in vitro* de las NpsAg UTSA

Las mortalidades de los protozoarios registradas cada 15 min durante 1hr post-exposición a las NpsAg UTSA se muestran en la Figura 4.

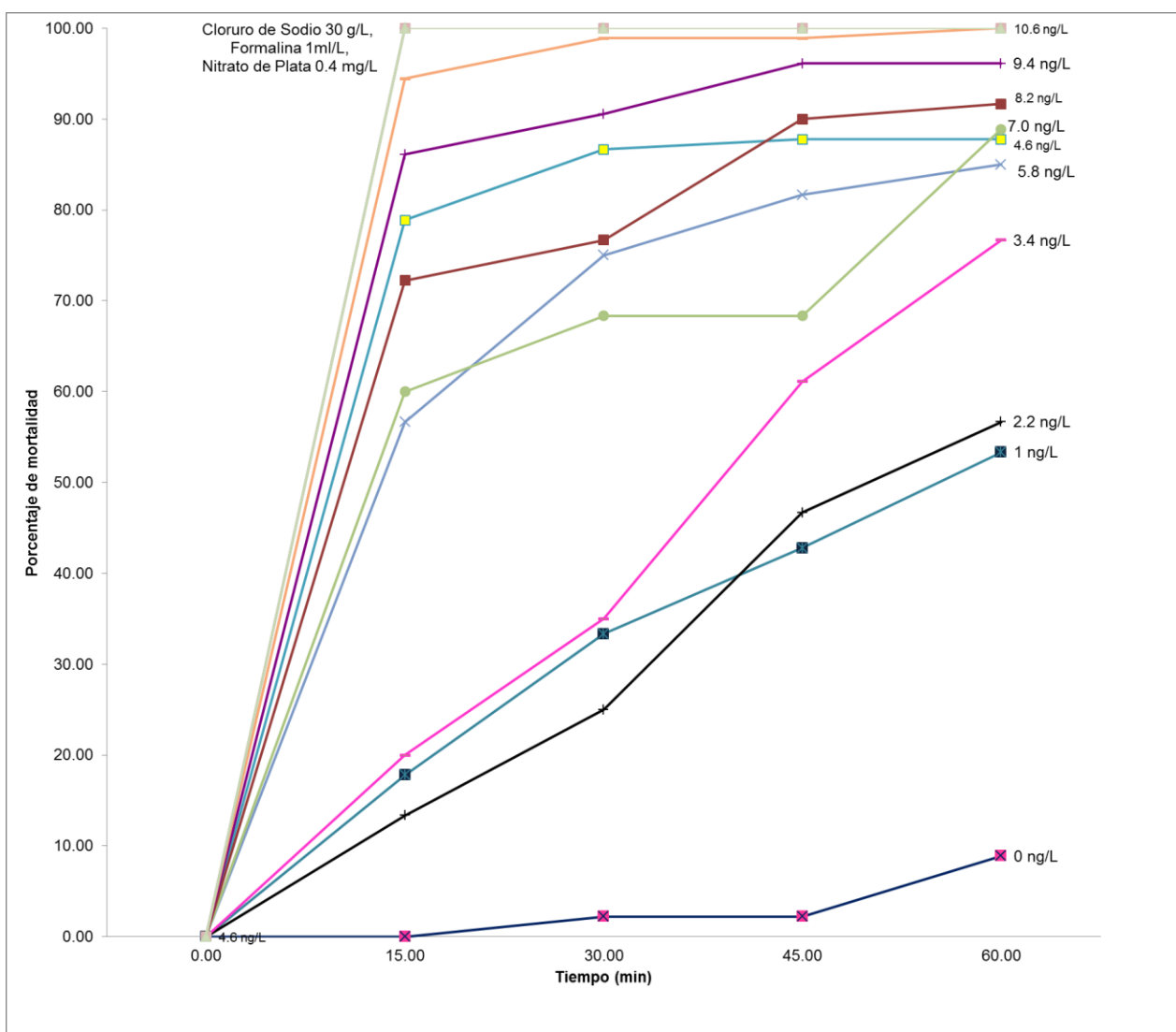


Figura 4.- Porcentaje de mortalidad de *Tetrahymena* sp. a diferentes tiempos (min) y concentraciones de NpsAg UTSA. Testigos: negativo (0 ng/L) y positivos (formalina, cloruro de sodio y nitrato de plata).

La tendencia observada es similar a las NpsAg Argovit™ en donde al aumentar la concentración de nanopartículas (NpsAg UTSA) y tiempo de exposición se ve incrementada la actividad antiprotozoaria.

En la gráfica se observan tres grupos, las concentraciones que no alcanzaron el 70% de mortalidad al final del bioensayo (0, 2.2 y 1 ng/L), las concentraciones que tuvieron de 70 a 90% de mortalidad (3.4 a 7 ng/L) y los que alcanzaron mortalidades de más de 90 al 100% (8.2 a 10.6 ng/L) junto con los positivos de nitrato de plata, formalina y cloruro de sodio. El testigo negativo NpsAg UTSA mostró una mortalidad del 9% a los 60 min.

VII.2.3 Cálculo de la concentración letal media (LC₅₀) y los tiempos letales medios (TL₅₀) de las NpsAg Argovit™ Y UTSA

De las dos nanopartículas evaluadas (Argovit™ y UTSA) se calculó la CL₅₀ a partir de las diferentes concentraciones utilizadas experimentalmente (Cuadro 4).

Cuadro 4. Concentración letal media (LC₅₀) e intervalos de confianza (95%) para cada una de las concentraciones de las dos NpsAg evaluadas en *Tetrahymena* sp. durante 1 hora de tratamiento, utilizando el programa SPSS 15.0 ®

NpsAg Argovit™		Intervalos de confianza al 95%	
Tiempo (min)	LC ₅₀ (ng/L)*	Límite inferior	Límite superior
15	2501	1716.581	6920.279
30	1554	1007.393	2336.629
45	1160	791.247	1527.243
60	796	510.316	1046.636
NpsAg UTSA			
15	4	2.361	6.164
30	3	1.040	4.344

45	2	0.538	2.784
60	1	0.626	1.724

*las cifras se redondearon

La concentración letal media para ambas nanopartículas disminuyó conforme se incrementó el tiempo de exposición (min). Los intervalos de confianza más cortos se identificaron en NpsAg UTSA.

Respecto a los tiempos letales medios para ambas nanopartículas (Cuadro 5), éstos de manera general disminuyen conforme aumenta la concentración. Los tiempos letales medios en la concentración más alta fue de 2 min y 8 min para las NpsAg UTSA y NpsAg ArgovitTM respectivamente.

Cuadro 5. Tiempo letal medio (TL₅₀) de las dos nanopartículas para las concentraciones evaluadas utilizando el programa SPSS 15.0 ®.

NpsAg Argovit TM		Intervalos de confianza al 95%	
Concentración (ng/L)	TL ₅₀ (min)**	Límite inferior	Límite superior
900	54	46.792	66.218
1200	35	31.380	38.654
1500	39	*	*
1800	45	30.288	155.265
2100	40	35.300	44.982
2400	14	9.957	17.511
2700	25	*	*
3000	8	5.207	10.373
3300	*	*	*
NpsAg UTSA			

1	55	47.290	69.404
2.2	52	46.173	59.849
3.4	35	21.312	60.872
4.6	1	.000	3.829
5.8	11	6.968	14.673
7.0	11	*	*
8.2	6	*	*
9.4	2	.151	4.909
10.6	2	.129	5.327

*Indeterminado ; ** las cifras se redondearon

VII.3 Efectividad de las NpsAg en *Tetrahymena* sp.

En el análisis estadístico de las efectividades de las nanopartículas Argovit™ los datos de 15 y 30 min no presentaron normalidad por lo que se les realizó un Anova no paramétrico y una comparación múltiple Kruskal-Wallis. Los datos de 30 y 60 min acusaron normalidad y homogeneidad por lo que se les realizó la prueba de comparación Newman-Keuls.

Por otro lado todos los datos de las nanopartículas NpsAg UTSA no presentaron normalidad, por lo que se llevó a cabo un Anova no paramétrico y comparación múltiple mediante prueba de Kruskal-Wallis.

VII.3.1. Efectividad de las NpsAg Argovit™

A los 15 min se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0.5$) entre las concentraciones de 3000 y 3300 ng/L con el testigo (Fig. 5). Por otro lado a los 30 min se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0.5$) entre la máxima concentración (3300 ng/L) y el testigo (Fig. 6).

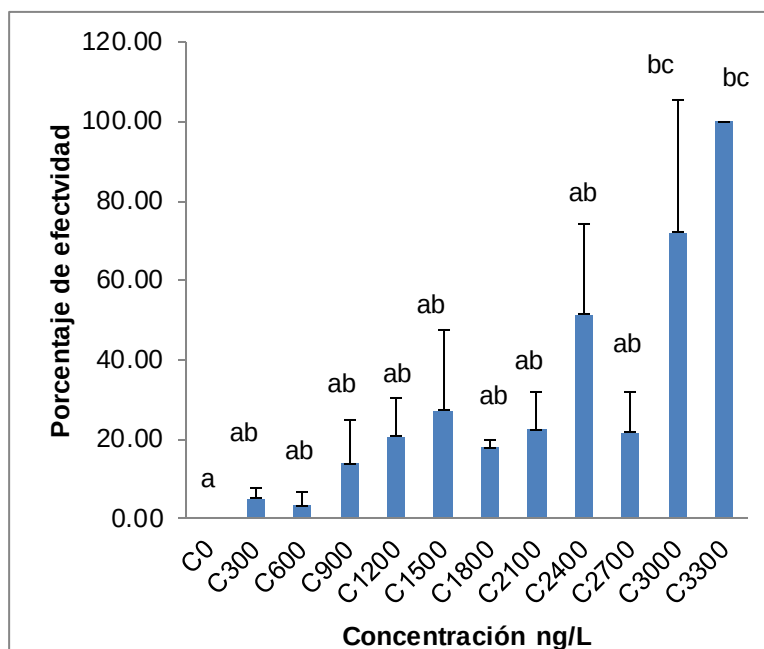


Figura 5.- Efectividad de las NpsAg Argovit™ en *Tetrahymena* sp. a los 15 min de exposición

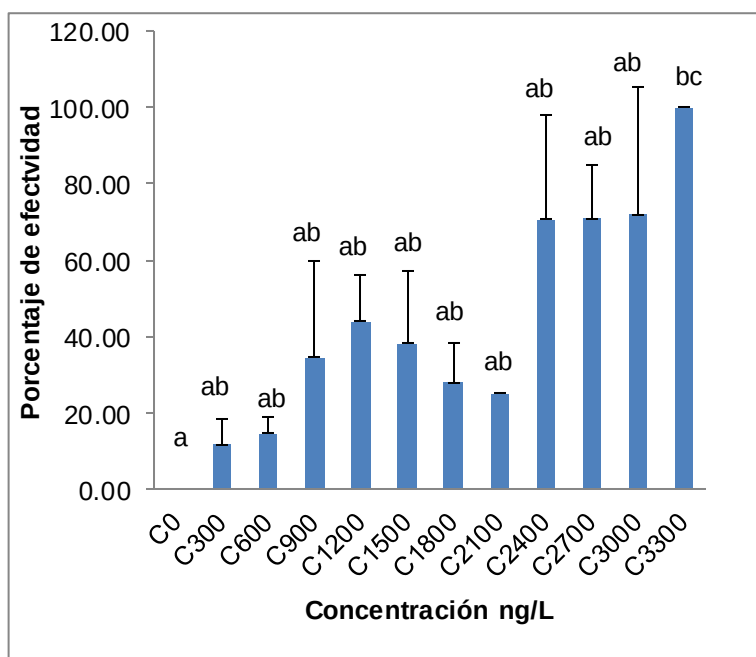


Figura 6.- Efectividad de las NpsAg Argovit™ en *Tetrahymena* sp. a los 30 min de exposición

A partir de las concentraciones de 900-3300 ng/L a los 15 y 30 minutos no se observó ninguna diferencia significativa en la efectividad, mientras que a los 45 minutos de exposición con el testigo se presentaron diferencias significativas ($p \leq 0.5$) (Fig. 7). Asimismo se presentaron diferencias significativas ($p \leq 0.5$) entre las concentraciones de 1200, 2100-3300 ng/L y la concentración de 300 ng/L.

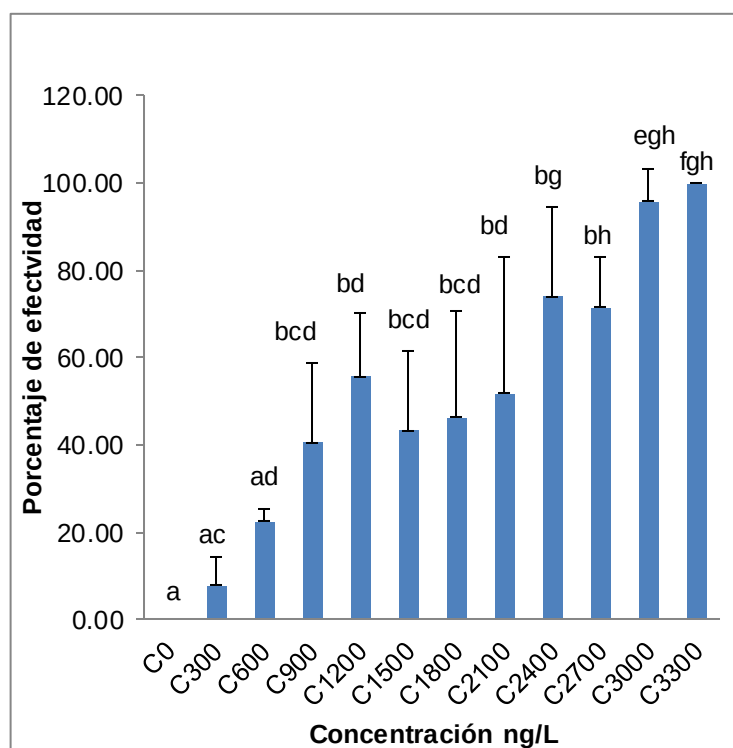


Figura 7.- Efectividad de las NpsAg Argovit™ en *Tetrahymena* sp. a los 45 min de exposición

Las concentraciones de 2400-3300 ng/L presentaron diferencias significativas ($p \leq 0.5$) con la concentración de 600 ng/L. Asimismo las concentraciones de 3000 y 3300 presentaron diferencias significativas ($p \leq 0.5$) con las concentraciones de 600-2100 ng/L.

A los 60 min se observaron diferencias significativas ($p \leq 0.5$) entre los tratamientos de las concentraciones de 600-3300 ng/L con el testigo.

También hubo diferencias significativas ($p \leq 0.5$) entre las concentraciones de 900-3300 y la concentración más baja 300 ng/L. Por otro lado las concentraciones de 2400-3300 ng/L mostraron diferencias significativas ($p \leq 0.5$) con la concentración de 600 ng/L.

La concentración de 900 ng/L mostró diferencias significativas ($p \leq 0.5$) con la concentración de 2400, 3000 y 3300 ng/L. Asimismo diferencias significativas entre las concentraciones de 1500 ng/L y 3300. Por ultimo las concentraciones de 1800 y 2100 ng/L presentaron diferencias significativas ($p \leq 0.5$) con las concentraciones de 3000 y 3300 ng/L (Fig.8).

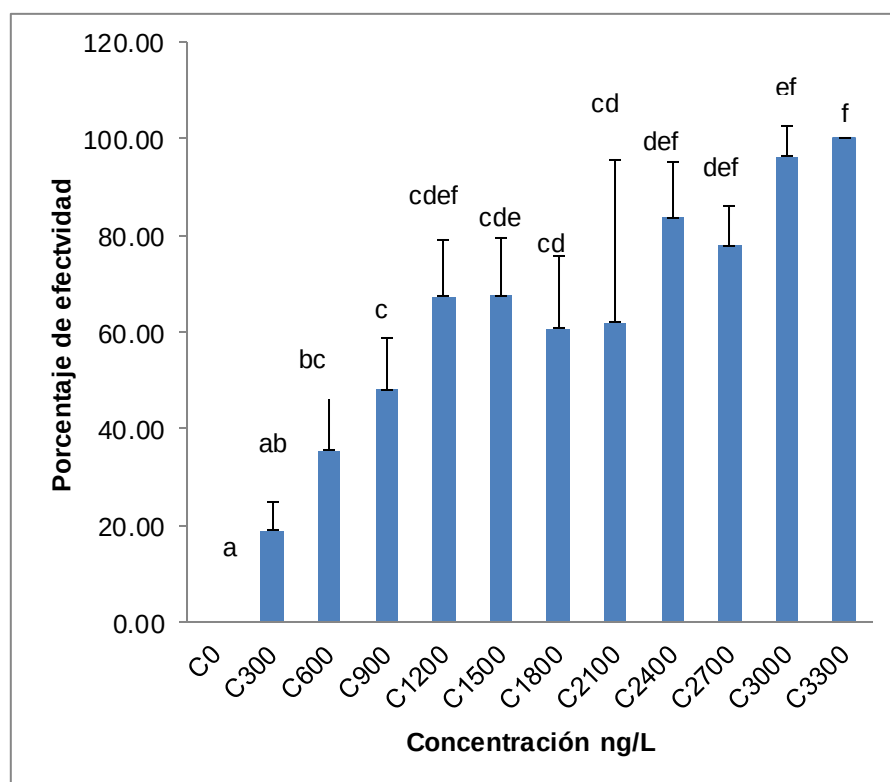


Figura 8.- Efectividad de las NpsAg Argovit™ en *Tetrahymena* sp. a los 60 min de exposición

Las concentraciones de NpsAg Argovit™ de 3000 y 3300 ng/L fueron las más efectivas con 96 y 100% de efectividad respectivamente a los 60 min de exposición (Fig. 8).

VII.3.2. Efectividad de las NpsAg de UTSA.

A los 15, 30, 45 y 60 min se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0.5$) entre el grupo testigo y la concentración de 10.6 ng/L (Figs. 9,10 ,11 y 12).

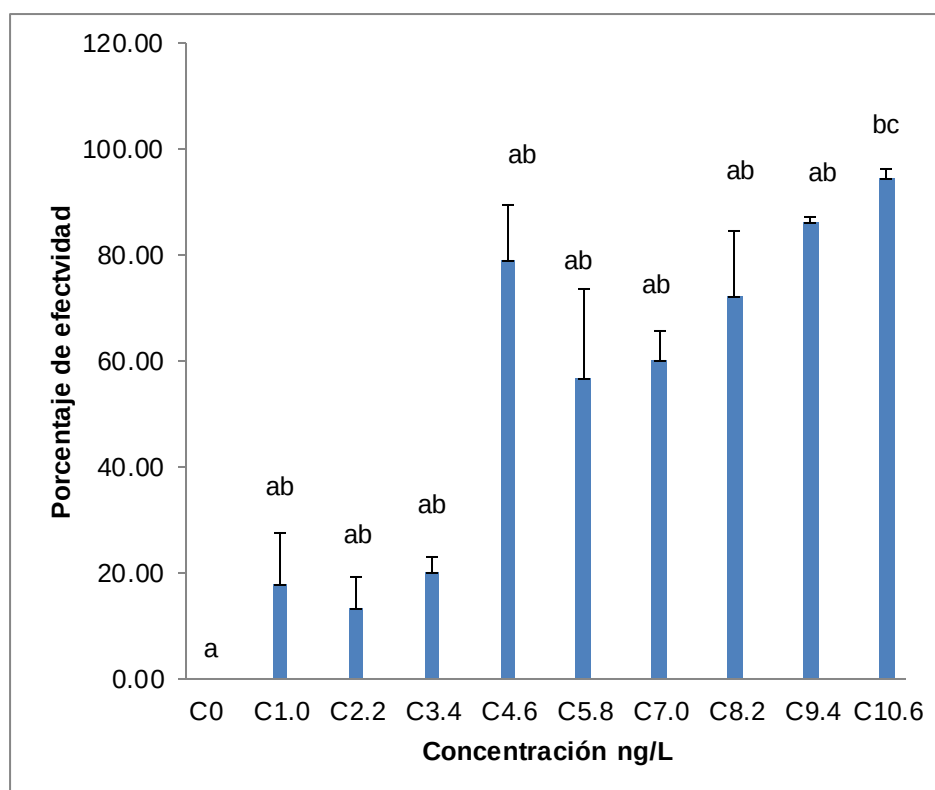


Figura 9.- Efectividad de las NpsAg UTSA en *Tetrahymena* sp. a los 15 min de exposición

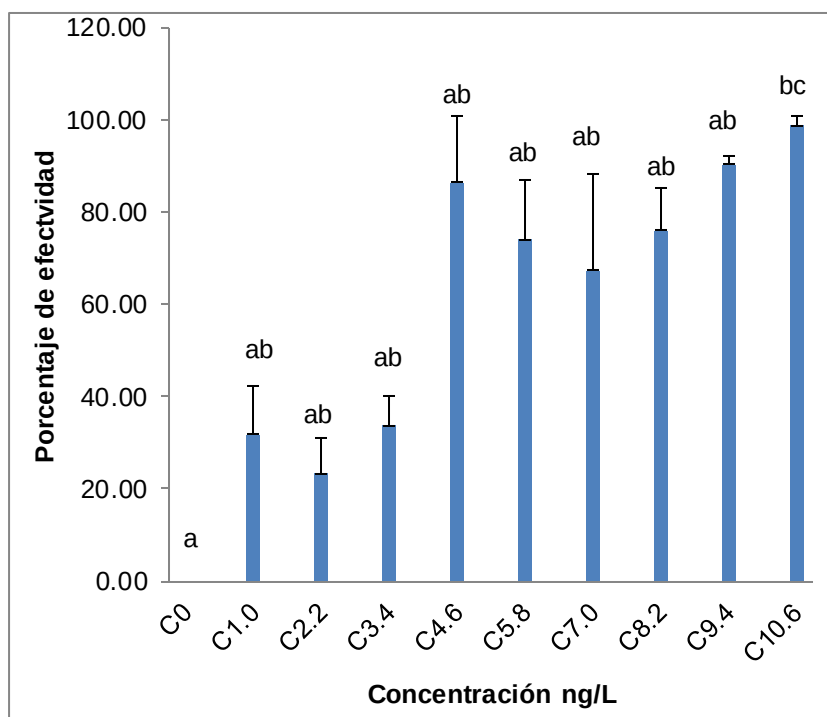


Figura 10.- Efectividad de las NpsAg UTSA en *Tetrahymena* sp. a los 30 min de exposición

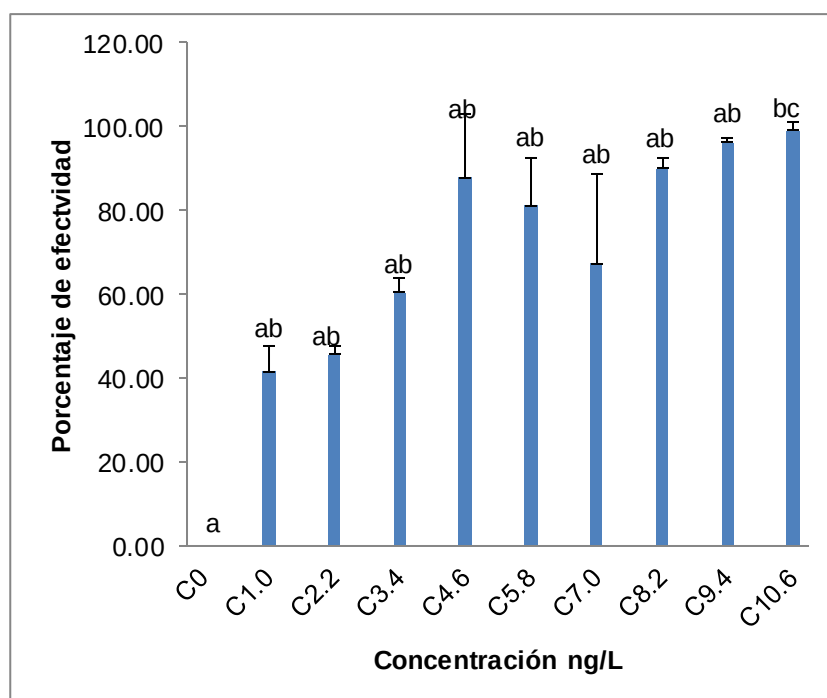


Figura 11.- Efectividad de las NpsAg UTSA en *Tetrahymena* sp. a los 45 min de exposición

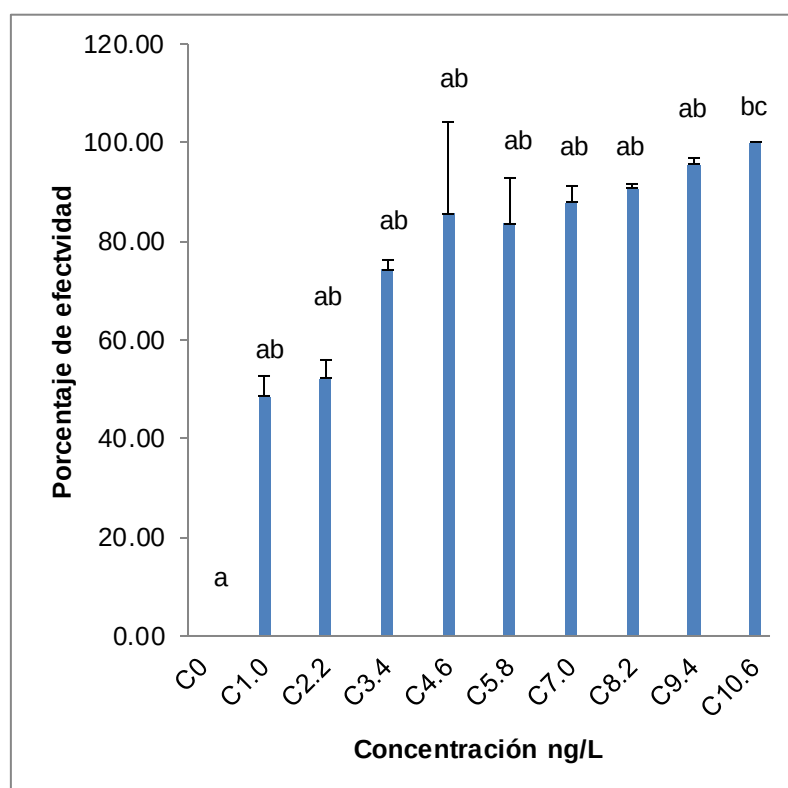


Figura 12.- Efectividad de las NpsAg UTSA en *Tetrahymena sp.* a los 60 min de exposición

Las concentraciones de 9.4 y 10.6 ng/L de NpsAg UTSA fueron las más efectivas durante el experimento, con un 96 y 100% de efectividad respectivamente.

VII.4 Microscopia óptica y microscopía electrónica de barrido: interacción de las NpsAg sobre *Tetrahymena sp.*

Microscopía óptica

En la Figura 13a se observa microscópicamente la morfología de *Tetrahymena sp.* completa, sin cambio en sus estructuras y morfología, mientras que en las Figuras 13b y 13c se observa el efecto de las concentraciones máximas y mínimas de las

NpsAg Argovit™ sobre membranas y núcleo en la morfología de *Tetrahymena* sp. comparada con un organismo vivo utilizado como testigo negativo.

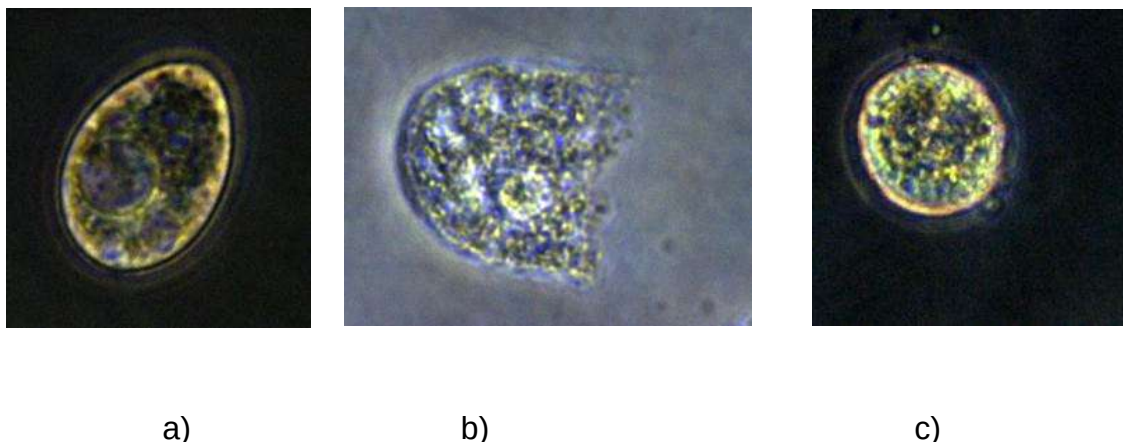


Figura 13.- Microfotografías del ciliado *Tetrahymena* sp. (400x), a) Testigo negativo. Expuesta a NpsAg Argovit™: b) máxima concentración 3300 ng/L, c) mínima concentración 300 ng/L).

En la máxima concentración (3300 ng/L) se observa una *Tetrahymena* sp. (Fig 13b) con ruptura de membrana plasmática y fuga de contenido celular con respecto al testigo negativo.

En la mínima concentración (300 ng/L) como se observa en la Figura 13c los protozoarios pierden su morfología ovalada. Las microfotografías del efecto en *Tetrahymena* sp. con las diferentes concentraciones de NpsAg Argovit™ se observan en el anexo (Cuadro 6).

También se observaron cambios morfológicos en *Tetrahymena* sp. expuesta a las NpsAg UTSA a la concentración máxima y mínima (Fig. 14).

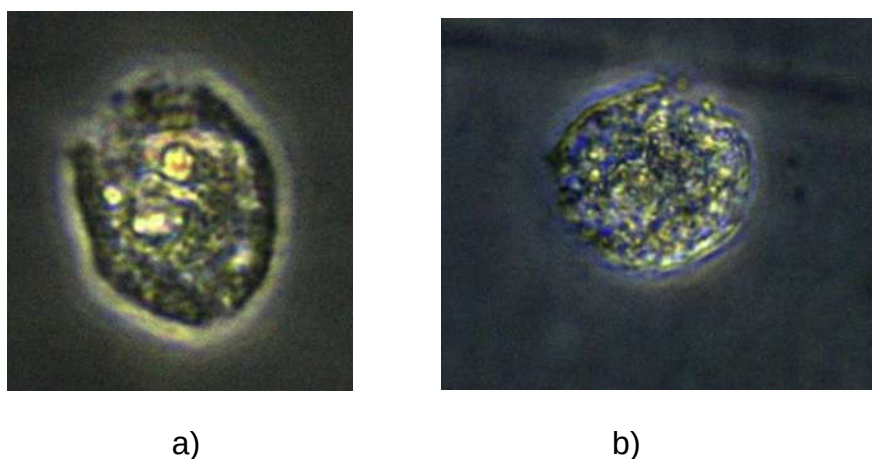


Figura 14.- *Tetrahymena* sp. expuesta a NpsAg UTSA (400 x):

a) Máxima concentración 10.6 ng/L b) Mínima concentración 1 ng/L

En la máxima concentración evaluada (10.6 ng/L) la ruptura de membrana y fragmentación del núcleo (apoptosis) fueron evidentes mientras que en la mínima concentración evaluada (1 ng/L) solamente se detectó ruptura de membrana. Las microfotografías del efecto en *Tetrahymena* sp. con las diferentes concentraciones de NpsAg UTSA se observan en el anexo (Cuadro 7).

Microscopía electrónica de barrido (MEB)

Se obtuvieron imágenes de MEB para conocer el efecto de las NpsAg ArgovitTM y UTSA sobre *Tetrahymena* sp., ambas nanopartículas provocaron una estructura amorfa de la célula en contraste con su característica forma ovalada. La Figura 15 muestra una célula completa de *Tetrahymena* sp, embebida en un fondo blanco que es artefacto debido a los materiales de fijación.

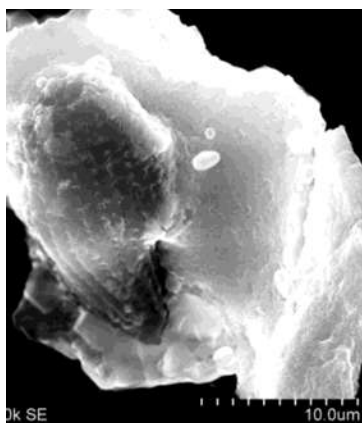
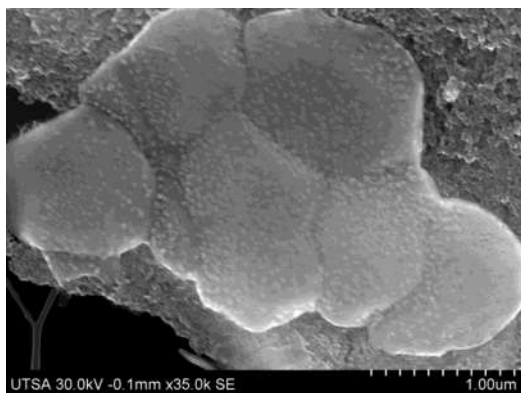
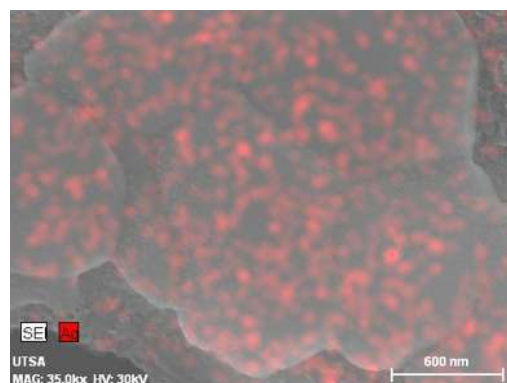


Figura 15.- *Tetrahymena* sp. testigo negativo

La Figura 16a muestra una célula de *Tetrahymena* sin estructura ni forma con numerosos puntos blancos en su interior. La técnica de espectroscopia de dispersión reveló la plata en las células afectadas coloreada en rojo (Fig. 16b). En forma similar, con las NpsAg UTSA, se observan los organismos afectados en una forma amorfa (Fig. 17a) y mediante la técnica de espectroscopia de dispersión las partículas de plata resaltadas de color rojo (Fig. 17b).



a)



b)

Figura 16.- a) *Tetrahymena* sp. dañada por nanopartículas Argovit™ y

b) Identificación de plata (rojo) en *Tetrahymena* sp.

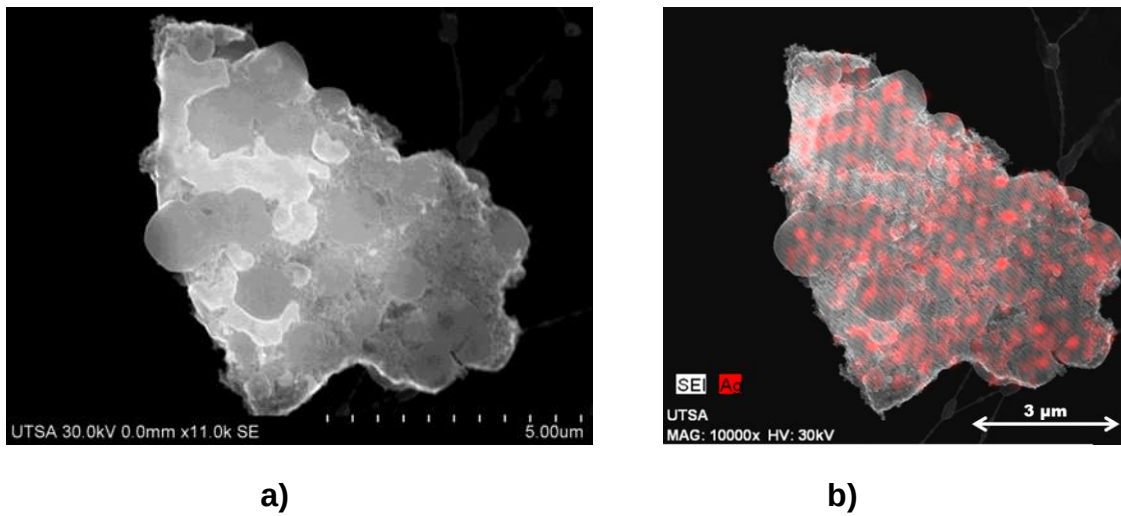


Figura 17.- a) Célula dañada con NpsAg UTSA y b) Detección en rojo de la plata dentro de la célula dañada.

VIII.- DISCUSIÓN

Entre los ciliados parásitos de mayor impacto al cultivo de peces dulceacuícolas se encuentra *Ichthyophthirius multifiliis* causante de grandes pérdidas económicas en las granjas de peces comerciales: trucha (*Oncorhynchus mykiss*), tilapia (*Oreochromis aureus*), bagre (*Ictalurus punctatus*), pez blanco (*Chirostoma stor*) y peces de ornato de diferentes estados de México (Constantino *et al.*, 1997; SAGARPA, 2012; SAGARPA, 2013). Sin embargo, las investigaciones sobre la efectividad de la terapia para su control en México son escasas debido a la ausencia de cultivo de estos parásitos en el laboratorio. Estudios sobre el empleo de organismos de fácil cultivo como el ciliado *Tetrahymena thermophila*, taxonómicamente relacionado a *Ichthyophthirius multifiliis* y con secuencias de genes similares a sus terontes infectivos (Coyne *et al.*, 2011) mostraron toxicidad en *T. thermophila* y en los estadios infectivos de *I. multifiliis* (Xu *et al.*, 2015). Es por ello que el protozoario *Tetrahymena* sp. cultivada se emplea como modelo de estudio para el presente trabajo.

El ciliado parásito cultivado en el laboratorio en este estudio mostró las tres membranelas extendidas oblicuamente a lo largo de la pared izquierda de la cavidad bucal y la membrana perioral características para el género *Tetrahymena* descritas por Lom y Dykova (1992). La *Tetrahymena* sp. aislada del cultivo de *Lactuca sativa* fue corroborada en cuanto a género y coincidió con la descripción de las cuatro membranas del aparato oral que reporta Lom y Dykova, (1992) para *Tetrahymena* sp. De igual manera, adicionalmente, se constató que los datos de las secuencias de bases del gen 18S coincidieron en 95% con las bases de datos moleculares del género en el NCBI, 2015.

En esta investigación tanto las NpsAg Argovit™ como las UTSA presentaron actividad antiprotozoaria dosis dependiente (al incrementarse la concentración se incrementó la toxicidad), coincidiendo con lo reportado por Shi *et al.*, (2012) quienes sintetizaron y evaluaron NpsAg en *T. pyriformis*. Asimismo, coincide con lo descrito por Cameron *et al.*, (2016) en la coccidia *Cryptosporidium parvum* tratada con

NpsAg NM-300. En particular, las concentraciones antiprotozoarias efectivas de las NpsAg Argovit™ (3300 ng/L) y UTSA (10.6 ng/L) fueron bajas comparadas con la menor concentración (30 000 000 ng/L) de otras Nps que causaron 100% de mortalidad en los ciliados *Paramecium caudatum* y *Tetrahymena pyriformis* (Kvitek et al., 2009, Shi et al., 2012, Shi et al., 2013, Abe et al., 2014). Es importante destacar que 311 veces menos concentrada las NpsUTSA ocasionaron el mismo efecto que las NpsAg Argovit™ evidenciando su mayor toxicidad y efecto sobre *Tetrahymena* sp. No obstante, la CL₁₀₀ de las NpsAg Argovit™ a *Tetrahymena* sp. fue de 3300 ng/L a los 15 min, dicho tiempo coincide con lo descrito por Abe et al., 2014 en *Tetrahymena* sp. Mientras la CL₁₀₀ de las NpsAg UTSA fue 10.6 ng/L a los 60 min. Aunque los estudios sobre toxicidad de las nanopartículas de Argovit™ y UTSA en otras especies se encuentran actualmente en proceso a través del proyecto 258607 CONACYT: “Estudio del efecto de nanopartículas de plata en virus, bacterias y parásitos de organismos acuáticos”, los resultados alcanzados parecen indicar un menor riesgo para peces y otros organismos acuáticos en contraste con los registros de Asharani et al.,(2011); Bruneau et al., (2016) y Afifi et al.,(2016) donde el uso excesivo de otras NpsAg no solo son bio-acumulables sino altamente tóxicas para los organismos acuáticos generando a su vez contaminación ambiental (Griffit et al., 2008 y Luoma et al., 2013) (Cuadro 8).

El tamaño efectivo de las nanopartículas es un factor importante a considerar en la toxicidad de las Nps sobre las células (Carlson et al., 2008). Se ha demostrado que mientras más pequeñas, las nanopartículas tienen una mejor actividad antiprotozoaria (Kvitek et al., 2009; Allahverdiyev, et al., 2011; Bergmann et al., 2012; Chauke y Siebrits, 2012; Said et al., 2012; Shi et al., 2012; Shi et al., 2013; Gaafar, 2014 y Cameron et al., 2016). Al comparar la toxicidad de las NpsAg Argovit™ contra las NpsAg UTSA, existe una toxicidad diferencial, en donde menores concentraciones de las NpsAg UTSA causaron mayor mortalidad en *Tetrahymena* sp. que las NpsAg Argovit™ atribuible probablemente a su menor tamaño (1 nm

NpsAg UTSA vs 35 nm NpsAg Argovit™) y coincidente con los experimentos de Shi *et al.*, (2013) al evaluar el efecto de partículas de (15-25 nm) en *T. pyriformis*.

La LC₅₀ de *Tetrahymena* sp. a las NpsAg Argovit™ y UTSA fueron de 796 y 1 ng/L respectivamente a los 60 min, valores mucho menores a los reportadas por Abe *et al.*, 2014 (30 000 000 ng/L) en *Paramecium caudatum*.

La aplicación de las NpsAg (Argovit™ y UTSA) en *Tetrahymena*, ocasionó ruptura de la membrana celular similar a lo descrito por Cameron *et al.*, (2016) al aplicar NpsAg en el protozooario *Cryptosporidium parvum*. Asimismo daños semejantes en la membrana celular se han identificado en otros organismos eucariotas, tales como *Candida albicans* (Lara *et al.*, 2015) y algas (Dash *et al.*, 2012; Razack *et al.*, 2016). La microscopía de luz evidenció apoptosis, lo cual ha sido identificado previamente en embriones de ratón en fase de blastocisto (Li *et al.*, 2010).

Los testigos positivos evaluados Formalina (1mL/L) y Cloruro de sodio (30 g/L) ocasionaron 100% de mortalidad en *Tetrahymena* sp. a los 15 minutos de exposición (Cuadro 9) coincidente con los registros de la FDA (2016) (Cuadro 10). Similarmente la concentración de la plata iónica (0.4 mg/L), ocasionó la muerte inmediata de *Tetrahymena* sp., tal como se reportó para el ciliado *Paramecium* (Kvitek *et al.*, 2009).

Los efectos antimicrobianos de la plata (Ag) se han reconocido por varias centurias ya que los iones de la plata poseen el más alto nivel de actividad antimicrobiana de todos los metales pesados. El efecto antimicrobiano de la Plata ha sido demostrado en numerosas aplicaciones contra diferentes tipos de microorganismos incluidos bacterias, virus y protozoarios (Silvestry *et al.*, 2007).

En el presente trabajo se evaluaron tres soluciones de plata, la primera fue la solución de nitrato de plata (Kvitek *et al.*, 2009) y la segunda, fue la plata en forma de dos nanopartículas (Argovit™ y UTSA) sobre el ciliado *Tetrahymena* sp., ambas formas de plata resultaron ser efectivas. No obstante la plata en su forma iónica a

pesar de su efectividad, no puede ser aplicada en el ambiente acuático debido a su gran concentración (mg/L) y alta toxicidad sobre los peces y crustáceos (Baert *et al.*, 2006) (Cuadro 11). Por tal motivo la plata en forma de nanopartícula podría utilizarse con más ventajas para el ambiente acuático ya que las concentraciones tóxicas son millones de veces menos concentradas que el nitrato de plata. Así la toxicidad del Nitrato de plata se mide en mg/L, mientras que la toxicidad de las NpsAg se mide en ng/L, o sea que la concentración tóxica de las NpsAg es un millón de veces mayor que la concentración del nitrato de plata. Sin embargo se requieren realizar estudios más exhaustivos sobre la toxicidad y bioseguridad de las Nanopartículas en el ambiente acuático para tomar una decisión definitiva sobre su uso.

IX.- CONCLUSIONES

- 1.- Se logró identificar el protozoo utilizado en el presente trabajo a nivel de Género (*Tetrahymena* sp.) a través de taxonomía clásica y a nivel molecular a través de la secuenciación de la región V9 del gen Ribosomal (18).
- 2.- Los resultados de las evaluaciones *in vitro* demostraron que las NpsAg ArgovitTM y UTSA fueron 100% efectivas para eliminar al ciliado *Tetrahymena* sp.
- 3.- La aplicación de las NpsAg (ArgovitTM y UTSA) en *Tetrahymena* sp., ocasionaron ruptura en la membrana celular y apoptosis.
- 4.- Las NpsAg UTSA fueron 311 veces más tóxicas que las de ArgovitTM posiblemente debido a su tamaño más pequeño y que por ello pudieron ocasionar la fragmentación del núcleo de los protozoarios.

.

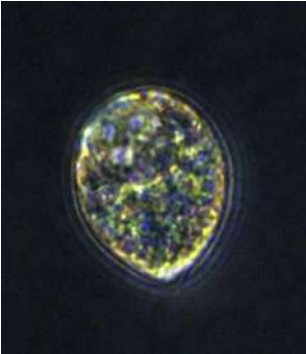
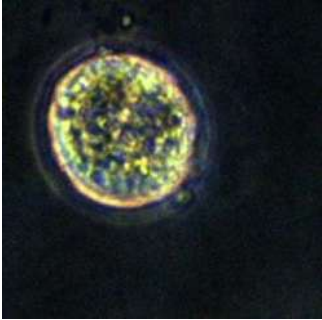
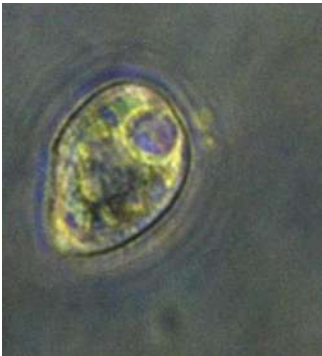
X.- PERSPECTIVAS

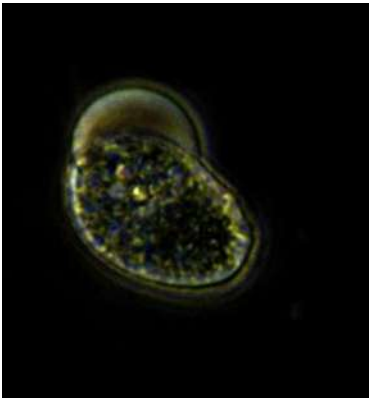
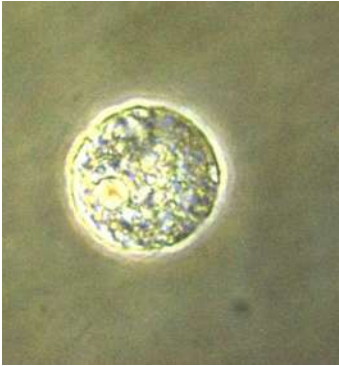
Derivado del presente trabajo se propone evaluar *in vivo* las concentraciones letales (LC_{100}) a *Tetrahymena sp.* en peces, con la finalidad de identificar si existe algún daño o toxicidad a estos vertebrados. También se propone evaluar la bioacumulación de las NpsAg en órganos internos para conocer posibles vías de absorción, probable daño histológico a huevos y juveniles de peces y la factibilidad de ser un problema de daño al consumidor. Dicha información proporcionará elementos complementarios sobre la factibilidad de la terapia con NpsAg en peces infestados con protozoarios ciliados.

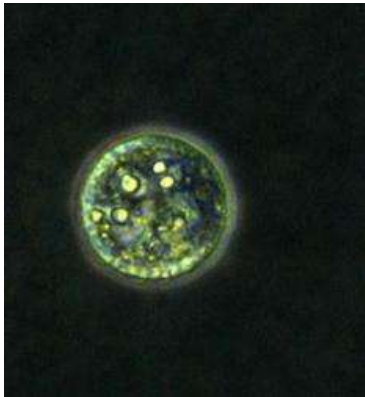
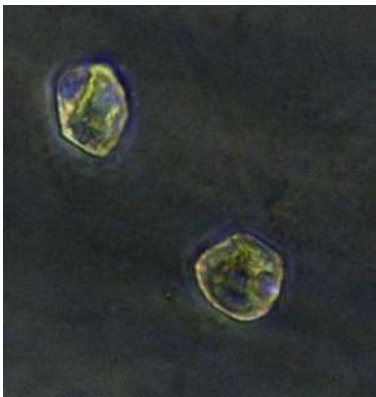
Es de importancia evaluar *in vitro* la actividad antiparasitaria de las NpsAg sobre otras especies de parásitos protozoarios y metazoarios para determinar la efectividad del uso de estas NpsAg como una moderna terapia.

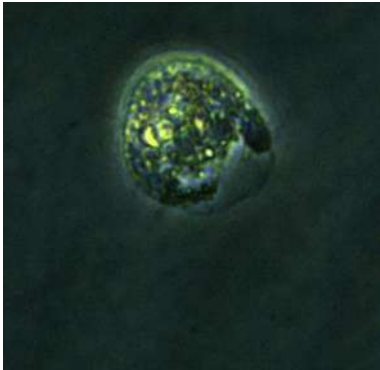
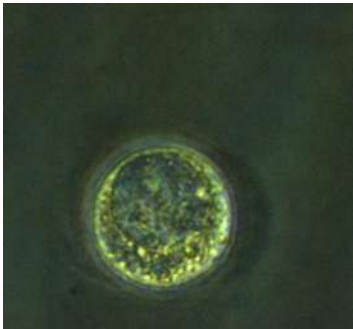
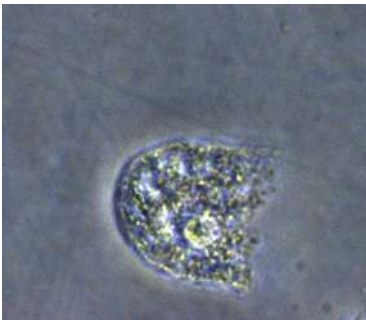
XI.- ANEXOS

Cuadro 6.- Efecto de diferentes concentraciones de NpsAg Argovit™ en *Tetrahymena* sp.

Concentración ng/L	NpsAg Argovit™ 400 x
0	
300	
600	

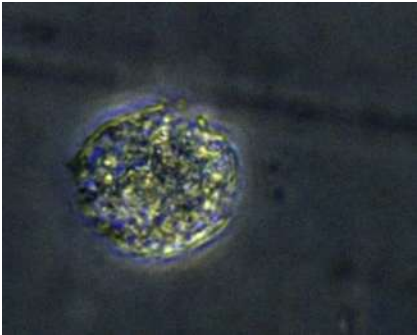
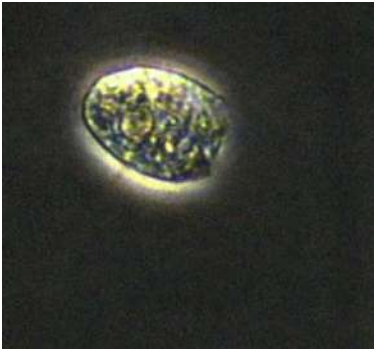
900	
1200	
1500	

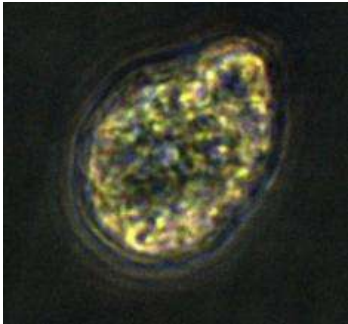
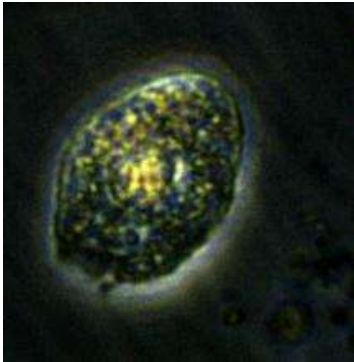
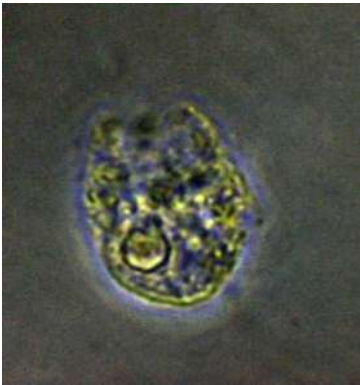
1800	 *
2100	
2400	

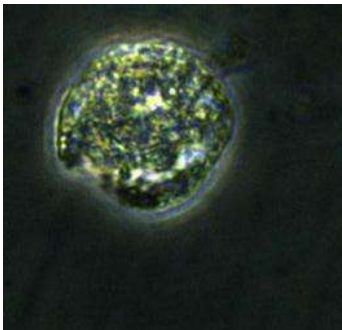
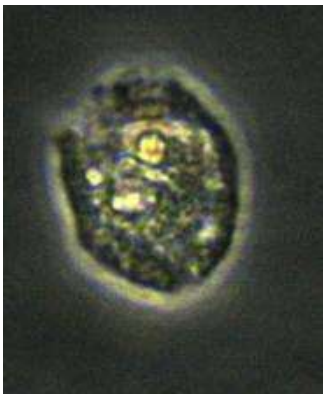
2700	
3000	
3300	

*200 x

Cuadro 7.- Efecto de diferentes concentraciones de NpsAg UTSA en *Tetrahymena* sp.

Concentración ng/L	UTSA
1.0	
2.2	
3.4	
46	

4.6	
5.8	
7.0	

8.2	
9.4	
10.6	

Cuadro 8.- Toxicidad de diferentes NpsAg en peces

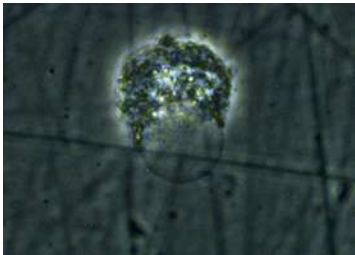
Tamaño de la nanopartículas (nm)	Condiciones de exposición	Concentración letal y/o Principales hallazgos	Referencia
22	Duración 96 h 40 µg/L	Hembras juveniles <i>Oncorhynchus mykiss</i> Analizaron hígado y branquias Mayor acumulación de plata en hígado Sugiere distribución sistemática de NpsAg en peces	Bruneau <i>et al.</i> , 2016
<100	Duración 24, 48 y 96 h Concentraciones 0,5,10,20,30 y 40 mg/L	Machos de <i>Oreochromis niloticus</i> LC ₅₀ :19.5 mg/L Incremento significativo de partículas de Ag en cerebro de peces expuestos. Distribución NpsAg a través de circulación sanguínea y subsecuente acumulación en órganos. 4 mg/L Con efecto en el sistema antioxidante del cerebro.	Affi <i>et al.</i> , 2016

<i>ESTUDIOS DE NANOTOXICIDAD DE PLATA EN EL PEZ CEBRA (Danio rerio)</i>			
20-30	Duración 48 h 0-10 mg/L ,	LC ₅₀ (hembras): 7.07 mg/L, Juveniles: 7.20 mg/L	Griffit <i>et al.</i> , 2008
5-20	Duración 24 h	LC ₅₀ (hembras y adultos) 250 mg/L. NpsAg inducen estrés oxidativo, daño DNA y apoptosis en hígado	Choi <i>et al.</i> , 2010
81	Duración 48 h 8 concentraciones µg/L: 18, 36, 54, 72, 79, 107, 125, 143	LC ₅₀ (machos) 84 µg/L LC ₁₀ : 57 µg/L	Bilberg <i>et al.</i> , 2012
11-45 Nps Químicas , 20-40 Nps Biológicas, partir de extractos de <i>Psidium</i> <i>guajava</i>	Duración 96 h	LC ₅₀ Nps Químicas: 80 µg/L Nps Biológicas: 400 µg/L	Sarkar <i>et al.</i> , 2014
20/ 110	Duración 96 h 1,2, 5 ppm	Branquias e intestino órganos blancos de toxicidad de plata en los peces. Los resultados demuestran la importancia del tamaño de la partícula en el impacto de las AgNPs	Osborne <i>et al.</i> , 2015

5-50	Duración 96 h 6 concentraciones µg/L: 23.7, 47.4, 142.2, 237, 284.4, 331.8	LC ₅₀ (hembras y machos) 142.42 µg/L	Krisnaraj <i>et al.</i> , 2016
------	--	---	--------------------------------

Nps: nanopartículas

Cuadro 9.- Efectos del Nitrato de plata, Formalina y Cloruro de sodio en *Tetrahymena* sp.

Químico	Testigos positivos (400 x)
Nitrato de plata	
Formalina	
Cloruro de sodio	

Cuadro 10. - Descripción de la Formalina y Cloruro de sodio

Químico/S tatus FDA	Conc.	Actividad	Ventajas	Tiempo de exposi ción	Implicaciones de su uso	Seguridad en la vida acuática	Información toxicológica en peces	Tiempo de vida (días)
Formalina/ (Aprobado) (FDA, 2016)	0.05- 0.35 ml/L (FAO, 1991)	Control de infecciones bacterianas y micóticas en huevos de peces	Esterilizante Debido a su amplio espectro de actividad (Flick, 1998). Es bactericida, viricida, fungicida (CDC, 2008). Alta solubilidad en el agua y no se bioacumula en organismos acuáticos (WHO, 1989).	Baño corto 10 min-2 hrs	La exposición a altas concentraci es de vapor de formaldehído causa graves irritaciones respiratorias que pueden poner en peligro la vida. Los niveles más bajos de vapor pueden causar irritación en	Toxicidad aguda para la vida acuática 96h: 0.00458 ml/L Toxicidad crónica para la vida acuática 0.00161 ml/L (Hohreiter y Rigg, 2001) Toxicidad aumenta sustancialmente al subir la temperatura del	LC ₅₀ : 0.01694-0.123 ml/L (Cuadro 12) La tolerancia a la formalina es diferente entre especies (Intorre, 2007)	2-20 (Australian Department of the Environment and Heritage 2001)

	0.025–0.030 ml/L FAO, 1991	Ictioparásitos protozoarios: <i>Cryptobia</i> sp., <i>Ichthyobodo</i> sp., <i>Chilodonella</i> sp., <i>Trichodina</i> sp. y <i>Trichodinella</i> . Infecciones micóticas		Baños largos	los ojos, las vías respiratorias y la piel. Ingerir el formaldehído puede poner en peligro la vida (FDA, 2007). Puede causar daño ocular severo, incluso ceguera Y agravar una afección preexistente: asmática y rinitis alérgica (FDA, 2007). El vapor de formaldehído puede ser	agua (FAO, 1996). Daño a las branquias de los peces (FAO, 1996). Remueve el oxígeno del ambiente acuático, es también un alguicida. Peces muy enfermos no toleran tratamiento completo (University of Florida, 1996) En especies de peces sensibles		
	0.25 ml/L FAO, 1991			Baños cortos de 30-60min				
	0.25 ml/L (FDA, 2007).	Control de protozoarios parásitos de peces tales como: <i>Chilodonella</i> spp., <i>Costia</i> spp., <i>Epistylis</i> spp., <i>Ichthyophthirius</i>						

		spp., <i>Scyphidia</i> spp. y <i>Trichodina</i> spp .			cancerígeno si se inhala (FDA, 2007). Costoso y grandes volúmenes se requieren (University of Florida, 1996) Uso contraindicado >28°C (Wise <i>et al.</i> , 2004)	la concentración a usarse debe ser <10 mg/L (University of Florida, 1996) A bajas temperaturas es transformado en paraformaldehído: altamente tóxico para los peces (University of Florida, 1996)		
	1ml -2 ml/L. (FDA, 2007).	Control de hongos de la familia Saprolegniaceae en peces (excepto Acipenseriformes)				Toxicidad afectada por la química del agua (pH, dureza y constituyentes naturales en el agua) (Meinelt <i>et al.</i> , 2005).		

						Alteración en las células de mucosas (Leal <i>et al.</i> , 2016).		
Cloruro de sodio (Baja prioridad regulatoria) (FDA, 2016)	0.5-1 g/L (FDA, 2011)	Minimiza el estrés osmoregulatorio durante el transporte de peces.	Previene la metahemoglobinemia en algunas especies de peces.		No es práctica en estanques por la gran cantidad de sal que se requeriría (University of Florida, 2015). Recipientes	Efectividad de la sal en el control de la ichthiophthiriosis puede variar entre especies de peces, concentración de sal y la cepa de ich (Mitsuf y Rowland, 2008).	LC ₅₀ : 10.39 - 21.69 g/L (Adultos) (Cuadro 13)	ND
	2 g /L (Mifsud y Rowland, 2008).	Control de la ictioftiriasis en tanques, acuarios y sistemas de recirculación	Incrementa la producción de mucus en la piel. Bajo costo, lista para uso y					

	20-50g/l (FAO, 1991)	Control de infecciones bacterianas y micóticas en huevos de peces.	cuando es apropiadamente es segura para uso en peces dulceacuícolas (University of Florida, 1995)	Baños cortos	con recubrimiento de zinc nunca deben ser usados para los baños de NaCl (FAO, 1991).	Éxito del tratamiento depende de la severidad de la infestación (Wise <i>et al.</i> , 2004).		
	4-5 g/l	Infecciones por Ich estadios terontes (intolerantes a salinidad) (University of Florida, 2015)			Temperaturas del agua inferiores a 5 °C	Diferencia entre las concentraciones letales de cloruro de sodio para los peces y los parásitos no es muy grande, es necesario durante el tratamiento atenerse a pruebas de tolerancia (FAO, 1991).		
	30 g/L (FAO, 1991).	Control efectivo de ictioparásitos protozoarios: <i>Cryptobia</i> sp., <i>Ichthyobodo</i> sp., <i>Chilodonella</i> sp., <i>Trichodina</i> sp. y <i>Trichodinella</i> sp.		Baños cortos de 15-30 min	de los baños de sales se reduce sustancialmente (FAO, 1991). Ligeramente irritante en piel y ojos de usuario. Efectos	Peces expuestos		

					mutágenicos a células somáticas de mamíferos (MSDS, 2013). Impacto ambiental del agua de descarga en cuerpos acuíferos (Mifsud <i>et al.</i> , 2008)	a soluciones salinas muestran nado errático y pérdida de balance en forma dosis dependiente (Mallick <i>et al.</i> , 2016). Altas concentraciones y exposiciones provocan la muerte (Burgdorf <i>et al.</i> , 2011)		
--	--	--	--	--	---	--	--	--

Cuadro 11.- Diferentes formas de plata utilizadas como bactericidas en la industria médica y alimentaria

	Nanopartículas	Plata iónica	Partículas (Plata coloidal) metálica
Constitución	1-100 nm de longitud o diámetro (Thomas y Sayre, 2005)	Átomos de Plata que han perdido un electrón quedando con una carga positiva.	Pequeñas 1-100 μm (Gary , 1994) Pequeñas partículas de Plata metálica que, a su vez, están formadas por muchos átomos.
Método de formación	Químico, físico, biológico	DN	Mecanismo de precipitación (Gary, 1994)
Superficie volumen radio	Mayor , por lo que aumenta sus propiedades superficiales : Mayor interacción por lo son potencialmente más reactivas que las partículas más grandes (Beer <i>et al.</i> , 2012) 59	DN	Menor área superficial (Beer <i>et al.</i> , 2012)

Iones de plata libres	Continúa liberación (Van der Zande <i>et al.</i>, 2012) Papel importante en la toxicidad de las suspensiones de AgNP (Beer <i>et al.</i>, 2012).	DN	Continúa liberación (Van der Zande <i>et al.</i> , 2012)
Comportamiento en el organismo humano	Vías de exposición oral, respiratoria y dérmica son las más relevantes (Johnston <i>et al.</i>, 2010). Tamaño de las AgNPs también influye en la distribución tisular en la penetración dermal e intestinal y en la captación celular (Chithrani <i>et al.</i>, 2006, De Jong <i>et al.</i>, 2008, Sonavane <i>et al.</i>, 2008)	Iones pueden pasar a la sangre de forma que al entrar en contacto con la luz solar, se reducen a Plata metálica (Ag 0) y originan manchas azuladas en la piel, es decir, producen Argiria (Drake y Hazelwood, 2005).	Pasan a través del tracto digestivo, sin ninguna posibilidad de pasar a la sangre, ya que la plata como metal noble es totalmente insoluble en líquidos orgánicos, hasta eliminarse finalmente por las heces en su totalidad (HSE, 1998).
Toxicidad animales terrestres	Muestran efectos tóxicos inaceptables en el humano y ambiente (Panyala <i>et al.</i>, 2008). Más baja toxicidad de NpsAg en organismos eucariotas en comparación con procariotas (Kvítek <i>et al.</i>, 2011). Estudios <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> NPsAg producen una toxicidad	Bajo riesgo para los humanos (Juberg, 1998). Absorción en pulmones y tracto gastrointestinal. Ingestión por varios de plata puede causar argiria en humanos y	Forma metálica menor riesgo para la salud humana (Drake y Hazelwood, 2008). No se reconoce seguras (FDA, 1999) Limite permisible de

	pulmones, riñones, cerebro, órganos reproductores y el hígado (órgano principal de acumulación de las AgNPs.) (Avalos <i>et al.</i> , 2013).	animales, este efecto es solamente cosmético y no es peligroso a la salud (EPA, 1993). Dosis letal en el humano AgNO ₃ : 10g	exposición 0.01 mg/m ³ todas las formas de plata (National Institute for Occupational Safety and Health, 2003)
Toxicidad animales acuáticos	Toxicidad en peces LC ₅₀ (96h) 0.08-19.5 mg/L (Consultar Cuadro 8). No representan riesgo para el ambiente (Kvítek <i>et al.</i> , 2011)	Alta toxicidad: Algas, peces y <i>Daphnia</i> concentraciones nanomolares (Baer, <i>et al.</i> , 2006).	No se reconoce segura (FDA, 1999)
Acumulación	Presente (Marín <i>et al.</i> , 2015)	Presente (Marín <i>et al.</i> , 2015)	Ausente
Actividad antimicrobiana	Mejor agente antimicrobiano inhiben el crecimiento de microorganismos a concentraciones más bajas (Kvítek <i>et al.</i> , 2011). Actividad letal contra muchos microorganismos tales como hongos y bacterias, así como contra virus (Morones <i>et al.</i>	Menor agente antimicrobiano (Kvítek <i>et al.</i> , 2011), Gram negativas más sensibles en comparación a Gram positivas (Feng <i>et al.</i> 2000)	Antimicrobiano que se ha utilizado como aditivo en forma de compuestos que liberan iones de plata (Ag ⁺) en solución acuosa (Cano y Cantú, 2017).

	2005). Tamaño de las partículas 2- 10 nm mata las bacterias y mejorar la respuesta inmune y regeneración de tejidos (Morones <i>et al.</i> , 2005)		
Efectos en la célula	Inducen bordes irregulares en la membrana y encogimiento celular (Hussain <i>et al.</i> , 2005) Apoptosis (Li <i>et al.</i> , 2010)		Apoptosis (Franco <i>et al.</i> , 2010)
Aplicaciones	Medicina (UNAM, 2017). Electrónica, ropa, pinturas, cosméticos, bactericidas, biofungicidas, en la industria médico-farmacéutica y alimentaria (Avalos <i>et al.</i> , 2013)	Medicina (Drake y Hazelwood, 2005)	Desinfectante de fruta, vegetales (Silver, 2003) y agua (Franco <i>et al.</i> , 2010)

DN: Dato no disponible

Cuadro 12.- Concentración letal LC₅₀ de la Formalina (36-38% Formaldehído) para peces.

Especie	LC ₅₀ 96 h (ml/L)	Referencia
<i>Morone saxatilis</i>	0.01694**	Hohreiter y Rigg, 2001
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	0.05873**	Hohreiter y Rigg, 2001
<i>Salvelinus namaycush</i>	0.04033**	Hohreiter y Rigg, 2001
<i>Lepomis macrochirus</i>	0.03916**	Hohreiter y Rigg, 2001
<i>Lepomis cyanellus</i>	0.06978**	Hohreiter y Rigg, 2001
<i>Ictalurus punctatus</i>	0.02228**	Hohreiter y Rigg, 2001
<i>Anguilla rostrata</i>	0.0311**	Hohreiter y Rigg, 2001
<i>Pimephales promelas</i>	0.0256**	Hohreiter y Rigg, 2001
<i>Ameiurus melas</i>	0.02505**	Hohreiter y Rigg, 2001
<i>Micropterus dolomieu</i>	0.05485**	Hohreiter y Rigg, 2001
<i>Micropterus salmoides</i>	0.05768 **	Hohreiter y Rigg, 2001
<i>Acipenser oxyrinchus</i>	0.031	Kim y Farrel, 2002
<i>Sphoeroides annulatus</i>	0.079 (72h)	Fajer et al., 2003
<i>Poecilia reticulata</i>	0.097-0.103	Dolezelova et al., 2009
<i>Danio rerio</i>	0.117-0.123	Dolezelova et al., 2009
<i>Clarias gariepinus.</i>	0.1122	Ayuba et al., 2013

** Promedio de toxicidades agudas reportadas para la especie

Cuadro 13.- Concentración letal LC₅₀ del Cloruro de sodio para peces.

Especie	Respuesta (g/L) LC ₅₀ :96 hr	Referencia
<i>Acipenser oxyrinchus</i>	9.735 (Juveniles)	Kim y Farrel, 2002
<i>Pylodictis olivaris</i>	100 (Juveniles)	Bringolt <i>et al.</i> , 2005
<i>Metynnis orinocensis</i>	10.5 (Juveniles) 10.8 (Adultos)	Velasco y Cruz, 2008
<i>Poecilia reticulata</i>	21.69 (Adultos)	Dolezelova <i>et al.</i> , 2009
<i>Danio rerio</i>	10.39 (Adultos)	Dolezelova <i>et al.</i> , 2009
<i>Labeo rohita</i>	Huevo: 0.0032 Alevines: 5.206	Mallick <i>et al.</i> , 2016

XII. - BIBLIOGRAFIA

- Abe, T., K. Haneda y N. Haga. 2014. **Silver Nanoparticle Cytotoxicity and Antidote Proteins against Silver Toxicity in *Paramecium***. *Nano Biomedicine* 6 (1): 35-40.
- Afifi, M., S. Saddick, y O. A. A. Zinada. 2016. **Toxicity of silver nanoparticles on the brain of *Oreochromis niloticus* and *Tilapia zillii***. *Saudi Journal of Biological Sciences* 23 (6): 754-760.
- Allahverdiyev, A. M., E. S. Abamor, M. Bagirova, C. B. Ustundag, C. Kaya, F. Kaya y M. Rafailovich. 2011. **Antileishmanial effect of silver nanoparticles and their enhanced antiparasitic activity under ultraviolet light**. *International Journal of Nanomedicine* 6: 2705–2714. Londres, Reino Unido.
- Allaker, R. P. y G. Ren. 2008. **Potential impact of nanotechnology on the control of infectious diseases**. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 102 (1): 1-2.
- Amaral, Z.L. A., E. A. McCliment, H. W. Ducklow y S. M. Huse. 2009. **A method for studying protistan diversity using massively parallel sequencing of V9 hypervariable regions of small-subunit ribosomal RNA genes**. *PLoS one*, 4(7), 1-9.
- American Chemical Society. 2010. **"Progress on vaccine for 'Ich,' bane of fish farms and home aquarium hobbyists."** <https://www.sciencedaily.com/releases/2010/08/100826162005.htm> (Accesada en marzo 2015).
- Arany, E., J. Láng, D. Somogyvári, O. Láng, T. Alapi, y K. Hernádi. 2014. **Vacuum ultraviolet photolysis of diclofenac and the effects of its treated aqueous solutions on the proliferation and migratory responses of *Tetrahymena pyriformis***. *Science of the Total Environment* 468: 996-1006. Netherlands.

- Asharani, P. V., G. Low Kah Mun, M. P. Hande y S. Valiyaveetil. 2008. **Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells**. *ACS nano* 3 (2): 279-290.
- Australian Department of the Environment and Heritage. 2001. **State of knowledge report: air toxics and indoor air quality in Australia 2001**. <http://www.ea.gov.au/atmosphere/airtoxics/sok/profiles/> (Accesada en Febrero de 2016).
- Ávalos, A., A. I. Haza, D. Mateo y P. Morales. 2013. **Nanopartículas de plata: aplicaciones y riesgos tóxicos para la salud humana y el medio ambiente**. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias* 7 (2): 1-23.
- Ayuba, V. O., S. P. Iyakwari y M. E. Oyeniyi. 2013. **Acute Toxicity of Formalin on *Clarias gariepinus* juveniles**. *Publication of Nasarawa State University* 9 (1): 21-28.
- Baer, H. V. P., C. Fortin, D. Y. Lee, y P. G. Campbell. 2006. **Toxicity of silver to two freshwater algae, *Chlamydomonas reinhardtii* and *Pseudokirchneriella subcapitata*, grown under continuous culture conditions: influence of thiosulphate**. *Aquatic toxicology* 78 (2): 136-148.
- Beer, C., R. Foldbjerg, Y. Hayashi, D. S. Sutherland y H. Autrup. 2012. **Toxicity of silver nanoparticles—nanoparticle or silver ion?**. *Toxicology letters* 208 (3): 286-292.
- Bergmann, R. B., L. W. Pacienza, P. D. Marcato, R. De-Conti y N. Durán. 2012. **Therapeutic potential of biogenic silver nanoparticles in murine cutaneous leishmaniasis**. *Journal of Nano Research* 20: 89–97. Switzerland.
- Bilberg, K., M. B. Hovgaard, F. Besenbacher y E. Baatrup. 2012. **In vivo toxicity of silver nanoparticles and silver ions in zebrafish (*Danio rerio*)**. *Journal of toxicology* 2012: 1-9. United States.

- Bogdanchikova, N., M. R. Vázquez, S. A. Huerta, J. A. Pena, U. G. Aguilar, D. P. L. Picos y H. Almanza. 2016. **Silver nanoparticles composition for treatment of distemper in dogs.** *International Journal of Nanotechnology* 13 (1-3): 227-237.
- Borrego, B., G. Lorenzo, M. J. D. Mota, R. H. Almanza, F. Mateos, G. E. López y N. Bogdanchikova. 2016. **Potential application of silver nanoparticles to control the infectivity of Rift Valley fever virus *in vitro* and *in vivo*.** *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 12 (5): 1185-1192.
- Bringolf, R. B., T. J. Kwak, W. G. Cope y M. S. Larimore. 2005. **Salinity tolerance of flathead catfish: implications for dispersal of introduced populations.** *Transactions of the American Fisheries Society* 134 (4): 927-936.
- Bruneau, A., P. Turcotte, M. Pilote, F. Gagné, y C. Gagnon. 2016. **Fate of silver nanoparticles in wastewater and immunotoxic effects on rainbow trout.** *Aquatic Toxicology* 174: 70-81. Netherlands.
- Burgdorf, A., M. A. Mitchell y M. Watson. 2011. **Clinical and physiologic effects of sodium chloride baths in goldfish (*Carassius auratus*).** *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 42 (4): 586-592.
- Cameron, P., B. K. Gaiser, B. Bhandari, P. M. Bartley, F. Katzer, y H. Bridle. 2016. **Silver nanoparticles decrease the viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts.** *Applied and environmental microbiology* 82 (2): 431-43.
- Cano, R. F. K. y C. A. Mendoza. 2017. **Nanopesticides, a real breakthrough for agriculture?.** *Revista Bio Ciencias* 4 (3): 164-178.
- Carlson, C., S. M. Hussain, A. M. Schrand, L. K. Braydich-Stolle, K. L. Hess, R. L. Jones y J. J. Schlager. 2008. **Unique cellular interaction of silver**

- nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species.** *The journal of physical chemistry B*, 112 (43):13608-13619.
- Center for disease control and prevention (CDC). 2008. **Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities.**
- https://www.cdc.gov/hicpac/pdf/guidelines/Disinfection_Nov_2008.pdf (Accesada en Febrero de 2016).
- Chauke N. y F. K. Siebrits. 2012. **Evaluation of silver nanoparticles as a possible coccidiostat in broiler production.** *South African Journal of Animal Science* 42 (5): 493-497.
- Chithrani, B. D., A. A. Ghazani y W. C. Chan. 2006. **Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells.** *Nano letters* 6 (4): 662-668.
- Choi, J. E., S. Kim, J. H. Ahn, P. Youn, J. S. Kang, K. Park, y D. Y. Ryu. 2010. **Induction of oxidative stress and apoptosis by silver nanoparticles in the liver of adult zebrafish.** *Aquatic Toxicology* 100 (2): 151-159.
- Choi, O., K. K. Deng, N. J. Kim, L. Ross, R. Y. Surampalli y Z. Hu. 2008. **The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth.** *Water research* 42 (12): 3066-3074.
- Constantino, C.F., A. Armijo, D.O. Sarabia y L.A. Chávez. 1997. **Infección por *Aeromonas hydrophila* e *Ichthyophthirius multifiliis* en trucha (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) y tilapia (*Oreochromis aureus*) de un centro de acopio de Morelos, México. Estudio patológico.** *Veterinaria México* 28: 59–62. Distrito federal, México.
- Coyne, R. S., L. Hannick, D. Shanmugam, J. B. Hostetler, D. Bami, V. S Joardar y U. Kumar. 2011. **Comparative genomics of the pathogenic ciliate *Ichthyophthirius multifiliis*, its free-living relatives and a host species**

- provide insights into adoption of a parasitic lifestyle and prospects for disease control.** *Genome biology*, 12(10),1-26.
- Dash, A., A. P. Singh, B. R. Chaudhary, S. K. Singh y D. Dash. 2012. **Effect of silver nanoparticles on growth of eukaryotic green algae.** *Nano-Micro Letters* 4 (3): 158-165.
- De Jong, W.H., W. I. Hagens, P. Krystek, M. C. Burger, A. J. A. M. Sips y R. E. Geertsma. 2008. **Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration.** *Biomaterials* 29: 1912-1919. United Kingdom.
- Desai N. 2012.**Challenges in development of nanoparticle-based therapeutics.** *AAPS Journal* 14 (2): 282–295.
- Dolezelova, P., S. Macova, L. Plhalova, V. Pistekova, Z. Svobodova, I. Bedanova y E. Voslarova. 2009. **Comparison of the sensitivity of different fish species to medical substances.** *Neuroendocrinology Letters* 30 (1): 248-252.
- Drake, P. L. y K. J. Hazelwood. 2005. **Exposure-related health effects of silver and silver compounds: a review.** *Annals of Occupational Hygiene* 49 (7): 575-585.
- Drexler E. 1986. **Engines of creation. The coming era of nanotechnology.** Anchor Library of Science, Garden City, New York. 263 pp.
- Elechiguerra, J. L., J. L. Burt, J. R. Morones, B. A. Camacho, X. Gao, H. H. Lara y M. J. Yacamán. 2005. **Interaction of silver nanoparticles with HIV-1.** *Journal of nanobiotechnology* 3 (1): 1-6.
- Environmental Protection Agency (EPA). 1993. **R.E.D. Facts. Silver.** https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/reregistration/fs_G-75_1-Jun-93.pdf (Accesada en Febrero de 2016).

- Fajer, A. E. J., P. I. Abdo, Z. G. Aguilar, A. Contreras, R. J. Zaldívar y L. M. Betancourt. 2003. **Toxicity of formalin to bullseye puffer fish (*Sphoeroides annulatus* Jenyns, 1843) and its effectiveness to control ectoparasites.** *Aquaculture* 223 (1): 41-50.
- Feng, Q.L., J. Wu, G. Q. Chen, F. Z. Cui, T. N. Kim y J. O. Kim. 2000. **A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*.** *Journal of biomedical materials research* 52 (4): 662-668.
- Flick G. 1998. **Common chemicals for cleaning and disinfecting aquaculture facilities. Proceedings the second international conference on recirculating aquaculture.** <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201300079537> (Accesada en Febrero de 2016).
- Foissner, W. 1992. **The “wet” silver nitrate method.** En: J. J. Lee y A. T. Soldo (Ed.). **Protocols in Protozoology** . Editorial Allen Press. USA. pp. 8.1-8.5.
- Food and agriculture organization of the United Nations (FAO). 1996. **Métodos sencillos para la acuicultura: gestión** ftp://ftp.fao.org/fi/CDrom/FAO_training/FAO_training/general/x6709s/Index.htm (Accesada en Febrero de 2016).
- Food and agriculture organization of the United Nations (FAO). 1991. **Manual for International Training Course on Fresh-Water Fish Diseases and Intoxications: Diagnostics, Prophylaxis and Therapy.** <ftp://ftp.fao.org/fi/Cdrom/aquaculture/a0845t/volume2/docrep/field/003/ac160e/AC160E04.htm> (Accesada en Febrero de 2016).
- Food and agriculture organization of the United Nations (FAO). 2015. **FAO Global Aquaculture Production database updated to 2013 – Summary**

- information.** <http://www.fao.org/3/a-i4899e.pdf> (Accesada en Febrero de 2016).
- Food and drug Administration (FDA). 1999. **Over-the-counter drug products containing colloidal silver ingredients or silver salts.** <http://www.fda.gov/ohrms/dockets/98fr/081799a.txt> (Accesada en Febrero de 2016).
- Food and drug Administration (FDA). 2007. **Regulated Drugs for Aquaculture: Parasite-S NADA 140-989.** <http://www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/Products/ApprovedAnimalDrugProducts/FOIADrugSummaries/UCM054898.pdf> (Accesada en Febrero de 2016).
- Food and drug Administration (FDA). 2011. **Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance. CHAPTER 11: Aquaculture Drugs.** <http://www.fda.gov/downloads/Food/GuidanceRegulation/UCM252410.pdf> (Accesada en Febrero de 2016).
- Food and drug administration (FDA). 2016. **Approved Aquaculture Drugs.** <https://www.fda.gov/AnimalVeterinary/DevelopmentApprovalProcess/Aquaculture/ucm132954.htm> (Accesada en Marzo 2017).
- Food and drug administration (FDA). 2016. **Code of Federal Regulations,** <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=123.3> (Accesada en Marzo 2017).
- Franco, M. M. A., G. E. Mendoza, R. C. A. Sierra, F. R. A. Gómez, B. Zapata, T. P. Castillo y P. C. Rodríguez. 2010. **Antitumor activity of colloidal silver on MCF-7 human breast cancer cells.** *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 29 (1): 1-7.

- Frankel, J. 2000. **Cell biology of *Tetrahymena thermophila***. *Methods in Cell Biology*. 62: 27–125. United States.
- Gaafar, M. R., R. F. Mady, R. G. Diab y T. I. Shalaby. 2014. **Chitosan and silver nanoparticles: Promising anti-toxoplasma agents**. *Experimental parasitology* 143: 30-38. United States.
- Gallego, A., G. A. Martín, R. Ortega y J. C. Gutiérrez. 2007. **Flow cytometry assessment of cytotoxicity and reactive oxygen species generation by single and binary mixtures of cadmium, zinc and copper on populations of the ciliated protozoan *Tetrahymena thermophila***. *Chemosphere* 68 (4): 647-661.
- Gary, D. C. 1994. **Analytical chemistry**. United States of America: Editorial John Wiley and Sons Inc.
- Gherbawy, Y. A., I. M. Shalaby, M. S. A. El-sadek, H. M. Elhariry y A. A. Banaja. 2013. **The anti-fasciolasis properties of silver nanoparticles produced by *Trichoderma harzianum* and their improvement of the anti-fasciolasis drug triclabendazole**. *International journal of molecular sciences* 14 (11): 21887-21898.
- Girón, V. N.G. 2014. **Evaluación de los efectos citotóxicos y genotóxicos de las nanopartículas de plata Argovit en cultivos *in vitro* de linfocitos humanos**. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Baja California. Ensenada, B.C. México.
- Griffitt, R. J., J. Luo, J. Gao, J. C. Bonzongo, y D. S. Barber. 2008. **Effects of particle composition and species on toxicity of metallic nanomaterials in aquatic organisms**. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27 (9): 1972-1978.

- Gutiérrez, W.C., R. Esparza, H. C. Vargas, G. M. E. Fernández y M. J. Yacamán. 2012. **Microwave-assisted synthesis of gold nanoparticles self-assembled into self-supported superstructures.** *Nanoscale* 4: 2281–2287. United Kingdom.
- Health and Safety Executive (HSE). 1998 .**Metallic silver.** HSE review 1996. Report no. D97. <http://www.hse.gov.uk/involvement/1996.htm> (Accesada en Febrero de 2017).
- Hohreiter, D. W. y D. K. Rigg. 2001. **Derivation of ambient water quality criteria for formaldehyde.** *Chemosphere* 45 (4): 471-486.
- Holbrook, R. D., K. E. Murphy, J. B. Morrow y K. D. Cole. 2008. **Trophic transfer of nanoparticles in a simplified invertebrate food web.** *Nature Nanotechnology* 3 (6): 352–355.
- Hussain, S.M., K. L. Hess, J. M. Gearhart, K. T. Geiss y J. J. Schlager. 2005. **In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells.** *Toxicology In Vitro* 19 (7): 975–983.
- Intorre, L., V. Meucci, D. Di Bello, G. Monni, G. Soldani, y C. Pretti. 2007. **Tolerance of benzalkonium chloride, formalin, malachite green, and potassium permanganate in goldfish and zebrafish.** *Journal of the American Veterinary Medical Association* 231 (4): 590-595.
- Johnston, H. J., G. Hutchison, F. M. Christensen, S. Peters, S. Hankin y V. Stone. 2010. **A review of the in vivo and in vitro toxicity of silver and gold particulates: particle attributes and biological mechanisms responsible for the observed toxicity.** *Critical reviews in toxicology* 40 (4): 328-346.
- Juárez, M. K., González, E. B., Girón, V.N., Chávez, S. R. A., Mota, M. J. D., Pérez, M. L. L. y N. Bogdanchikova. 2016. **Comparison of cytotoxicity and**

- genotoxicity effects of silver nanoparticles on human cervix and breast cancer cell lines.** *Human and Experimental Toxicology*, 1-18. United States.
- Juárez, M.K., R. C. H. Mejía, F. Díaz, V. H. Reyna, A. D. Re, E. F. Vazquez y N. Bogdanchikova. 2017. **Effect of silver nanoparticles on the metabolic rate, hematological response, and survival of juvenile white shrimp *Litopenaeus vannamei*.** *Chemosphere*, 169: 716-724. United Kingdom.
- Juberg, R. D. 1998. **Health risk assessment of environmental silver.** En: A.W. Andren y T. W. Bober (Eds.). **Transport, Fate, and Effects of Silver in the Environment.** Canada. pp. 183-190.
- Kim K. y P. Farrell. 2002. **Sensitivity of Juvenile Atlantic Sturgeon to Three Therapeutic Chemicals Used in Aquaculture.** *North American Journal of Aquaculture* 64 (1): 60-65.
- Krishnaraj, C., S. L. Harper, y S. I. Yun. 2016. **In Vivo toxicological assessment of biologically synthesized silver nanoparticles in adult Zebrafish (*Danio rerio*).** *Journal of hazardous materials* 301: 480-491. Netherlands.
- Kvitek, L., A. Panacek, R. Prucek, J., Soukupova, M. Vanickova, M. Kolar, y R. Zboril. 2011. **Antibacterial activity and toxicity of silver–nanosilver versus ionic silver.** *Journal of Physics Conference series*, 304(1).United Kingdom.
- Kvitek, L., M. Vanickova, A. Panacek, J. Soukupova, M. Dittrich, E. Valentova, y R. Zboril. 2009. **Initial study on the toxicity of silver nanoparticles (NPs) against *Paramecium caudatum*.** *The Journal of Physical Chemistry* 113 (11): 4296-4300.
- Lara, H. H., U. D. G. Romero, C. Pierce, R. J. L. López, J. M. Arellano y M. J. Yacamán. 2015. **Effect of silver nanoparticles on *Candida albicans* biofilms: an ultrastructural study.** *Journal of nanobiotechnology* 13 (1): 1-12.

- Lara, H.H., T. E. N. Garza, T. L. Ixtapan, y D. K. Singh. 2011. **Silver nanoparticles are broad-spectrum bactericidal and virucidal compounds.** *Journal of nanobiotechnology* 9 (1): 1-8.
- Leal, J. F., M. G. P. Neves, E. B. Santos y V. I. Esteves. 2016. **Use of formalin in intensive aquaculture: properties, application and effects on fish and water quality.** *Reviews in Aquaculture* 1-15. Australia.
- Li, P.W., T. H. Kuo, J. H. Chang, J. M. Yeh, y W. H. Chan. 2010. **Induction of cytotoxicity and apoptosis in mouse blastocysts by silver nanoparticles.** *Toxicology Letters* 197 (2): 82-87.
- Lom, J. y I. Dykova, 1992. **Protozoan Parasites of Fishes.** Editorial Elsevier. Amsterdam, The Netherlands. 315 pp.
- Luoma, S.N. 2013. **Silver Nanotechnologies and the Environment: Old Problems or New Challenges?** Washington, DC: Project on Emerging Nanotechnologies, Woodrow Wilson International Center for Scholars <http://www.nanotechproject.org/publications/archive/silver/> (Accesada en Diciembre de 2016).
- Mallick A., B. C. Mohapantra y N. Sarangi. 2016. **Acute toxicity of sodium chloride on different developmental stages (Egg, Spawn, Fry and Fingerlings) of *Labeo rohita* (Rohu).** *International Journal of Experimental Research and Review* 5: 49-57.
- Marambio, J.C. y E. M. Hoek. 2010. **A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment.** *Journal of Nanoparticle Research* 12 (5): 1531-1551.

- Marin, S., V. G. Mihail, T. R. Elena, B. I. Raluca, M. Lemnaru, M. M. Minodora y G. Mihai. 2015. **Applications and toxicity of silver nanoparticles: a recent review**. *Current topics in medicinal chemistry* 15 (16): 1596-1604.
- Material Safety Data Sheet Sodium chloride MSDS. Science Lab. 2013. **Sodium chloride MSDS**. <https://www.sciencelab.com/msds.php?msdsId=9927593> (Accesada en Febrero de 2017).
- Mehlhorn, H. 2016. **Nanoparticles in the fight against parasites**. Editorial Springer. Düsseldorf, Alemania. 218 pp.
- Meinelt, T., M. Pietroock, K. Burnison, y C. Steinberg. 2005. **Formaldehyde toxicity is altered by calcium and organic matter**. *Journal of applied ichthyology* 21 (2): 121-124.
- Melnik, E. A., Y. P. Buzulukov, V. F. Demin, V. A. Demin, I. V. Gmoshinski, N. Tyshko y V. A. Tutelyan. 2013. **Transfer of silver nanoparticles through the placenta and breast milk during *in vivo* experiments on rats**. *Acta Naturae* 5 (3): 107-115.
- Meyer, F. P. 1991. **Aquaculture disease and health management**. *Journal of animal science* 69 (10): 4201-4208.
- Mifsud, C. y S. J. Rowland. 2008. **Use of salt to control ichthyophthiriosis and prevent saprolegniosis in silver perch, *Bidyanus bidyanus***. *Aquaculture Research* 39 (11): 1175-1180.
- Miyoshi, N., T. Kawano, M. Tanaka, T. Kadono, T. Kosaka, M. Kunimoto y H. Hosoya. 2003. **Use of Paramecium species in bioassays for environmental risk management: determination of IC50 values for water pollutants**. *Journal of health science* 49 (6): 429-435.

- Morones, J. R., J. L. Elechiguerra, A. Camacho, K. Holt, J. B. Kouri, J. T. Ramirez y M. J. Yacamán. 2005. **The bactericidal effect of silver nanoparticles**. *Nanotechnology* 16 (10): 2346-2353.
- National center for biotechnology information (NCBI). 2015. **Basic local alignment search tool**. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (Accesada en Diciembre 2016).
- National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH). 2003. **Registry of toxic effects of chemical substances (RTECS): silver. VW3500000**. <http://www.cdc.gov/niosh/rtecs/> (Accesada en Febrero de 2017).
- Oberdörster, G., E. Oberdörster, y J. Oberdörster. 2005. **Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles**. *Environmental health perspectives* 113 (7): 823-839.
- Onaka, E., M. Martins y F. Moraes. 2003. **Eficacia do albendazol e praziquantel no controle de *Anacanthorus penilabiatatus* (Monogenea: Dactylogyridae), parasito de Pacu *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthyes: Characidae) i banhos terapêuticos**. *Boletim do Instituto de Pesca* 29 (2): 101-107.
- Osborne, O. J., S. Lin, C. H. Chang, Z. Ji, X. Yu, X. Wang y A. E. Nel. 2015. **Organ-specific and size-dependent Ag nanoparticle toxicity in gills and intestines of adult zebrafish**. *ACS nano* 9 (10): 9573-9584.
- Panyala, N. R., M. E. Peña y J. Havel. 2008. **Silver or silver nanoparticles: a hazardous threat to the environment and human health**. *Journal of applied biomedicine* 6 (3): 117-129.
- Raid, M., K. Kon, A. Ingle, N. Duran, S. Galdiero y M. Galdiero. 2014. **Broad-spectrum bioactivities of silver nanoparticles: the emerging trends and future prospects**. *Applied microbiology and biotechnology* 98 (5): 1951-1961.

- Razack, S. A., S. Duraiarasan y V. Mani. 2016. **Biosynthesis of silver nanoparticle and its application in cell wall disruption to release carbohydrate and lipid from *C. vulgaris* for biofuel production.** *Biotechnology Reports* 11: 70-76. Netherlands.
- Romero, U. D. G., H. H. Lara, S. Velázquez, M. J. Arellano, E. Larios, A. Srinivasan y M. J. Yacamán. 2015. **Ultrastructural changes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* induced by positively charged silver nanoparticles.** *Beilstein journal of nanotechnology* 6 (1): 2396-2405.
- Said, D. E., L. M. Elsamad y Y. M. Gohar. 2012. **Validity of silver, chitosan, and curcumin nanoparticles as anti-Giardia agents.** *Parasitology research* 111 (2): 545-554.
- Sarkar, B., S. P. Netam, A. Mahanty, A. Saha, R. Bosu y K. Krishnani. 2014. **Toxicity evaluation of chemically and plant derived silver nanoparticles on zebrafish (*Danio rerio*).** *Biological Sciences* 84 (4): 885-892.
- Sauvant M. P., D. Pepin y E. Piccinni. 1999. ***Tetrahymena pyriformis*: a tool for toxicological studies. A review.** *Chemosphere* 38 (7): 1631-1669.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) .2013. **Carta Nacional Acuícola 2013.** http://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/117710/09092013_CARTA_NACIONAL_ACUICOLA.pdf (Accesada en Marzo 2017).
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) .2012. **Carta Nacional Acuícola 2012.** http://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/117711/06062012_SAGARPA.pdf (Accesada en Marzo 2017).

- Shi, J. P., C. Y. Ma, B. Xu, H. W. Zhang y C. P. Yu. 2012. **Effect of light on toxicity of nanosilver to *Tetrahymena pyriformis***. *Environmental Toxicology and Chemistry* 31 (7): 1630-1638.
- Shi, J., B. Xu, X. Sun, C. Ma, C. Yu y H. Zhang. 2013. **Light induced toxicity reduction of silver nanoparticles to *Tetrahymena Pyriformis*: Effect of particle size**. *Aquatic toxicology* 132: 53-60. Netherlands.
- Shinn, A. P., J. Pratoomyot, J. E. Bron, G. Paladini, E. E. Brooker, A.J. Brooker. 2015. **Economic costs of protistan and metazoan parasites to global mariculture**. *Parasitology* 142 (01): 196-270.
- Silver, S. 2003. **Bacterial silver resistance: molecular biology and uses and misuses of silver compounds**. *Microbiology review* 27: 341–353.
- Silvestry, R. N., R. E. E. Sicairos, C. P. Gerba y K. R. Bright. 2007. **Silver as a disinfectant**. *Reviews of environmental contamination and toxicology* 191: 23-45.
- Sonavane, G., K. Tomoda, A. Sano, H. Ohshima, H. Terada, K. Makino. 2008. ***In vitro* permeation of gold nanoparticles through rat skin and rat intestine: effect of particle size**. *Colloids and Surfaces* 65 (1): 1-10.
- Thomas, K. y P. Sayre. 2005. **Research strategies for safety evaluation of nanomaterials, Part 1: Evaluating the human health implications of exposure to nanoscale materials**. *Toxicological Sciences* 87 (2): 316-321.
- Uma, S., J. P. Kelly y S. K. Rajasekaran. 2008. **An investigation of the value of the *Tetrahymena pyriformis* as a test organism for assessing the acute toxicity of antidepressants**. *Biomedical Research* 19: 37–40.
- Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). 2017. **¿Qué son las nanopartículas?** <http://www.fundacionunam.org.mx/unam-al-dia/la-unam-te-explica-que-son-las-nanoparticulas/> (Accesada en Octubre de 2016).

- University of Florida. 1995. **The use of salt in aquaculture.**
<http://www.aces.edu/dept/fisheries/education/ras/publications/Update/Use%20of%20Salt%20in%20Aquaculture.pdf> (Accesada en Febrero de 2016).
- University of Florida. 1996. **Use of Formaline to control Fish parasites.**
<http://fisheries.tamu.edu/files/2013/09/Use-of-Formalin-to-Control-Fish-Parasites.pdf> (Accesada en Marzo de 2016).
- University of Florida. 2015. **Topics: Fisheries and Aquatic Sciences (SFRC).**
<http://edis.ifas.ufl.edu/fa006> (Accesada en Enero de 2017).
- Van der Zande, M., R. J. Vandebriel y D. E. Van. 2012. **Distribution, limination, and toxicity of silver nanoparticles and silver ions in rats after 28-day oral exposure.** *ACS Nano* 6: 7427–7442. United States.
- Vázquez, M.R., B. M. Avalos y L. E. Castro. 2014. **Ultrastructural analysis of *Candida albicans* when exposed to silver nanoparticles.** *PloS one* 9 (10): 1-10.
- Velasco, S.Y.M. y C. P. E. Cruz. 2008. **Behavioural and gill histopathological effects of acute exposure to sodium chloride in moneda (*Metynnis orinocensis*).** *Environmental toxicology and pharmacology* 25 (3): 365-372.
- Wise, D. J., A. C. Camus, T. E. Schwedler y J. S. Terhune. 2004. **Health management.** *Developments in Aquaculture and Fisheries Science* 34: 444-503.
- World Health organization (WHO). 1989. **Environmental health criteria 89. Formaldehyde.** Disponible en:
<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc89.htm> (Accesada en Febrero de 2017).

- Xu, D. H., Q. Z. Zhang y D. Zhang. 2015. **Two *in vitro* methods for screening potential parasitocides against *Ichthyophthirius multifiliis* using *Tetrahymena thermophila*.** *Journal of fish diseases* 39 (3): 285-294.
- Zhu, Y. J. y F. Chen F. 2014. **Microwave-assisted preparation of inorganic nanostructures in liquid phase.** *Chemical reviews* 114 (12): 6462-6555.