



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

ESTUDIO DEL EFECTO ANTIVIRAL DE NANOPARTÍCULAS DE
PLATA EN CAMARÓN *Penaeus vannamei* INFECTADO CON
WSSV.

T E S I S

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

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

P r e s e n t a

Carlos Rosendo Romo Quiñonez

La Paz, Baja California Sur, junio de 2022.

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 14 horas del día 02 del Mes de Junio del 2022, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"Estudio del efecto antiviral de nanopartículas de plata en camarón *Penaeus vannamei* infectado con WSSV"

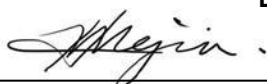
Presentada por el alumno:

Carlos Rosendo Romo Quiñonez

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

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

LA COMISIÓN REVISORA



Dr. Claudio Humberto Mejía Ruiz
Co-Director



Dr. Pindaro Álvarez Ruiz
Co-Director



Dra. Cristina Escobedo Fregoso
Co-Tutora



Dra. Crisalejandra Rivera Pérez
Co-Tutora



Dr. Aaron Barraza Celis
Co-Tutor



Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro,
Directora de Estudios de Posgrado y
Formación de Recursos Humanos

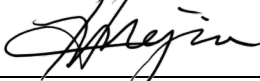
La Paz, Baja California Sur, a 03 de Junio de 2022.

Los miembros del comité de tesis del estudiante CARLOS ROSENDO ROMO QUIÑONEZ del Programa de Doctorado en Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales, revisamos el contenido de la tesis y otorgamos el Vo. Bo. dado que la tesis no representa un plagio de otro documento como lo muestra el reporte de similitud realizado:

- **Herramienta antiplagio:**
iThenticate
- **Filtros utilizados:**
Excluir citas y bibliografía
Reporte de similitud
- **Porcentajes de similitud:**
16%
Se muestra captura de pantalla

Citas excluidas		16% SIMILAR
Bibliografía excluida		
Resumen de Coincidencias		
1	Internet 532 palabras Copiado el 13-Ene-2019 cibnor.repositorioinstitucional.mx	2%
2	Internet 450 palabras Copiado el 24-Jul-2016 pt.scribd.com	1%
3	Internet 314 palabras Copiado el 10-Feb-2022 www.cienciasinaloa.ipn.mx	1%
4	Internet 244 palabras Copiado el 11-May-2021 cicese.repositorioinstitucional.mx	1%
5	Internet 203 palabras Copiado el 21-May-2021 dspace.cibnor.mx:8080	1%
6	Internet 197 palabras Copiado el 13-May-2019 adoc.site	1%

Firmas del comité



Dr. Claudio Humberto Mejía
Co-Director



Dr. Pindaro Álvarez Ruiz
Co-Director



Dra. Cristina Escobedo Fregoso
Co-Tutora



Dra. Crisalejandra Rivera Pérez
Co-Tutora



Dr. Aaron Barraza Celis
Co-Tutor

Conformación de Comités

Comité Tutorial

Dr. Claudio Humberto Mejía Ruiz
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Co-Director de Tesis

Dr. Píndaro Álvarez Ruiz
Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Sinaloa
Co-Director de Tesis

Dra. Cristina Escobedo Fregoso
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Co-Tutora de Tesis

Dra. Crisalejandra Rivera Pérez
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Co-Tutora de Tesis

Dr. Aarón Barraza Celis
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Co-Tutor de Tesis

Comité Revisor de Tesis

Dr. Claudio Humberto Mejía Ruiz
Dr. Píndaro Álvarez Ruiz
Dra. Cristina Escobedo Fregoso
Dra. Crisalejandra Rivera Pérez
Dr. Aarón Barraza Celis

Jurado de Examen

Dr. Claudio Humberto Mejía Ruiz
Dr. Píndaro Álvarez Ruiz
Dra. Cristina Escobedo Fregoso
Dra. Crisalejandra Rivera Pérez
Dr. Aarón Barraza Celis

Suplentes

Dr. Ricardo Pérez Enríquez
Dr. Eduardo Romero Vivas

Resumen

Las nanopartículas de plata (AgNPs: por sus siglas en inglés) se han reconocido como una real alternativa para eliminar patógenos de diferentes sistemas biológicos. En el presente estudio evaluamos cinco nuevas formulaciones de AgNPs: Argovit[®] (Argovit-1[®], Argovit-2[®], Argovit-3[®], Argovit-4[®] y Argovit-5[®]), para seleccionar la mejor entre ellas con propiedad antiviral y posteriormente estudiar los efectos tóxicos vía intramuscular y *per-os*, en camarón (*Penaeus vannamei*) contra WSSV. Los camarones se sometieron a bioensayos de reto con diferentes objetivos: a) Evaluar toxicidad aguda y efecto antiviral en dosis intramusculares con las cinco formulaciones de Argovit[®] y seleccionar la mejor; b) Analizar la expresión de genes mediante un estudio de RNAseq en camarones sometidos a Argovit-4[®] suministradas por vía intramuscular (*i.m.*); c) Determinar la toxicidad aguda de Argovit-4[®] suministradas en alimento; d) Evaluar el efecto antiviral de Argovit-4[®] suministradas en alimento contra WSSV; e) Determinar si Argovit-4[®] promueve un efecto inmunoestimulante en el camarón cuando se suministra en el alimento; f) Evaluar toxicidad crónica de Argovit-4[®] suministradas en el alimento con diferentes regímenes de alimentación; g) Determinar la duración del efecto antiviral de Argovit-4[®] contra WSSV y la respuesta inmune a nivel transcripcional en camarones alimentados con las AgNPs incluidas en el alimento bajo diferentes regímenes de suministro. Los resultados indicaron que las cinco formulaciones evaluadas mostraron propiedades antivirales contra WSSV, siendo, Argovit-4[®] la formulación con mayor capacidad antiviral sin efectos de toxicidad en camarones. El análisis transcripcional en branquias de camarones expuestos a las AgNPs, no mostró sobre-expresión importante de genes. Paralelamente, el estudio de expresión de genes relacionados al sistema inmune (S.I.) (Pen3, Crustin, PAP, Rab6 y ProPO), no mostró cambios significativos ($P < 0.05$). Asimismo, el efecto antiviral del alimento suplementado con Argovit-4[®] en camarón, fue dependiente de la concentración de AgNPs, alcanzando supervivencias de 97, 90 y 84% en las concentraciones de 1000, 100 y 10 $\mu\text{g/g}$ de alimento, respectivamente. La aplicación de 1000 μg de Argovit-4[®]/g de alimento no interfirió con el crecimiento del camarón, ni generó toxicidad y pudo protegerlo contra la infección por WSSV, con mayor eficiencia cuando se aplicó una vez por semana. El análisis de la expresión de los cinco genes relacionados con el S.I., no mostró efectos significativos, lo que sugiere que las AgNPs interactúan con la envoltura del virión incapacitándolo para infectar, más que con la estimulación de genes del S.I. en el camarón. En conclusión, Argovit-4[®] puede ser un excelente candidato como aditivo antiviral en el alimento y ofrecer una estrategia profiláctica potencial para prevenir infecciones por WSSV en la camaronicultura a corto plazo.

Palabras claves: camarón, AgNPs, WSSV, Antiviral.

ORCID: 0000-0002-7821-8355

Vo. Bo. Co-Directores de Tesis



Dr. Claudio Humberto Mejía Ruiz



Dr. Píndaro Álvarez Ruiz

Summary

Silver nanoparticles (AgNPs) have been recognized as a real alternative to eliminate pathogens from different biological systems. In the present study we evaluated five new formulations of AgNPs: Argovit[®] (Argovit-1[®], Argovit-2[®], Argovit-3[®], Argovit-4[®] and Argovit-5[®]), to select the best among them with antiviral property and subsequently study the toxic effects intramuscularly and *per-os*, in of shrimp (*Penaeus vannamei*) against the White Spot Virus (WSSV). Shrimp were subjected to challenge bioassays with different objectives: a) Evaluate acute toxicity and antiviral effect in intramuscular doses with the five formulations of Argovit[®] and select the best; b) Analyze the expression of genes by RNAseq study in shrimp subjected to selected AgNPs (Argovit-4[®]) administered intramuscularly (i.m.); c) Determine acute toxicity of Argovit-4[®] supplied in food; d) Evaluate the antiviral effect of Argovit-4[®] supplied in food against WSSV; e) Determine if Argovit-4[®] promotes an immunostimulatory effect in shrimp when supplied in feed f) Evaluate chronic toxicity of Argovit-4[®] supplied in feed with different feeding regimens; g) To determine the duration of the antiviral effect of Argovit-4[®] against WSSV and the immune response at transcriptional level in shrimp fed with the AgNPs included in the feed under different supply regimens. The results indicated that the five formulations evaluated showed antiviral properties against WSSV, being Argovit-4[®] the formulation with the highest antiviral capacity without toxicity effects in shrimp. Transcriptional analysis in shrimp gills exposed to AgNPs did not show significant over-expression of genes. In parallel, the study of gene expression related the immune system (S.I.) (Pen3, Crustin, PAP, Rab6 and ProPO) did not show significant changes ($P < 0.05$). Likewise, the antiviral effect of feed supplemented with Argovit-4[®] in shrimp was dependent on the concentration of AgNPs, reaching survivals of 97, 90 and 84% at concentrations of 1000, 100 and 10 $\mu\text{g/g}$ of feed, respectively. The application of 1000 μg of Argovit-4[®]/g of feed did not interfere with growth of shrimp, nor did it generate toxicity and was able to protect it against WSSV infection, with greater efficiency when applied once a week. The expression analysis of five genes related to I.S., did not show significant alterations, which suggests that the AgNPs interact with the virion envelope, disabling it to infect, rather than with the stimulation of S.I. genes. in shrimp. In conclusion, Argovit-4[®] may be an excellent candidate as an antiviral feed additive and offer a potential prophylactic strategy to prevent WSSV infections in shrimp farming in the short term.

Key words: shrimp, AgNPs, WSSV, Antiviral.

ORCID: 0000-0002-7821-8355

Vo. Bo. Co-Directores de Tesis



Dr. Claudio Humberto Mejía Ruiz



Dr. Píndaro Álvarez Ruiz

Dedicatoria

*Dedico mi trabajo a mi linda Esposa, Blanca
Maldonado y a mis amados Hijos Carlos Ernesto
y Miranda Victoria.....*

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada (No. 260986).

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

A la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos por la beca de extensión recibida durante el periodo Septiembre-Octubre de 2021, en especial a la Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro, a la Lic. Osvelia Ibarra Morales, a Tania Verónica Núñez Valdez y a la Lic. Raquel Emilia Herrera Vega, por las facilidades otorgadas durante mis estudios Doctorales.

De igual manera, agradezco a la Fundación UNAM por la beca otorgada (CNyN/DIR/0082/2022) durante el periodo de Enero-Febrero de 2022.

Al Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Sinaloa (CIIDIR) por las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo.

Al Proyecto **CB-258607**: “ESTUDIO DEL EFECTO DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA EN VIRUS, BACTERIAS Y PARÁSITOS DE ORGANISMOS ACUÁTICOS”, por el financiamiento de esta investigación

Al Proyecto de Redes Temáticas del CONACyT, **No.233418**, Fondo F0003-03, denominado “RED TEMÁTICA INTERNACIONAL DE BIONANOTECNOLOGÍA CON IMPACTO EN NANOMEDICINA, ALIMENTACIÓN Y BIOSEGURIDAD”, por el financiamiento de esta investigación

A la Secretaría de Investigación y Posgrado del IPN con el Proyecto Multidisciplinario, Clave **1972** - Módulos **SIP20180526** y **SIP20196634** “DISEÑO DE ESTRATEGIAS BIOTECNOLÓGICAS PARA INHIBIR PATÓGENOS VIRALES Y BACTERIANOS PROMOVIENDO INMUNOCOMPETENCIA EN POSTLARVAS DE CAMARÓN BLANCO”, por el financiamiento de esta investigación

Al Dr. Claudio Humberto Mejía Ruiz, por su paciencia y apoyo en cada uno de sus comentarios, y por facilitarme los medios para la realización de este trabajo.

Al Dr. Píndaro Álvarez Ruiz por todo su apoyo, quien además de su amistad me brindó toda su ayuda en los protocolos moleculares, bioensayos reto y compartió sus conocimientos y experiencias, por toda su paciencia y tiempo que me fueron muy útiles durante todo mi doctorado.

Agradezco a los Dres. Aarón Barraza Celis, Cristina Escobedo Fregoso y Crisalejandra Rivera Pérez por aceptar ser mis Co-Tutores de Tesis, por ofrecer distintos enfoques, comentarios y bastantes recomendaciones para mejorar esta investigación,

A la Dra. María del Carmen Rodríguez Jaramillo, Técnico responsable del Laboratorio de Histología e Histoquímica y María Eulalia Meza Chávez. Por su tiempo, paciencia e interpretación de los datos histológicos.

A la Dra. Cristina Chávez Sánchez de CIAD-Mazatlán, por su paciencia y apoyo incondicional para la realización de este proyecto.

Al Dr. Francisco Javier Magallón Barajas por todo su apoyo incondicional desde la Maestría hasta el Doctorado. Lo aprecio mucho porque cuando ocupaba ayuda, usted siempre estuvo presente, me llevo gratos recuerdos.

A la Dra. Nina Bogdanchikova por la donación de las formulaciones de Argovit[®], piedra angular en el desarrollo de esta investigación.

A Rene Rodolfo Rebollar Prudente Técnico del Laboratorio de Biotecnología de Organismos Marinos, por su ayuda brindada en el uso de los equipos, apoyo técnico y material utilizado en la realización de este trabajo.

A la Dra. Norma Angélica Ochoa Álvarez, responsable del Laboratorio de Diagnóstico Microbiológico, por toda su amistad, tiempo y conocimiento compartido en mi etapa académica en CIBNOR.

A Karina Gámez Técnico del Laboratorio de Biología Molecular del CIIDIR-Sinaloa, por su apoyo técnico en los análisis moleculares.

A mis compañeros en CIDIIR-Sinaloa; Diana Báez, Gabi López, Alonso Medina, Elvia Medina, Marco Astorga, German León.

A Ana María Talamantes Cota, Susana Luna García, María Esther Ojeda Castro y Elizabeth Guadalupe Sánchez Vázquez (Chavelita) por el apoyo incondicional del material bibliográfico, y también de manera personal al Ing. Horacio Sandoval Gómez y al Lic. José Manuel Melero Astorga por sus facilidades otorgadas en el centro de cómputo y a todos los que apoyaron directamente e indirectamente la realización de este trabajo.

Contenido	
Resumen	i
Summary	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Contenido	vi
Lista de figuras	ix
Lista de tablas	xi
Glosario	xii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1 AgNPs como agente antiviral.....	4
2.2 Aplicación Argovit® como agente antiviral.....	5
2.3 Mecanismo de acción antiviral.....	6
2.4 Internalización celular	7
2.5 Activación de la respuesta inmune	8
2.6 Efectos de tóxicos	10
3. JUSTIFICACIÓN	12
4. HIPÓTESIS	13
5. OBJETIVOS	14
5.1 Objetivo general	14
5.2 Objetivos particulares.....	14
6. MATERIAL Y MÉTODOS	15
6.1 Efecto de toxicidad aguda en camarón a dosis intramusculares de AgNPs.....	15
6.1.1 Obtención y preparación de AgNPs	15
6.1.2 Camarones experimentales.....	16
6.1.3 Diseño experimental	16
6.2 Análisis de la virulencia de WSSV cuando es sometido a AgNPs	17
6.2.1 Organismos experimentales.....	17
6.2.2 Preparación del inóculo infeccioso	17
6.2.3 Titulación del inoculo	18
6.2.4 Selección de la dosis infecciosa (SID50) de trabajo	19
6.2.5 Efecto en la virulencia de WSSV.....	20
6.3 Análisis transcriptómico en branquias de camarón inyectados con Argovit®	21
6.3.1 Secuenciación masiva.....	21
6.3.2 Preprocesamientos bioinformático de datos.....	22
6.3.3 Análisis exploratorio de datos.....	23
6.3.4 Identificación de genes expresados diferencialmente	23
6.3.5 Anotación del transcriptoma	23
6.3.6 Análisis de términos ontológico	23
6.4 Efecto de toxicidad aguda de Argovit-4® en alimento a distintas concentraciones.....	24
6.4.1 Obtención de juveniles de camarón	24
6.4.2 Incorporación de Argovit-4® al alimento balanceado	24
6.4.3 Toxicidad aguda de Argovit-4®	25
6.5 Efecto antiviral de Argovit-4® en una dosis alimenticia ante WSSV	26

6.5.1 Preparación del inóculo infeccioso	26
6.5.2 Diseño experimental	27
6.6 Capacidad inmunoestimulante de Argovit-4® incorporado en alimento	28
6.6.1 Toma de muestra	28
6.6.2 Extracción de ARN total y síntesis de ADNc	28
6.6.3 Perfil de expresión de genes asociados con el sistema inmune	29
6.7 Efecto de la toxicidad crónica de AgNPs incluidas en la alimentación por intervalos de tiempo.....	31
6.7.1 Organismos experimentales.....	31
6.7.2 Diseño experimental	31
6.7.3 Rendimiento productivo	32
6.7.4 Análisis de la toxicidad crónica mediante histología	32
6.8 Respuesta antiviral en camarones sobrevivientes a toxicidad crónica mediante infecciones experimentales de WSSV.....	34
6.8.1 Efecto protector de la alimentación crónica de AgNPs ante WSSV.....	34
6.8.1.1 Preparación del inóculo viral.....	34
6.8.1.2 Diseño experimental del reto infeccioso	34
6.8.2 Respuesta inmune de los camarones sobrevivientes ante WSSV	35
6.8.2.1 Extracción de ARN total y síntesis de ADNc	35
6.8.2.2 Perfil de expresión de genes	36
6.9 Análisis estadísticos	36
7. RESULTADOS	38
7.1 Efecto de la toxicidad aguda de AgNPs inyectado en camarón	38
7.2 Análisis de la virulencia de WSSV cuando es sometido a distintas concentraciones de AgNPs.....	38
7.2.1 Titulación del inóculo viral	38
7.2.2 Selección de SID50 mínima de trabajo.....	40
7.2.3 Análisis de la virulencia de WSSV sometido a AgNPs	41
7.3 Análisis transcriptómico en branquias de camarón inyectados con AgNPs	42
7.3.1 Análisis de los datos transcriptómicos	42
7.3.2 Análisis de genes expresados diferencialmente	43
7.3.2.1 Genes sobre-expresados.....	45
7.3.2.2 Genes sub-expresados	48
7.4 Efecto de la toxicidad aguda de Argovit-4® en alimento a distintas concentraciones	52
7.5 Efecto antiviral de Argovit-4® en una dosis alimenticia contra WSSV	52
7.6 Capacidad inmunoestimulante de Argovit-4® incorporado en alimento	53
7.7 Efecto de la toxicidad crónica de AgNPs incluidas en la alimentación por intervalos de tiempo.....	56
7.7.1 Variables productivas.....	56
7.7.2 Análisis del daño histológico	57
7.8 Respuesta antiviral en camarones sobrevivientes a toxicidad crónica contra WSSV	61
7.8.1 Efecto protector de la alimentación continua y por intervalos de tiempo contra WSSV	61
7.8.2 Capacidad de respuesta del sistema inmune ante WSSV	62
7.8.2.1 Gen de la proteína activadora de la fagocitosis (PAP)	62

7.8.2.1.1 Gen de la Profenoloxidasa (ProPO).....	62
7.8.2.1.2 Expresión del gen de la lectina 3 tipo C (CTL-3).....	63
7.8.2.1.3 Expresión genética de péptidos antimicrobianos (PEN3, PEN4 y Crustina) ..	63
8. DISCUSIÓN	65
8.1 Efecto de la toxicidad aguda por AgNPs inyectadas en camarón	65
8.2 Efecto antiviral de AgNPs contra WSSV por contacto directo	67
8.3 Análisis transcriptómico de genes de respuesta a AgNPs.....	68
8.3.1 Genes sobre-expresados.....	69
8.3.2 Genes sub-expresados	72
8.4 Efecto de la toxicidad aguda de AgNPs en alimento.....	74
8.5 Efecto antiviral de Argovit-4® con una sola dosis en el alimento contra WSSV	75
8.6 Capacidad inmunoestimulante de las AgNPs.....	77
8.7 Efecto de la toxicidad crónica de AgNPs incluidas en la alimentación por intervalos de tiempo.....	79
8.8 Respuesta antiviral en camarones sobrevivientes a toxicidad crónica ante una infección experimental de WSSV	82
9. CONCLUSIÓN.....	86
9.1 Perspectivas.....	86
10. LITERATURA CITADA.....	87
11. ANEXOS.....	114
Anexo A.- Artículo Publicado: Evaluation of a new Argovit as an antiviral agent included in feed to protect the shrimp <i>Litopenaeus vannamei</i> against White Spot Syndrome Virus infection.....	114
Anexo B.-Artículo Sometido: Chronic toxicity of shrimp feed added with silver nanoparticles (Argovit-4®) in <i>Litopenaeus vannamei</i> and immune response to WSSV infection.	137

Lista de figuras

Figura 1. Mecanismo de acción antiviral de las AgNPs en la cápside viral	6
Figura 2. Mecanismo alternativo de acción antiviral de las AgNPs	7
Figura 3. Esquema de los mecanismos de entrada de la AgNPs a la célula	8
Figura 4. Mecanismo de citotoxicidad inducidos por AgNPs.....	11
Figura 5. Diagrama del flujo de la titulación de inóculos infecciosos de WSSV	19
Figura 6. Estrategia bioinformática para el análisis de datos transcriptómicos.....	22
Figura 7. Proceso de adición de AgNPs al alimento para camarón.	25
Figura 8. Proceso de obtención del tejido infectado para infectar juveniles por vía oral.....	26
Figura 9. Mortalidad acumulada en camarón infectado con 7, 10, 100 SID50 de WSSV.	40
Figura 10. Análisis de componentes principales.....	42
Figura 11. MA-plot de genes expresados diferencialmente en tejido branquial	43
Figura 12. Proceso biológico de genes sobre-expresados.....	46
Figura 13. Función molecular de genes sobre-expresados.....	47
Figura 14. Componente celular de genes sobre-expresados.....	47
Figura 15. Rutas metabólicas de genes sobre-expresados en camarones tratados intramuscularmente con Argovit-4®	48
Figura 16. Proceso biológico de genes sub-expresados	50
Figura 17. Función molecular de genes sub-expresados	50
Figura 18. Componente celular de los genes sub-expresados	51
Figura 19. Rutas metabólicas asociadas a genes sub-expresados en camarones expuestos intramuscularmente con Argovit-4®	51
Figura 20. Supervivencia en porcentaje de camarones tratados con alimentos medicados que incluyen distintas concentraciones de AgNPs.....	52
Figura 21. Supervivencia de camarones tratados con distintas concentraciones Argovit-4® en el alimento y retos contra WSSV por vía oral	53
Figura 22. Niveles de expresión de genes asociados a péptidos antimicrobianos en camarones alimentados con 1000 µg de Argovit-4®/g.....	54
Figura 23. Niveles de expresión de genes asociados a fagocitosis en camarones alimentados con 1000 µg de Argovit-4®/g	55
Figura 24. Niveles de expresión del gen asociado al sistema profenoloxidasa en camarones alimentados con 1000 µg de Argovit-4®/g.....	56
Figura 25. Evaluación semicuantitativa del grado de daño en hepatopáncreas de <i>P. vannamei</i> bajo distintos regímenes de alimentación con Argovit-4® (1000 µg/g)	58
Figura 26. Evaluación semicuantitativa del grado de daño general a hepatopáncreas	59
Figura 27. Evaluación cuantitativa del diámetro de células B en micras (µm).....	59
Figura 28. Micrografía en hepatopáncreas (Hep) de camaron alimentado con AgNPs por frecuencias alimenticias	60
Figura 29. Supervivencia en camarones tratados con Argovit-4® (1000 µg/g) en el alimento, suministrado bajo diferentes regímenes de frecuencia [diario (D1), cada 4 días (D4) y cada 7 días (D7)] y retos contra WSSV por vía oral.....	61
Figura 30. Respuesta transcripcional del gen PAP en camarones retos contra WSSV.....	62
Figura 31. Respuesta transcripcional del gen ProPO en camarones retos contra WSSV	63
Figura 32. Respuesta transcripcional del gen CTL-3 en camarones retos contra WSSV	63

Figura 33. Respuesta transcripcional de los genes PEN3 (A), PEN4 (B) y Crustina en camarones retados contra WSSV..... 64

Lista de tablas

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de las formulaciones de Argovit®	15
Tabla 2. Evaluación de la toxicidad aguda de cinco formulaciones de AgNPs aplicadas por vía intramuscular.	16
Tabla 3. Selección de la dosis infecciosa de trabajo	19
Tabla 4. Análisis de la virulencia de WSSV cuando es sometido a AgNPs	20
Tabla 5. Análisis transcriptómico en branquias de camarón inyectados con Argovit®	21
Tabla 6. Toxicidad aguda de Argovit-4® vía intramuscular en camarón	25
Tabla 7. Actividad antiviral de AgNPs <i>per os</i> en juveniles de camarón contra WSSV	27
Tabla 8. Oligonucleótidos utilizados para determinar capacidad inmunoestimulante.....	29
Tabla 9. Condiciones de amplificación de genes asociados con el sistema inmune del camarón.....	30
Tabla 10. Toxicidad aguda de Argovit-4® suministrada en el alimento de juveniles de camarón.....	31
Tabla 11. Grado de severidad observado en tejido hepatopancreático	33
Tabla 12. Evaluación del efecto protector de la alimentación crónica de AgNPs ante WSSV	35
Tabla 13. Oligonucleótidos utilizados para determinar la respuesta antiviral de camarones alimentados con AgNPs por frecuencias alimenticias ante WSSV.....	36
Tabla 14. Efecto de AgNPs administrado intramuscularmente en juveniles de camarón	38
Tabla 15. Mortalidad obtenida durante la titulación de WSSV en juveniles de camarón.....	39
Tabla 16. Mortalidad de AgNPs+WSSV administrado intramuscularmente en camarón	41
Tabla 17. Lista de los 20 genes más significativamente regulados al alza.....	44
Tabla 18. Lista de los 20 genes más significativamente regulados a la baja	44
Tabla 19. Función de 20 genes más significativamente regulados al alza.....	45
Tabla 20. Función de 20 genes más significativamente regulados a la baja	49
Tabla 21. Rendimiento productivo de camarón alimentado con AgNPs a tres frecuencias de alimentación de AgNPs durante 28 días	57

Glosario

Agente patógeno	Agentes infecciosos que pueden provocar el desarrollo de una enfermedad (Morales y Cuellar, 2014).
Apoptosis	Función que controla la muerte de las células, de forma programada (Morales y Cuellar, 2014).
Atrofia	Disminución del tamaño de la célula y/o órgano del que forma parte, debido a la pérdida de masa celular (Morales y Cuellar, 2014).
Bioacumulación	Proceso de acumulación de ciertos productos dentro de los organismos (Vazquez-Muñoz, 2017).
Biocompatibilidad	Capacidad para desempeñar una respuesta adecuada en el medio biológico, sin provocar efectos indeseables.
Bioensayo	Experimento que se hace utilizando organismos vivos, bajo condiciones y ambientes controlados (Morales y Cuellar, 2014).
Cutícula	Formación rígida, acelular (sin células), de estructura compleja y compuesta por quitina y calcio entre otras sustancias (Morales y Cuellar, 2014).
Diámetro hidrodinámico	Corresponde al tamaño de una esfera sólida hipotética que se difunde de la misma manera que la de la partícula que se mide, asumiendo una capa de hidratación que rodea a la partícula o molécula (Vazquez-Muñoz, 2017).
Dosis infecciosa (SID50)	Cantidad de virus que al ser aplicada individualmente a un grupo de organismos es capaz de infectar al 50% de estos (Reed y Muench, 1938).
Enfermedad infecciosa	Expresión clínica del proceso infeccioso, que se traduce en signos y síntomas tanto el daño causado por el agente infeccioso como el resultado de la inflamación resultante. Se pueden clasificar en función del microorganismo causal como bacterias, virus, hongos o parásitos o desde el punto de vista de las manifestaciones clínicas que produce (síndromes y enfermedades); ésta puede ser transitoria o puede llevar a la muerte (Barreto <i>et al.</i> , 2006; García-Palomo <i>et al.</i> , 2010; Vazquez-Muñoz, 2017).
Enfermedad Aguda	Enfermedad que tienen un inicio y un fin claramente definido que generalmente son de corta duración (Morales y Cuellar, 2014).
Enfermedad crónica	Patología de larga duración, cuyo fin o curación no puede preverse claramente o no ocurrirá nunca (Morales y Cuellar, 2014).
Ensamblado	Proceso por el cual los fragmentos cortos del ADN secuenciados se juntan en fragmentos más grandes hasta reconstruir el genoma o el transcriptoma completo (Hernández <i>et al.</i> , 2020).
Epitelio	Tejido formado por una o varias capas de células yuxtapuestas que recubren todas las superficies libres del organismo, y constituyen el recubrimiento interno de las cavidades y órganos. Los epitelios también forman el parénquima de muchos órganos (Morales y Cuellar, 2014).
Espécimen	Aquel individuo o parte de un individuo que se toma como muestra, especialmente el que se considera representativo de los caracteres de la población a la que pertenece (Morales y Cuellar, 2014).
Estrés	Toda demanda física o fisiológica que se le haga al organismo. Puede ser causada por enfermedades o ser de origen séptico, nutricional o ambiental (Morales y Cuellar, 2014).
Fagocitosis	Proceso por el cual un cuerpo extraño o un desecho celular es ingerido por células especiales (fagocito) mediante invaginación (Morales y Cuellar, 2014).
Gen	Secuencia en el ADN que codifica un producto determinado, ARN o proteínas (Romo-Quiñonez, 2014).

Genoma	Corresponde al total de la información genética, en particular que posee un organismo (Morales y Cuellar, 2014).
Hemocitos	Células plasmáticas de los crustáceos (como el camarón), encargadas de funciones relacionadas con el sistema inmune (Morales y Cuellar, 2014).
Hemolinfa	Tejido sanguíneo de los camarones que irriga los órganos y tejidos llevando oxígeno y nutrientes (Morales y Cuellar, 2014).
Hospedero	Organismo que alberga a otro en su interior o lo porta sobre sí, ya sea un parásito, un comensal o un mutualista.
Infección	Corresponde a la presencia y multiplicación de un microorganismo en los tejidos del hospedero; representa la interacción del agente patógeno (y sus factores de virulencia) con el hospedero.
Infiltración hemocítica	Migración de hemocitos a un tejido en donde hay presencia de un agente patógeno (Morales y Cuellar, 2014).
Lamela branquial	Ramificación secundaria de las branquias de los camarones (Morales y Cuellar, 2014).
Letargia	Condición presente en varias enfermedades nerviosas, infecciosas o tóxicas, caracterizada por un estado de somnolencia profunda y aletargamiento. Conduce en camarones la pérdida del reflejo de huida (Morales y Cuellar, 2014).
Mapeo	Alineamiento de secuencias cortas (producto de la secuenciación) de una calidad asignada sobre un conjunto de secuencias de referencia (secuencias largas que representan un genoma o transcriptoma) (Rollano-Peñaloza y Mollinedo-Portugal, 2017).
Melanina	Pigmento de color negro o pardo negruzco en forma de gránulos que existe en el protoplasma de ciertas células de los vertebrados; en invertebrados es producto de la activación del sistema inmune (cascada proPO) y se da para encapsular a un agente agresor (melanización) (Morales y Cuellar, 2014).
Metabolismo	Conjunto de reacciones y procesos físico-químicos que ocurren en una célula. Estos complejos procesos interrelacionados son la base de la vida a nivel molecular y permiten las diversas actividades de las células: crecer, reproducirse, mantener sus estructuras, responder a estímulos (Morales y Cuellar, 2014).
Muda	Desprendimiento periódico de la cubierta externa para permitir el crecimiento (aumentar en tamaño) de los tejidos blandos internos (Morales y Cuellar, 2014).
Nanomaterial	Estructuras con al menos una dimensión inferior a 100 nm (Vazquez-Muñoz, 2017).
Necrosis	Muerte patológica de un conjunto de células o de cualquier tejido del organismo, provocada por un agente nocivo que ha provocado una lesión tan grave que no se puede reparar. Una vez que se ha producido y desarrollado la necrosis, es irreversible (Morales y Cuellar, 2014).
Patógeno	Es toda aquella entidad biológica capaz de producir enfermedad o daño en la biología de un hospedero (humano, animal, vegetal, entre otros) sensiblemente predispuesto (Morales y Cuellar, 2014).
Pool	Grupo de muestras que son obtenidas y/o procesadas de forma combinada para reducir variabilidad genética (Morales y Cuellar, 2014).
Potencial Z	Medida de la magnitud de electrostática o repulsión / atracción de carga entre partículas, y es uno de los parámetros fundamentales que se sabe afectan la estabilidad. Su medición aporta una comprensión detallada de las causas de dispersión, agregación o floculación, y puede aplicarse para mejorar la formulación de dispersiones, emulsiones y suspensiones (Vazquez-Muñoz, 2017).
Respuesta innata	También conocida como inmunidad inespecífica; consiste en un sistema de mecanismos de defensa con el que cuenta un organismo y que lo protege contra

	bioagresores. Impide que ingrese a los tejidos, materiales dañinos u organismos patógenos (Morales y Cuellar, 2014).
Secuenciación	Técnica que permite conocer el orden de los nucleótidos en una molécula de ADN (Hernández <i>et al.</i> , 2020).
Tóxico	Sustancia química que, administrada a un organismo vivo, tiene efectos nocivos (Morales y Cuellar, 2014).
Toxicidad aguda (inmediata)	Capacidad de una sustancia de causar daño durante su exposición a esta. Los síntomas se pueden presentar durante la exposición, pocas horas después, o pocos días después de la exposición (United Nations, 2016).
Toxicidad crónica (largo plazo)	Capacidad de una sustancia para producir efectos adversos en un organismo debido a la exposición continua o repetida de cantidades relativamente bajas durante un periodo prolongado.
Valor Q (Phred)	Valor de calidad de cada base secuenciada. Un valor de 30 indica que la precisión de la base secuenciada es del 99.9% (Hernández <i>et al.</i> , 2020).
Virión	Partícula vírica morfológicamente completa e infecciosa (Morales y Cuellar, 2014).
Virulencia	Designa el carácter patogénico, nocivo y violento de un microorganismo, como una bacteria, hongo o virus (Morales y Cuellar, 2014).
Virus	Entidad biológica capaz de autorreplicarse utilizando la maquinaria celular de un hospedero (Morales y Cuellar, 2014).

Nota aclaratoria: Para una mejor interpretación del manuscrito, se realizó un glosario de vocabulario técnico, las cuales algunas de las definiciones fueron sacadas del manuscrito de Morales, V. y J. Cuéllar-Anjel (eds.). 2014. Guía Técnica – Patología e Inmunología de Camarones Penaeidos. OIRSA, Panamá, Rep. de Panamá.

1. INTRODUCCIÓN

El cultivo de camarón es uno de los sistemas de producción acuícola de mayor crecimiento en las últimas décadas en Asia y América Latina (FAO, 2020), en México su cultivo representa la principal actividad acuícola, siendo *Penaeus vannamei*, la especie de camarón mayormente cultivada debido a su fuerte oferta y demanda en el mercado nacional e internacional. Así como, su buena adaptación a desarrollarse a distintas condiciones de densidad de producción, salinidad, y al cautiverio. Cuando su manejo es adecuado, los rendimientos en términos de producción y productividad que se generan son muy elevados comparado contra otros cultivos de camarón (e.g., *Farfantepenaeus californiensis*, *Penaeus monodon*) (Chávez-Sánchez & Higuera-Ciapara, 2003; Nisar *et al.*, 2021). Estas características han contribuido a que su cultivo se haya extendido, diversificado (e.g., cultivo en jaulas flotantes), intensificado (e.g., cultivo intensivo e hiperintensivo) y avanzado tecnológicamente (e.g., cultivo en biofloc) en todo territorio mexicano (Chávez-Sánchez & Higuera-Ciapara, 2003; Lara-Espinoza *et al.*, 2015; Oliveira-Pinto *et al.*, 2020; Esparza-Leal *et al.*, 2020; Aïzonou *et al.*, 2021; Emerenciano *et al.*, 2021). Sin embargo, como en toda actividad productiva, no está exenta de problemas sobre todo en sanidad, siendo las enfermedades virales, una de las principales amenazas que enfrenta la industria del camarón (Álvarez-Ruiz, 2012).

Los virus son agentes infecciosos de carácter intracelular estricto, es decir, que no son capaces de autorreplicarse, por lo que necesitan infectar células hospederas, apoderándose de su maquinaria celular para hacer copias de sí mismo (Morales-Covarrubias, 2010). Uno de los principales patógenos para el camarón de cultivo en las últimas tres décadas, es el virus del síndrome de la mancha blanca (mejor conocido como “WSSV”, por sus siglas en inglés), el cual genera mortalidades en post-larvas y juveniles de hasta un 100% de la producción, en un lapso que puede tardar de 3 a 10 días después de los primeros signos clínicos de la enfermedad (Sánchez-Paz, 2010; Lightner, 2011). Un camarón infectado por este patógeno manifiesta comportamiento letárgico, reducción en la ingesta de alimento, nado errático (desorientación), anoxia (falta de oxigenación), pérdida de cutícula, coloración rozada a rojiza debido a la expansión de los cromatóforos del epitelio cuticular y dependiendo de la especie puede

presentar manchas blancas sobre su exoesqueleto (Escobedo-Bonilla *et al.*, 2008; Bustillos-Ruiz *et al.*, 2009; Leu *et al.*, 2009; Morales-Covarrubias, 2010). La infección de WSSV es altamente virulenta, contagiosa y no tiene un tratamiento comercial profiláctico o terapéutico que sea capaz de proteger la salud del camarón, esto ha generado un problema sanitario tan grave que no solamente ha impactado económicamente a este sector productivo, sino que también ha generado desempleo entre los acuicultores, restricciones a la exportación y la disminución de la confianza del consumidor hacia el producto (Moser *et al.*, 2012).

Ante esta problemática, la nanotecnología basada en nanomateriales es un campo emergente con múltiples aplicaciones en el cultivo del camarón, principalmente para el tratamiento de enfermedades causadas por patógenos (Khosravi-Katuli *et al.*, 2017; Meneses-Márquez *et al.*, 2018). La nanotecnología es un campo de estudio capaz de observar, medir, manipular y producir estructuras de tamaño nanométrico que oscilan entre 0.1 a 100 nm, las cuales se clasifican acorde a su tamaño, forma e interacciones biológicas (Rai *et al.*, 2009; Albanese *et al.*, 2012; Morris *et al.*, 2019). Entre los nanomateriales, se destaca el uso de nanopartículas de plata (AgNPs por sus siglas en inglés) y ha surgido como un tratamiento alternativo contra virus, bacterias resistentes a antibióticos y hongos (Meneses-Márquez *et al.*, 2018). En los últimos años, los productos Argovit® (productos basados en AgNPs) han llamado mucho la atención, debido a su alta actividad antimicrobiana de amplio espectro, su baja toxicidad en células eucariotas y su excelente biocompatibilidad (Borrego *et al.*, 2016; Ruiz-Ruiz *et al.*, 2020; Luna-Vázquez-Gómez *et al.*, 2021). Estos productos se han utilizado como agente antibacteriano contra *Candidatus Liberibacter asiaticus*, bacteria responsable de la enfermedad de HLB (Huanglongbing) en lima mexicana *Citrus aurantifolia* (Stephano-Hornedo *et al.*, 2020). En el área médica, se ha aplicado en pacientes con úlceras de pie diabético para prevenir amputaciones (Almonaci-Hernández *et al.*, 2017; 2020) y para combatir infecciones de hongos como *Candida albicans*, agente causante de vulvovaginitis micótica (Vazquez-Muñoz *et al.*, 2014). Como agente antiviral se ha aplicado para tratar perros infectados con moquillo canino (Bogdanchikova *et al.*, 2016) y se ha evaluado *in vitro* contra el virus de la fiebre del río rift (Borrego *et al.*, 2016). En acuicultura, este producto se ha aplicado eficazmente como agente antiparasitario contra los protozoarios *Tetrahymena pyriformis* (Fuentes-Valencia *et al.*, 2020) y

Perkinsus marinus (Bravo-Guerra *et al.*, 2020), y contra el platelminto *Cichlidogyrus spp* (Pimentel-Acosta *et al.*, 2019).

En la actualidad, la información sobre la eficacia de las AgNPs contra virus que afectan a los camarones aún es escasa. Sin embargo, estudios realizados por nuestro grupo de investigación han demostrado que Argovit[®], manejado por inyección intramuscular es eficaz para prevenir (método profiláctico) y/o tratar (método terapéutico) infecciones de WSSV en camarón (Juárez-Moreno *et al.*, 2017; Ochoa-Meza *et al.*, 2019). Sin embargo, la aplicación intramuscular resulta impráctico en el campo productivo, considerando la enorme cantidad de organismos a tratar. Por lo que esta tecnología debe enfocar su aplicación a través del alimento, y evaluar sus efectos tóxicos en la salud del camarón.

El propósito de este trabajo fue estudiar las características de nuevas formulaciones de Argovit[®], seleccionando aquella con mejor actividad antiviral, evaluando su toxicidad, y determinando su capacidad inmunoestimulante. La actividad antiviral de la formulación seleccionada fue evaluada vía intramuscular y *per os*. Asimismo, se estudió el mejor régimen alimenticio con el fin de determinar su efecto sobre el crecimiento y estado de salud (toxicidad) del camarón, analizando por histología el daño a hepatopáncreas. Todos los bioensayos fueron realizados en juveniles de camarón *P. vannamei*, tallas desde 2 a 7 gramos.

2. ANTECEDENTES

2.1 AgNPs como agente antiviral

En los últimos años, se han suscitado nuevos brotes de enfermedades infecciosas y ha habido un incremento a la resistencia antiviral a los medicamentos, lo que ha generado numerosas investigaciones enfocadas en el desarrollo de nuevos fármacos y/o formulaciones basadas en AgNPs como agente antiviral debido a su alto potencial antimicrobiano de amplio espectro (Kim *et al.*, 2010; Galdiero *et al.*, 2011; Juárez-Moreno *et al.*, 2017). El tamaño y la forma de las AgNPs son dos parámetros importantes en la actividad antiviral. Dimensiones inferiores a 10 nm producen superficies más reactivas, y la variación de la forma (por ejemplo, triangular, barra o espiral) afectan drásticamente el mecanismo de acción antiviral, siendo las AgNPs esféricas y cilíndricas las más fagocitadas (Soiza *et al.*, 2018; Marimuthu *et al.*, 2020; Pilaquinga *et al.*, 2021). Diversos estudios confirman la actividad antiviral que ejercen las AgNPs sobre diferentes tipos de virus que causan enfermedades infecciosas (e.g., humanos, simios, cerdos, bovinos y pollos), como la influenza H1N1 (Mehrbood *et al.*, 2009; Mori *et al.*, 2013), virus parainfluenza humano tipo 3 (Galdiero *et al.*, 2013), adenovirus humano tipo 3 (Chen *et al.*, 2013), virus respiratorio sincitial (Yang *et al.*, 2016; Morris *et al.*, 2019), el virus de la inmunodeficiencia humana (Elechiguerra *et al.*, 2005; Lara *et al.*, 2010), herpes simple tipo I y tipo 2 (Baram- Pinto *et al.*, 2009; Hu *et al.*, 2014; Orłowski *et al.*, 2014), hepatitis B (Lu *et al.*, 2008), virus del ébola (Yen *et al.*, 2015), Virus Tacaribe (Speshock *et al.*, 2010), virus de la viruela del simio o monkeypox (Rogers *et al.*, 2008), virus de la peste porcina africana (Thi Ngoc Dung *et al.*, 2020), virus de la diarrea epidémica porcina (Du *et al.*, 2018), virus de la poliomielitis (Huy *et al.*, 2017), virus del dengue (Suresh *et al.*, 2015), virus del chikungunya (Sharma *et al.*, 2018), virus de la malaria (Elumalai *et al.*, 2017), SARS-CoV-2 (Jeremiah *et al.*, 2020), virus de enfermedad bursal infecciosa (Pangestika *et al.*, 2017), adenovirus tipo 3 (Chen *et al.*, 2013) y herpesvirus bovino tipo I (El-Mohamady *et al.*, 2018). Estos estudios han creado enormes expectativas sobre las AgNPs como terapia alternativa antiviral.

2.2 Aplicación Argovit® como agente antiviral

El diseño de las AgNPs de Argovit® en conjunto con sus propiedades físico-químicas, les confieren un enorme potencial para controlar agentes infecciosos potencialmente patógenos. En este sentido, Borrego *et al.* (2016) evaluó su actividad antiviral contra el virus de la fiebre del valle rift en cultivo celular Vero® y ratón INFAR® (ratón deficiente del receptor interferón tipo I), logrando una reducción significativa de la infectividad del patógeno tanto de forma *in vitro* e *in vivo*. Por otra parte, Bogdanchikova *et al.* (2016) evaluó su potencial terapéutico contra el virus del moquillo canino en etapas clínicas no neurológica (con afectación digestiva, cutánea y respiratoria) y neurológica (con daño al sistema nervioso) de la enfermedad. Para este estudio, Argovit® fue suministrado diariamente en dosis de 1 mg/Kg (miligramo de AgNPs por kilogramo de peso) durante 15 días. Los resultados revelaron más del 90% de supervivencia en aquellos organismos que fueron tratados en etapa no neurológico, recuperándose de la enfermedad y sin secuelas, mientras que, en aquellos organismos que fueron tratados en etapa avanzada neurológicas de la enfermedad, se obtuvo un 6% de supervivencia. Estos resultados demuestran el enorme potencial de Argovit® como tratamiento alternativo contra el virus del moquillo canino en etapas iniciales de la enfermedad.

Asimismo, en las postrimerías de la pandemia de Covid-19, Almanza-Reyes *et al.* (2021) demostró la actividad antiviral de una variante de Argovit® (Ag-Protect), sobre la infección por SARS-CoV-2 en células cultivadas Vero E6® (Cat. No. CRL-1586), posteriormente, Ag-Protect® se aplicó como tratamiento preventivo en el personal de áreas hospitalarias (Hospital General de Tijuana, B.C., México), con estrecha interacción en pacientes diagnosticados de COVID-19. El grupo experimental recibió instrucciones de realizar enjuagues bucales y nasales con la solución de AgNPs, mientras que, al grupo control se le indicó que se hiciera enjuagues bucales y nasales de manera convencional. La incidencia de infección por SARS-CoV-2 fue significativamente menor en el grupo experimental (dos participantes de 114, 1.8%) en comparación con el grupo control (33 participantes de 117, 28.2%), con un 84.8% eficiencia.

Con respecto a virus de interés acuícola, esta formulación se ha aplicado contra WSSV en camarón *Penaeus vannamei*, demostrando que una sola dosis profiláctica intramuscular de AgNPs (50 ng/ μ L) es capaz de aumentar la supervivencia de los camarones hasta un 80%, sin efectos tóxicos (Juárez-Moreno *et al.*, 2017). Por otra parte, Ochoa Meza *et al.* (2019) demostró que la misma dosis intramuscular, pero de forma terapéutica puede retardar la infección de WSSV, incluso en presencia de una alta concentración de iones ferrosos (Fe^{2+}). Los iones Fe^{2+} en ambiente acuoso pueden controlar la expresión de los genes de virulencia bacteriano y WSSV, lo que ocasiona un aumento sinérgico de la enfermedad, es decir, que infectividad o virulencia del patógeno hacia el hospedero se potencializa (Litwin & Calderwood, 1993; Lin *et al.*, 2015).

2.3 Mecanismo de acción antiviral

Investigaciones enfocadas a explicar el mecanismo de acción antiviral describen que las AgNPs experimentan una afinidad hacia residuos que contienen azufre en las glucoproteínas de la envoltura del virus (Fig. 1), y este complejo de AgNPs-virus interfiere con la adhesión en la célula hospedera durante las primeras etapas de infección (Elichiguerra *et al.*, 2005; Rogers *et al.*, 2008; Lara *et al.*, 2010).

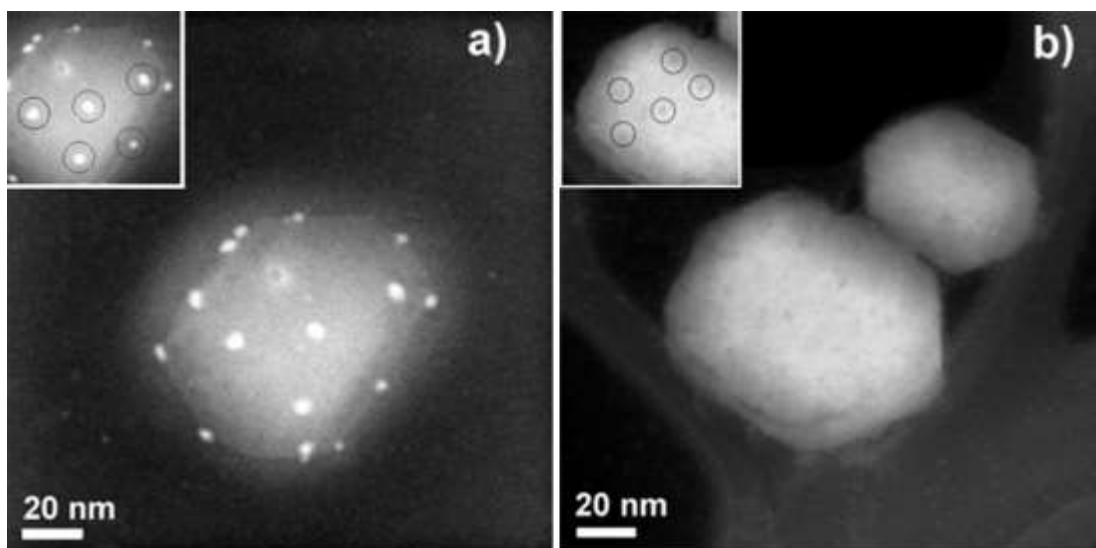


Figura 1. Mecanismo de acción antiviral de las AgNPs en la cápside viral. a) Micrografía del virus VIH-1 expuesto a AgNPs, b) Micrografía del virus HIV-1 sin AgNPs (modificado de Elichiguerra *et al.*, 2005).

Alternativamente, un segundo mecanismo sugiere que las AgNPs son capaces de cruzar la membrana celular y bloquear eficazmente los factores celulares necesarios para el ensamblaje adecuado de la progenie viral (Fig. 2) (Galdiero *et al.*, 2011; Greulich *et al.*, 2011; Khandelwal *et al.*, 2014). Sin embargo, no es del todo claro y aún está en discusión.

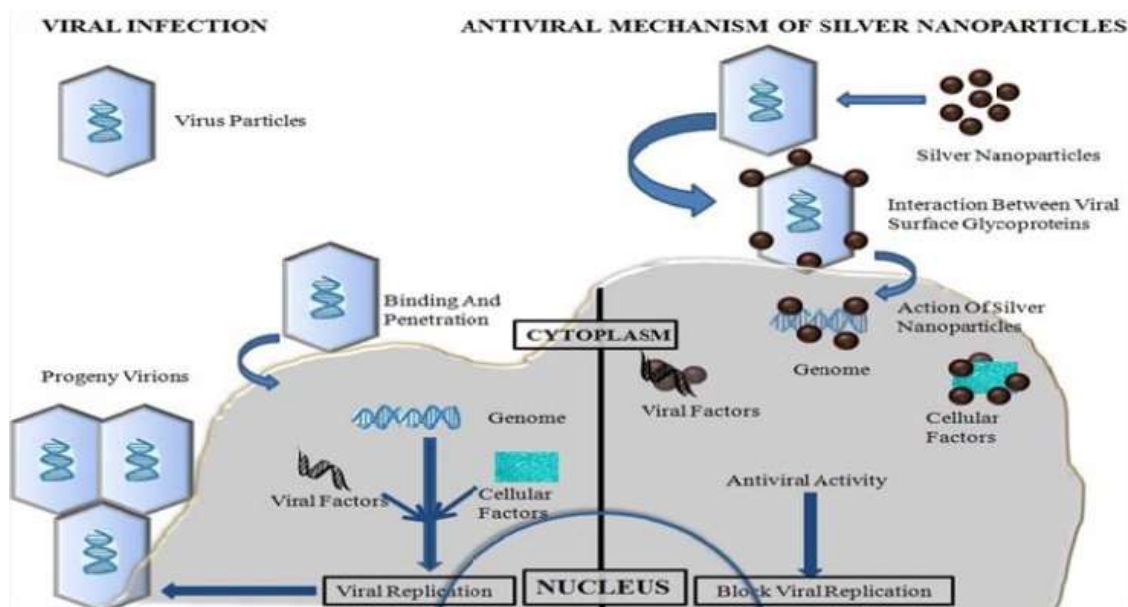


Figura 2. Mecanismo alternativo de acción antiviral de las AgNPs (Khandelwal *et al.*, 2014).

Los dos mecanismos propuestos tienen en común, que las AgNPs interfieren con la replicación viral tanto en etapa inicial de la infección como en el ensamblaje del virión. No obstante, estas AgNPs tienen la capacidad de internalizarse dentro de los sistemas biológicos y generar una respuesta inmune en el organismo hospedero, por lo que, esto no se descarta como probable acción antiviral (Dacoba *et al.*, 2017; Coutiño *et al.*, 2017).

2.4 Internalización celular

El proceso de internalización celular de las AgNPs depende de variables como: concentración administrada, tamaño, forma, carga iónica, tiempo de exposición y estado en que está se encuentre la célula (Coutiño *et al.*, 2017). Las AgNPs de carga neutra (sin carga; Ag^0) y pequeñas (<12 nm) pueden difundirse rápidamente por la membrana celular por vía lipídica directa. Por otra parte, las AgNPs en forma iónica de carga positiva, pueden entrar por despolarización de la membrana celular, induciendo la apertura de poros de canales (canal de calcio) y bombas

iónicas (sodio-potasio), afectando su permeabilidad y funcionabilidad de membrana (Milic *et al.*, 2015; Coutiño *et al.*, 2017). Por otra parte, AgNPs de 30-50 nm pueden entrar por endocitosis mediada por receptores celulares para ingresar mediante vesículas de clatrina y AgNPs mayor a 70 nm se internalizan por pinocitosis donde eventualmente alcanzarán el lisosoma (Alkilany & Murphy, 2010; Albanese *et al.*, 2012). (Fig. 3).

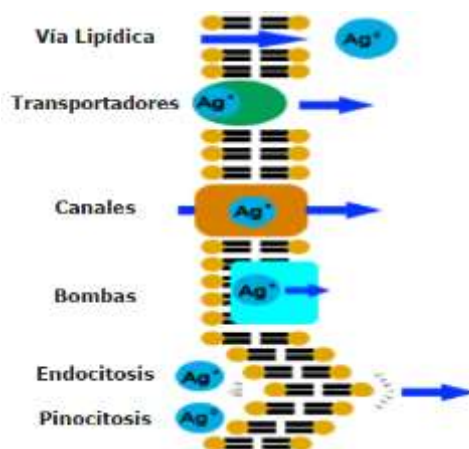


Figura 3. Esquema de los mecanismos de entrada de la AgNPs a la célula (Coutiño *et al.*, 2017).

En resumen, las AgNPs pueden transportarse al interior de las células eucariotas por vía endocítica mediada por receptores o por pinocitosis, o bien dependiendo de la carga, tamaño y concentración pueden acceder libremente por difusión o por medio de vesículas de caveolina (Coutiño *et al.*, 2017). Dentro de la célula, las interacciones de las AgNPs con el sistema biológico son inevitables, por lo que, estas pueden estimular respuesta inmune, inmunosupresión, estrés oxidativo o simplemente ser inocuas, es decir, no causan ningún efecto nocivo en el cuerpo del hospedero (Kononenko *et al.*, 2015; Dacoba *et al.*, 2017).

2.5 Activación de la respuesta inmune

La función principal del sistema inmune es detectar y reconocer sustancias foráneas para proteger al hospedero (Kulkarni *et al.*, 2021). Teniendo en cuenta lo anterior, las AgNPs tienen la capacidad de penetrar la membrana celular debido a su tamaño nanométrico, y estimular una respuesta inflamatoria mediada por las citocinas IL-1, IL-6 y TNF- α (Kononenko *et al.*, 2015). En vertebrados e invertebrados, el proceso de inflamación es una respuesta inmune y surge como mecanismo de defensa para destruir agentes extraños y reparar tejidos u órganos dañados. En

este sentido, Trickler *et al.* (2010) observó que el proceso inflamatorio de las AgNPs sobre células endoteliales del cerebro de ratón fue significativamente más alto en AgNPs de que 25 nm comparado con 40 y 80 nm. Esto sugiere, que la intensidad de la respuesta inflamatoria se correlaciona dependiendo del tamaño de la nanopartícula, es decir, entre más pequeñas son más bioactivas, debido a que tiene mayor área superficial. Por otra parte, las AgNPs cargadas positivamente poseen una alta capacidad inflamatoria más que las cargadas negativamente o neutras (Dobrovolskaia *et al.*, 2007). También la carga superficial juega un papel importante en la actividad fagocítica, ya que tanto la carga catiónica (positiva) como la aniónica (negativa) son más atractivas para los fagocitos en comparación con las partículas neutras del mismo tamaño (Zahr *et al.*, 2006). Por otra parte, las nanopartículas metálicas de cobalto interactúan con células del sistema innato mediante mecanismos relacionados con receptores tipo Toll (TLRs), en particular TLR-4, que funciona como proteína transmembranal de señalización y finalizan con la activación de la respuesta inmune innata (Potnis *et al.*, 2013).

En el caso particular del camarón, su sistema inmune está basado por la inmunidad innata que consiste en efectores celulares y humorales (Rendón & Balcázar, 2003; Vaseeharan *et al.*, 2006; Fonseca-Moreno *et al.*, 2013). Cuando su cuerpo es invadido por agentes extraños, los hemocitos migran a estos sitios de infección (infiltración) y generan una respuesta inflamatoria. En estos sitios de infección ocurre el proceso de fagocitosis y/o la formación de agregados celulares en torno de las partículas invasoras (nodulación y encapsulación). Comúnmente, estas respuestas culminan con la liberación de diferentes moléculas inmunoefectoras (e.g. melanina, péptidos antimicrobianos), capaces de neutralizar y degradar los agentes invasores (Jiravanichpaisal *et al.*, 2006). En este sentido, Ochoa-Meza *et al.* (2019) encontró que una dosis terapéutica intramuscular de 50 ng/μL de AgNPs Argovit® fue capaz de retardar la infección por WSSV e inducir una respuesta transcripcional de los genes LGBP y Cu/Zn-SOD asociados al sistema inmune del camarón por la presencia de altas concentraciones de ion ferroso. Por su parte, Sivaramasamy *et al.* (2016) reportó que las AgNPs (5-25 nm) promueven incrementos en el número de hemocitos totales y expresión de genes relacionados al sistema inmune en varios tejidos del camarón. Estos estudios sugieren que las AgNPs promueven un estado inmunomodulador en el camarón. Sin embargo, dependiendo de las propiedades fisicoquímicas

de la nanopartícula, pueden generar respuesta inmune, inmunosupresión o estrés oxidativo mediada por ROS.

2.6 Efectos de tóxicos

Existe aún controversia acerca de la toxicidad de las nanopartículas metálicas, ya que estos dependen de la forma, carga superficial, tamaño, dosis administrada y estado de aglomeración. Estos parámetros influyen directamente en la respuesta de naturaleza oxidativa, por lo que, el diseño de las AgNPs es muy importante (Cho *et al.*, 2009; Coutiño *et al.*, 2017). La generación de EROs (especies reactivas de oxígeno) y EO (estrés oxidativo) parecen ser dos mecanismos potenciales de toxicidad (Hsin *et al.*, 2008). En el organismo debe existir un equilibrio entre las EROs y los sistemas de defensa antioxidante. Cuando dicho equilibrio se rompe a favor de las EROs se produce el denominado estrés o daño oxidativo (Kohen & Nyska, 2002). El mecanismo antioxidante mediado por la acción de glutatión peróxidasa (GPX), catalasa (Cat), tiorredoxina (Trx), superóxido dismutasa (SOD) y peroxidasa de tiorredoxina (TrxR) son responsables de neutralizar el estrés oxidativo de las EROs generado en gran medida por el metabolismo energético mitocondrial (Ahamed & Siddiqui, 2007). Sin embargo, se ha visto que las AgNPs son capaces de interactuar con las enzimas GPX y SOD, disminuyendo su actividad, promoviendo peroxidación lipídica (Carlson *et al.*, 2008). En consecuencia, la acumulación de EROs y el estrés oxidativo provocan una gran cantidad de eventos fisiológicos y celulares incluyendo el estrés, perturbación y destrucción de la mitocondria, apoptosis, inflamación y daño al ADN (Ahamed *et al.*, 2010). La Figura 4 muestra ejemplifica mecanismos citotóxicos inducidos por las AgNPs metálicas.

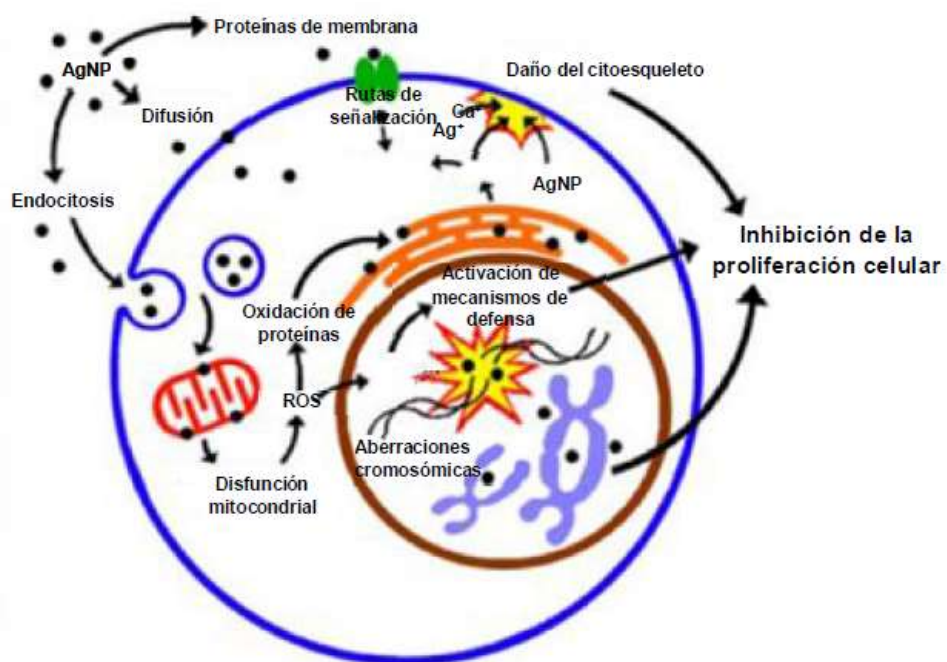


Figura 4. Mecanismo de citotoxicidad inducidos por AgNPs (modificado de AshaRani *et al.*, 2009).

3. JUSTIFICACIÓN

La industria del camarón participa activamente generando divisas a los países productores; tan solo Ecuador vendió en 2021, 1000 millones de dólares a los Estados Unidos. Debido a su alta oferta y demanda en los mercados internacionales, la actividad ha incrementado su importancia para el desarrollo regional, donde se ubican granjas de camarón, congeladoras, centrales de abastos, empresas de insumos y/o equipos acuícolas. Sin embargo, esta actividad productiva no está exenta de problemas, sobre todo, por el manejo inadecuado del cultivo y por la presencia de agentes infecciosos. En este contexto, el WSSV representa uno de los problemas sanitarios más importantes para esta industria, ya que es altamente contagioso y letal para el cultivo de camarón. Hasta el momento no se cuenta con algún tratamiento comercial que elimine su impacto, que puede causar hasta un 100% de mortalidades en la producción en un lapso de 3 a 10 días después de los primeros signos de la enfermedad. Esto abre una ventana de oportunidades para buscar estrategias capaces de proteger la salud del camarón. En este sentido, el uso de las AgNPs de Argovit® ha llamado la atención, gracias a su potencial antimicrobiano ante distintos virus y otros patógenos, así como, su baja toxicidad en células eucariotas y su excelente biocompatibilidad, es decir, su buena capacidad para desempeñar una respuesta adecuada en el medio biológico, sin provocar efectos indeseables, lo convierte en una excelente alternativa para el tratamiento del virus WSSV. Derivado de lo anterior, el presente estudio pretende contribuir al conocimiento de las propiedades antimicrobianas mediante el uso de AgNPs de Argovit® incluido en alimento contra el virus WSSV. La presente propuesta es una opción terapéutica contra este patógeno, para mejorar la sanidad del camarón de cultivo, beneficiando a las familias dedicadas a esta actividad. Sin embargo, al aplicar esta tecnología en el campo productivo, surge la necesidad de entender su mecanismo de acción antiviral y generar conocimiento sobre los efectos en el crecimiento, estatus de salud, capacidad inmunoestimulante y toxicidad que está pueda ocasionar en el camarón.

4. HIPÓTESIS

Si una sola dosis de AgNPs suministrada a camarones por vía intramuscular no ocasiona signos de toxicidad y promueve un efecto antiviral contra WSSV. Entonces, la aplicación de AgNPs incluidas en alimento generará una respuesta protectora contra WSSV sin efectos nocivos en el crecimiento y salud de juveniles camarón.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar la toxicidad y mecanismos antivirales de AgNPs, cuando son administradas al camarón (*Penaeus vannamei*) por vía intramuscular y adicionadas en el alimento, mediante infecciones experimentales contra WSSV.

5.2 Objetivos particulares

1. Seleccionar la formulación de AgNPs (Argovit®) con mayor potencial antiviral y baja toxicidad de entre cinco formulaciones, administrándolas intramuscularmente en juveniles de camarón y retándolos contra WSSV.
2. Identificar genes implicados en mecanismos de defensa del camarón por efectos de la formulación de las AgNPs seleccionadas mediante análisis transcriptómico.
3. Determinar toxicidad aguda de las AgNPs incluidas en el alimento de juveniles de camarón.
4. Evaluar la actividad antiviral contra WSSV con una sola dosis de las AgNPs incluidas en alimento.
5. Analizar la respuesta transcripcional de genes del sistema inmune en camarones tratados con AgNPs incluidas en el alimento.
6. Evaluar la toxicidad crónica, alteraciones en crecimiento y daño histológico en hepatopáncreas, ocasionados por la administración continua o intermitente de AgNPs incluidas en el alimento.
7. Evaluar el efecto antiviral contra WSSV en camarones tratados con AgNPs incluidas en el alimento después de cuatro semanas de tratamiento.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Efecto de toxicidad aguda en camarón a dosis intramusculares de AgNPs

6.1.1 Obtención y preparación de AgNPs

En este estudio se analizaron cinco formulaciones de AgNPs (Argovit[®]) que fueron donadas por la Dra. Nina Bogdanchikova de CNYN-UNAM de Ensenada, B.C. Los productos Argovit[®] (Novosibirsk, Rusia; patente 2427380 y 2014200380) consisten en una solución de AgNPs esféricas de 35 ± 15 nm a una concentración de 12 mg/mL de partícula metálica funcionalizada con 188 mg/mL de PVP a distintas masas moleculares (8-12 kDa, 10-16 kDa; 45-58 kDa). La caracterización fisicoquímica se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de las formulaciones de Argovit[®].

Propiedades	AgNPs-1 [®]	AgNPs-2 [®]	AgNPs-3 [®]	AgNPs-4 [®]	AgNPs-5 [®]
Peso molecular del polímero (kDa)	8 - 12	10 - 16	10 - 16	45 - 58	45-58
Contenido de plata metálica (mg/mL)	12				
Contenido de PVP (mg/mL)	188				
Morfología de la partícula	Esferoide				
Diámetro promedio de la partícula metálica mediante TEM (nm)	35±15				
Intervalo de tamaño de las partículas metálica mediante TEM (nm)	1 a 90				
Diámetro Hidrodinámico: AgNP con PVP (nm)	70				
Potencial Z (mV)	-15				
Resonancia plasmónica de superficie (nm)	420				
Estructura PVP mediante FTIR	Confirmada				

Para el estudio de toxicidad aguda, las AgNPs de Argovit[®] fueron diluidas en PBS 1X (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7.4) para obtener dosis en relación a la cantidad de AgNPs administrado por gramo de peso del espécimen. Las dosis probadas fueron 50 y 1000 (ng de AgNPs/g de camarón) de cada formulación, administradas en 100 µL de bufer PBS 1X.

6.1.2 Camarones experimentales

Se obtuvieron juveniles de camarón de 6.0 ± 2.0 g de la empresa Inmobiliaria Osiba de San Ignacio de Dimas, Sinaloa. Los camarones fueron transportados al Departamento de Acuicultura del CIIDIR-IPN y colocados en tanques con 500 L de agua marina a 30 UPS (Unidades Prácticas de Salinidad) y aireación constante. Los camarones se alimentaron *ad libitum* dos veces al día con alimento comercial (Camaronina[®], Purina-Cargill LTD, Minnesota, USA) con 35% de proteína. Posteriormente, se analizaron 20 camarones de manera aleatoria para descartar la presencia de WSSV, virus de la necrosis hipodermal hematopoyética (IHHNV) y *Vibrio* causante de la enfermedad de la necrosis aguda del hepatopáncreas (V_{AHPND}).

6.1.3 Diseño experimental

El experimento consistió en evaluar el efecto tóxico de 5 formulaciones Argovit[®] en camarón. Se probó una dosis baja (50 ng/g), basado en estudios de Juárez-Moreno *et al.* (2017) y una dosis 20 veces más alta (1000 ng/g). Ambas dosis fueron aplicadas por vía intramuscular en 100 μ L de bufer PBS 1X. El diseño se describe en la Tabla 2 con 10 organismos por réplica y tres réplicas por grupo.

Tabla 2. Evaluación de la toxicidad aguda de cinco formulaciones de AgNPs aplicadas por vía intramuscular.

Grupo	Tratamiento	AgNPs (ng/g) ¹	Peso (g) ²	AgNPs/100 μ L (ng) ³
1	AgNPs-1 [®]	50	6	300
2		1000	6	6000
3	AgNPs-2 [®]	50	6	300
4		1000	6	6000
5	AgNPs-3 [®]	50	6	300
6		1000	6	6000
7	AgNPs-4 [®]	50	6	300
8		1000	6	6000
9	AgNPs-5 [®]	50	6	300
10		1000	6	6000
11	Ctrl. PBS 1X	-	6	-

¹ nanogramos de AgNPs por gramo de camarón.

² Peso de cada camarón.

³ AgNPs inyectadas a cada camarón diluidas en 100 μ L de bufer PBS 1X.

Las dosis en ng/g se administraron intramuscularmente entre el tercer y cuarto segmentos abdominales de los organismos experimentales. Los camarones fueron colocados en acuarios de vidrio con 25 L de agua marina a 30 UPS, 27 ± 1 °C y aireación continua. Se alimentaron diariamente con alimento comercial (Camaronina® con 45% de proteína), de acuerdo al 4% de la biomasa en dos raciones diarias (8:00 am a 6:00 pm). Se registraron la mortalidad y efectos tóxicos de acuerdo a su comportamiento (letargia, nado errático, falta de apetito) cada 12 h durante 96 h. El alimento no consumido, las heces y mudas fueron removidos por sifoneo cada 48 h con recambio de agua del 50%. Al final de ensayo se determinó el porcentaje de supervivencia mediante la siguiente formula:

(1)

$$\text{Supervivencia (\%)} = \left(\frac{\text{número de organismos totales}}{\text{número de organismos iniciales}} \right) \times 100$$

6.2 Análisis de la virulencia de WSSV cuando es sometido a AgNPs

6.2.1 Organismos experimentales

Para este bioensayo, los camarones experimentales de 2.0 ± 0.5 g fueron donados por el Dr. Héctor Manuel Esparza Leal. Este lote de camarón provenía del Laboratorio de Acuicultura del CIIDIR-Sinaloa. Al igual que el apartado 6.1.2, se les realizaron pruebas de PCR para confirmar la ausencia de WSSV, IHHNV y V_{AHPND} .

6.2.2 Preparación del inóculo infeccioso

El inóculo infeccioso de WSSV (aislado Guasave-2005) fue proporcionado por el Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular del CIIDIR. El inóculo se preparó de acuerdo con la metodología descrita por Álvarez-Ruiz *et al* (2013). Se inyectaron 10 camarones por vía intramuscular con una dilución del inóculo (1:100 con PBS 1X) y se colocaron en un acuario de vidrio con 40 L de agua marina a 30 UPS, 27 ± 1.0 °C, con aireación y un filtro de cascada. Cuando los camarones presentaron signos de enfermedad se colectaron, se extrajo el tejido muscular, se pesó y se homogenizó en un mortero con 10 volúmenes de búfer PBS 1X. El homogenizado se transfirió a

tubos de 1.6 mL, se centrifugó a 13,000 x *g* durante 20 minutos a 4°C. El sobrenadante se transfirió a tubos nuevos de 1.6 mL, y se centrifugó nuevamente a 13,000 x *g* durante 20 minutos a 4°C. El sobrenadante se filtró por 0.45 µm (Millipore®) y se almacenó en alícuotas a -70°C.

6.2.3 Titulación del inóculo

El título viral se determinó acorde a lo descrito por Álvarez-Ruiz *et al.* (2013) y Apún-Molina *et al.* (2017). Para esto, se prepararon 6 diluciones seriadas (factor de dilución 10) del nuevo inóculo, utilizando buffer PBS 1X como diluyente. Se inocularon por vía intramuscular a camarones de manera individual 100 µL de las 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵ y 10⁻⁶. La inyección se realizó entre el tercer y cuarto segmentos abdominales en cinco especímenes por dilución. Los camarones infectados fueron colocados en acuarios con 25 L de agua marina filtrada, a 30 UPS, 27 ± 1°C y aireación constante. Se registró el comportamiento y la mortalidad cada 12 h por un periodo de 96 horas. El título viral se calculó de acuerdo a la fórmula propuesta por Reed & Muench (1938). Los resultados obtenidos fueron descritos como SID₅₀/mL (dosis infecciosas media de camarón por mL). La figura 5 resume todo el proceso para determinar el título viral.

$$DP = \frac{A - B}{A - C} \quad (2)$$

Donde:

DP= Distancia proporcional

A= corresponde al porcentaje de mortalidad obtenido por encima del 50%;

B= corresponde al 50% de mortalidad;

C= corresponde al porcentaje de mortalidad por debajo del 50%.

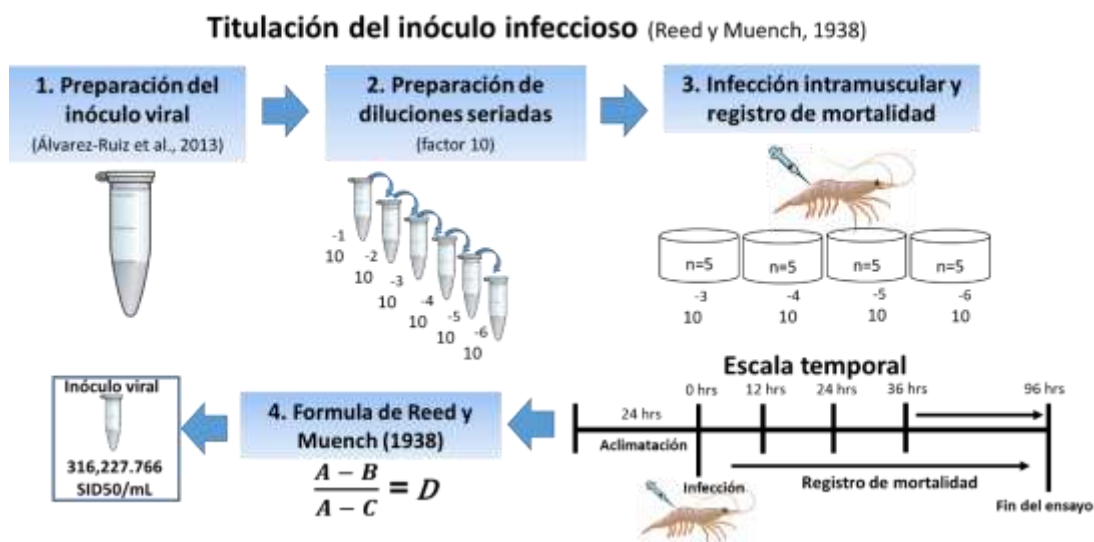


Figura 5. Diagrama del flujo de la titulación de inóculos infecciosos de WSSV.

6.2.4 Selección de la dosis infecciosa (SID₅₀) de trabajo

El diseño experimental para seleccionar la dosis mínima en SID₅₀, capaz de generar 100% de infección y proyectar claros signos clínicos de la enfermedad, se realizó por triplicado (n=10 organismos por réplica) y consistió en 3 grupos experimentales y un grupo control (Tabla 3). Los organismos de los grupos experimentales se infectaron por vía intramuscular con 7, 10 y 100 SID₅₀ en 100 µL de PBS 1X. Mientras que, en el grupo control solamente recibieron 100 µL de buffer PBS. Se monitorearon los signos de la enfermedad cada 6 h. El experimento terminó cuando todos los camarones infectados murieron, es decir, cuando se obtuvo un 100% de mortalidad en las tres dosis infecciosas.

Tabla 3. Selección de la dosis infecciosa de trabajo

Grupo	Tratamiento	Infección con WSSV
1	7 SID ₅₀	Si
2	10 SID ₅₀	Sí
3	100 SID ₅₀	Sí
C (-)	PBS	No

6.2.5 Efecto en la virulencia de WSSV

Con la finalidad de evaluar el efecto antiviral de las 5 formulaciones de AgNPs sobre inóculos infecciosos de WSSV se seleccionó el título viral de 7 SID₅₀ (inciso 6.2.3), ya que esta dosis fue capaz de generar una infección del 100% de mortalidad a 72 hpi, con signos claros de la enfermedad. Esta cantidad de virus (7 SID₅₀) se puso en contacto con diferentes cantidades de AgNPs (40, 100, 200 y 1000 ng), juntos, virus y AgNPs diluidos en 100 µL de buffer PBS. Las mezclas se mantuvieron en agitación suave (50 RPM) por 1 hora. Posteriormente fueron inyectadas a los camarones. El diseño experimental consistió en 20 grupos experimentales y 2 grupos control; control negativo (camarones tratados solo con PBS) y control positivo (WSSV en PBS sin AgNPs). El experimento se realizó por triplicado, utilizándose 30 organismos por tratamiento (n=10 organismos por réplica). El diseño experimental se describe en la Tabla 4.

Tabla 4. Análisis de la virulencia de WSSV cuando es sometido a AgNPs

Grupo	Descripción	ng AgNPs/7SID ₅₀ WSSV
1	AgNPs-1®	40
2		100
3		200
4		1000
5	AgNPs-2®	40
6		100
7		200
8		1000
9	AgNPs-3®	40
10		100
11		200
12		1000
13	AgNPs-4®	40
14		100
15		200
16		1000
17	AgNPs-5®	40
18		100
19		200
20		1000
21	C (+)	solo WSSV
22	C (-)	PBS

Durante el experimento, los camarones fueron mantenidos en acuarios de vidrio con 25 L de agua marina (30 UPS; 27±1°C) y aireación constante. Los juveniles se alimentaron acorde al 4%

del peso corporal y esta se dividió en dos raciones diarias. El alimento no consumido junto con el material fecal fue removido por sifonéo cada 48 h con intercambio de agua del 50%. El experimento tuvo una duración de 96 h, registrándose la presencia de organismos muertos y su comportamiento (activos, letárgicos o moribundos) cada 12 h.

6.3 Análisis transcriptómico en branquias de camarón inyectados con Argovit®

Con el propósito de entender los mecanismos inmunológicos y/o de toxicidad que se activan en presencia de AgNPs en el camarón, realizamos un estudio exploratorio de expresión diferencial génica por RNAseq. Para este estudio se utilizaron 12 juveniles de 6 ± 2 g (*apartado 6.1.2*) y se colocaron en 2 acuarios (6 organismos por acuario) de vidrio con 20 L de agua marina (30 UPS) a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ y aireación constante, los cuales se dejaron aclimatar bajo estas condiciones por 24 h. El experimento fue diseñado completamente al azar y consistió en 2 grupos experimentales. En el grupo 1, los juveniles fueron tratados intramuscularmente con dosis de 1000 ng/g de Argovit-4® en la región dorso-ventral del tercer segmento abdominal en volúmenes de 100 μL . Mientras, el grupo 2 (control) no fueron tratados con AgNPs (Tabla 5). Después 8 h de iniciado el experimento, se tomaron muestras de branquias de 3 camarones por grupo experimental y se agruparon en pool. Cada pool fue considerado como réplica biológica y estas fueron fijados en RNAlater®. Al final del experimento se obtuvieron 2 réplicas biológicas por grupo experimental y estas fueron almacenadas a -20°C hasta su uso.

Tabla 5. Análisis transcriptómico en branquias de camarón inyectados con Argovit®

Grupo	Tratamiento	Dosis
1	Argovit-4®	Tratados con dosis de 1000 ng/g
2	Control	No tratados

6.3.1 Secuenciación masiva

Las muestras fijadas se enviaron a la empresa Genewiz (New Jersey, USA) para su procesamiento (extracción de ARN y preparación de librerías) y secuenciación. La integridad del ARN fue verificada con Bioanalyzer (Agilent, Santa Clara, California, USA) y a partir de estas

muestras, se construyeron un total de 4 librerías con terminaciones pareadas (*pair-end*) correspondientes a 2 réplicas biológicas por tratamiento. La secuenciación se realizó en la plataforma HiSeq 2500 de illumina, con una longitud de secuenciación de 150 pb. La Figura 6 muestra la estrategia de trabajo que se siguió para el análisis de los datos transcriptómicos.

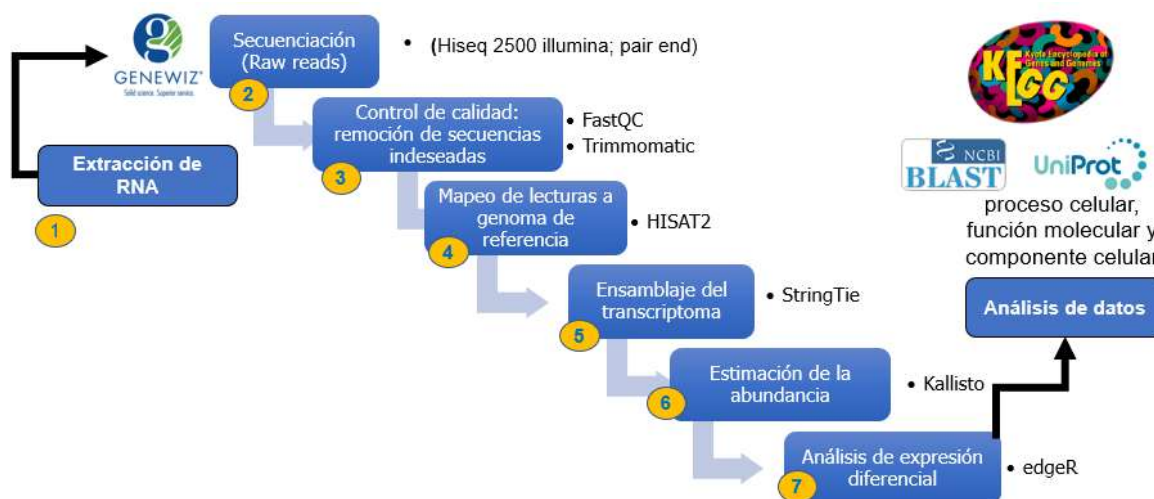


Figura 6. Estrategia bioinformática para el análisis de datos transcriptómicos.

6.3.2 Preprocesamientos bioinformático de datos

Los análisis bioinformáticos se realizaron en terminal mediante el acceso al nodo233 del servidor de Transcriptómica del CIBNOR. Se verificó la calidad de la secuenciación de las lecturas crudas ("Raw reads") utilizando el programa *FastQC v0.11.7* (Andrews *et al.*, 2010). La depuración de adaptadores y filtrado de lecturas de mala calidad ($Q > 30$) fueron procesadas mediante el programa *trimmomatic v0.38* (Bolger *et al.*, 2014). El mapeo de las lecturas se realizó mediante el programa *HISAT2 v2.1* (Kim *et al.*, 2015), usando el genoma de referencia de *Penaeus vannamei* (clave NCBI: GCF_003789085.1). El ensamble del transcriptoma se realizó mediante el programa *StringTie v1.3.4* siguiendo el protocolo de Pertea *et al.*, (2016).

6.3.3 Análisis exploratorio de datos

Con la finalidad de explorar las relaciones entre las réplicas biológicas dentro de los tratamientos, se realizó un análisis de componentes principales, seguidos de un análisis de correlación por distancias.

6.3.4 Identificación de genes expresados diferencialmente

Para determinar el nivel de expresión de los genes expresados diferencialmente en los tratamientos, se realizó lo siguiente. Primeramente, se cuantificó la abundancia génica mediante *Kallisto v0.45* (Bray *et al.*, 2016). El análisis de expresión diferencial fue realizado mediante *edgeR* (Robinson *et al.*, 2010). Para el análisis de expresión se seleccionó aquellos transcritos que únicamente presentaron valores superiores de 1 CPM (conteos por millón) y se consideró como genes diferencialmente expresados aquellos con un valor-*P* ajustado (basado en el modelo FDR de Benjamini & Hochberg, 1995) inferiores a 0.05 y un valor logFC (*fold change FC*) superior a 2. El valor-*P* ajustado o FDR < 0.05 sugiere que la proporción de falsos positivos de los genes expresados diferencialmente es del 5%.

6.3.5 Anotación del transcriptoma

Con el fin de determinar la anotación funcional, se realizó un alineamiento de secuencias expresadas diferencialmente basado en homologías mediante *BLASTX* (valor $E < 1e^{-5}$) respecto a proteínas predichas en el genoma de *Penaeus vannamei* de NCBI y Uniprot (Clave: UP000283509).

6.3.6 Análisis de términos ontológico

Se realizó la categorización funcional de los genes expresados diferencialmente basados en términos ontológicos (GO) mediante el programa Blast2GO de OmicsBox v1.3 (Gotz *et al.*, 2008) y mediante una comparación de secuencias de aminoácidos de la base de datos de la Enciclopedia de Genes y Genomas de Kyoto (KEGG) utilizando la herramienta web *blastKOALA* (Kanehisa *et al.*, 2016).

6.4 Efecto de toxicidad aguda de Argovit-4® en alimento a distintas concentraciones

6.4.1 Obtención de juveniles de camarón

Los camarones experimentales fueron obtenidos de una granja comercial en Guasave, Sinaloa, México. Fueron transportados a las instalaciones del departamento de Acuicultura del CIIDIR-Sinaloa en tinacos y colocados en tinas con 500 L de agua marina y aireación constante. Una vez aclimatados, 10 organismos fueron tomados al azar para confirmar la ausencia de WSSV, IHHNV y V_{AHPND}.

6.4.2 Incorporación de Argovit-4® al alimento balanceado

Las AgNPs de Argovit-4® fueron incorporadas al alimento en concentraciones de 10, 100 y 1000 µg/g (µg de AgNPs por gramos de alimento) mediante el método descrito por Gutiérrez-Dagnino *et al.* (2015). El alimento comercial (Camaronina® Purina, 35% de proteína), fue pulverizado en un molino de café. El alimento en polvo se mezcló con las AgNPs a las concentraciones antes mencionadas, y se les agregó agua destilada (~60%) hasta formar una pasta homogénea. Posteriormente, se agregó a cada pasta el 2% de alginato de sodio (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA) como agente aglutinante para la reconstitución del pellet. Finalmente, las tres pastas se pasaron por una jeringa desechable (Millipore®, Merck, Darmstadt, Germany) de 50 mL para obtener los pellets; estos se dejaron secar en el refrigerador a 4°C recubiertos con papel aluminio. El alimento control (sin AgNPs) se preparó sustituyendo las AgNPs por agua destilada. La Figura 7 muestra el proceso para preparar el alimento.



Figura 7. Proceso de adición de AgNPs al alimento para camarón.

6.4.3 Toxicidad aguda de Argovit-4®

Para determinar si las AgNPs en alimento producen efectos de toxicidad en juveniles camarón, se realizó un bioensayo con tres grupos de camarones experimentales y un grupo control. Los tres grupos experimentales fueron alimentados con 10, 100 y 1000 µg de AgNPs/g de alimento respectivamente. El grupo control fue tratado con alimento sin AgNPs. El diseño experimental se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6. Toxicidad aguda de Argovit-4® vía intramuscular en camarón

Grupo	Tratamientos	Alimentación (% biomasa)	Raciones	Org/réplica	Réplicas
1	10 µg de AgNPs/g	4	2	10	3
2	100 µg de AgNPs/g				
3	1000 µg de AgNPs/g				
C (-)	Alimento sin AgNPs				

Durante el experimento, los camarones fueron colocados en acuarios con 25 L de agua marina (30 UPS; 27°C) y se alimentaron diariamente en relación al 4% de su peso corporal dividido en dos raciones (8:00 AM y 18:00 PM). El experimento tuvo una duración de 8 días (192 h) y durante este proceso todo el alimento no consumido junto con el material fecal fue removido cada 48 h por sifoneo con intercambios de agua del 50%. Asimismo, se registró la mortalidad cada 12 horas. Al final del ensayo se determinó la supervivencia.

6.5 Efecto antiviral de Argovit-4® en una dosis alimenticia ante WSSV

6.5.1 Preparación del inoculo infeccioso

De manera natural, el virus se propaga horizontalmente entre los camarones cultivados, cuando un camarón enfermo es canibalizado por los camarones sanos. En este sentido, con la finalidad de emular la propagación horizontal del virus WSSV, se realizó lo siguiente. Primeramente, se prepararon 31 SID_{50} contenidos en 100 μ L del inóculo viral obtenido del apartado 6.2.1 y se inocularon en la parte dorso-ventral entre el tercer y cuarto segmento abdominal. En el momento en que los camarones mostraron signos graves de la enfermedad (letargia, falta de apetito, coloración canela por expansión de cromatóforos o moribundo) fueron colectados y almacenados a -70°C hasta obtener el 100% de infectados. Una vez infectados todos los organismos, se les retiró cefalotórax, pleópodos y el exoesqueleto, obteniendo únicamente el tejido muscular, el cual se pesó y se homogenizó con agua marina (30 UPS) en un procesador de alimentos para obtener fragmentos pequeños (~ 1 mm) y así, minimizar la competencia del tejido infectado entre los camarones del experimento. Una vez obtenido el tejido macerado, se procedió inmediatamente a realizar el ensayo reto. La Figura 8 muestra el proceso de obtención del tejido infectado para infectar juveniles de camarón por vía oral.

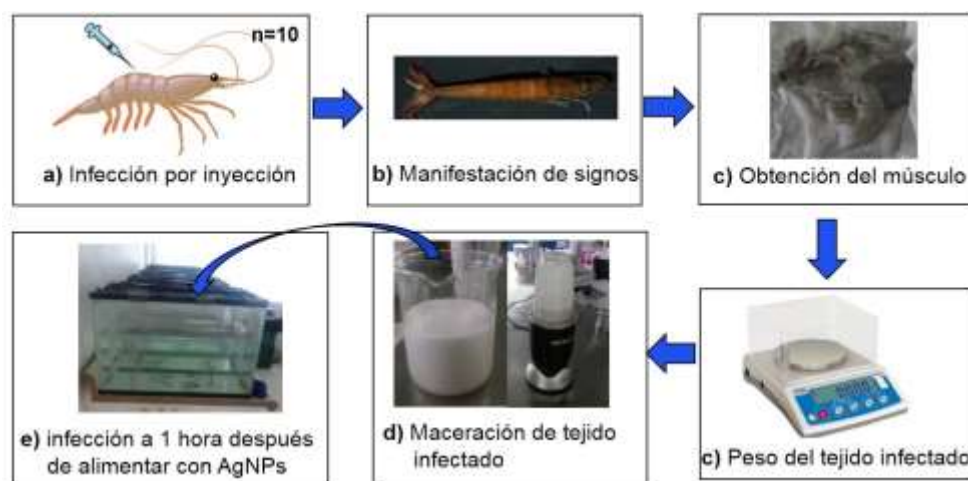


Figura 8. Proceso de obtención del tejido infectado para infectar juveniles por vía oral.

6.5.2 Diseño experimental

El diseño experimental fue completamente al azar y se realizó por triplicado (n= 30 organismos por tratamiento; 10 organismos por réplica), este consistió en 3 grupos experimentales y 2 grupos control. En los grupos experimentales, los camarones fueron alimentados con 10, 100 y 1000 μg de AgNPs (Argovit-4[®])/g de alimento, respectivamente. La alimentación de Argovit-4[®] fue ajustado acorde al 4% del peso corporal de los especímenes experimentales y dividida en 2 raciones previo al reto. Después de 1 hora de la alimentación, se realizó la infección con el tejido infectado, suministrándose en promedio 200 mg de tejido macerado por organismo experimental. Por otra parte, en el grupo control positivo, los camarones se alimentaron con alimento comercial y posteriormente se infectaron con 200 mg de tejido infectado, mientras que, en el grupo control negativo, solamente se alimentaron con alimento comercial. El diseño experimental se describe en la Tabla 7.

Tabla 7. Actividad antiviral de AgNPs *per os* en juveniles de camarón contra WSSV

Grupo	Tratamiento	Raciones	Infección WSSV	Tejido WSSV/camarón	Réplicas
1	10 μg de AgNPs/g	2	Si	200 mg	3
2	100 μg de AgNPs/g	2	Si	200 mg	3
3	1000 μg de AgNPs/g	2	Si	200 mg	3
C (+)	Alimento comercial	2	Si	200 mg	3
C (-)	Alimento comercial	2	No	No	3

Después de la infección, los camarones fueron alimentados con alimento comercial dos veces al día con el 4% de su peso corporal como tasa de alimentación diaria. El experimento se condujo en acuarios de vidrio con 25 L de agua marina filtrada a una salinidad de 30 UPS con aireación constante a $27 \pm 1^\circ\text{C}$. El bioensayo tuvo una duración de 192 horas post-infección. La mortalidad y signos clínicos se registraron cada 12 horas. Durante su transcurso se realizaron sifoneos cada 2 días en todos los tratamientos, seguidos de recambios de agua del 50%.

6.6 Capacidad inmunoestimulante de Argovit-4[®] incorporado en alimento

6.6.1 Toma de muestra

Para este experimento se utilizaron los juveniles de camarón del inciso 6.4.1. El experimento consistió en 2 grupos experimentales (n=20 camarones por grupo). En el grupo 1, los camarones fueron alimentados con Argovit-4[®] suplementado en alimento a una concentración de 1000 µg AgNPs (Argovit-4[®])/g alimento, mientras que, el grupo 2, los camarones fueron alimentados con el alimento control (alimento sin Argovit-4[®]). Los grupos experimentales fueron alimentados dos veces al día acorde al 4% de su peso corporal previo a la toma de muestras.

Se tomaron muestras de hemolinfa por triplicado de cada tratamiento a las 0, 6, 12, 24 y 48 h post-alimentación. Las muestras de hemolinfa fueron colectadas del seno ventral en la base del primer segmento abdominal, usando una jeringa de 1 mL cargada con 50 µL de oxalato de potasio al 5% en PBS 1X como anticoagulante (Apún-Molina *et al.*, 2017). Las muestras de hemolinfa fueron centrifugadas a 800 x *g* por 10 min a 4°C. El plasma (sobrenadante) se eliminó por decantación. Posteriormente, el paquete celular fue lavado con 250 µL de anticoagulante frío y centrifugado nuevamente a 800 x *g* por 10 min a 4°C. Se retiró el sobrenadante y se añadieron 200 µL de Trizol *Reagent*[®] e inmediatamente, las muestras fueron almacenadas a -70°C hasta su procesamiento.

6.6.2 Extracción de ARN total y síntesis de ADNc

La extracción del ARN total se realizó de acuerdo al protocolo de Trizol *Reagent*[®] siguiendo las recomendaciones del fabricante. La concentración y pureza del ARN total fue obtenida en un NanoDrop 2000 (*ThermoFisher scientific*[®]). Posteriormente, el ARN obtenido fue tratado con ADNasa I (1 U/µL; Sigma-Aldrich[®]). La síntesis de ADN complementario (ADNc) se realizó a partir de 500 ng de ARN total usando el kit de transcriptasa reversa [Improm II (Promega[®])] con oligo

dT₂₀ en volumen final de 20 μ L. El ADNc obtenido fue diluido con 80 μ L de agua ultra pura y almacenado a -70°C hasta su análisis.

6.6.3 Perfil de expresión de genes asociados con el sistema inmune

Se evaluó la expresión relativa de cinco genes relacionados con el sistema inmune de los camarones y un gen de referencia (Peneidina-4, Crustina, proPO, Rab6, PAP y β -actina) utilizando RT-qPCR. Se preparó un mastermix a 2X de concentración que contenía: (1.5 μ L de buffer de reacción 10X, 0.75 μ L de 50 mM MgCl₂, 0.3 μ L de 10 mM dNTPs, 0.75 μ L de EvaGreen® 20X [Biotium, Hayward, CA, USA], 0.1 μ L de ADN Polimerasa de la marca GoTaq® Flexi [PROMEGA, Madison, WI, USA] y 4.1 μ L de agua ultra pura). Los oligonucleótidos utilizados están descritos en la Tabla 8.

Tabla 8. Oligonucleótidos utilizados para determinar capacidad inmunoestimulante

Genes	Secuencias de los oligonucleótidos (5'-3')	Producto (pb)	Referencias
proPO	Fw: CTGGGCCCCGGAACTCAAG Rv: GGTGAGCATGAAGAAGAGCTGGA	125	Soto-Alcalá <i>et al.</i> , 2018
Pen4	Fw: GCCCCGTACCCAAACCATC Rv: CCGTATCTGAAGCAGCAAAGTC	106	Wang <i>et al.</i> , 2010
PAP	Fw: CGAAGTTCAGGTTGTGCGTG Rv: ACTGATGCACCATTGGCCTT	126	Soto-Alcalá <i>et al.</i> , 2018
Rab6	Fw: GTTCCGCAGCCTTATTCCCT Rv: ATCACTGCCTCGCTCTGTTC	133	Soto-Alcalá <i>et al.</i> , 2018
Crustin	Fw: GAGGGTCAAGCCTACTGCTG Rv: ACTTATCGAGGCCAGCACAC	157	Wang <i>et al.</i> , 2010
β -Actin	Fw: CCACGAGACCACCTACAAC Rv: AGCGAGGGCAGTGATTC	142	Wang <i>et al.</i> , 2007

La amplificación fue realizada por duplicado en una placa con 96 pozos en un volumen de reacción que contenía 7.5 μ L de PCR Master Mix 2X, 0.35 μ L de cada primer (10 μ M, Sigma-Aldrich®), 1.8 μ L de agua ultra pura y 5 μ L de ADNc para alcanzar un volumen total de 15 μ L. Las condiciones amplificación se describen en la Tabla 9.

Tabla 9. Condiciones de amplificación de genes asociados con el sistema inmune del camarón.

Pasos	Temperatura/tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C/3 minutos	1
Desnaturalización	95°C/10 segundos	
Alineamiento	60°C/20 segundos	40
Extensión	72°C/30 segundos	
Lectura de fluorescencia (umbral de fluorescencia)	79°C/5 segundos	
Preservación	25°C/ ∞	1

Después de cada reacción, se registró una curva de disociación de 65 a 90°C en incrementos de 0.5°C para examinar productos únicos y específicos. La eficiencia (E) de la reacción de PCR de cada gen fue determinada calculando una pendiente con 5 diluciones seriadas (factor de dilución = 5) de un pool representativo de ADNc mediante la siguiente ecuación.

$$\text{Eficiencia (\%)} = \left(\frac{-1}{10^{\text{pendiente}}} - 1 \right) \times 100 \quad (3)$$

La expresión relativa de cada gen fue calculada con la ecuación de Pfaffl, utilizando como gen de referencia a β -actina (Pfaffl *et al.*, 2001). La expresión relativa fue calculada mediante la ecuación:

$$\text{Radio} = \frac{(E_{\text{target}})\Delta Cq^{\text{target (control-muestra)}}}{(E_{\text{ref}})\Delta Cq^{\text{ref (control-muestra)}}} \quad (4)$$

Donde:

E target = Eficiencia de amplificación del gen de interés;

E ref = Eficiencia de amplificación del gen de referencia;

Cq = punto de cruce de un nivel umbral designado;

$\Delta Cq^{\text{target (control-muestra)}}$ = corresponde al *Cq* de la eficiencia de amplificación en control menos el *Cq* del gen de interés en la muestra;

$\Delta Cq^{\text{ref (control-muestra)}}$ = corresponde al *Cq* de la eficiencia de amplificación en control menos el *Cq* del gen de referencia en la muestra.

6.7 Efecto de la toxicidad crónica de AgNPs incluidas en la alimentación por intervalos de tiempo

6.7.1 Organismos experimentales

Los juveniles que se utilizaron para este bioensayo fueron donados por el Dr. Apún-Molina del CIIDIR-Unidad Guasave y fueron aclimatados a las mismas condiciones descritas anteriormente del inciso 6.4.1.

6.7.2 Diseño experimental

El diseño experimental consistió en tres grupos experimentales y un grupo control por triplicado (n=20 organismos por réplica). Los grupos 1, 2 y 3 fueron tratados con Argovit-4[®] incorporado en alimento una vez; al día, cada 4 días y cada 7 días respectivamente. El grupo control consistió en alimentar los camarones con alimento comercial (Camaronina[®]). La Tabla 10 resume el diseño experimental.

Tabla 10. Toxicidad aguda de Argovit-4[®] suministrada en el alimento de juveniles de camarón

Grupo	Descripción	µg AgNPs /g alimento
D1	Alimentación diaria con alimento experimental	1000 µg/g
D4	Alimentación cada 4 días con alimento experimental	1000 µg/g
D7	Alimentación cada 7 días con alimento experimental	1000 µg/g
C (-)	Alimento comercial	-----

Los camarones se alimentaron diariamente acorde al 2.5% del peso corporal total, la alimentación fue dividida en dos raciones, siendo la primera ración a las 9:00 h y la segunda a las 16:00 h. El grupo de camarones que fueron alimentados de forma diaria con AgNPs, solamente se alimentaron en la primera ración, la segunda fue con alimento comercial (Camaronina[®]). Se realizaron biometrías semanales en los organismos experimentales durante 28 días. El experimento se realizó con 20 organismos por tanque. Los tanques fueron llenados con 150 L de agua marina filtrada a una salinidad de 25 UPS, manejando fotoperiodos de 12:12 (horas luz – oscuridad) y una temperatura oscilante de 23 ± 2°C.

6.7.3 Rendimiento productivo

El rendimiento productivo fue medido acorde a parámetros zootécnicos de porcentaje de supervivencia, factor de conversión alimenticia (FCA), tasa de crecimiento específico (CES) y ganancia en peso (PG) mediante las siguientes formulas:

$$\text{Supervivencia (S\%)} = \left(\frac{\text{Número de organismos totales}}{\text{Número de organismos iniciales}} \right) \times 100 \quad (5)$$

$$\text{Factor de conversión alimenticia (FCA)} = \left(\frac{\text{Alimento proporcionado (g)}}{\text{Peso ganado}} \right) \times 100 \quad (6)$$

$$\text{Tasa de crecimiento específico (CES)} = \left[\frac{(\text{In peso final} - \text{In peso inicial})}{\text{Número de días}} \right] \times 100 \quad (7)$$

$$\text{Ganancia en peso (\% GP)} = \left[\frac{(\text{Peso final} - \text{Peso inicial})}{\text{Peso inicial}} \right] \times 100 \quad (8)$$

Al final de este experimento, se sacrificaron distintos organismos distribuidos en los grupos experimentales y control para evaluar la toxicidad crónica mediante cortes histológicos. Así mismo, se tomaron células hemocíticas del camarón para evaluar la capacidad de respuesta ante el virus WSSV mediante dosis subletales cuando son expuestos a alimentación continua y de intervalos de tiempo con Argovit-4[®] incorporado en alimento con respecto al control.

6.7.4 Análisis de la toxicidad crónica mediante histología

Al final del experimento se sacrificaron 3 especímenes por grupo experimental para determinar el efecto de toxicidad crónica de AgNPs. Estos organismos fueron fijados por 48 horas en solución AFA Davidson (12% glicerina; 22% de formaldehído al 37-40% (v/v); 33% de etanol al 96% (v/v); 33% de agua de mar filtrada; 1/9 de ácido acético (v/v) añadido justo antes de su uso) y procesado siguiendo la metodología de Bell y Lightner (1988). Cada organismo fue disectado

para obtener tejido hepatopancreático y branquial, estos tejidos fueron posteriormente deshidratados en serie ascendente de etanol (70% a 100%), luego fueron pasados a baños de xileno para su aclarado. Posteriormente, las muestras fueron sumergidas en parafina líquida a 62°C y luego enfriado a 5°C para facilitar su corte. Los cortes histológicos se realizaron en secciones de 4 µm de espesor, utilizando un micrótopo de rotación (*LIECA RM 2025*). Las secciones histológicas fueron montadas en portaobjetos (laminillas) y teñidos con hematoxilina-eosina.

Las laminillas fueron examinadas con un microscopio óptico compuesto (*OLYMPUS BX-41, Cámara NIKON*) a magnificaciones de 20X, 40X y 100X para evaluar el nivel de daño entre los grupos experimentales. Por otra parte, se realizó un análisis cuantitativo, en base al diámetro total de células B en micras, utilizando el programa *Image Pro Plus 6.0*. Por otra parte, el grado de severidad fue determinado acorde al método modificado de Lightner (1996), el cual se basa en un valor numérico en una escala de 0 a 4 dependiendo el daño histológico, donde el valor 0 indica la ausencia de daño y 4 indica el máximo daño (Tabla 11).

Tabla 11. Grado de severidad observado en tejido hepatopancreático

Grado de severidad	Descripción
0	No hay lesiones. No presentan signos de deformación tubular.
1	Daño ligero (lesiones menores del 25% del área). Presencia muy baja de deformación tubular (1-5/organismo). Se observan muy poco desprendimiento celular.
2	Daño moderado (lesiones presentes del 25-50% del área). Se observa la presencia moderada de deformación tubular (6-10/organismo). Presencia de hemocitos y formación de nódulos hemocíticos.
3	Daño alto (lesiones presentes del 50-75% del área). Se observa la presencia alta de deformación tubular (11-20/organismo). Se observan lesiones moderadas a severas, como melanización, desprendimiento celular, atrofia tubular y formación de nódulos hemocíticos.
4	Daño severo (lesiones mayores 75% del área). Se observa gran cantidad de túbulos deformes (más de 20/organismo). Se observan severas lesiones como melanización, necrosis, atrofia tubular, túbulos vacíos, formación de nódulos hemolíticos y presencia de granulomas.

Cabe mencionar que el grado de severidad es una medida semicuantitativa, ya que está sujeto a variaciones, que dependen de la agudeza visual del evaluador. Para determinar las diferencias significativas de los grados de severidad entre los grupos experimentales, se realizó un análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis ($P < 0.05$), teniendo como variables de respuesta: delaminación de los túbulos, atrofia, infiltración hemocítica.

6.8 Respuesta antiviral en camarones sobrevivientes a toxicidad crónica mediante infecciones experimentales de WSSV

6.8.1 Efecto protector de la alimentación crónica de AgNPs ante WSSV

6.8.1.1 Preparación del inocular viral

Se infectaron intramuscularmente un lote de camarones ($n=15$ organismos) de 10 ± 2 g con 32 SID_{50} en 100 μ L de PBS 1X. Los organismos con claros signos clínicos fueron separados individualmente y se almacenaron a -70°C hasta obtener todos los organismos infectados.

6.8.1.2 Diseño experimental del reto infeccioso

Los organismos provenientes del bioensayo de alimentación de 28 días fueron puestos en acuarios de vidrio con 25 L de agua marina a 25 UPS, aclimatándose a 27°C por 24 horas previo al bioensayo. El diseño experimental se describe en la Tabla 12. Previo al reto infeccioso, los organismos fueron sometidos a ayuno por 12 h, después los organismos fueron infectados con 500 mg tejido infectado por organismo directamente al acuario. El bioensayo tuvo una duración de 252 h y cada 12 h se registró la mortalidad y signos clínicos.

Tabla 12. Evaluación del efecto protector de la alimentación crónica de AgNPs ante WSSV

Grupo	Tratamiento	Infección WSSV	Tejido infectado (mg/camarón)
1	D1 ¹	Si	500 mg
2	D4 ²	Si	500 mg
3	D7 ³	Si	500 mg
Control (+)	Alimento comercial	Si	500 mg
Control (-)	Alimento comercial	No	NO

D1¹: Alimentación diaria con 1000 µg de AgNPs/g de alimento.

D4²: Alimentación cada 4 días con 1000 µg de AgNPs/g de alimento.

D7³: Alimentación cada 7 días con 1000 µg de AgNPs/g de alimento.

6.8.2 Respuesta inmune de los camarones sobrevivientes ante WSSV

Para medir la capacidad de respuesta inmune de los camarones alimentados con AgNPs ante WSSV, se tomaron 3 organismos por replica de cada tratamiento (n= 9 organismos por tratamiento) y se transfirieron a acuarios de vidrio con 20 litros de agua marina a 27°C y aireación constante, los cuales se mantuvieron a estas condiciones por 2 horas para su aclimatación. Posteriormente, se infectaron intramuscularmente con una dosis infecciosa (1 SID₅₀) para ver la respuesta transcripcional de genes asociados al sistema inmune ante WSSV. Después de la inyección, inmediatamente se tomaron muestras de hemolinfa a las 0, 6 y 12 h. Las muestras de hemolinfa fueron colectadas a partir del seno ventral en la base del primer segmento abdominal, usando una jeringa de 1 mL enjuagada con oxalato de potasio al 5% en solución isotónica (850 mOsm/kg), como anticoagulante (Apún-Molina *et al.*, 2017). Las muestras de hemocitos fueron colectadas siguiendo el mismo protocolo del apartado 6.7.1.

6.8.2.1 Extracción de ARN total y síntesis de ADNc

A partir de la obtención de hemocitos del apartado anterior, se extrajo ARN total de acuerdo al protocolo de Trizol *Reagent*[®] siguiendo las recomendaciones del fabricante. La concentración y calidad del ARN total fue obtenida en un NanoDrop 2000 (*ThermoFisher scientific*[®]). El ARN obtenido fue tratado con ADNasa I (1 U/µL; Sigma-Aldrich[®]) para eliminar los restos de ADN. La síntesis de ADNc se realizó a partir de 500 ng de ARN total usando el método de la transcriptasa

reversa de Improm II (Promega®) con oligo dT₂₀. El ADNc obtenido fue diluido con 110 µL de agua ultra pura y almacenado a -70°C hasta su análisis.

6.8.2.2 Perfil de expresión de genes

Se utilizarán cinco microlitros (5 µL) de cada dilución de ADNc para determinar los perfiles de expresión de genes del sistema inmune como: proPO (profenol oxidasa), Pen3 (peneidina 3), Crustin (Crustina) PAP; proteína activadores de la fagocitosis) y CTL3; lectina-3 de tipo C en cada reacción de RT-qPCR. La actividad del gen β-actina se utilizó como gen de referencia. Los conjuntos de los oligonucleótidos específicos y sus respectivas secuencias para esta investigación se describen en la Tabla 13. La expresión relativa de cada gen fue calculada con la ecuación de Pfaffl (Pfaffl *et al.*, 2001), utilizando como gen de referencia a β-actina.

Tabla 13. Oligonucleótidos utilizados para determinar la respuesta antiviral de camarones alimentados con AgNPs por frecuencias alimenticias ante WSSV

Genes	Secuencias de los oligonucleótidos (5´-3´)	Producto (pb)	Referencias
proPO	Fw: CTGGGCCCGGGA ACTCAAG Rv: GGTGAGCATGAAGAAGAGCTGGA	125	Soto-Alcalá <i>et al.</i> , 2018
Pen4	Fw: GCCCGTTACCCAAACCATC Rv: CCGTATCTGAAGCAGCAAAGTC	106	Wang <i>et al.</i> , 2010
Pen3	Fw: CACCCTTCGTGAGACCTTTG Rv: AATATCCCTTCCACGTGAC	141	Wang <i>et al.</i> , 2010
PAP	Fw: CGAAGTTCAGGTTGTGCGTG Rv: ACTGATGCACCATTGGCCTT	126	Soto-Alcalá <i>et al.</i> , 2018
CTL3	Fw: ATGTTCTTCGTGCTCCTGCTGT Rv: GCAGTGGTCGTAAATGTTGTG	120	Li <i>et al.</i> , 2014
Crustin	Fw: GAGGGTCAAGCCTACTGCTG Rv: ACTTATCGAGGCCAGCACAC	157	Wang <i>et al.</i> , 2010
β-Actin	Fw: CCACGAGACCACCTACAAC Rv: AGCGAGGGCAGTGATTTT	142	Wang <i>et al.</i> , 2007

6.9 Análisis estadísticos

Previo al análisis estadístico, los datos de supervivencia en porcentaje y niveles de expresión génica fueron ajustados a una distribución normal mediante la función arcoseno $\sqrt{\%/100}$ y mediante la función log₁₀ (logaritmo base 10), respectivamente. Posteriormente se determinó

normalidad y homogeneidad de varianzas mediante las pruebas de Shapiro-Wilks (1965) y Levene (1960), respectivamente.

Para determinar diferencias significativas entre las medias de supervivencia de los diferentes tratamientos, se utilizó el análisis estadístico ANDEVA, seguido por la prueba de Tukey. Asimismo, para aquellas variables que no cumplieron el requisito de normalidad u homogeneidad de varianzas, se empleó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, seguida de Dunn. Las diferencias entre medias se consideraron significativamente diferentes cuando el valor $P < 0.05$.

Por otra parte, para determinar diferencias significativas entre las medias de los niveles de expresión, se utilizó el análisis estadístico de T-student. Las diferencias entre medias se consideraron significativamente diferentes cuando el valor $P < 0.05$.

7. RESULTADOS

7.1 Efecto de la toxicidad aguda de AgNPs inyectado en camarón

Los resultados revelaron supervivencias del 93%, 97% y 97% para los grupos tratados con 50 ng/g de Argovit-3[®], Argovit-4[®] y Argovit-5[®], respectivamente. Estas mortalidades se observaron durante el proceso de inyección, los cuales permanecieron de inmóviles y después de pocas horas murieron debido al estrés generado por el manejo de la inyección y su etapa de muda, los cuales se encontraban recién mudados. El resto de los grupos experimentales (incluyendo el control) no presentaron mortalidades, tampoco mostraron un comportamiento anormal de natación, coloración atípica de los cromatóforos o falta de apetito durante todo el experimento a dosis de 1000 ng/g. El análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre los cinco tratamientos de Argovit[®] (ANDEVA *bifactorial*; $P= 0.160$), ni en dosis administradas (ANDEVA *bifactorial*; $P= 0.130$), tampoco hay un efecto en la interacción entre ambas variables de respuesta (sinergia entre tratamiento y dosis administradas) que afecte a los organismos ($P= 0.798$). La siguiente tabla agrupa los resultados obtenidos.

Tabla 14. Efecto de AgNPs administrado intramuscularmente en juveniles de camarón

Grupo	Dosis (ng/g)	Supervivencia (%) de las formulaciones administradas				
		Argovit-1 [®]	Argovit-2 [®]	Argovit-3 [®]	Argovit-4 [®]	Argovit-5 [®]
1	50	100 ± 0 ^a	100 ± 0 ^a	93 ± 6 ^a	97 ± 6 ^a	97 ± 6 ^a
2	1000	100 ± 0 ^a	100 ± 0 ^a	100 ± 0 ^a	100 ± 0 ^a	100 ± 0 ^a
PBS	-	100 ± 0 ^a	100 ± 0 ^a	100 ± 0 ^a	100 ± 0 ^a	100 ± 0 ^a

Los valores están representados en promedios ± D.E. (n= 3). Las letras diferentes en las columnas indican diferencias significativas.

7.2 Análisis de la virulencia de WSSV cuando es sometido a distintas concentraciones de AgNPs

7.2.1 Titulación del inóculo viral

De las 4 diluciones aplicadas en los juveniles de camarón, solamente la dilución 10^{-3} (dilución 1:1000) alcanzó el 100% de mortalidad, mientras que la dilución 10^{-6} (dilución 1:1000,000) no causó mortalidad, ni signos visibles de la enfermedad. Por otra parte, la dilución 10^{-4} (dilución

1:10,000) generó un 71% de mortalidad y la dilución 10^{-5} (dilución 1:100,000) causó un 29%. Estos resultados sugieren que la dilución que infecta y causa mortalidades del 50%, se encuentra entre estas dos últimas diluciones. Los resultados de mortalidad se presentan en la Tabla 15.

Tabla 15. Mortalidad obtenida durante la titulación de WSSV en juveniles de camarón

Dilución	Camarones		Muertos acumulados	Vivos acumulados	Total Acumulativo (Muertos + Vivos)	Proporción (Muertos Acum. / Acumulativo)	Mortalidad (%)
	Muertos	Vivos					
10^{-3}	5	0	10	0	10	10/10	100
10^{-4}	3	2	5	2	7	5/7	71
10^{-5}	2	3	2	5	7	2/7	29
10^{-6}	0	5	0	10	10	0/10	0

Aplicando los resultados de mortalidad a la fórmula de Reed y Muench (1938), que permite determinar la distancia proporcional entre diluciones, tenemos lo siguiente:

$$DP = A - B / A - C^{(2)} \quad (9)$$

Donde:

DP= Distancia proporcional

A= corresponde al porcentaje de mortalidad obtenido por encima del 50%;

B= corresponde al 50% de mortalidad;

C= corresponde al porcentaje de mortalidad por debajo del 50%.

$$DP = (71 - 50) / (71 - 29) = 0.5 \quad (10)$$

Los resultados mostraron que, la distancia proporcional entre la dilución 10^{-4} y 10^{-5} fue de 0.5, lo que sugiere, que la dilución de $10^{-4.5}$ del extracto viral puede causar al 50% de juveniles infectados. Para determinar el total de SID_{50} en el extracto viral, se multiplicó $10^{-4.5}$ por el antilogaritmo del factor de dilución (en este caso -1), haciendo que el exponente se convierta en un valor positivo ($10^{4.5}$). Este resultado, indica que por cada 100 μ L del extracto viral (volumen del extracto administrado en camarón) contiene $10^{4.5}$ SID_{50} . Sin embargo, el título viral se expresa por mL y un mililitro contiene diez veces esa proporción, se concluyó que el extracto viral contenía $10^{5.5}$ SID_{50}/mL ($10 \times 10^{4.5}$), es decir 316, 227.78 SID_{50}/mL .

7.2.2 Selección de SID₅₀ mínima de trabajo

Las tres dosis SID₅₀ (dosis infecciosas media para camarón) probadas mostraron 100% de mortalidad a diferentes intervalos de tiempo. El grupo de camarón infectado con 100 SID₅₀ presentó mortalidad después de las 30 horas post-infección con valores alrededor del 3%, alcanzando el 100% de mortalidad a 54 horas post-infección con un tiempo de letalidad media a las 40 h ($TL_{50} = 40$ h). En contraste, el grupo de camarones infectados con 10 SID₅₀ presentó mortalidad después de 36 hpi con valores superiores al 17%, alcanzando el 100% a 60 horas post-infección i con un tiempo de letalidad de 43 h ($TL_{50} = 43$ h). Mientras que, el grupo de camarones infectados con 7 SID₅₀, la mortalidad comenzó a las 36 hpi con valores superiores al 13%, llegando al 100% a las 72 hpi con un tiempo de letalidad media de 45 h ($TL_{50} = 45$ h). El grupo de control (PBS) no mostró mortalidad durante el experimento (Fig. 9). Los resultados revelaron que 7 SID₅₀ es la cantidad mínima capaz de causar un 100% de la infección con signos claros de la enfermedad (falta de apetito, natación errática y coloración atípica).

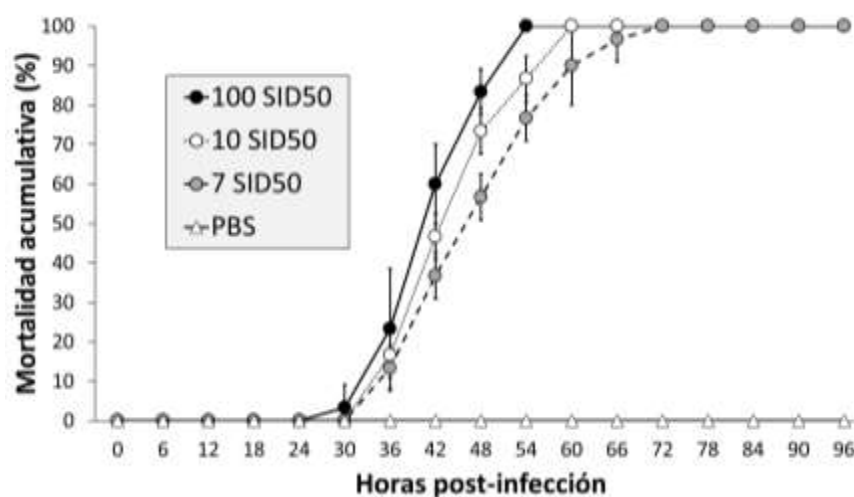


Figura 9. Mortalidad acumulada en camarón infectado con 7, 10, 100 SID₅₀ de WSSV. Los resultados se presentan como media \pm DE.

7.2.3 Análisis de la virulencia de WSSV sometido a AgNPs

El nivel de infectividad o virulencia de WSSV fue medido en relación al nivel de supervivencia (%) de juveniles infectados con este patógeno. El análisis estadístico reveló que la virulencia de WSSV se ve afectado significativamente por las formulaciones de Argovit® (ANDEVA *bifactorial*; $p= 8.18e-08$). Por otra parte, cuando el virus es sometido a las diferentes concentraciones de AgNPs y posteriormente es administrado en juveniles de camarón, se obtuvo que las AgNPs afectan significativamente la virulencia del virus ($P= 2e-16$). Sin embargo, la relación entre la concentración de AgNPs con WSSV y la virulencia de WSSV no están asociados con las formulaciones Argovit® administradas ($P= 0.245$). La mejor formulación que mostró una disminución significativa de la virulencia de WSSV fue Argovit-4® ($P= 0.002$) y esta disminución fue dependiente de la concentración de AgNPs a la que fue expuesto WSSV, obteniendo supervivencia de 10%, 17%, 30% y 50% a 96 horas post-infección comparados con el resto de los grupos experimentales. El grupo control positivo (C+) mostró 100% de mortalidad a 72 horas post-infección (hpi), mientras que el grupo del control negativo no mostró mortalidad (Tabla 16).

Tabla 16. Mortalidad de AgNPs+WSSV administrado intramuscularmente en camarón

Concentración (ng AgNPs/7SID ₅₀ WS SV)	Supervivencia (%)				
	Argovit-1®	Argovit-2®	Argovit-3®	Argovit-4®	Argovit-5®
40	3 ± 6 ^a	13 ± 6 ^b	3 ± 6 ^{ab}	10 ± 0 ^b	3 ± 6 ^{ab}
100	13 ± 6 ^b	20 ± 10 ^b	10 ± 0 ^b	17 ± 6 ^c	7 ± 6 ^{ab}
200	20 ± 0 ^b	27 ± 6 ^{bc}	17 ± 12 ^c	30 ± 0 ^d	17 ± 12 ^{bc}
1000	43 ± 6 ^c	40 ± 10 ^c	-----	50 ± 0 ^e	30 ± 0 ^c
C+	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
C- (PBS)	100 ± 0 ^d	100 ± 0 ^d	100 ± 0 ^d	100 ± 0 ^f	100 ± 0 ^d

Los valores están representados en promedios ± D.E. (n= 3). Las letras diferentes en las columnas indican diferencias significativas.

7.3 Análisis transcriptómico en branquias de camarón inyectados con AgNPs

7.3.1 Análisis de los datos transcriptómicos

El análisis de componentes principales 2 clusters (agrupaciones) con 79% de variabilidad total de los datos. El componente principal 1 (CP1) mostró un 56% de varianza, señalando que las réplicas del control NegA y NegB, junto con ArgB tienden a agruparse.

Por otra parte, el componente principal 2 (CP2) mostró un 23% de varianza y señala que las réplicas del grupo tratado se encuentran un poco más dispersas (Fig. 10a). Este comportamiento también se observó en la matriz de correlación de distancias y señala que la librería ArgB muestra cierta relación con los controles (NegA y NegB) (Fig. 10b). Sin embargo, es común debido al procesamiento de las muestras en pools y al bajo número de réplicas.

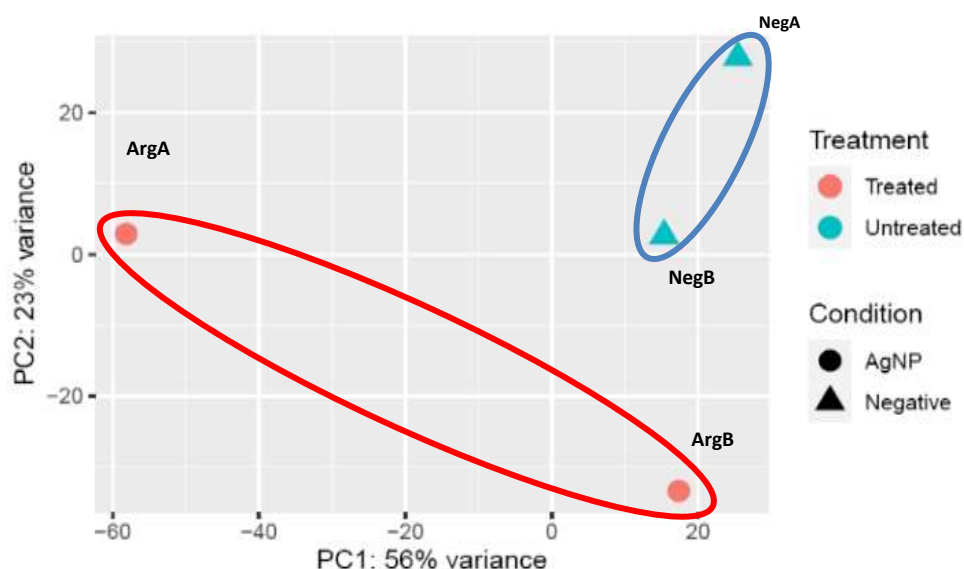


Figura 10. Análisis de componentes principales. El eje Y muestra el porcentaje de variación del componente 2. El eje X muestra el porcentaje del componente 1. El círculo en rojo muestra las librerías construidas a partir de réplicas biológicas provenientes del grupo tratado con AgNPs. El círculo azul muestra las librerías construidas a partir de réplicas biológicas del grupo control.

Tabla 17. Lista de los 20 genes más significativamente regulados al alza

	ID ¹	Gen	logFC ²	logCPM ³	PValue ⁴	FDR ⁵
1	MSTRG.4906.15	LOC113807116	16.07556	7.058602387	2.94E-66	8.05E-62
2	XM_027358296.1	LOC113807116	14.19419	5.179068699	5.75E-43	5.24E-39
3	MSTRG.6812.7	LOC113809991	12.94180	3.930169452	9.07E-24	4.96E-20
4	MSTRG.316.10	LOC113803567	12.83796	3.826622626	2.21E-13	2.63E-10
5	MSTRG.7770.11	LOC113811733	11.99237	2.986364132	1.34E-19	4.59E-16
6	MSTRG.16745.5	LOC113826864	11.99827	2.992468641	7.33E-12	6.82E-09
7	XM_027378235.1	LOC113825408	11.94455	2.938849669	1.14E-18	2.83E-15
8	MSTRG.285.13	LOC113803099	11.58116	2.578996836	5.10E-17	1.07E-13
9	MSTRG.7634.5	LOC113811463	11.12036	2.123605427	2.07E-12	2.02E-09
10	MSTRG.7132.2	LOC113805529	10.95454	1.961628228	8.21E-07	1.76E-04
11	MSTRG.6948.6	LOC113828429	10.93528	1.942701348	9.75E-07	1.99E-04
12	MSTRG.13501.2	LOC113821536	10.91794	1.926011834	3.75E-05	4.34E-03
13	MSTRG.13825.1	LOC113822105	10.80182	1.810152508	2.75E-11	2.28E-08
14	XM_027368153.1	LOC113816127	10.77053	1.779729639	2.68E-14	3.67E-11
15	MSTRG.16915.2	LOC113827159	10.55436	1.567667443	7.48E-12	6.82E-09
16	XM_027379647.1	LOC113826765	10.54099	1.55375137	2.65E-07	7.25E-05
17	MSTRG.9488.2	LOC113814616	10.41820	1.433817716	8.36E-08	2.76E-05
18	XM_027369583.1	LOC113817510	10.19265	1.214995068	9.63E-12	8.50E-09
19	MSTRG.5882.17	LOC113808617	10.16339	1.185453431	1.01E-07	3.10E-05
20	MSTRG.488.3	LOC113805986	10.09538	1.120237272	3.71E-11	2.90E-08

ID¹= identificador de la secuencia,

logFC²= cambio de expresión transformado logarítmicamente,

logCPM³= conteos por millón transformados logarítmicamente,

PValue⁴= Valor P,

FDR⁵= Tasa de descubrimiento falso.

Tabla 18. Lista de los 20 genes más significativamente regulados a la baja

	ID ¹	Gen	logFC ²	logCPM ³	PValue ⁴	FDR ⁵
1	MSTRG.5624.1	LOC113808270	-14.43333638	5.417582365	3.33E-48	4.55E-44
2	MSTRG.16318.7	LOC113826199	-14.16404987	5.148918192	1.48E-05	1.90E-03
3	MSTRG.5624.3	LOC113808270	-13.05476273	4.04203277	3.37E-32	2.30E-28
4	XM_027377941.1	LOC113825148	-12.44957339	3.439422956	8.02E-22	3.65E-18
5	XM_027353288.1	LOC113802681	-12.12917091	3.121309588	5.14E-10	3.43E-07
6	MSTRG.5526.1	NA	-11.80159627	2.794981879	1.80E-08	7.36E-06
7	MSTRG.1186.14	LOC113817599	-11.76747319	2.760974562	3.75E-07	9.59E-05
8	MSTRG.11810.4	LOC113818750	-11.62699218	2.621724183	1.18E-07	3.48E-05
9	MSTRG.5440.18	LOC113807930	-11.52458119	2.520157344	4.48E-07	1.09E-04
10	MSTRG.13576.2	LOC113821648	-11.3955668	2.392295983	1.91E-06	3.49E-04
11	MSTRG.18179.3	LOC113829339	-11.37418652	2.372263139	8.79E-19	2.40E-15
12	MSTRG.15052.3	LOC113823946	-11.32949926	2.32775259	8.78E-13	9.60E-10
13	MSTRG.6852.4	LOC113810030	-11.14783578	2.14871027	7.85E-15	1.43E-11
14	XM_027372826.1	LOC113820488	-11.13220027	5.216320882	1.48E-14	2.25E-11
15	XM_027372827.1	LOC113820488	-11.13220027	5.216320882	1.48E-14	2.25E-11
16	XM_027377944.1	LOC113825148	-10.62761343	1.636398874	2.52E-13	2.87E-10

17	MSTRG.6543.11	LOC113809569	-10.47990133	1.493100849	2.87E-06	4.81E-04
18	MSTRG.12922.3	LOC113820663	-10.34845569	1.361990881	1.85E-09	1.05E-06
19	MSTRG.5440.2	LOC113807930	-10.32319826	1.336845471	6.22E-08	2.20E-05
20	XM_027373195.1	LOC113820821	-10.30314289	1.317413338	1.80E-08	7.36E-06

ID¹= identificador de la secuencia,

logFC²= cambio de expresión transformado logarítmicamente,

logCPM³= conteos por millón transformados logarítmicamente,

PValue⁴= Valor P,

FDR⁵= Tasa de descubrimiento falso.

7.3.2.1 Genes sobre-expresados

El gen más sobre-expresado (FC>2) fue ficolin-1 con un FC > 16, seguido por otra isoforma de ficolin-1; genes para ficolinas, aún no caracterizados funcionalmente. Sin embargo, se ha visto que estas proteínas están involucradas dentro del sistema inmune innato y actúan como moléculas de reconocimiento de patrones conocidas como inmunolectinas (Tabla 19).

Tabla 19. Función de 20 genes más significativamente regulados al alza

	ID_proteína	Proteína	Función
1	XP_027214102.1	Ficolin-1	Función desconocida
2	XP_027214099.1	Ficolin-1	Función desconocida
3	XP_027217475.1	L-lactato deshidrogenasa	Actividad L-lactato deshidrogenasa; Proceso metabólico de carbohidratos; Proceso metabólico de ácido carboxílico
4	XP_027210169.1	Titina	Función desconocida
5	XP_027219325.1	alfa-1,6-manosil-glicoproteína	Actividad alfa-1,6-manosilglicoproteína 2-beta-N-acetilglucosaminiltransferasa; Unión de iones metálicos; glicosilación de proteínas; Proceso biosintético de oligosacáridos.
6	XP_027235563.1	Anexina B10	Unión a iones de calcio; Unión de fosfolípidos dependiente de calcio
7	XP_027234036.1	Subunidad no catalítica de proteína activadora de GTPasa rab3	Actividad activadora de GTPasa; Regulación de la actividad de GTPasa
8	XP_027209655.1	Anhidrasa carbónica-1	Actividad de carbonato deshidratasa; Unión de iones de zinc
9	XP_027219012.1	Anquirina-2	Función desconocida
10	XP_027212332.1	Proteasa de blástula (BP10)	Actividad metaloendopeptidasa; Unión de iones de zinc; Proteólisis
11	XP_027237210.1	Proteína 13 que contiene el dominio CCCH de dedo de zinc	Función desconocida
12	XP_027229841.1	Proteína predicha hipotéticamente	Función desconocida
13	XP_027230431.1	Erbina	Función desconocida
14	XP_027223954.1	Proteína del complejo T11 (TCP11)	Función desconocida
15	XP_027235859.1	Hormona nuclear del receptor FTZ-F1 beta	Actividad del receptor nuclear; Unión de iones de zinc; unión de ADN de secuencia específica;

			Regulación de la transcripción, ADN templado; Vía de señalización del receptor intracelular
16	XP_027235449.1	Pro-resilina	Función desconocida
17	XP_027222469.1	Proteína desconocida	Función desconocida
18	XP_027225384.1	Transportador de monocarboxilato 12	Función desconocida
19	XP_027215877.1	Proteína 2 asociada a microtúbulos de equinodermo	Proteólisis
20	XP_027212878.1	Factor activador de la Profenoloxidasa	Actividad endopeptidasa de tipo serina; Proteólisis

Según el análisis de la ontología, los principales procesos biológicos de los genes sobre-expresados están asociados a proteólisis, fosforilación oxidativa, fosforilación de proteínas, transporte de membrana, transducción de señales, respuesta a estrés oxidativo, glicosilación de proteínas y detoxificación oxidante celular (Fig. 12), en donde las funciones principales se clasificaron para proteínas de unión a iones metálicos, de unión a ATP, proteínas de unión a iones Zinc, constituyentes estructurales de cutícula y proteínas con actividad metalopeptidasa (Fig. 13). La clasificación basada en el componente celular indica que los productos de estos genes son proteínas integrales de membrana, citoplasma, núcleo, membrana y en ambiente extracelular.

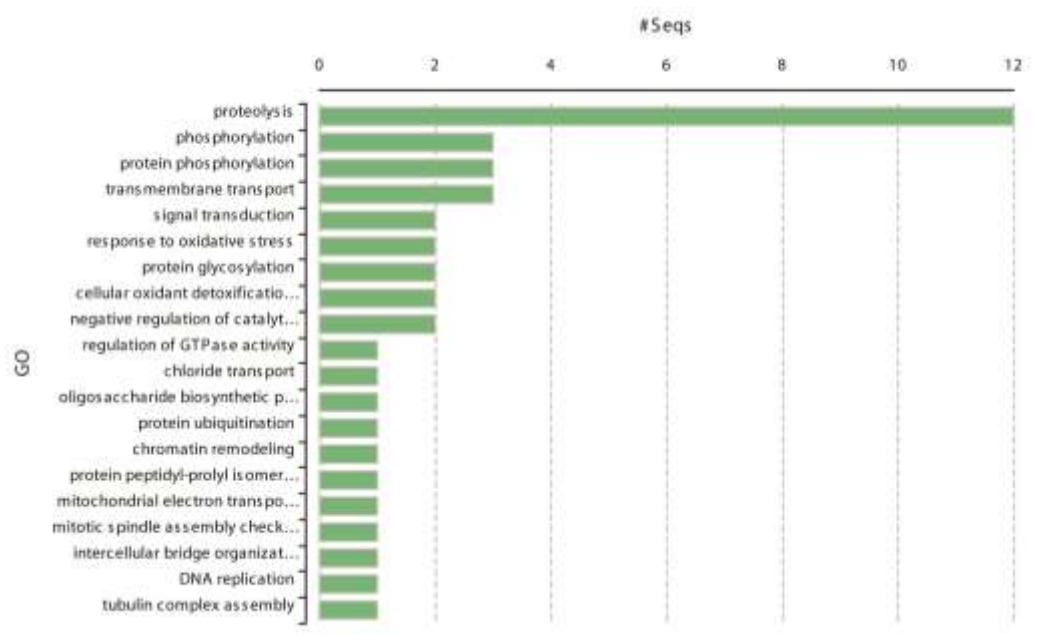


Figura 12. Proceso biológico de genes sobre-expresados

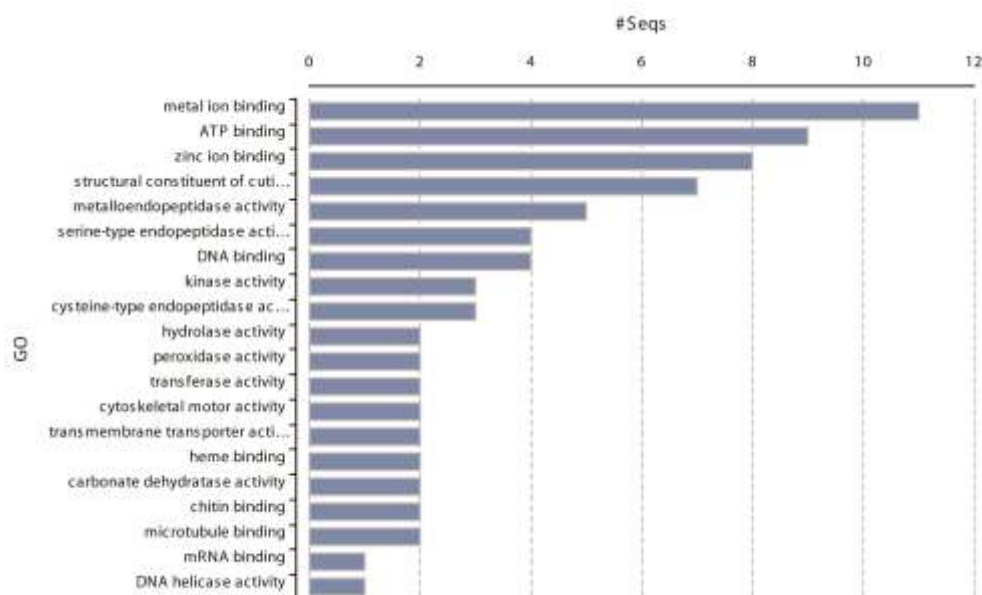


Figura 13. Función molecular de genes sobre-expresados.

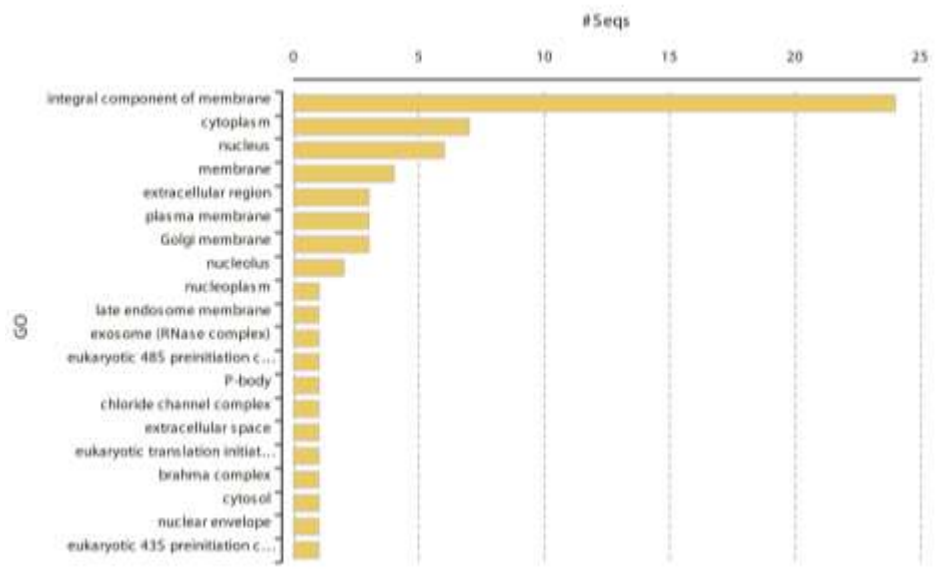


Figura 14. Componente celular de genes sobre-expresados

En el análisis de rutas metabólicas de las 155 secuencias ingresadas en KEGG, se obtuvo un 16.1% de anotación funcional (25 secuencias anotadas)(Fig. 15), de la cual el 6% corresponden a la familia de proteínas asociadas al procesamiento de información genética (ko03000), donde predominan procesos de biogénesis del ARN mensajero (ko03019), tráfico de membranas (ko04131) y sistema de ubiquitina (ko04121), seguido del 2.6% correspondientes a familias de proteínas asociadas a procesos celulares y de señalización, siendo la categoría funcional de

proteínas del citoesqueleto (ko04812), la que presentó un mayor número de genes. También, se encontró un 1.3% correspondiente a familias de proteínas asociadas al metabolismo, siendo la categoría de enzimas (ko01000), la más abundante en cuanto a número de genes, seguido de proteínas quinasas (ko01001), fosfatasa (ko01009) y glucosiltransferasas (ko01003). De igual manera, se encontró un 1.3% de proteínas asociadas a procesamiento de información ambiental, llevándose procesos de transducción de señales para vías de señalización de calcio (K00476) y PI3K-Akt (K06252)

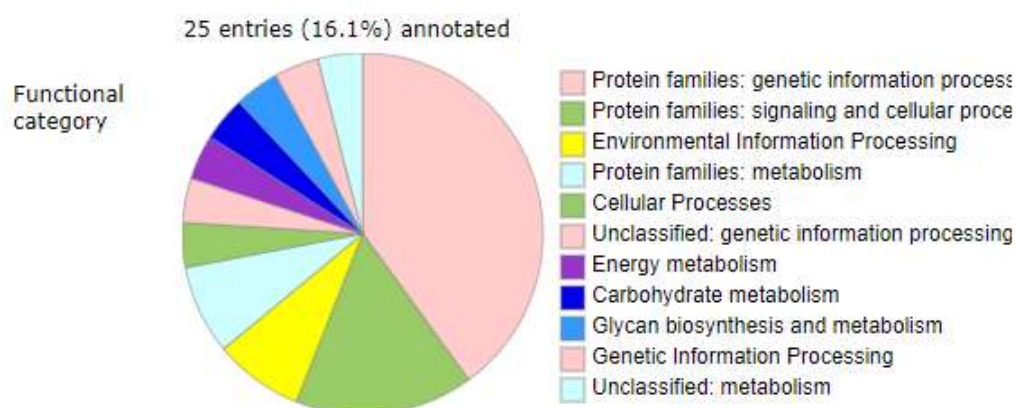


Figura 15. Rutas metabólicas de genes sobre-expresados en camarones tratados intramuscularmente con Argovit-4®

7.3.2.2 Genes sub-expresados

De los 143 genes sub-expresados ($FC < -2$) que se identificaron, el gen que más se sub-expresó fue LOC113808270 codificante para una proteína no caracterizada/hipotética de C7M84_007055 cuya función se desconoce. El segundo gen que más se sub-expresó correspondió a LOC11382619 codificante para la proteína 2 de unión al factor de crecimiento tipo insulina, el cual regula el crecimiento celular (Tabla 20).

Tabla 20. Función de 20 genes más significativamente regulados a la baja

ID proteína	Proteína	Función
1	Sin ID Proteína hipotética de C7M84_007055	Función desconocida
2	XP_027234874.1 proteína 2 de unión al factor de crecimiento tipo insulina	Regulación del crecimiento celular
3	Sin ID Proteína hipotética de C7M84_007055	Función desconocida
4	XP_027233742.1 6-phosphofructo-2kinase/fructose-2,6-bisphosphatase	Proceso metabólico de la fructosa 2,6-bisfosfato; fosforilación de carbohidratos; actividad de 6-fosfofructo-2-kinasa; actividad de la fructosa-2,6-bisfosfate 2-fosfatasa
5	XP_027209089.1 Notch	Vía de señalización Notch; diferenciación celular; regulación del proceso de desarrollo; unión a iones calcio
6	Sin ID Proteína desconocida	Función desconocida
7	XP_027225449.1 Mucina	Secreción de glicoproteínas, adhesión celular y procesos inmunológicos
8	XP_027226742.1 Receptor relacionado con sortilin	Componente integral de membrana
9	XP_027215058.1 Peroxidasa	Respuesta a estrés oxidativo; detoxificación oxidante celular; actividad peroxidasa
10	XP_027229962.1 Katanina	Corte y unión de microtúbulos
11	XP_027238295 Proteína de transmembrana 179	Función desconocida
12	XP_027232479.1 proteína de hemocitos-glutamina gamma-glutamyltransferasa	Entrecruzamiento peptídico; actividad de la proteína-glutamina gamma-glutamyltransferasa; Unión a iones metálicos
13	XP_027217517.1 Proteína no caracterizada	Función desconocida
14	XP_027228627.1 Hornerin	Función desconocida
15	XP_027228627.1 Hornerin	Función desconocida
16	XP_027233745.1 6-phosphofructo-2-kinasa/fructose-2,6- bisfosfatasa	Proceso metabólico de la fructosa; proceso metabólico de la fructosa 2,6-bisfosfato; desfosforilación; fosforilación de carbohidratos; actividad de 6-fosfofructo-2-kinasa; unión a ATP
17	XP_027217000.1 Proteína 1 tipo beta integrina	Función desconocida
18	XP_027228804.1 Proteína homóloga a RER1	Función desconocida
19	XP_027215058.1 Peroxidasa	Respuesta a estrés oxidativo; detoxificación oxidante celular
20	XP_027228996.1 Mucina 17	Secreción de glicoproteínas, adhesión celular y procesos inmunológicos

Según el análisis de la ontología resultante, los principales procesos biológicos de los genes sub-expresados están asociados a procesos de proteólisis, regulación negativa de la actividad endopeptidasa, regulación de actividad catalítica, fosforilación de proteínas, regulación de la transcripción de ADN, fosforilación oxidativa, entre otros (Fig. 16). Siendo principalmente proteínas, de unión a ATP, unión a iones metálicos, de unión a iones Zinc, actividad inhibidora de endopeptidasas tipo serina, de unión a ARN, de unión a hemo y actividad metalopeptidasa

(Fig. 17), estando localizados en el componente integral de membrana, núcleo, región extracelular, citoplasma, membrana y en espacio extracelular (Fig. 18).

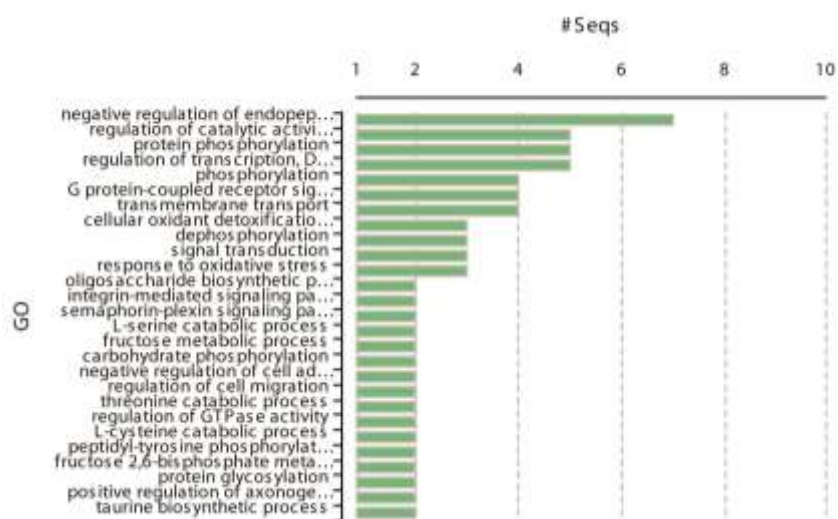


Figura 16. Proceso biológico de genes sub-expresados

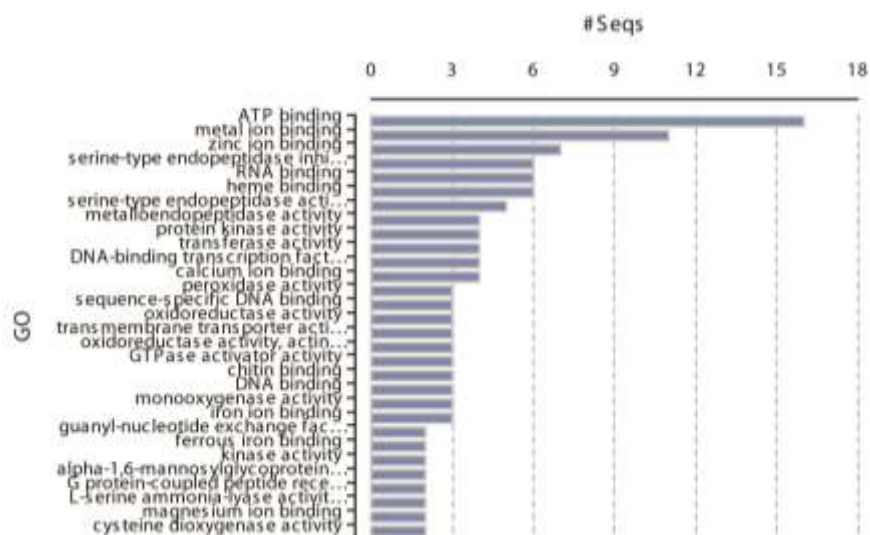


Figura 17. Función molecular de genes sub-expresados

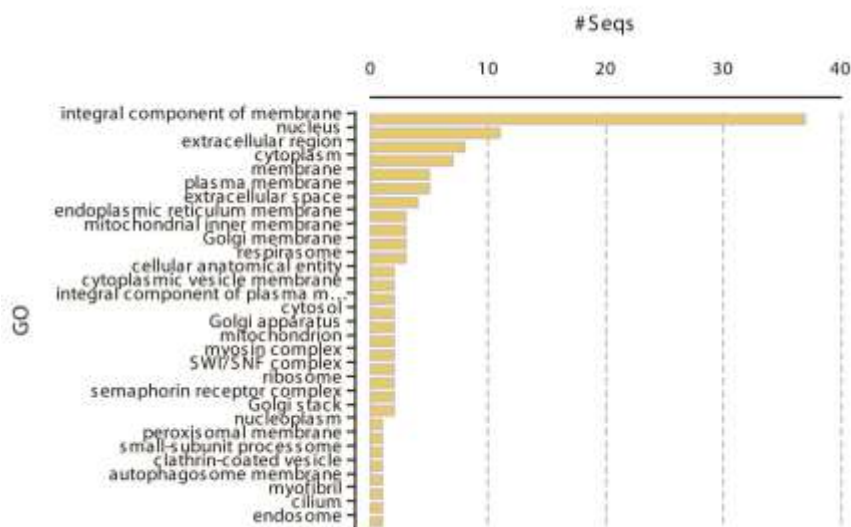


Figura 18. Componente celular de los genes sub-expresados

En el análisis de rutas metabólicas de las 143 secuencias ingresadas en KEGG se obtuvo un 14.1% de anotación funcional (Fig. 19), en donde el 2.82% corresponden a la familia de proteínas presentes en el procesamiento de información genética, predominando los genes codificantes para proteínas asociadas a cromosomas (ko03036), factores de traducción (ko03012) y tráfico de membranas (ko04131), seguido del 2.82% de genes asociados a la categoría de enfermedades humanas (09160), Asimismo, se encontró que el 2.11% de genes involucrados en rutas del metabolismo de carbohidratos (09101), llevándose a cabo rutas metabólicas relacionadas al metabolismo de fructosa y manosa, y metabolismo del butanoato.

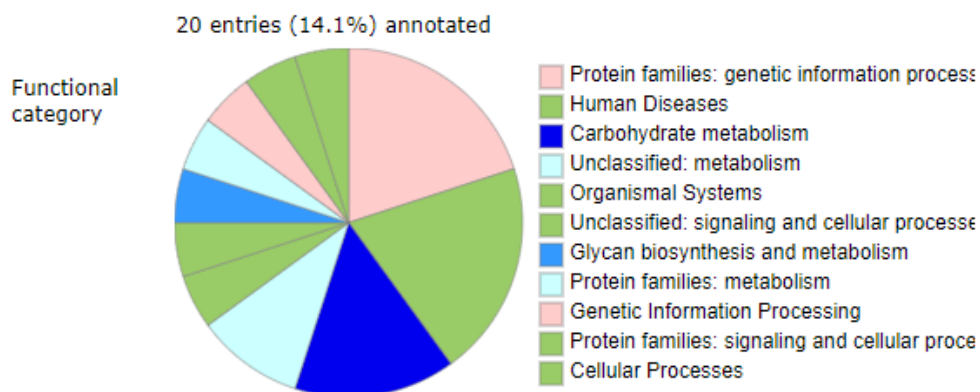


Figura 19. Rutas metabólicas asociadas a genes sub-expresados en camarones expuestos intramuscularmente con Argovit-4®

7.4 Efecto de la toxicidad aguda de Argovit-4® en alimento a distintas concentraciones

Ningunas de las concentraciones de Argovit-4® (10, 100 y 1000 µg de AgNPs/g) suministradas en el alimento de manera continua por 8 días ocasionaron mortalidad en los organismos tratados. Además, no se observaron manifestaciones de comportamiento atípico (evaluado mediante falta de apetito anormal por observación de intestino vacío, letargo, movimientos erráticos o mortalidad) atribuibles a una posible toxicidad (Fig. 20).

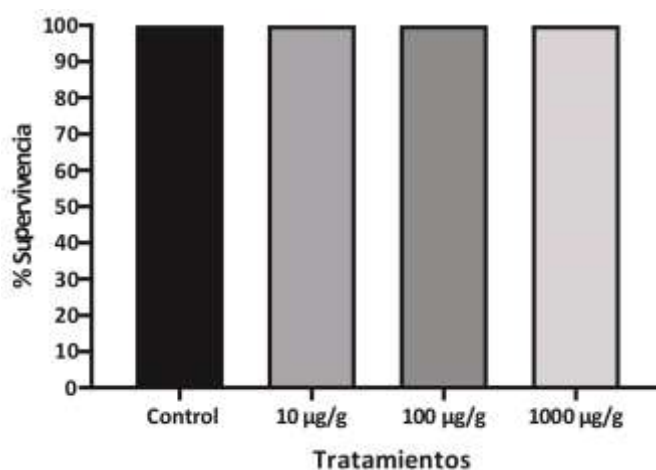


Figura 20. Supervivencia en porcentaje de camarones tratados con alimentos medicados que incluyen distintas concentraciones de AgNPs. El alimento 1 contiene 10 µg de AgNPs/g de alimento. El alimento 2 contiene 100 µg de AgNPs/g de alimento. El alimento 3 contiene 1000 µg de AgNPs/g de alimento.

7.5 Efecto antiviral de Argovit-4® en una dosis alimenticia contra WSSV

Los alimentos suplementados con 10, 100 y 1000 µg de Argovit-4®/g de alimento, fueron administrados a grupos de camarones y posteriormente expuestos al virus por vía oral suministrando tejido muscular de camarones infectados (como se indica arriba). Los resultados mostraron un efecto en la disminución de la mortalidad de manera dosis dependiente, alcanzando supervivencias de 84, 90 y 97 % respectivamente contra 57% en el control sin Argovit-4®. El control negativo no presentó mortalidad (Fig. 21).

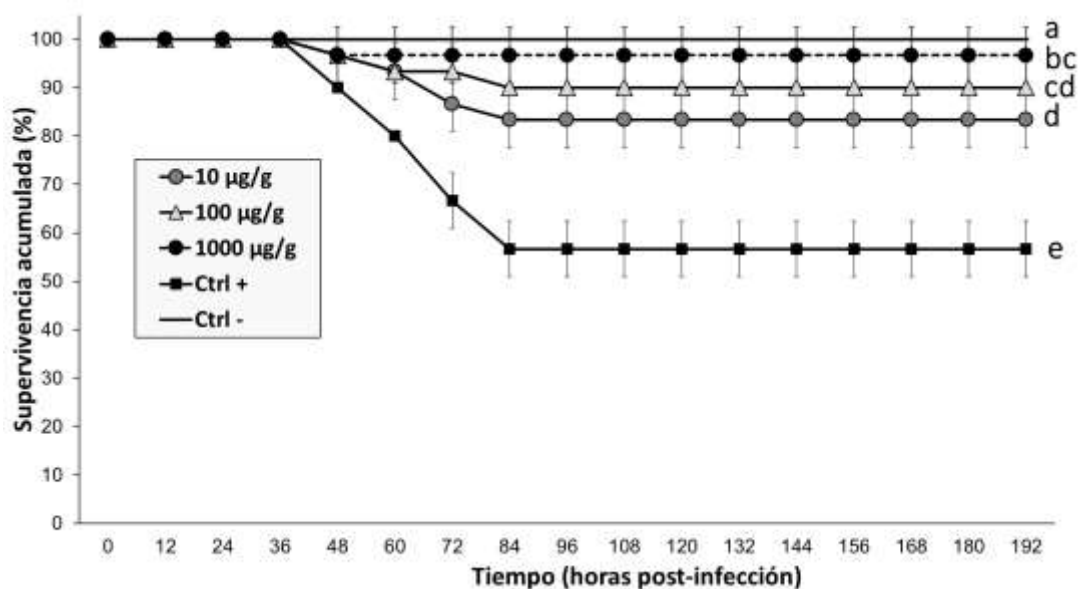


Figura 21. Supervivencia de camarones tratados con distintas concentraciones Argovit-4® en el alimento y retados contra WSSV por vía oral. Los resultados se presentan como media \pm DE. Las letras diferentes en la gráfica indican diferencias significativas entre los tratamientos de acuerdo a un ANDEVA unifactorial ($P \leq 0.05$) y una prueba Tukey.

7.6 Capacidad inmunoestimulante de Argovit-4® incorporado en alimento

Los niveles de expresión del gen *Crustin* no mostraron cambios en las primeras 24 horas del tratamiento, alcanzando el pico más alto a las 48 horas. Sin embargo, no fueron significativos ($P = 0.074$) con respecto al control (Fig. 22a). Mientras que, los niveles de expresión para el gen *PEN4* no mostraron cambios ($P > 0.05$) en las primeras horas del tratamiento con respecto al control (Fig. 22b).

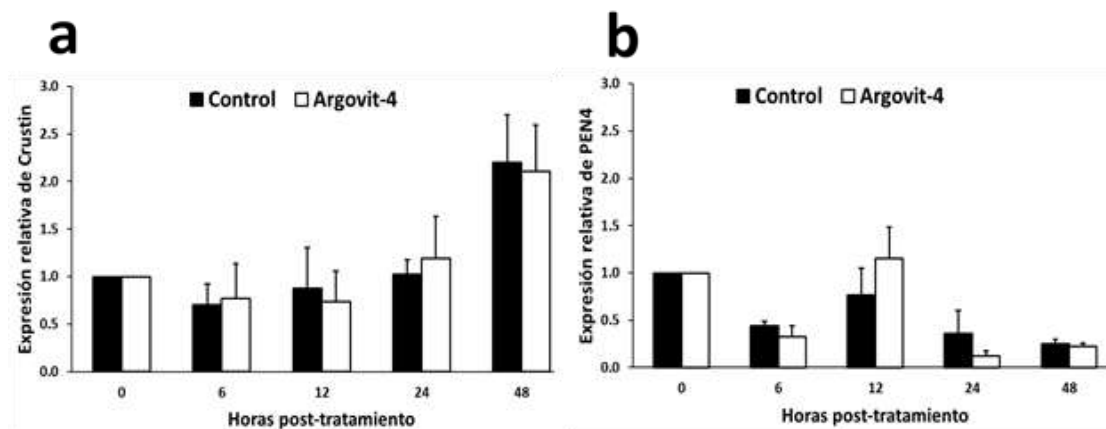


Figura 22. Niveles de expresión de genes asociados a péptidos antimicrobianos en camarones alimentados con 1000 μg de Argovit-4[®]/g. a) gen Crustina y b) gen penaeidina (PEN4). Las barras negras muestran los niveles de expresión génica en hemocitos de los organismos en el control sin Argovit-4[®] y las barras blancas muestran los niveles de expresión génica en los organismos tratados. Los resultados se presentan como media \pm DE. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas entre el control y el tratamiento en cada tiempo, de acuerdo a una prueba de *T-student* ($P \leq 0.05$).

Las AgNPs por sus diferencias de tamaño podrían ser fagocitadas. Por lo tanto, en el presente estudio se evaluaron los niveles de expresión del gen PAP (gen que codifica para la proteína activadora de la fagocitosis) y del gen Rab6 (gen que codifica para la proteína de unión tipo Ras-6, relacionada con la formación de fagosomas). La expresión alcanzó el pico más alto a las 48 horas, pero sin diferencias significativas entre el tratamiento y el control ($P \leq 0.05$) (Fig. 23a y 23b).

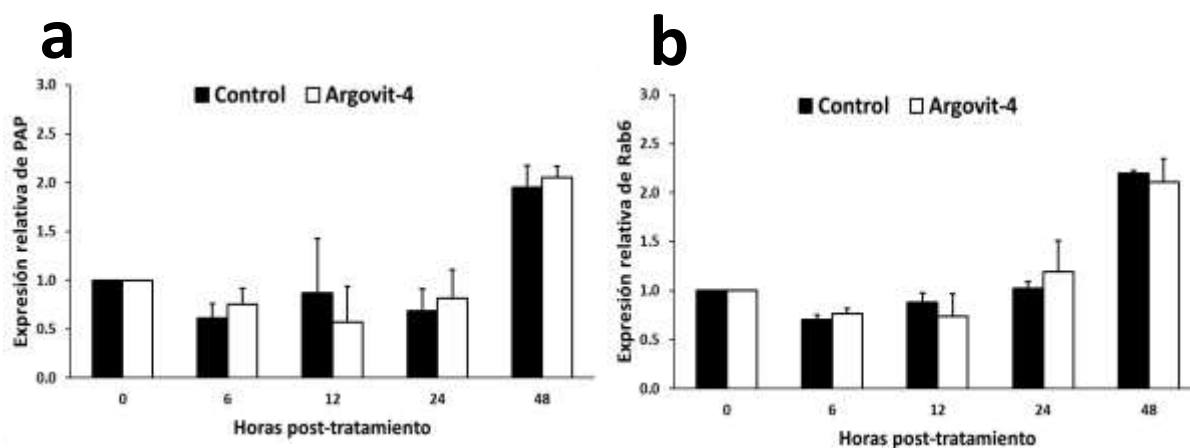


Figura 23. Niveles de expresión de genes asociados a fagocitosis en camarones alimentados con 1000 μg de Argovit-4[®]/g. a) gen PAP y b) gen Rab6. Las barras negras muestran los niveles de expresión génica en hemocitos de los organismos en el control sin Argovit-4[®] y las barras blancas muestran los niveles de expresión génica en los organismos tratados. Los resultados se presentan como media \pm DE. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas entre el control y el tratamiento en cada tiempo, de acuerdo a una prueba de *T-student* ($P \leq 0.05$).

La expresión del gen *proPO*, mostró un descenso significativo a las 48 h en los camarones tratados con AgNPs con respecto al control ($P = 0.024$) (Fig. 24). Estos resultados descartan el efecto inmunoestimulante de Argovit-4[®], y sugiere las AgNPs poder regular de manera negativa la expresión del gen *proPO*.

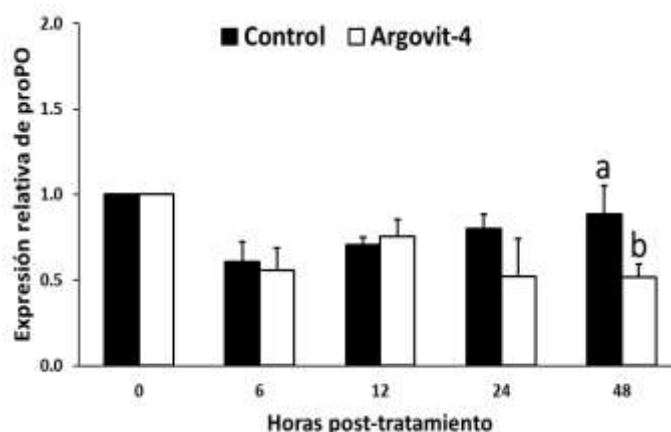


Figura 24. Niveles de expresión del gen asociado al sistema profenoloxidasas en camarones alimentados con 1000 μg de Argovit-4[®]/g. Las barras negras muestran los niveles de expresión génica en hemocitos de los organismos en el control sin Argovit-4[®] y las barras blancas muestran los niveles de expresión génica en los organismos tratados. Los resultados se presentan como media \pm DE. Las letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas entre el control y el tratamiento en cada tiempo, de acuerdo a una prueba de T-student ($P \leq 0.05$).

7.7 Efecto de la toxicidad crónica de AgNPs incluidas en la alimentación por intervalos de tiempo

7.7.1 Variables productivas

Se aplicó una ración de alimento adicionado con 1000 μg de Argovit-4[®]/g de alimento a juveniles de camarón con tres frecuencias [diario (D1), cada 4 días (D4) y cada 7 días (D7)] durante 28 días. El grupo control consistió en camarones alimentados con alimento comercial sin Argovit-4[®].

Los organismos del control presentaron el mayor peso ganado (PG) y menor FCA. Sin embargo, no fue significativamente diferente al resto de los tratamientos ($P_{\text{PG}} = 0.488$; $P_{\text{FCA}} = 0.548$). Por otra parte, el grupo D7 mostró una mayor tasa de crecimiento específica (TCE) comparado con el resto de los tratamientos. No obstante, el análisis estadístico no mostró diferencias significativas ($P_{\text{TCE}} = 0.473$). En cuanto a la supervivencia, fue muy alta en todos los tratamientos

sin encontrar diferencias significativas entre ellas ($P_s = 0.519$). El grupo D1 registró la menor supervivencia (97%) con respecto a los demás tratamientos donde no hubo mortalidad. Los resultados indican que las frecuencias de Argovit-4[®], no ejercen efectos significativos ($P \leq 0.05$) en las variables de rendimiento productivo en juveniles de camarón.

Tabla 21. Rendimiento productivo de camarón alimentado con AgNPs a tres frecuencias de alimentación de AgNPs durante 28 días

Parámetros productivos	Tratamientos			
	D1	D4	D7	Control
Densidad (org/m ³)	133	133	133	133
Peso inicial (g/camarón)	4.82 ± 0.19	5.05 ± 0.03	4.84 ± 0.15	4.95 ± 0.12
Peso final (g/camarón)	5.98 ± 0.35	6.06 ± 0.05	6.01 ± 0.26	6.13 ± 0.11
Biomasa (g)	115.67 ± 9.16	121.17 ± 0.96	120.23 ± 5.20	122.60 ± 2.13
PG ¹ (g)	24.01 ± 2.73 ^a	19.96 ± 0.43 ^a	24.23 ± 6.57 ^a	23.85 ± 2.82 ^a
TCE ² (%/día)	0.65 ± 0.15 ^a	0.65 ± 0.01 ^a	0.77 ± 0.19 ^a	0.76 ± 0.08 ^a
S ³ (%)	97 ± 0.6 ^a	100 ± 00 ^a	100 ± 00 ^a	100 ± 00 ^a
FCA ⁴	2.60 ± 0.46 ^a	2.81 ± 0.06 ^a	2.41 ± 0.56 ^a	2.37 ± 0.30 ^a

PG¹ = Peso ganado,

TCE² = tasa de crecimiento específica,

S³ = supervivencia,

FCA⁴ = factor de conversión alimenticia. Los valores de la misma fila con diferentes letras de superíndice son diferentes significativamente ($P \leq 0.05$).

7.7.2 Análisis del daño histológico

Los organismos que fueron alimentados con Argovit-4[®] (1000 µg/g) cada 1, 4 y 7 días presentaron alteraciones en hepatopáncreas. Se identificó la presencia de atrofia, delaminación de túbulos e infiltración hemocítica para cuantificar el grado de daño general del tejido (análisis semicuantitativo) y el diámetro de las células B (análisis cuantitativo) como evidencia de lesión en el tejido. Los resultados muestran una relación directa entre el grado de daño encontrado y el régimen alimenticio (Fig. 25), siendo la frecuencia de alimentación continua y cada 4 días, las que generaron un mayor grado de infiltración significativa de hemocitos en hepatopáncreas comparado con la alimentación de 7 días y el control ($P=0.015$).

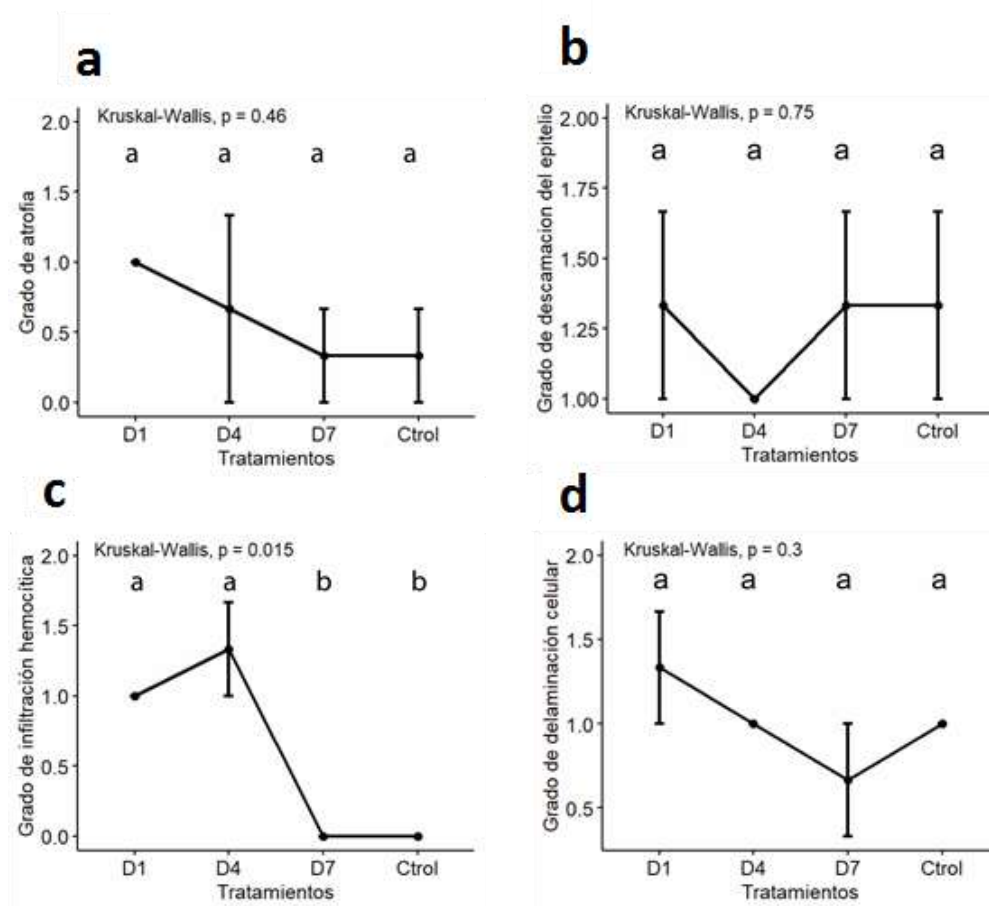


Figura 25. Evaluación semicuantitativa del grado de daño en hepatopáncreas de *P. vannamei* bajo distintos regímenes de alimentación con Argovit-4® (1000 µg/g). a) grado de atrofia celular, b) grado de descamación epitelial, c) grado de infiltración hemocítica, d) grado de delaminación celular. Los resultados se presentan como media \pm DE. Las letras diferentes en la gráfica indican diferencias significativas mediante las pruebas de Kruskal-Wallis ($P \leq 0.05$) seguido de una prueba de Dunn.

Acorde al daño general del tejido, se encontraron diferencias significativas ($P=0.036$) entre el grupo alimentado diariamente con respecto al alimentado cada 7 días, por lo que dar alimentación diariamente AgNPs por periodos superiores de 28 días, perjudica la salud del camarón (Fig. 26)

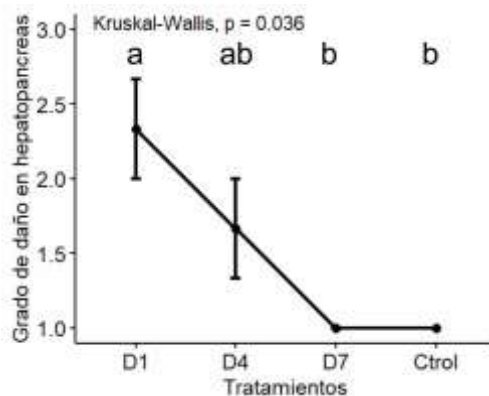


Figura 26. Evaluación semicuantitativa del grado de daño general a hepatopáncreas. Los resultados se presentan como media \pm DE. Las letras diferentes en la gráfica indican diferencias significativas mediante las pruebas de Kruskal-Wallis ($P \leq 0.05$) seguido de una prueba de Dunn.

Por otra parte, se presentó una disminución significativa ($P = 2.2e-16$) del tamaño de las células B de los grupos experimentales comparadas con grupo el control como se observa en la Figura 27, siendo el grupo de alimentación continua, la frecuencia alimenticia que presentó una disminución de las células B del control ($12.25 \pm 1.02 \mu\text{m}$) comparado con el control ($24.44 \pm 1.94 \mu\text{m}$). Las alteraciones histopatológicas en hepatopáncreas se pueden observar de manera descriptiva en la Figuras 27 y 28.

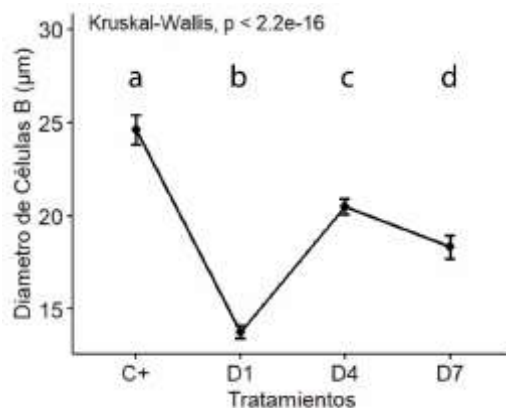


Figura 27. Evaluación cuantitativa del diámetro de células B en micras (μm). Los resultados se presentan como media \pm DE. Las letras diferentes en la gráfica indican diferencias significativas mediante las pruebas de Kruskal-Wallis ($P \leq 0.05$) seguido de una prueba de Dunn.

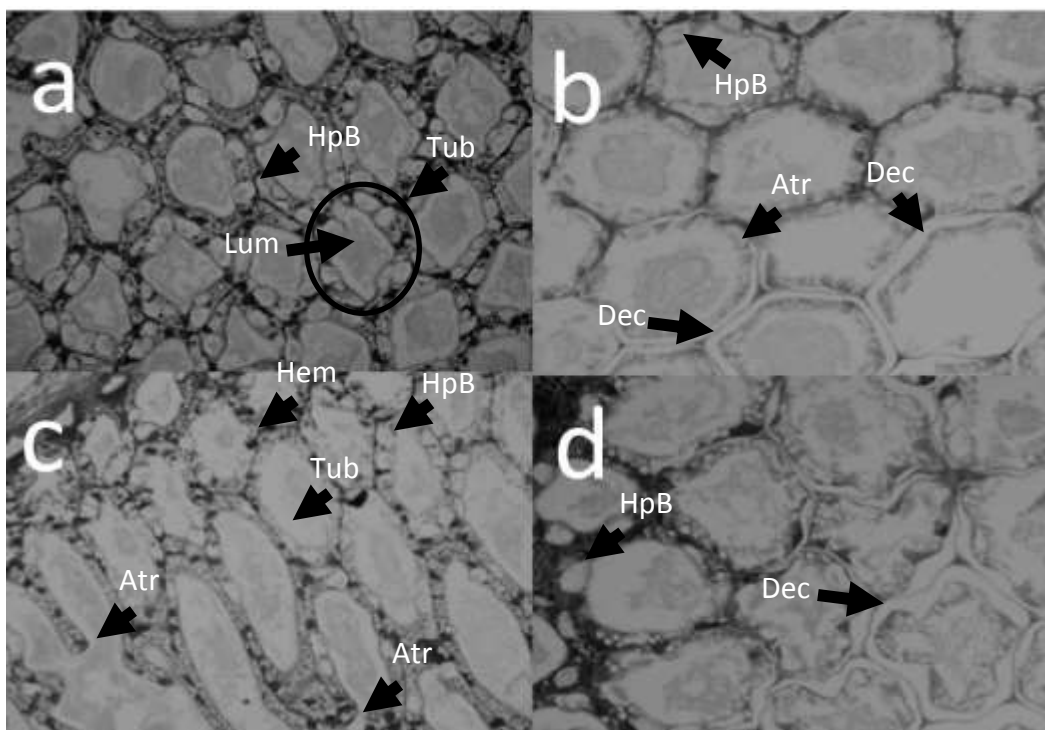


Figura 28. Micrografía en hepatopáncreas (Hep) de camaron alimentado con AgNPs por frecuencias alimenticias. A) grupo control con células B (HpB), túbulos (Tub), Lumen (Lum). B) grupo alimentado continuamente, las flechas muestran espacios en blanco de células desprendidas (Dec), Atrofia (Atr). C) grupo alimentado cada 4 días, las flechas indican Atrofia (Atr), infiltración hemocítica (Hem). D) grupo alimentado cada 7 días, espacios en blanco de células desprendidas (Dec), células B (HpB).

7.8 Respuesta antiviral en camarones sobrevivientes a toxicidad crónica contra WSSV

7.8.1 Efecto protector de la alimentación continua y por intervalos de tiempo contra WSSV

Se realizó un experimento con juveniles de camarón suministrando Argovit-4® (1000 µg/g) en el alimento: diario (D1), cada 4 días (D4) y cada 7 días (D7). Después de 28 días de tratamiento, los camarones fueron infectados por vía oral con WSSV. Los resultados mostraron 10% de supervivencia en el control sin Argovit-4® a las 240 horas post-infección. En contraste, no se presentó mortalidad en el control negativo. Por otro lado, el grupo D7 alcanzó 50% de supervivencia, mientras que, el grupo D1 y D4 alcanzaron 10 y 30 % de supervivencia respectivamente (Fig. 29).

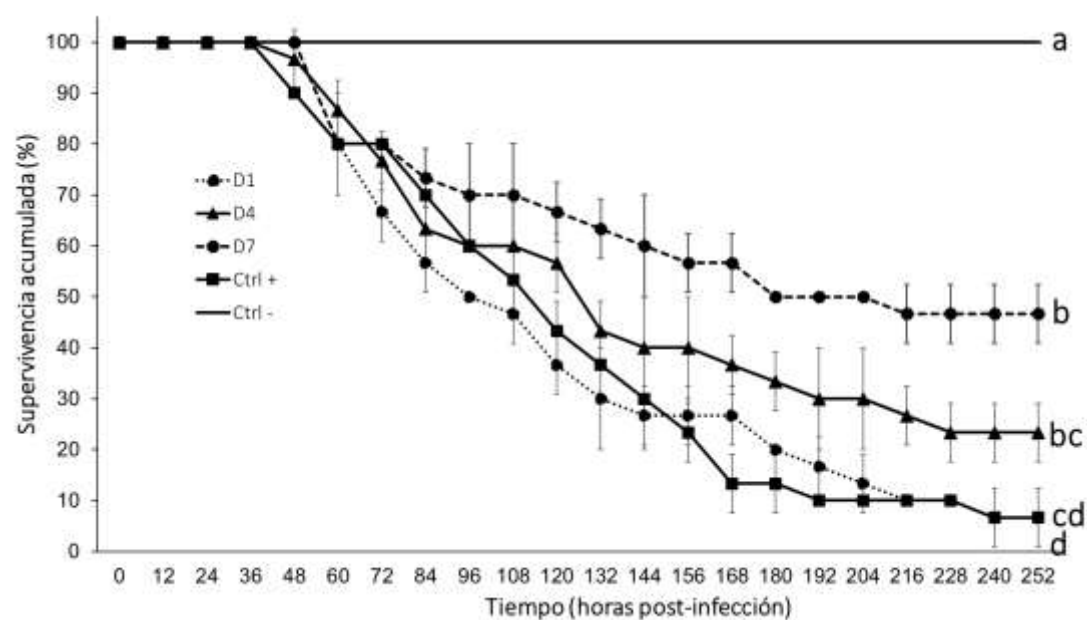


Figura 29. Supervivencia en camarones tratados con Argovit-4® (1000 µg/g) en el alimento, suministrado bajo diferentes regímenes de frecuencia [diario (D1), cada 4 días (D4) y cada 7 días (D7)] y retos contra WSSV por vía oral. Los resultados se presentan como el promedio de supervivencia ± DE. Las letras diferentes en la gráfica indican diferencias significativas ($P \leq 0.05$) y una prueba de Tukey.

7.8.2 Capacidad de respuesta del sistema inmune ante WSSV

7.8.2.1 Gen de la proteína activadora de la fagocitosis (PAP)

El análisis del gen PAP, relacionado con la fagocitosis, mostró una disminución de la expresión en el control y en el tratamiento D7 (6 y 12 hpi); en el tratamiento D1 la expresión aumentó a las 6 hpi (Figura 30). Por otra parte, a las 0h el control tubo la mayor expresión con respecto a los tratamientos, a su vez el tratamiento D7 tuvo mayor expresión que D1 y D4. A las 6 hpi el tratamiento D1 alcanzó la mayor expresión de PAP con respecto al control y D4. No hubo diferencias entre los tratamientos a las 12 hpi (Figura 30).

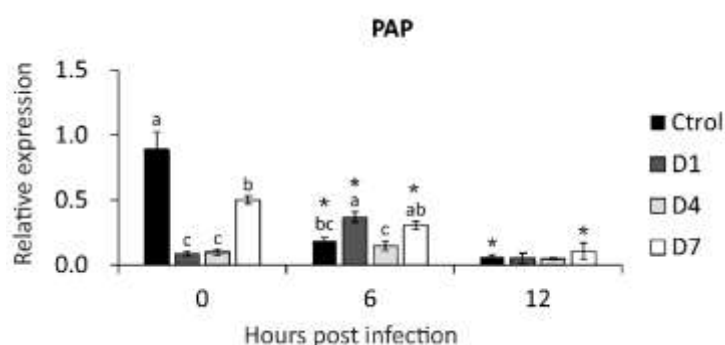


Figura 30. Respuesta transcripcional del gen PAP en camarones retados contra WSSV. Los organismos fueron previamente tratados durante 28 días con una dosis de A-AgNPs diario (D1), cada 4 días (D4), cada 7 días (D7) y un control sin AgNPs. La expresión del gen se evaluó antes de la infección (0h) y a las 6 y 12 hpi. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre tratamientos en cada tiempo. El asterisco (*) indica diferencias significativas con 0h.

7.8.2.1.1 Gen de la Profenoloxidasa (ProPO)

El análisis del gen ProPO, mostró una disminución de la expresión en el control y en el tratamiento D7 después de la infección (6 y 12 hpi); en contraste, en el tratamiento D1 la expresión aumentó a las 6 hpi (Figura 31). Por otra parte, a las 0h el control tubo la mayor expresión con respecto a los tratamientos con A-AgNPs, a su vez el tratamiento D7 tuvo mayor expresión que D1 y D4. A las 6 hpi el tratamiento D1 alcanzaron una mayor expresión de ProPO con respecto a los demás tratamientos. A las 12 hpi el control y D1 tuvieron mayor expresión que D4 y D7 (Figura 31).

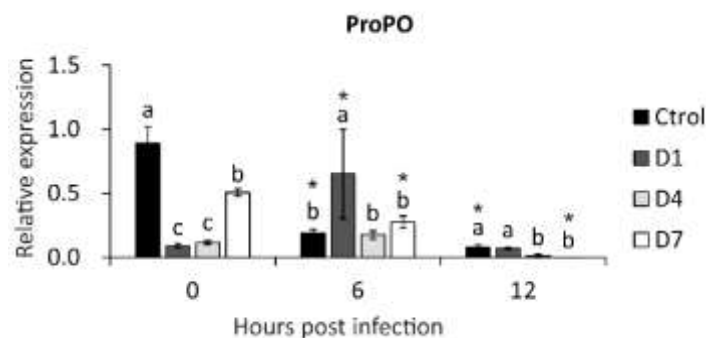


Figura 31. Respuesta transcripcional del gen ProPO en camarones retados contra WSSV. Las condiciones experimentales son las mismas que en la figura 30.

7.8.2.1.2 Expresión del gen de la lectina 3 tipo C (CTL-3)

El análisis del gen CTL-3, mostró un aumento en la expresión en el control y D1 a las 6hpi; en contraste, en el tratamiento D4 la expresión disminuyó a las 12 hpi (Figura 32). Por otra parte, no hubo diferencias significativas a las 0h entre los tratamientos. A las 6 hpi el tratamiento D4 alcanzó la mayor expresión de CTL-3 con respecto a los demás tratamientos y D7 tubo la menor expresión. A las 12 hpi el tratamiento D4 tuvo la menor expresión con respecto a los demás tratamientos (Figura 32).

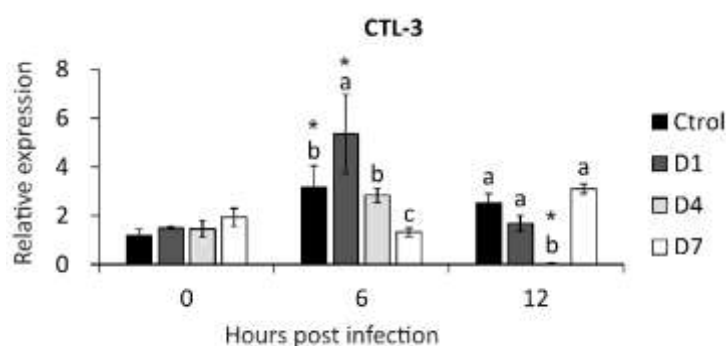


Figura 32. Respuesta transcripcional del gen CTL-3 en camarones retados contra WSSV. Las condiciones experimentales son las mismas que en la figura 30.

7.8.2.1.3 Expresión genética de péptidos antimicrobianos (PEN3, PEN4 y Crustina)

El análisis del gen PEN3, mostró una disminución de su expresión en el tratamiento D7 a las 12 hpi (Figura 33A). Por otra parte, no hubo diferencias significativas a las 0h entre los

tratamientos. A las 6 hpi los tratamientos D4 y D7 alcanzaron una mayor expresión de PEN3 con respecto a D4 ya al control. A las 12 hpi el tratamiento D7 tuvo la menor expresión con respecto a los demás tratamientos (Figura 33A). Por otra parte, el análisis del gen PEN4, solo mostró un efecto en el tratamiento D7 con un aumento significativo de su expresión a las 12 hpi con respecto a los demás tratamientos (Figura 33B). Por otra parte, el análisis del gen Crustina, mostró un aumento de su expresión en los tratamientos D1 y D4 a las 6 y 12 hpi. En contraste el tratamiento D7 presentó una reducción en la expresión de Crustina a las 12 hpi (Figura 33C). Por otra parte, a las 0h el control y el tratamiento D7 tuvieron la mayor expresión con respecto a D1 y D4. No hubo diferencias significativas entre los tratamientos a las 6 hpi. A las 12 hpi el control y D1 tuvieron mayor expresión que D4 y D7 (Figura 33C).

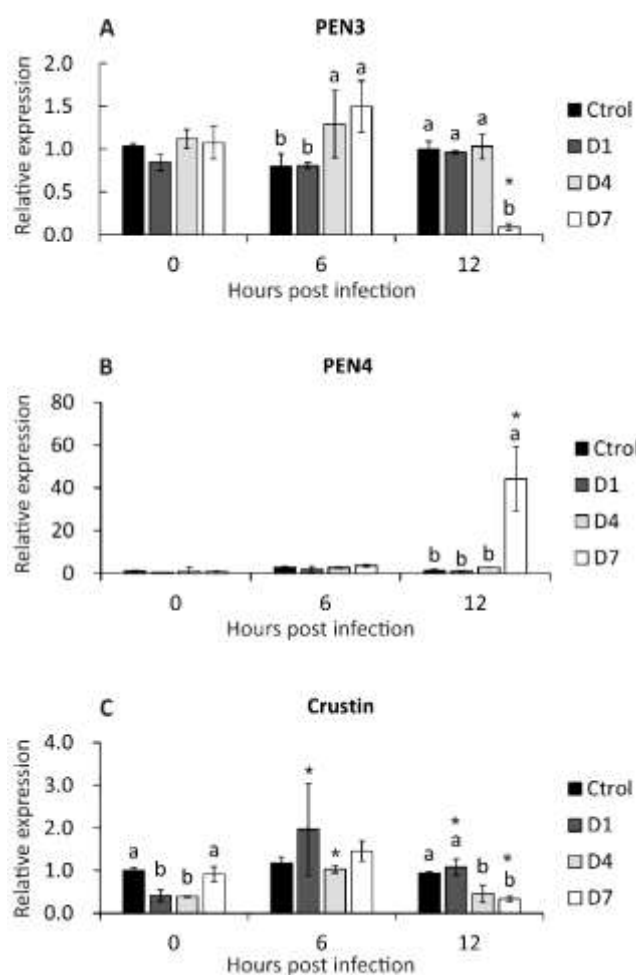


Figura 33. Respuesta transcripcional de los genes PEN3 (A), PEN4 (B) y Crustina en camarones retados contra WSSV. Las condiciones experimentales son las mismas que en la figura 30.

8. DISCUSIÓN

8.1 Efecto de la toxicidad aguda por AgNPs inyectadas en camarón

Como en toda actividad productiva, la industria del camarón cuenta con una serie de retos para mantener su sustentabilidad. Uno de los más significativos han sido las enfermedades ocasionadas por virus. El virus que ha causado más daño en los cultivos de camarón en todo el mundo ha sido el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV). La enfermedad de la mancha blanca (WSD) puede ocasionar el 100% de mortalidad en los casos más severos (Lightner *et al.*, 2011; Escobedo-Bonilla *et al.*, 2015; Álvarez-Ruiz *et al.*, 2015; Romo-Quiñonez *et al.*, 2020). Como el camarón carece de un sistema inmune adaptativo, la inmunización no ha sido una opción potente para contrarrestar a los patógenos (Morales-Covarrubias *et al.*, 2010; Fonseca-Moreno *et al.*, 2013; Cárcamo-Aréchiga *et al.*, 2016; Chen & He, 2019). En este sentido, el uso de nanopartículas de plata o AgNPs se posiciona como una alternativa viable para el tratamiento de enfermedades infecciosas contra virus, bacterias y parásitos (Barakat *et al.*, 2016; Morales-Covarrubias *et al.*, 2016; Acedo-Valdez *et al.*, 2017; Pimentel-Acosta *et al.*, 2019). Sin embargo, uno de los principales impedimentos de cualquier aplicación de un producto en organismos marinos, es el efecto tóxico que pueda causar. En el caso de las AgNPs su toxicidad parece estar asociada a su naturaleza oxidativa e inflamatoria (Cho *et al.*, 2009), la cual genera genotoxicidad (AshaRani *et al.*, 2009) y citotoxicidad (Gliga *et al.*, 2014) mediante la generación de especies reactivas de oxígeno (EROs). Cuando las AgNPs se mantienen dentro de un organismo por un periodo prolongado, y las enzimas antioxidantes no logran neutralizarlas, se puede producir estrés oxidativo que culmina en la inducción de apoptosis, daño del material genético, desestabilización de membranas, disrupción de proteínas y mitocondrias (Carlson *et al.*, 2008; Choi & Hu, 2008; AshaRani *et al.*, 2009; Horie *et al.*, 2012; Parveen *et al.*, 2012; Arvizo *et al.*, 2012; Borrego *et al.*, 2016; Coutiño *et al.*, 2017; Tang & Zheng, 2018).

Por otra parte, las AgNPs en ambientes acuáticos tienen una alta capacidad de formar agregados (Lekamge *et al.*, 2018). En este sentido, es posible que cuando las AgNPs sean inoculadas en el camarón, estas interactúen con la hemolinfa y formen agregados. La liberación de los iones plata (Ag^+) de los agregados en el interior del camarón pueden desencadenar

efectos notorios de toxicidad en un corto periodo de exposición. Este fenómeno ya ha sido reportado por Arulvasu *et al.* (2014) en experimentos con *Artemia salina* expuestos a 12 nM (1.29 ng/*Artemia*) de AgNPs por 48 h, observando agregación de estas en la región intestinal, células apoptóticas y daño al ADN, seguido de aumento en la tasa de mortalidad. Por otra parte, las mortalidades causadas por iones de plata en crustáceos ya han sido descritas por Ishwarya *et al.* (2016), al determinar los efectos tóxicos de AgNO₃ en *Ceriodaphnia cornuta*. La plata iónica a partir de AgNO₃ mostró 100% de mortalidad a 40 µg/mL, incluso se observaron altas tasas de mortalidades a dosis de 20 y 30 µg/mL. Esto mismo fue reportado por Banumathi *et al.* (2017) obteniendo un 100% de mortalidad de *Ceriodaphnia cornuta* después de la exposición a AgNO₃ (40 µg/mL). Por otra parte, se ha reportado que la plata metálica en dosis bajas no causa altas mortalidades en camarones (Juárez-Moreno *et al.*, 2017), alcanzando supervivencias hasta del 98.7% en camarones inyectados con 5, 50 y 200 ng/g de camarón, después de 96 h de exposición.

Teniendo en cuenta lo anterior, en este estudio no se registraron signos evidentes de toxicidad en camarones tratados con cinco formulaciones de AgNPs (Argovit[®]) inyectando 50 y 1000 ng/g de camarón. Esto indica que las AgNPs de Argovit[®] no son tóxicas para el camarón. Esto puede deberse al diseño único de las AgNPs Argovit[®] y su recubrimiento con PVP (polivinilpirrolidona), de tal manera que transita por el organismo hasta llegar a su objetivo. Los resultados encontrados concuerdan con Juárez-Moreno *et al.* (2017), donde no reportaron cambios de comportamiento de los camarones tratados, ni alteraciones en la cantidad de hemocitos o descensos en el consumo de oxígeno. Ochoa-Meza *et al.* (2019) no reportaron daño histológico significativo en camarones sometidos a dosis de 120 y 1200 ng/g de plata metálica (Argovit[®]) por 96 h de exposición. Por el contrario, Chávez-Sánchez *et al.* (2020) reportaron mortalidades de un 20% con dosis de 1339 ng/g. Por lo tanto, podría ser evidente la formación de agregados en camarones tratados con dosis superiores a 1000 ng/g, lo que conllevaría a la liberación de iones Ag⁺ en el sistema circulatorio del camarón, causando incremento en la toxicidad y consecuentemente la muerte del organismo.

8.2 Efecto antiviral de AgNPs contra WSSV por contacto directo

La información sobre el efecto antiviral de las AgNPs en enfermedades por virus en camarón aún es limitada. Sin embargo, en el virus de la inmunodeficiencia humana 1 (VIH-1), la acción antiviral se debe a la capacidad de las AgNPs de unirse a glicoproteínas de superficie viral ricas en grupos sulfhidrilo o grupos tioles (compuestos formados por un átomo de azufre y un átomo de hidrogeno S-H), rompen sus enlaces disulfuro, conduciendo a la unión viral deteriorada al receptor de la célula diana (Elechiguerra *et al.*, 2005; Lara *et al.*, 2010; Hati & Bhattacharyya, 2020). Esto hace suponer que la acción antiviral de las AgNPs es dañar las proteínas de la superficie del virus, alterando la integridad estructural de los virus, lo que limita el paso del virus hacia la célula diana durante las primeras etapas del ciclo infectivo. En este contexto y con la finalidad de determinar si las AgNPs de Argovit[®] son capaces de inactivar o limitar la infectividad de WSSV, expusimos al virus con cinco formulaciones de AgNPs (Argovit[®]) y después se inocularon en los camarones. Los resultados demostraron que las cinco formulaciones de AgNPs tienen efecto antiviral por contacto directo, y que a mayor dosis de AgNPs el efecto es mayor. Este resultado coincide con lo encontrado por Speshock *et al.* (2010) que sugieren que las AgNPs fueron capaces de inhibir efectivamente la replicación de virus Tacaribe (Arenovirus), cuando sus inóculos infecciosos son sometidos a concentraciones de AgNPs antes de la infección. De igual manera, Borrego *et al.* (2016) sometieron inóculos infectivos del virus de la fiebre del valle del rift (RVFV) con AgNPs de Argovit[®] antes de la infección, lo que condujo a una reducción de su infectividad tanto en ensayo *in vitro* en cultivo con células Vero[®], como en ensayo con ratón.

Cabe mencionar que, de las cinco formulaciones evaluadas (Argovit-1[®], Argovit-2[®], Argovit-3[®], Argovit-4[®] y Argovit-5[®]), se seleccionó Argovit-4[®] por ser la de mayor efecto antiviral para adicionarlo en el alimento. Posiblemente la mayor actividad de Argovit-4[®] está relacionada con la masa molecular de PVP y su capacidad de contacto con las AgNPs (Kyrychenko *et al.*, 2015), ya que acorde a comunicación personal con la Dra. Nina Bogdanchikova, estas formulaciones evaluadas difieren en masa molecular de PVP, siendo Argovit-4[®] y Argovit-5[®] las AgNPs

recubiertas de PVP con mayor masa molecular de 45 a 58 KDa respectivamente. De esta manera, si la molécula de PVP es más corta, tiene menos masa molecular, y por lo tanto atrapa menos AgNPs, disminuyendo el contacto con el virus. Por esto, Argovit-4[®] mostró una actividad antiviral superior al compararla con las formulaciones Argovit[®] con PVP de menor masa molecular.

8.3 Análisis transcriptómico de genes de respuesta a AgNPs

Los estudios de RNAseq o secuenciación del ARN nos permite comprender el transcriptoma, es decir, todos los transcritos expresados (ARN mensajeros) en una célula o grupo de células, en un momento determinado o situación concreta, basándose en el análisis de sus perfiles de expresión génica (Morozova *et al.*, 2009; Gironella-Cos, 2010). En resumen, un estudio RNAseq nos permite conocer que genes están activados y cuál es su nivel de expresión en un tejido o célula en un momento determinado. Además, dependiendo del estudio, también nos permite conocer en qué momento se activan o desactivan. En este sentido, con la finalidad de identificar que genes se expresan cuando se administra AgNPs en el camarón, se realizó un estudio de RNAseq. Para este análisis, se seleccionaron branquias como tejido diana debido a que su epitelio es capaz de atrapar partículas metálicas, las cuales elimina durante la muda (Martin *et al.*, 2000; Henry *et al.*, 2012; Chávez-Sánchez *et al.*, 2020). Esto sugiere que el tejido branquial es capaz de bioacumular partículas metálicas por un cierto periodo, resultando en un tejido idóneo para identificar que genes se activan en presencia de AgNPs. El tejido branquial de 3 organismos fue considerado como una réplica biológica. Se enviaron 2 réplicas biológicas de camarones tratados con AgNPs y 2 no tratadas e infectadas con WSSV, generándose el mismo número de librerías. Lamarre *et al.* (2018) sugieren que, el número de replicas tiene un mayor impacto en el análisis de expresión diferencial que en la profundidad de secuenciación. En este sentido, aún no está completamente definido, cuántas réplicas biológicas se necesitan para garantizar una interpretación biológica válida de los resultados y tampoco cuáles herramientas estadísticas son las mejores para analizar los datos. Schurch *et al.* (2016) realizaron un experimento de RNA-seq para evaluar el desempeño de 11 herramientas bioinformáticas (e.g. edgeR, DESeq, DESeq2,

Lima, entre otras) utilizando 3, 6, 12 y 20 réplicas biológicas, concluyendo los siguientes cinco puntos:

- 1) Para experimentos donde es importante determinar los cambios de expresión diferencial en la mayoría de los genes son necesarios al menos 6 réplicas, aumentando a 12 para una mayor certidumbre en los resultados.
- 2) Para experimentos con menos de 12 réplicas por condición, edgeR (exact) o DESeq2 funcionan muy bien, ya que controlan adecuadamente su FDR (tasa de descubrimiento falso) con bajo número de replicas,
- 3) Para experimentos con más de 12 réplicas por condición, DESeq es el más adecuado, ya que minimiza abismalmente el número de falsos positivos,
- 4) Si se utilizan 3 réplicas biológicas solamente entre 20-40% de genes expresados diferencialmente son encontrados,
- 5) Si se utilizan 20 réplicas se obtienen más del 85% de genes expresados diferencialmente.

Ante estos puntos, consideramos que nuestros resultados son exploratorios, dado el bajo número de réplicas biológicas utilizadas. No obstante, nos proporciona una idea sobre los mecanismos que son afectados en presencia de las AgNPs.

8.3.1 Genes sobre-expresados

El análisis de expresión diferencial mostró una sobre-expresión de algunos genes relacionados con el sistema inmune innato, destacándose el gen que codifica para ficolina-1 (LOC113807116) y cuya función está involucrado en el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) (Han *et al.*, 2018; Bidula *et al.*, 2019). Ficolina-1 se encuentra dentro de la familia de las lectinas denominadas FREPs (del inglés, fibrinogen-related proteins), debido a su dominio altamente conservado semejante a fibrinógeno, también contiene un dominio de la superfamilia de las inmunoglobulinas, razón por la cual se conocen como inmunolectinas. Se ha reportado que las ficolinas son capaces de unirse a diferentes bacterias Gram positivas y Gram negativas mediante el reconocimiento de peptidoglicanos y lipopolisacáridos (LPs),

desencadenando una reacción de aglutinación/coagulación hacia estas (Wu *et al.*, 2011; Udompetcharaporn *et al.*, 2014). Por otra parte, Söderhäll *et al.* (2009) y Angthong *et al.* (2010) mencionan que las ficolinas también son capaces de inhibir el proceso de melanización en cangrejo *Pacifastacus leniusculus* y en el camarón *Penaeus monodon*. Esto se relaciona con los bajos niveles de expresión de los genes codificantes cuyas funciones están asociados a sistema inmune innato: factor activador de la pro-fenoloxidasa (activador de la sistema proPO), perlucin (su función está ligada a la regulación de la fagocitosis y expresión de péptidos antimicrobianos), proteína similar al factor anti-lipopolisacárido (su actividad antimicrobiana está asociada a su propiedad de unirse al LPS y desencadenar una respuesta celular) y proteína putativa a péptido antimicrobiano (con actividad detergente o formadora de poros en membrana, lo que provoca una desestabilización de este tejido) (Somboonwivat *et al.*, 2008; Rosa *et al.*, 2013; Cárcamo-Aréchiga *et al.*, 2016; Bi *et al.*, 2020). Estos bajos niveles pueden indicar que la actividad de ficolina-1 en *Penaeus vannamei* puede estar ligada no solamente en el reconocimiento de patógenos, sino que también pueden ser importantes inmunofactores en la regulación del proceso de melanización, que es uno de los principales mecanismos de defensa del camarón del sistema humoral.

Como era de esperarse, se identificaron genes codificantes para metalotioneínas, las cuales están involucradas en la homeostasis de metales en virtud de sus propiedades de unión a los mismos, principalmente de cobre y zinc, que son requeridos comúnmente en reacciones enzimáticas metabólicas (Ostrakhovitch *et al.*, 2007; Isani & Carpenè, 2014). Otra de las muchas funciones que cumplen estas proteínas son la detoxificación de metales pesados de cadmio y mercurio debido a sus grupos tiol (-SH) capaces de unirse hacia estos metales, favoreciendo la protección el daño oxidativo y remoción de radicales libres, los cuales contribuyen al control de la proliferación celular y de la apoptosis (Sato & Bremner, 1993; Klaassen *et al.*, 1999; Amiard *et al.*, 2006; Shestivska *et al.*, 2011; Isani & Carpenè, 2014). También juegan un papel importante en la peroxidación de membranas lipídica y control del daño al ADN (Fang *et al.*, 1997; Kondoh *et al.*, 2003; Ruttkay-Nedecky *et al.*, 2013).

Se ha investigado ampliamente el mecanismo de defensa de las metalotioneínas ante radicales libres y se ha concluido que la actividad de estas proteínas puede proporcionar un excelente biomarcador de estrés oxidativo en caso de exposición a metales pesados (Carpenè *et al.*, 1992; García-Rico *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2005; Serafim & Bebianno, 2010; Cirillo *et al.*, 2012; Isani & Carpenè, 2014; Lemus *et al.*, 2016; Oaten *et al.*, 2017). Por otra parte, el elemento plata (Ag^+) tiene una alta afinidad hacia los grupos tioles (-SH) y uniones disulfuro predominantes en proteínas (Coutiño *et al.*, 2017). En este contexto, las metalotioneínas contienen bastantes grupos tioles en los residuos de cisteína, lo que indica que estas proteínas pueden presentar afinidad hacia este elemento. En base a esto, se ha evaluado la respuesta de las metalotioneínas en tilapia *Oreochromis niloticus*, ostión *Crassostrea virginica* y mejillón *Mytilus galloprovincialis* expuestos a concentraciones de AgNPs, los resultados mostraron que los niveles de expresión permiten monitorear los potenciales efectos tóxicos y correlacionarlo con la respuesta inmune del organismo después de la exposición a AgNPs (Ringwood *et al.*, 2010; Gomes *et al.*, 2014; Thummabancha *et al.*, 2016). Teniendo en cuenta la anterior, los niveles de expresión de los genes para metalotioneínas en camarones sometidos a dosis de 1000 ng/g de AgNPs sugerirían que estas proteínas son capaces de secuestrar a las AgNPs evitando bioacumulación que genere efectos tóxicos en el organismo, además de neutralizar especies reactivas de oxígeno (EROs) generadas por la liberación de iones plata de la nanopartícula. Esta hipótesis es soportada por la expresión del gen de la peroxina encontrado en el presente estudio, la cual es una proteína esencial para el ensamblaje de peroxisoma funcional (Van Veldhoven & Baes, 2013). Los peroxisomas son organelos oxidativos cuyas funciones son clave en el metabolismo de los lípidos y con frecuencia transforman el oxígeno molecular en peróxido de hidrogeno (H_2O_2), es decir, participan en la reducción de especies reactivas de oxígeno (Bonekamp *et al.*, 2009). En este contexto, la dosis administrada en los camarones experimentales no causó efectos letales por estrés oxidativo, sugiriendo que permite mantener su homeostasis estable al neutralizar especies reactivas de oxígeno eficientemente.

Del mismo modo, se encontraron genes relacionados a proteólisis y de acuerdo al análisis de términos ontológicos (GO term), se identificó como el principal proceso biológico encontrado en los organismos tratados con AgNPs. Este proceso es mediado por proteínas de unión a iones

metálicos (metalopeptidasas), principalmente en componentes que integran la membrana celular. El procesamiento proteolítico es un mecanismo común en la regulación fisiológica y tiene una amplia gama de propósitos dentro del organismo, entre los cuales incluyen: digestión completa de proteínas de la dieta como fuente de aminoácidos por las proteasas digestivas (tripsina, quimotripsina, pepsina), degradación de los componentes estructurales, recambio de proteínas intracelulares para prevenir la acumulación de proteínas mal plegadas (e.g. lisosoma, sistema ubiquitina-proteasoma), digestión parcial de antígenos externos en la vigilancia inmunológica, degradación de ciclinas en diferentes etapas del ciclo celular, conversión de proteínas precursoras en sus estructuras biológicamente activas (e.g. zimógenos, pro-enzimas, prohormonas, otros péptidos crípticos), desprendimiento de ectodominios para iniciar o modular la señalización y en eventos transcripcionales nucleares a través de proteólisis intramembrana regulada (Neurath, 1989; Wolfe, 2009; Torner & Nalieva, 2011). Del mismo modo, se identificaron genes que codifican para proteína de la cutícula 16.5, AMP1A, AM1236, pupal 27, CP1158 y otras proteínas no caracterizadas que contienen dominios de unión a quitina. La expresión de estos genes en conjunto, pueden indicar que las AgNPs estaban interactuando en estos organismos en el proceso de la muda.

Lo anterior puede ser reforzado por lo observado durante experimentos de toxicidad aguda, donde se indujo el proceso de muda en algunos organismos después de ser tratados intramuscularmente con AgNPs (1000 ng/g). Posiblemente, este cambio cuticular se indujo por estrés ocasionado por la dosis administrada. Resultados similares fueron observados por Chávez-Sánchez *et al.* (2020), quienes después de inyectar camarones con 1399 ng/g de AgNPs, permanecieron acostados en el fondo del acuario por unos minutos, mostrando efectos de estrés por la inyección. Ante este modelo, se puede proponer un estudio posterior para conocer el impacto de AgNPs sobre el proceso de muda.

8.3.2 Genes sub-expresados

A pesar de que el gen codificante para una proteína hipotética de C7M84_007055 (LOC11380827) fue el más sub-expresado en las librerías del grupo tratado con AgNPs respecto

al control, su función biológica aún no se conoce. Sin embargo, contiene un dominio de unión a adenosín monofosfato (AMP) perteneciente a la familia de acil-CoA sintetasa, las cuales están involucradas en vías metabólicas de ácidos grasos, tanto en la síntesis de *novo* como en la modificación de los lípidos existentes principalmente de ácidos grasos de cadena larga (Shockey *et al.*, 2000). En base a lo anterior, la proteína hipotética con clave C7M84_007055 podría estar ligada a procesos de biosíntesis de la cutina. No obstante, falta más investigación para aclarar este punto. El segundo gen más importante codifica para la proteína 7 de unión al factor de crecimiento tipo insulina (LOC113826199), su función está relacionada con la insulina, es decir, que tienen acción reguladora del crecimiento y/o proliferación celular en el desarrollo de vertebrados e invertebrados (Granada-Ybern, 2006; Gutiérrez *et al.*, 2008; Sharker *et al.*, 2020). Estos genes se relacionan con crecimiento y desarrollo del camarón, lo que apoya la hipótesis de que estos organismos se estaban preparando para el proceso de muda. En este modelo, también se encontraron genes codificantes para quitinasa y receptor de ecdisona dentro de las muestras control, lo que soporta tal afirmación.

De igual manera, se identificaron genes codificantes para proteínas que participan en regulación negativa de la actividad endopeptidasa, principalmente de tipo cisteína y serina. En este sentido, la inhibición de la actividad proteasas de tipo cisteína está involucrada en la fase de ejecución de la apoptosis, que es un proceso de muerte celular programada, cuya función está relacionada en la regulación de la homeostasis de un organismo, actuando directamente en los tejidos y respuesta inmunológica. La regulación negativa de la endopeptidasa tipo cisteína actúa directamente en la regulación de la actividad caspasa apoptóticas que están asociadas al desmantelamiento celular (Chowdhury *et al.*, 2008; Barraco *et al.*, 2014). Esto indica que los organismos estaban experimentando una alteración celular a nivel de tejido. En este contexto, también se encontraron genes involucrados en rutas del metabolismo de carbohidratos, llevándose a cabo rutas metabólicas relacionadas al metabolismo de fructosa. En este contexto, se identificaron genes codificantes para 6-fosfofructo-2-cinasa y fructosa-2,6-bisfosfatasa, cuyas funciones son clave en la regulación de glucólisis y en gluconeogénesis, respectivamente (Jenkins *et al.*, 2011; Cota-Ruiz *et al.*, 2016). Esto sugiere, un cambio del metabolismo aerobio al metabolismo anaerobio con el aumento en la producción de ATP (Aragonés *et al.*, 2009).

Probablemente, debido a estrés por muestreo a la que estuvieron expuestos estos organismos (respuesta de escape hasta agotamiento) y este estrés provocó una demanda de energía adicional. En conclusión, la respuesta molecular de estos genes responde a estímulos de hipoxia/anoxia que desencadena procesos fisiológicos y bioquímicos de adaptación, que se armonizan para maximizar la absorción de oxígeno y el suministro de tejido, y para obtener energía en condiciones limitantes de oxígeno. En este contexto, los animales marinos responden a la escasez de oxígeno intentando primero mantener el suministro de oxígeno, luego mediante la depresión de la tasa metabólica y finalmente produciendo energía a partir del metabolismo anaeróbico (Cota-Ruiz *et al.*, 2016)

8.4 Efecto de la toxicidad aguda de AgNPs en alimento

Los efectos de toxicidad de las AgNPs se deben a varios factores, que incluyen: forma, tamaño, composición química, área superficial, carga superficial, dosis administrada, estado de aglomeración, liberación de iones Ag^+ , entre otras. Si no se controlan estas variables de diseño desde un inicio y se administran en el organismo, las células responsables de reconocer materiales extraños podrían salirse de control y conducir a una respuesta inflamatoria capaz de generar efectos dañinos al organismo (AshaRani *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2010; Coutiño *et al.*, 2017; López-Marín & Valdemar-Aguilar, 2018).

La toxicidad de las AgNPs se ha investigado arduamente en las últimas 2 décadas (McShan *et al.*, 2014), y durante este periodo, estudios de toxicidad aguda han demostrado que muy pocos diseños de AgNPs pueden aprobarse para su aplicación como fármacos, principalmente con especies acuícolas de interés comercial (Camacho-Jiménez *et al.*, 2020). Sin embargo, la concentración que se administre en especies marinas es un factor importante para efectos de toxicidad. Varios autores [Arulvasu *et al.* (2014) y An *et al.* (2019)], han observado en experimentos con *Artemia salina*, que la toxicidad aguda aumenta junto con la concentración de nanopartícula administrada. Acorde a este parámetro, Rajkumar *et al.* (2016) encontraron una reducción en parámetros hematológicos, incrementos significativos de enzimas antioxidantes en branquias, hígado y musculo seguido de lesiones histopatológicas en peces de la especie

Labeo rohita, expuestos a 100 µg/g de AgNPs por 7 días. Maldonado-Muñiz *et al.* (2019) probaron alimentos suplementados con AgNPs a 10, 100, 1000, 10,000 µg/g en camarón *P. vannamei* por 7 días, la alimentación con AgNPs no afectó variables productivas de supervivencia, crecimiento y FCA (tasa de conversión alimenticia). Sin embargo, a dosis altas de 10,000 µg/g encontraron un pequeño descenso significativo en el índice hepatosomático (HPI), lo que implica una disminución mínima de las reservas energéticas en hepatopáncreas de estos individuos y por consiguiente una baja alteración en su condición normal. Este efecto negativo sobre HPI, seguido de daño histológico, ha sido reportado en truchas después de 8 semanas de estar expuestas con AgNPs en agua a concentraciones de 3300 y 1000 mg/L de AgNPs (Monfared & Soltani, 2013).

En el presente trabajo, evaluamos el efecto de toxicidad aguda de AgNPs (Argovit-4[®]) a niveles de 10, 100 y 1000 µg/g de AgNPs en alimento, los cuales fueron suministrados por 8 días en juveniles de camarón. No se evidenciaron efectos de toxicidad basados en el registro de mortalidades ocurridas, cambios conductuales como nado errático, falta de apetito o apariencia atípica como color y flacidez de tejido. Esto se puede atribuir al diseño único de las AgNPs (Argovit-4[®]) de forma esferoide, tamaño uniforme, PVP como agente estabilizante y carga. Estas características, han permitido que organismos sanitarios internacionales, como la Organización Mundial de la Salud (OMS), avalen su uso en aplicaciones veterinarias y médicas (Bogdanchikova *et al.*, 2016; Borrego *et al.*, 2016). Un mal diseño de AgNPs ocasiona efectos de toxicidad, generando mortalidades en los organismos tratados. Esto fue observado por Vaseeharan *et al.* (2010), que reportan mortalidades del camarón *Fenneropenaeus indicus* en 29% del tratamiento alimentados con 10 µg de AgNPs durante 5 días de exposición.

8.5 Efecto antiviral de Argovit-4[®] con una sola dosis en el alimento contra WSSV

La administración intramuscular de cualquier fármaco o sustancia antimicrobiana no es un método práctico en acuicultura, considerando la gran cantidad de organismos que necesitarían ser tratados (Dananjaya *et al.*, 2016). Por lo tanto, la incorporación de estas, como aditivos en alimento proporcionan una estrategia factible para su potencial aplicación en campo y de esta

manera mejorar la respuesta inmunológica ante un patógeno (Campa & Luna, 2011; Plant & Lapatra, 2011; Álvarez-Sánchez *et al.*, 2017; Romo-Quiñonez *et al.*, 2020). Por tal razón, en la presente investigación se aplicaron AgNPs de Argovit-4[®] como aditivo antiviral en alimento para camarón con la finalidad de evaluar su capacidad protectora ante una infección del WSSV en camarón *P. vannamei*. Este estudio se realizó acorde a ensayos donde se juntaron las AgNPs-Argovit-4[®] con el WSSV antes de ser inoculadas en los camarones, determinando que Argovit-4[®] es capaz de limitar la virulencia de WSSV y sugiriendo que su acción antiviral es mediada por contacto directo con las partículas virales. Considerando lo anterior, nosotros preparamos tres alimentos con diferentes concentraciones de AgNPs (10, 100 y 1000 µg/g) de Argovit-4[®]. Los alimentos se suministraron una sola vez a los camarones antes de ser infectados por vía oral con WSSV. Los resultados mostraron un efecto antiviral de manera dosis dependiente, Probablemente debido a la alta biodisponibilidad de las AgNPs en el tracto digestivo, esto incrementó la interacción AgNPs-virus.

Hasta la fecha este estudio es el primero en evaluar el uso de AgNPs como un aditivo antiviral suplementado en alimento para camarón contra WSSV. Este ensayo nos permitió, por un lado, demostrar que esta tecnología solo una dosis alimenticia promueve actividad antiviral. Por otra parte, se confirmó un efecto similar al ensayo intramuscular, donde la mortalidad fue acorde a la concentración de AgNPs administrada. Estudios similares han evidenciado que la incorporación de nanopartículas metálicas en el alimento se producen efectos antimicrobianos contra infecciones bacterianas. Por ejemplo, Sivaramasamy *et al.* (2016) evaluaron el efecto antimicrobiano de AgNPs incluidos en alimento contra infecciones de *Vibrio parahaemolyticus* en camarón *P. vannamei*, reduciendo la tasa de mortalidad de hasta un 10%. Asimismo, RathnaKumari *et al.* (2018) evaluaron su eficacia contra infecciones de *Vibrio parahaemolyticus*, en *Penaeus monodon*, reduciendo hasta un 15% la mortalidad con respecto al control. Vaseeharan *et al.* (2010) evaluaron la eficacia protectora de AgNPs en alimento contra infecciones de *Vibrio harveyi* patogénico en juveniles de *Fenneropenaeus indicus* y registro una supervivencia del 71%. Por su parte, Tello-Olachea *et al.* (2019) incorporaron nanopartículas de oro en alimento para combatir infecciones de *Vibrio parahaemolyticus* en camarón *P. vannamei*

y registraron una supervivencia del 80%. Alternativamente, también se ha evaluado la inclusión de AgNPs en alimento contra infecciones bacterianas, utilizando organismos como vehículos de transporte, que al ser consumidos le proporcionan al hospedero protección antimicrobiana. En este sentido, Sivaramasamy *et al.* (2016), demostraron que la alimentación con la bacteria *Bacillus subtilis* productora de AgNPs ofrecía un efecto protector contra *Vibrio parahaemolyticus* al aumentar la supervivencia de un 10% a 71% en camarones *P. vannamei*. De manera similar, Acedo-Valdez *et al.*, (2017) utilizó nauplios de *Artemia franciscana* cargados con AgNPs para tratar infecciones de NHP-B en postlarvas de camarón.

8.6 Capacidad inmunoestimulante de las AgNPs

Dentro del camarón, cualquier agente extraño, ya sea una bacteria o AgNPs son reconocidos por el sistema inmunológico como sustancia extraña, cuya función principal es mantener la integridad individual mediante reparación de tejidos dañados, diferenciación y eliminación de toda presencia extraña que alteren la integridad del organismo mediante efectores celulares y humorales (Fonseca-Moreno *et al.*, 2013; Cárcamo-Aréchiga *et al.*, 2016). Los efectores celulares se basan básicamente en células de la hemolinfa o hemocitos que realizan procesos de fagocitosis, nodulación y encapsulación, llevando a la melanización de agentes extraños (sistema proPO) y es completada con los efectores humorales, donde se liberan péptidos antimicrobianos (crustina, peneidinas), aglutininas, proteínas coagulantes y radicales libres como EROs (especies reactivas de oxígeno) y ERNs (especies reactivas de nitrógeno) (Fonseca-Moreno *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2019; Kulkarni *et al.*, 2021).

La mayoría de las nanopartículas son reconocidas como materiales extraños y eliminadas por el sistema inmunitario. Sin embargo, si estos materiales no son reconocidos como una amenaza, el sistema inmunitario lo ignora o lo tolera (Luo *et al.*, 2015). No obstante, dependiendo de las dosis y frecuencias que se administre puede generar una respuesta inflamatoria. En este contexto, se ha investigado el efecto de la administración de AgNPs en el organismo en modelo murino mediante administración en alimento, intramuscular, inhalación e instilación intratraqueal (incorporación lenta de una sustancia gota a gota en el cuerpo). Se encontró que

la exposición por periodos prolongados de 14 y 28 días induce respuestas inflamatorias y biodistribución tisular diferente (Park *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2011; Kobos *et al.*, 2020; Recordati *et al.*, 2021), por lo que no es descabellado pensar, que al ser AgNPs, partículas extrañas al cuerpo del camarón, estas tienen el potencial de desencadenar una respuesta inmunológica similar. Ante este modelo, Ochoa-Meza *et al.* (2019) reportaron que la aplicación terapéutica de una dosis intramuscular de 1200 ng de AgNPs/g de camarón, es capaz de generar una respuesta inmune sin causarle efectos dañinos, produciendo una alta expresión del gen LGBP, que es una proteína de unión a lipopolisacáridos y β -1,3-glucanos de hongos y bacterias Gram negativas e incluso se ha visto actividad en respuesta a infecciones virales en fase aguda (Roux *et al.*, 2002). En este contexto, se ha visto actividad del transcrito de LGBP en hemocitos de camarón en respuesta a infecciones con *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio anguillarum* y *Staphylococcus aureus* (Cheng *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2009). Esto significa que, durante el proceso de infección, LGBP es una proteína versátil y una vez unidas a sus respectivos patrones moleculares (PAMPs; e.g. lipopolisacárido, β -glucanos) presentes en los patógenos, activan el sistema proPO (profenoloxidasas), el cual juega un papel fundamental en la cascada inmunológica del camarón (Roux *et al.*, 2002; Cheng *et al.*, 2005).

Las células regulan sus actividades modulando la expresión de sus genes y en proporción al número de copias de ARN mensajero (ARNm) o transcrito de un gen determinado. Este es un hecho crucial a la hora de identificar la presencia de productos celulares específicos, ya que el ARNm se traduce para formar la proteína. Así es posible inferir la producción de proteínas específicas si se conoce la expresión de los genes (Fierro-Coronado *et al.*, 2019). En este sentido, evaluamos la expresión de los genes PEN-4, Crustin, PAP, Rab6 y proPO durante una serie de tiempo (0, 6, 12 y 24 h) después de suministrar las AgNPs, para determinar si la administración de AgNPs promueve un efecto inmunoestimulante en el camarón. Aunque se registraron diferencias en la expresión de los genes, no hubo significancia entre las mismas. Este resultado mostró que las AgNPs no tienen efecto inmunoestimulante, reforzando la hipótesis de que su efecto antimicrobiano es por contacto directo con el patógeno. Además, sugiere que por su constitución no son detectadas por el sistema inmune como un agente extraño.

En contraste, la expresión del gen proPO en los camarones tratados con AgNPs mostró un descenso significativo con respecto al control a las 48 h. Rosa & Barraco (2010) mencionan que, las crustinas juegan un papel fundamental en la inmunidad de crustáceos y durante procesos inflamatorios, éstas pueden regular la cascada proteica del sistema proPO. En este contexto y acorde al estudio de expresión de los 4 genes evaluados, podemos concluir que las AgNPs adicionadas en el alimento no inducen un efecto inmunoestimulante, y que el efecto antiviral caracterizado se debe, más bien, a la interacción directa de las AgNPs con el virus WSSV.

8.7 Efecto de la toxicidad crónica de AgNPs incluidas en la alimentación por intervalos de tiempo

La toxicidad de las AgNPs puede depender del organismo, dosis administrada y frecuencia de exposición entre otras. El efecto puede variar y generar bioacumulación, el cual puede promover respuestas inmunológicas, inflamatorias y de toxicidad, que influyen en el comportamiento, crecimiento y supervivencia de los organismos tratados (Camacho-Jiménez *et al.*, 2020). También, se ha demostrado que la exposición crónica de AgNPs desnudas (sin adyuvante) resulta en un mayor grado de toxicidad con respecto a las AgNPs recubiertas con polímeros (*e.g.* PVP) (Lekamge *et al.*, 2020). En este sentido, Chan & Chiu, (2015) evaluaron el efecto en términos de bioacumulación, crecimiento, desarrollo y metamorfosis producidos por la exposición crónica a dos concentraciones de AgNPs y a AgNO₃ durante el periodo larvario de *Balanus Amphitrite*, *Crepidula onyx* y *Hydroides elegans*. Después de 8 días de exposición, observaron que la bioacumulación de Ag⁺ a partir de AgNPs recubiertas con PVP o ácido oleico era menor que en las larvas expuestas a AgNO₃. Sin embargo, observaron que las larvas tratadas con ambas AgNPs, experimentaron un retraso significativo en el crecimiento y desarrollo comparados con el grupo control.

En ratas, se han realizado pruebas de toxicidad sub-crónica de AgNPs por vía oral hasta por 90 días, y han encontrado cúmulos de AgNPs en el hígado y riñones de los roedores, lo que podría sugerir que los tejidos análogos en invertebrados marinos como el camarón (*e.g.*, hepatopáncreas) podrían ser los órganos diana de bioacumulación de este material (Kim *et al.*, 2010; Camacho-Jiménez *et al.*, 2020). Esta hipótesis, fue comprobada por Bianchini *et al.*,

(2007), en los camarones *Penaeus duorarum* expuestos a una concentración de 1 y 10 $\mu\text{g/L}$ de plata iónica (AgNO_3) en agua marina por 48 h y observaron que el metal se acumuló en hepatopáncreas de forma dependiente de la dosis, lo que sugiere un papel clave de este órgano en la desintoxicación de plata. Asimismo, Maldonado-Muñiz *et al.*, (2019) confirmaron una rápida acumulación de Ag^+ en hepatopáncreas de camarones expuestos a alimentos suplementados con 1000 y 10,000 $\mu\text{g/g}$ de alimento durante 7 días. El consumo de AgNPs produjo una bioacumulación dosis dependiente y mostró una rápida tasa de acumulación en hepatopáncreas en este corto periodo.

En el presente estudio, se sometieron camarones a AgNPs en el alimento con varios periodos de suministro por 28 días, al concluir el periodo, no se registró mortalidad, retraso en el crecimiento, diferencias en la tasa de conversión alimenticia (FCA) comparado con el control. Esto sugiere que las variables zootécnicas no son afectadas, cuando los organismos son alimentados con AgNPs diariamente o en frecuencias de tiempo de cada 4 o 7 días. Estos resultados coinciden con Sivaramasamy *et al.* (2016), al no encontrar efectos significativos de supervivencia, crecimiento, factor de conversión alimenticia (FCA) y una alta resistencia a *Vibrio parahaemolyticus* en camarones *P. vannamei* ($6,82 \pm 2,16$ g) alimentados con AgNPs sintetizadas en *Bacillus subtilis* a una concentración de 10,000 $\mu\text{g/g}$ durante 65 días. En contraparte, Ribeiro *et al.* (2014) encontraron efectos de toxicidad crónica en *Daphnia magna* después de 21 días de exposición a concentraciones de AgNPs por encima de 1 $\mu\text{g/L}$, lo que afectó la tasa de alimentación y la reproducción.

El efecto de la toxicidad crónica se evaluó mediante análisis histológico a nivel de daño en el hepatopáncreas. Los resultados mostraron una relación directa entre la cantidad de plata suministrada con el nivel de daño en las células de hepatopáncreas, registrándose múltiples lesiones en este tejido, principalmente en camarones alimentados con AgNPs diariamente. Entre los daños observados se evidenció una disminución significativa del diámetro de células B y un aumento de infiltración hemocítica. En este contexto, la reducción de las células B (epiteliales de los túbulos hepatopancreáticos) ha sido considerado como indicativo de daño en hepatopáncreas, ya que son responsables de la digestión intracelular debido a su alto contenido

de enzimas digestivas para facilitar este proceso (Frías-Espericueta *et al.*, 2008; Franceschini-Vicentini *et al.*, 2009; Morales-Covarrubias *et al.*, 2016b). Una disminución de la cantidad o diámetro de las células B está asociado a la utilización de sus reservas de nutrientes, debido a un aumento en la demanda de energía por la osmorregulación y también puede ser indicativo de una mayor demanda de energía en el organismo para su supervivencia, al no haber suficiente absorción de alimento (Flores-Chavarria, 2018). Por otra parte, un aumento de infiltración hemocítica en cualquier tejido, está ligado a respuestas inflamatorias y reparación de heridas (Morales-Covarrubias *et al.*, 2016b). Este evento inmunológico inicia cuando la sustancia o partículas son reconocidas mediante proteínas de reconocimiento de patrones que se producen en el camarón, que le indican al organismo la presencia de los agentes invasores (Barracco *et al.*, 2014). Al ser reconocidos como agentes extraños al organismo, los hemocitos migran al sitio de infección o herida, iniciando el proceso de fagocitosis, formación de nódulos o encapsulación con la finalidad de neutralizarlos y eliminarlos (Jiravanichpaisal *et al.*, 2006). Por el contrario, los camarones tratados con AgNPs en el alimento una sola vez a la semana, no mostraron daños significativos en el diámetro de células B, infiltración hemocítica, grado de necrosis, desprendimiento celular o atrofia del tejido. Probablemente, esto se deba a la capacidad de eliminar y/o depurar los excesos de plata metálica por sí mismos, impidiendo la bioacumulación en el tejido. En contra parte, Chávez-Sánchez *et al.* (2020) observaron alteraciones histopatológicas significativas en musculo, branquias, glándula antenal, corazón, órgano linfoide y tejido conectivo de todos los camarones (tallas 5.3 gramos de peso de los especímenes) que fueron inyectados con dosis de 3.6 hasta 7.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de AgNPs (conversión a dosis de 679 a 1339 ng/g) por 11 días de exposición. Las alteraciones consistieron en necrosis en células epiteliales con infiltración hemocítica y formación de nódulos hemocíticos acompañado por melanización y depósitos negros con mortalidades de un 20% con la dosis más alta. Posiblemente, estas alteraciones fueron más notorias, ya que fueron aplicadas intramuscularmente e iniciaron cuando las AgNPs se liberaron del hemocele hacia los tejidos mencionados debido al sistema circulatorio abierto que tiene este organismo. Por el contrario, en este estudio, el daño celular registrado después de 28 días de exposición fue menor, posiblemente porque las AgNPs tuvieron que ser internalizadas en las células del camarón desde el exterior a través del tracto digestivo. Además, no se registró mortalidad durante los 28 días de cultivo. Será necesario un

estudio más exhaustivo durante un periodo de tiempo más largo (40-60 días) para confirmar que puede provocarse un daño más severo en este tejido.

8.8 Respuesta antiviral en camarones sobrevivientes a toxicidad crónica ante una infección experimental de WSSV

Para evaluar, si el efecto antiviral perdura en el camarón durante una exposición crónica de AgNPs, incorporamos 1000 µg de AgNPs por gramo de alimento (1000 µg/g) y lo aplicamos en la dieta en camarones en 3 frecuencias durante 28 días. Posteriormente, se infectaron con tejido infectado con WSSV con la finalidad de emular una infección natural. Los resultados mostraron, que el efecto antiviral se mantiene a manera dosis dependiente de la frecuencia alimenticia de AgNPs, es decir, el efecto antiviral disminuye acorde se aumenta la frecuencia de alimentación con AgNPs. En este contexto, la alimentación continua y/o diaria mostró un efecto similar al control (camarones infectados), obteniendo un porcentaje de supervivencia inferior al 10%, pero los signos clínicos y mortalidades fueron más aceleradas, lo que indica un efecto de toxicidad mediado por estrés en los camarones y cuando fueron sometidos a infección por WSSV, el sistema inmunológico se encontraba debilitado. Esta afirmación fue corroborada con el estudio de histología, el cual reveló daño significativo en camarones alimentados diariamente con AgNPs comparado con el resto de los tratamientos.

Por otra parte, los resultados también mostraron que el efecto antiviral de las AgNPs (Argovit-4[®]) es más potente cuando es aplicado en intervalos más largos, que de forma continua. En este contexto, la aplicación de cada 7 días o semanalmente parece ser la mejor estrategia para prevenir una infección por WSSV en el cultivo sin afectar el crecimiento y factor de conversión alimenticia. Esto coincide con Sivaramasamy *et al.* (2016), al no encontrar efectos significativos de supervivencia, crecimiento y factor de conversión alimenticia (FCA) en camarones *P. vannamei* (6,82 ± 2,16 g) alimentados con AgNP acarreada en *Bacillus subtilis* a una concentración de 10,000 ppm durante 65 días. Además, presentaron una alta resistencia a *Vibrio parahaemolyticus* positivo a AHPND.

Para complementar este trabajo, se evaluó la respuesta antiviral de las AgNPs en camarones sobrevivientes al estudio de toxicidad crónico ante WSSV mediante PCR cuantitativo, el cual resulta una herramienta útil para evaluar el efecto de inmunocompetencia en camarones bajo condiciones específicas (Pourmozaffar *et al.*, 2017; Soto-Alcalá *et al.*, 2018; Fierro-Coronado *et al.*, 2019; Han *et al.*, 2021). El camarón depende de su sistema inmunológico para protegerse de patógenos o partículas extrañas que dañen la integridad del organismo o generen problemas de salud (Barraco *et al.*, 2014). Su sistema inmunológico es mediado principalmente por hemocitos, los cuales generan una amplia variedad de respuestas celulares (e.g fagocitosis, encapsulación, formación de nódulos) y humorales (e.g. activación de sistema proPO, aglutininas, péptidos antimicrobianos) que se conjugan para eliminar el patógeno y reparación de heridas (Kulkarni *et al.*, 2021). La activación del sistema proPO estimula la producción de melanina y metabolitos oxidativos (Sritunyalucksana & Söderhäll 2000). El sistema ProPO y la fagocitosis son dos mecanismos de defensa esenciales contra patógenos en crustáceos (Sung *et al.*, 1996; Vazquez *et al.*, 2009). La proteína activadora de la fagocitosis está asociada con la vía de la fagocitosis y su expresión génica indica posible rol en respuesta del hospedero para resistir contra la infección de WSSV (Deachamag *et al.*, 2006; Shekhar *et al.*, 2012). En esta investigación, los niveles de expresión de PAP y ProPO no fueron sobre-regulados, por el contrario, disminuyeron en los tratamientos, comparado con el control después de 28 días de exposición, lo que sugiere que la plata parece inhibir los mecanismos de defensa esenciales en los camarones a largo plazo. Además, la expresión de los genes PAP y ProPO después del cultivo fue consistente con los datos de mortalidad. Esto concuerda con Romo-Quíñonez *et al.* (2020) que demostraron que la expresión de los genes PAP y ProPO no se ve afectada en camarones alimentados con Argovit-4[®] a las 6, 12, 24 y 48 horas después del suministro de alimento medicado. Auguste *et al.* (2018) mencionan que la exposición aguda (30 min) de hemocitos de mejillón (*Mytilus galloprovincialis*) a AgNPs no afectó su capacidad fagocítica. Juárez-Moreno *et al.* (2017), demostraron que las AgNP inyectadas en camarones no modificaron el número de hemocitos en camarón blanco. Estos hallazgos sugieren que la exposición de AgNPs (Argovit-4[®]) no interfiere con la expresión de los genes del sistema inmunitario.

Por otro lado, después de la infección con WSSV, los niveles de expresión de PAP y ProPO mostraron un comportamiento significativo, obteniendo su pico máximo a las 6 h en el tratamiento D1, donde fue mayor el contenido de AgNPs en los organismos, dado la frecuencia alimenticia recibida (diaria), sugiriendo un proceso de inmunoestimulación comparado con el resto de los tratamientos. No obstante, este tratamiento resultó la mayor mortalidad durante el bioensayo de reto. Esto nos hace inferir que el camarón a nivel fisiológico, está más ocupado por regular su homeóstasis por su alto contenido de AgNPs disponible que la misma infección. Contradictoriamente a lo anterior, el tratamiento D7 donde fue menor la AgNPs recibida, fue menor la mortalidad y parece indicar que el contenido de AgNPs disponibles fue suficiente para bloquear y/o inhibir la infección de WSSV, así como una mejor regulación homeostática por parte del organismo para depurarlo sin causarle daño.

Las lectinas juegan un papel esencial en muchos procesos biológicos, como efectores moleculares en el tráfico de proteínas, señalización celular y reconocimiento de patógenos debido a su capacidad para unirse a los carbohidratos (Wang & Wang, 2013). En este estudio, la alimentación de AgNPs incluidas en la dieta con las frecuencias mencionadas, no afectaron la expresión de CTL-3 antes de la infección por WSSV. Sin embargo, el gen CTL-3 aumentó después de la infección en camarones alimentados con AgNPs diariamente a las 6 h de exposición al virus. Esto fue similar a lo encontrado con PAP y proPO. En este contexto, se sabe que, en algunos casos, las lectinas mejoran la fagocitosis y protegen contra WSSV (Zhao *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2013). No obstante, en otros casos, las lectinas facilitan la infección (Zhao *et al.*, 2011; Dai *et al.*, 2016; Huang *et al.*, 2022). Por lo tanto, los resultados de este estudio sugieren que CTL-3 no estuvo involucrado en el mecanismo de defensa contra WSSV.

Los péptidos antimicrobianos (AMP) son componentes involucrados en los mecanismos de defensa contra patógenos en muchos organismos (Brown & Hancock, 2006). Las penaeidinas y crustinas son un tipo de AMPs específico del camarón (Destoumieux *et al.*, 1997; Padhi *et al.*, 2012; Barraco *et al.*, 2014), y varias penaeidinas y crustinas han mostrado actividad contra WSSV (García *et al.*, 2009; Antony *et al.*, 2011; Antony *et al.*, 2011b; Sun *et al.*, 2017). Sin embargo, en algunos casos, se ha regulado su expresión a la baja después de la infección por

WSSV (Jeswin *et al.*, 2013; Xue *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2018). Este estudio muestra que la expresión de PEN3 y Crustina no mostraron una afectación por las AgNPs ante WSSV en el tratamiento donde fue mayor el contenido de AgNPs en los organismos (tratamiento D1) en relación al control. Por el contrario, el resto de los tratamientos mostraron una expresión a la baja. Esto nos indica que su expresión podría no modular una respuesta inmune por la exposición de AgNPs.

9. CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente trabajo permiten concluir lo siguiente:

1. Las cinco formulaciones de AgNPs evaluadas en este proyecto tienen propiedades antivirales contra WSSV, siendo Argovit-4[®] la más eficiente.
2. El efecto antiviral de las AgNPs es por contacto directo con los viriones del WSSV.
3. Las concentraciones evaluadas de Argovit-4[®] no causaron mortalidad por toxicidad aguda o crónica en camarones por vía intramuscular o suministradas en alimento.
4. El alimento medicado con Argovit-4[®] protegió al camarón contra WSSV.
5. Las AgNPs incluidas en el alimento no son inmunoestimulantes en el camarón.
6. La aplicación de 1000 µg/g de Argovit-4[®] por gramo de alimento, no interfiere con el desempeño productivo del camarón.
7. Estos resultados sugieren que Argovit-4[®] incluido en el alimento podría ser usado para prevenir una infección por WSSV y considerarse un candidato seguro para salvaguardar los sistemas de acuicultura en el futuro.

9.1 Perspectivas

Dado que la incorporación de AgNPs (Argovit[®]) en alimento mostró ser una alternativa como estrategia experimental contra WSSV, entonces podría ser extrapolada a cultivos comerciales. Por otra parte, se debe llevar a cabo un bioensayo de toxicidad crónica durante todo un ciclo de cultivo y con distintas frecuencias alimenticias. Estos resultados darían una base sólida para determinar que concentración y que frecuencia alimenticia resulta con una mejor actividad antiviral sin llegar a ser tóxica. Otro punto importante es determinar si las AgNPs continúan activas después de ser sometidas a un proceso industrial de producción de alimento. Finalmente realizar un estudio costo-beneficio para determinar si es factible su aplicación en campo y de ser así, proceder a estudios piloto de aplicación.

10. LITERATURA CITADA

- Acedo-Valdez, M.R., Grijalva-Chon, J.M., Larios-Rodríguez, E., Maldonado-Arce, A.D., Mendoza-Cano, F., Sanchez-Paz, J.A., Castro-Longoria, R. 2017. Antibacterial effect of biosynthesized silver nanoparticles in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) infected with necrotizing hepatopancreatitis bacterium (NHP-B). *Latin American Journal of Aquatic Research*, 45(2):421–430. <https://doi.org/10.3856/vol45-issue2-fulltext-17>
- Ahamed, M., Posgai, R., Gorey, T.J., Nielsen, M., Hussain, S.M., Rowe J.J. 2010. Silver nanoparticles induced heat shock protein 70, oxidative stress and apoptosis in *Drosophila melanogaster*. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 242:263–269. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.10.016>
- Ahamed, M., Siddiqui M.K.J. 2007. Low level lead exposure and oxidative stress: Current opinions. *Clinica Chimica Acta*, 383:57–64. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2007.04.024>
- Aïzonou, R., Achoh, M.E., Hountcheme, I.A.C., Agadjihouédé, H., Ahouanssou-Montcho, S., Montchowui, E. 2021. Zootechnical Knowledge of floating cage aquaculture in freshwaters ecosystems and load capacity determination: Review. *Egyptian Journal of Aquatic Research*, 47(1):81-86. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2020.10.013>
- Alkilany, A.M., Murphy, C.J. 2010. Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles: what we have learned so far?. *Journal of Nanoparticle Research*, 12(7):2313. <https://doi.org/10.1007/s11051-010-9911-8>
- Álvarez Ruiz, P., Mejía-Ruiz, C.H., Magallón-Barajas, F.J., Escobedo-Bonilla, C.M. 2013. Silencing Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* LvRab7 reduces mortality in brooders challenged with white spot syndrome virus. *Aquaculture Research*, 44:772–782 <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.03084.x>.
- Álvarez-Ruiz, P. 2012. Inducción de la actividad antiviral por el silenciamiento del gen endógeno rab7 en *Litopenaeus vannamei* mediante RNA de interferencia. Tesis Doctoral en Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales, Centro de Investigaciones Biológica del Noroeste. La Paz, Baja California Sur, México.
- Álvarez-Ruiz, P., Luna-González, A., Escamilla-Montes, R., Mejía-Ruiz, C.H., Magallón-Barajas, F.J., Llera-Herrera, R. Galván-Alvarez, D.A. 2015. Long-lasting Effect Against White Spot Syndrome Virus in Shrimp Broodstock, *Litopenaeus vannamei*, by LvRab7 Silencing. *Journal of the World Aquaculture Society*, 46(6):571–582. <https://doi.org/10.1111/jwas.12236>
- Álvarez-Sánchez, A.R., Nolasco-Soria, H. Mejía-Ruiz, H. 2017. *In vitro* digestibility of specific dsRNA by enzymes of digestive tract of shrimp. *RevMVZ Córdoba*, 22(2):5867–5880. <https://doi.org/10.21897/rmvz.1024>

- Albanese, A., Tang, P.S., Chan, W.C.W. 2012. The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 14:1–16. <http://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071811-150124>
- Almanza-Reyes, H., Moreno, S., Plascencia-López, I., Alvarado-Vera, M., Patrón-Romero, L., Borrego, B., Reyes-Escamilla, A., Valencia-Manzo, D., Brun, A., Pestryakov, A., Bogdanchikova, N. 2021. Evaluation of silver nanoparticles for the prevention of SARS-CoV-2 infection in health workers: *In vitro* and *in vivo*. *PLoS ONE*, 16(8):e0256401. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0256401>
- Almonaci-Hernández, C.A, Juárez-Moreno, K., Castañeda-Juarez, M.E., Almanza-Reyes, H., Pestryakov, A., Bogdanchikova, N. 2017. Silver Nanoparticles for the Rapid Healing of Diabetic Foot Ulcers. *International Journal of Medical Nano Research*, 4(1): 19. <http://doi.org/10.23937/2378-3664.1410019>
- Almonaci-Hernández, C.A, Luna-Vazquez-Gomez, R., Luna-Vazquez-Gomez, R.A, Valenciano-Vega, J.I., Carriquiry-Chequer, N.I., Rembao-Hernández, A., Gomez-Zendejas, M.L., Almanza-Reyes, H., Garibo-Ruiz, D., Pestryakov, A., Bogdanchikova, N. 2020. Nanomedicine Approach for the Rapid Healing of Diabetic Foot Ulcers with Silver Nanoparticles. *Journal of Clinical and Medical Images*, 3(2): 1-7.
- Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., Barka, S., Pellerin, J., Rainbow, P.S. 2006. Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquat Toxicol*, 76:160–202. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.08.015>
- Andrews S. 2010. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>
- Angthong, P., Watthanasurorot, A., Klinbunga, S., Ruangdej, U., Soderhall, I., Jiravanichpaisal, P. 2010. Cloning and characterization of a melanization inhibition protein (PmMIP) of the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Fish & Shellfish Immunology*, 29:464–468. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.05.014>
- Antony, S.P., Philip, R., Joseph, V., Singh, I.S.B. 2011. Anti-lipopolysaccharide factor and crustin-III, the anti-white spot virus peptides in *Penaeus monodon*: Control of viral infection by up-regulation. *Aquaculture*, 319(1–2):11–17. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.06.022>
- Antony, S.P., Singh, I.S.B., Sudheer, N.S., Vrinda, S., Priyaja, P., Philip, R. 2011b. Molecular characterization of a crustin-like antimicrobial peptide in the giant tiger shrimp, *Penaeus monodon*, and its expression profile in response to various immunostimulants and challenge with WSSV. *Immunobiology*, 216(1–2):184–194. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2010.05.030>

- Apún-Molina, J.P., Robles-Romo, A., Alvarez-Ruiz, P., Santamaria-Miranda, A., Arjona, O., Racotta, I.S. 2017. Influence of stocking density and exposure to white spot syndrome virus in biological performance, metabolic, immune, and bioenergetics response of whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 479:528–537. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.06.027>
- Aragonés, J., Fraisl, P., Baes, M., Carmeliet, P., 2009. Oxygen Sensors at the Crossroad of Metabolism. *Cell metabolism*, 9(1):11-22. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.10.001>
- Arvizo, R.R., Bhattacharyya, S., Kudgus, R.A., Giri, K., Bhattacharya, R., Mukherjee, P. 2012. Intrinsic therapeutic applications of noble metal nanoparticles: past, present and future. *Chemical Society Reviews*, 41:2943–2970. <https://doi.org/10.1039/c2cs15355f>
- Arulvasu, C., Jennifer, S.M., Prabhu, D., Chandhirasekar, D. 2014. Toxicity effect of silver nanoparticles in brine shrimp artemia. *The Scientific World Journal*, 2:256919–256929. <https://doi.org/10.1155/2014/256919>
- AshaRani, P.V., Hande, M.P., Valiyaveetil, S. 2009. Anti-proliferative activity of silver nanoparticles. *BMC Cell Biology*, 10:65. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-10-65>
- Auguste, M., Ciacci, C., Balbi, T., Brunelli, A., Caratto V., Marcomini, A., Cuppini, R., Canesi, L. 2018. Effects of nanosilver on *Mytilus galloprovincialis* hemocytes and early embryo development. *Aquatic Toxicology*, 203:107–116. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.08.005>
- Avalos, A., Haza, A.I., Mateo, D., Morales, P. 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.
- Barakat, K.M., El-Sayed, H.S., Gohar, Y.M. 2016. Protective effect of squilla chitosan silver nanoparticles for *Dicentrarchus labrax* larvae infected with *Vibrio anguillarum*. *International Aquatic Research*, 8(2):179–189. <https://doi.org/10.1007/s40071-016-0133-2>.
- Baram-Pinto, D., Shukla, S., Perkas, N., Gedanken, A., Sarid, R. 2009. Inhibition of herpes simplex virus type 1 infection by silver nanoparticles capped with mercaptoethane sulfonate. *Bioconjugate Chemistry*, 20(8):1497–1502. <https://doi.org/10.1021/bc900215b>
- Barracco, M.A., Perazzolo, L.M., Rosa, R.D. 2014. Avances en la inmunología del camarón. En: Morales, V. y Cuéllar-Anje, J. (eds.). 2014. Guía Técnica Patología e Inmunología de Camarones Penaeidos. OIRSA, Panamá, República de Panamá. pp. 382.
- Barreto, M.L., Teixeira, M.G., Carmo, E.H., 2006. Infectious diseases epidemiology. *Journal of epidemiology and community health*, 60(3):192–5. <https://doi.org/10.1136/jech.2003.011593>.

- Banumathi, B., Vaseeharan, B., Suganya, P., Citarasu, T., Govindarajan, M., Alharbi, N.S., Kadaikunnan, S., Khaled, J.M., Benelli, G. 2017. Toxicity of Camellia sinensis-fabricated silver nanoparticles on invertebrate and vertebrate organisms: morphological abnormalities and DNA damages. *J Clust Sci*, 28:2027–2040. <https://doi.org/10.1007/s10876-017-1201-5>
- Bell, T.A., Lightner, D.V. 1988. A Handbook of Normal Penaeid Shrimp Histology. *World Aquaculture Society*.
- Benjamini, Y., Hochberg, Y. 1995. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*, 57(1):289–300. <https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x>
- Bi, J., Ning, M., Xie, X., Fan, W., Huang, Y., Gu, W., Wang, W., Wang, L., Meng, Q. 2020. A typical C-type lectin, perlucin-like protein, is involved in the innate immune defense of whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology*, 103:293–301. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.05.046>
- Bianchini, A., Playle, E.C., Wood, C.M., Walsh, O.J. 2007. Short-term silver accumulation in tissues of three marine invertebrates: shrimp *Penaeus duorarum*, sea hare *Aplysia californica*, and sea urchin *Diadema antillarum*. *Aquat Toxicol*, 84:182–189. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.02.021>
- Bidula, S., Sexton, D.W., Schelenz, S. 2019. Ficolins and the recognition of pathogenic microorganisms: An overview of the innate immune response and contribution of single nucleotide polymorphisms. *Journal of Immunology Research*, 2019:1–13. <https://doi.org/10.1155/2019/3205072>
- Bogdanchikova, N., Vázquez-Muñoz, R., Huerta-Saquero, A., Pena-Jasso, A., Aguilar-Uzcanga, G., Picos-Díaz, P.L., Pestryakov, A., Burmistrov, V., Martynyuk, O., Luna-Vazquez-Gomez, R., Almanza, H. 2016. Silver nanoparticles composition for treatment of distemper in dogs. *International Journal of Nanotechnology*, 13(1–3):227–237. <https://doi.org/10.1504/IJNT.2016.074536>
- Bolger, A.M., Lohse, M., Usadel, B. 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15):2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- Bonekamp, N.A., Völkl, A., Fahimi, H.D., Schrader, M. 2009. Reactive oxygen species and peroxisomes: Struggling for balance. *Biofactors*, 35(4):346–55. <https://doi.org/10.1002/biof.48>
- Boraschi, D., Italiani, P., Palomba, R., Decuzzi, P., Duschl, A., Fadeel, B., Moghimi, S.M. 2017. Nanoparticles and innate immunity: new perspectives on host defence. *Seminars in Immunology*, 34:33–51. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2017.08.013>

- Borrego, B., Lorenzo, G., Mota-Morales, J.D., Almanza-Reyes, H., Mateos, F., López-Gil, E., de la Losa, N., Burmistrov, V.A., Pestryakov, A.N., Brun, A., Bogdanchikova, N. 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. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2016.01.021>
- Bray, N.L.H., Pimentel, P., Melsted, L., Pachter. 2016. Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. *Nat Biotechnol*, 34:525–527. <https://doi.org/10.1038/nbt.3519>
- Bravo-Guerra, C., Cáceres-Martínez, J., Vásquez-Yeomans, R., Pestryakov, A., Bogdanchikova, N. 2020. Lethal effects of silver nanoparticles on *Perkinsus marinus*, a protozoan oyster parasite. *Journal of Invertebrate Pathology*, 169:107304. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2019.107304>
- Brown, K.L., Hancock, R.E.W. 2006. Cationic host defense (antimicrobial) peptides. *Current Opinion in Immunology*, 18 24-30. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2005.11.004>
- Bulet, P., Stöcklin, R., Menin, L. 2004. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol Rev*, 198:169–184. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.0124.x>
- Bustillos-Ruiz, M.I., Escobedo-Bonilla, C.M., Sotelo-Mundo, R.R. 2009. Revisión de patogénesis y estrategias moleculares contra el virus del síndrome de la mancha blanca en camarones peneidos. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 44(1):1–11. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-19572009000100001>
- Cárcamo-Aréchiga, N., Grijalva-Chon, J.M., Hernández-López, J., Varela-Romero, A., López-Torres, M.A., Medina-Juárez, L.A. 2016. Mecanismos De Defensa De Los Camarones Peneidos Durante Un Proceso Infeccioso: Una Revisión. *BIOtecnia*, 18(1):32–42. <https://doi.org/10.18633/bt.v18i1.242>
- Carlson, C., Hussain, S.M., Schrand, A.M., Braydich-Stolle, L.K., Hess, K.L., Jones, R.L., Schlager, J.J. 2008. Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size dependent generation of reactive oxygen species. *Journal of Physical Chemistry B*, 112:13608–13619. <https://doi.org/10.1021/jp712087m>
- Carpenè E., Camatti A., Isani G., Cattani O., Cortesi P. 1992. Cd-metallothionein in liver and kidney of goldfish (*Carassius auratus*): Effects of temperature and salinity. *Ital J Biochem*, 41:273–282
- Campa, A., Luna, A. 2011. Respuesta inmune en camarón blanco, *Litopenaeus vannamei*, expuesto a infecciones bacterianas y virales. En: Cruz-Suárez, L.E., Rique-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Villarreal-Cavazos, D.A., Gamboa-Delgado, J., Hernández-Hernández, L. (Eds), Avances en Nutrición Acuícola XI - Memorias del Décimo Primer Simposio Internacional de Nutrición Acuícola, 23-25 de Noviembre, San Nicolás de los

- Garza, N.L., México. ISBN 978-607-433-775-4. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México, pp. 317–344.
- Camacho-Jiménez, L., Álvarez-Sánchez, A.R., Mejía-Ruíz, C.H. 2020. Silver nanoparticles (AgNPs) as antimicrobials in marine shrimp farming: A review. *Aquaculture Reports*, 18:100512. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100512>
- Chan, C.Y.S., Chiu, J.M.Y., 2015. Chronic effects of coated silver nanoparticles on marine invertebrate larvae: A proof of concept study. *PLoS One*, 10(7):e0132457. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132457>
- Chávez-Sánchez, M.C., Abad-Rosales, S., Lozano-Olvera, R., Montoya-Rodríguez, L., Franco-Nava, M.Á., Mejía-Ruíz, C.H., Pestryakov, A., Bogdanchikova, N. 2021. Silver nanoparticles induce histopathological alterations in juvenile *Penaeus vannamei*. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(7):8224–8234. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-11175-3>
- Chávez-Sánchez, C., Higuera-Ciapara, I. 2003. Manual de buenas prácticas de producción acuícola de camarón para la inocuidad alimentaria. SAGARPA, SENASICA. Mazatlán, México. 96 p.
- Cheng, W., Liu, C.H., Tsai, C.H., Chen, J.C. 2005. Molecular cloning and characterisation of a pattern recognition molecule, lipopolysaccharide- and beta-1,3-glucan binding protein (LGBP) from the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, 18(4):297–310. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2004.08.002>.
- Chen, X., Schluesener, H.J. 2008. Nanosilver: a nanoparticle in medical application. *Toxicology Letters*, 176(1):1-12. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2007.10.004>
- Chen, N., Zheng, Y., Yin, J., Li, X., Zheng, C. 2013. Inhibitory effects of silver nanoparticles against adenovirus type 3 *in vitro*. *Journal of Virological Methods*, 193(2):470–477. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.07.020>
- Chen, Y.H., He, J.G. 2019. Effects of environmental stress on shrimp innate immunity and white spot syndrome virus infection. *Fish & Shellfish Immunology*, 84:744–755. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.10.069>
- Chen, D.D., Meng, X.L., Xu, J.P., Yu, J.Y., Meng, M.X., Wang, J. 2013. PclT, a novel C-type lectin from *Procambarus clarkii*, is involved in the innate defense against *Vibrio alginolyticus* and WSSV. *Developmental and Comparative Immunology*, 39:255-264. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dci.2012.10.003>
- Cho, W., Cho, M., Jeong, J., Choi, M., Cho, H.Y., Han, B.S., Kim, S.H., Kim, H.O., Lim, Y.T., Chung, B.H., Jeong, J. 2009. Acute toxicity and pharmacokinetics of 13 nm-sized PEG-coated gold nanoparticles. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 236:16–24. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2008.12.023>

- Choi, O., Hu Z. 2008. Size dependent and reactive oxygen species related nanosilver toxicity to nitrifying bacteria. *Environmental Science & Technology*, 42: 4583–4588. <https://doi.org/10.1021/es703238h>
- Chowdhury, I., Tharakan, B., Bhat, G.K. 2008. Caspases - an update. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 151(1):10–27. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2008.05.010>
- Cirillo, T., Cocchieri R.A., Fasano E., Lucisano A., Tafuri S., Ferrante M.C., Carpenè E., Andreani G., Isani G. 2012. Cadmium accumulation and antioxidant responses in *Sparus aurata* exposed to waterborne cadmium. *Arch Environ Contam Toxicol*, 62:118–126. <https://doi.org/10.1007/s00244-011-9676-9>
- Cota-Ruiz, K., Leyva-Carrillo, L., Peregrino-Uriarte, A.B., Valenzuela-Soto, E.M., Gollas-Galván, T., Gómez-Jiménez, S., Hernández, J., Yepiz-Plascencia, G. 2016. Role of HIF-1 on phosphofructokinase and fructose 1, 6-bisphosphatase expression during hypoxia in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 198:1-7. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.03.015>
- Coutiño, E.M.R., Ávila-Lagunes, L., Arroyo-Helguera, O. 2017. Las nanopartículas de plata: mecanismos de entrada, toxicidad y estrés oxidativo. *Revista de Educación Bioquímica*, 36(2):39–54.
- Dacoba, T.G., Olivera, A., Torres, D., Crecente-Campo, J., Alonso, M.J. 2017. Modulating the immune system through nanotechnology. *Seminars in Immunology*, 34:78–102 <https://doi.org/10.1016/j.smim.2017.09.007>
- Dananjaya, S.H.S., Godahewa, G.I., Jayasooriya, R.G.P.T., Lee, J., de Zoysa, M. 2016. Antimicrobial effects of chitosan silver nano composites (CAgNCs) on fish pathogenic *Aliivibrio* (*Vibrio*) *salmonicida*. *Aquaculture*, 450:422–430. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.08.023>
- Dai, Y., Wang, Y., Zhao, L., Qin, Z., Yuan, J., Qin, Q., Lin, L., Lan, J. 2016. A novel L-type lectin was required for the multiplication of WSSV in red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*). *Fish & Shellfish Immunology*, 55:48-55. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2016.05.020>
- de Lorgeril, J., Gueguen, Y., Goarant, C., Goyard, E., Mugnier, C., Fievet, J., Piquemal, D., Bachère, E. 2008. A relationship between antimicrobial peptide gene expression and capacity of a selected shrimp line to survive a *Vibrio* infection. *Mol Immunol*, 45:3438–3445. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2008.04.002>
- Deachamag, P., Intaraphad, U., Phongdara, A., Chotigeat, W. 2006. Expression of a phagocytosis activating protein (PAP) gene in immunized black tiger shrimp. *Aquaculture*, 225:165–175. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.01.010>

- Destoumieux, D., Bulet, P., Loew, D., Van Dorsselaer, A., Rodriguez, J., Bachère E. 1997. Penaeidins: a new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda). *J Biol Chem*, 272:28398–28406. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.45.28398>
- Dobrovolskaia, M.A., Shurin, M., Shvedova, A.A. 2016. Current understanding of interactions between nanoparticles and the immune system. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 299:78-89. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2015.12.022>
- Du, T., Lu, J., Liu, L., Dong, N., Fang, L., Xiao, S., Han, H. 2018. Antiviral activity of graphene oxide–silver nanocomposites by preventing viral entry and activation of the antiviral innate immune response. *ACS Applied Bio Materials*, 1(5):1286–1293. <https://doi.org/10.1021/acsabm.8b00154>
- Emerenciano, M.G.C., Miranda-Baeza, A., Martínez-Porchas, M., Poli, M.A., Vieira, F.N. 2021. Biofloc Technology (BFT) in Shrimp Farming: Past and Present Shaping the Future. *Frontiers in Marine Science*, 8:813091. <https://doi.org/10.3389/fmars.2021.813091>
- Elechiguerra, J.L., Burt, J.L., Morones, J.R., Camacho-Bragado, A., Gao, X., Lara, H.H., Yacaman, M.J. 2005. Interaction of silver nanoparticles with HIV-1. *Journal of Nanobiotechnology*, 3:1–10. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-3-6>
- Elumalai, D., Hemavathi, M., Deepaa, C.V., Kaleena, P.K. 2017. Evaluation of phytosynthesised silver nanoparticles from leaf extracts of *Leucas aspera* and *Hyptis suaveolens* and their larvicidal activity against malaria, dengue and filariasis vectors. *Parasite Epidemiology and Control*, 2(4):15-26. <https://doi.org/10.1016/j.parepi.2017.09.001>
- El-Mohamady, R.S., Ghattas, T.A., Zawrah, M.F., Abd El-Hafeiz, Y.G.M. 2018. Inhibitory effect of silver nanoparticles on bovine herpesvirus-1. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, 6(2):296-300 <https://doi.org/10.1016/j.ijvsm.2018.09.002>
- Escobedo-Bonilla, C.M., Alday-Sanz, V., Wille, M., Sorgeloos, P., Pensaert, M.B., Nauwynck, H.J. 2008. A review on the morphology, molecular characterization, morphogenesis and pathogenesis of white spot syndrome virus. *Journal of fish diseases*, 31(1):1–18. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2007.00877.x>
- Escobedo-Bonilla, C.M., L. Audoorn, M., Wille, V., Alday-Sanz, P., Sorgeloos, M.B., Pensaert, H., Nauwynck, H.J. 2006. Standardized white spot syndrome virus (WSSV) inoculation procedures for intramuscular or oral routes. *Diseases of Aquatic Organisms*, 68:181–188. <https://doi.org/10.3354/dao068181>
- Escobedo-Bonilla, C.M., Vega-Peña, S., Mejía-Ruiz, C.H. 2015. Efficacy of double-stranded RNA against white spot syndrome virus (WSSV) non-structural (*orf89*, *wsv191*) and structural (*vp28*, *vp26*) genes in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Journal of King Saud University - Science*, 27(2):182–188. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2014.11.004>

- Esparza-Leal, H.M., Ponce-Palafox, J.T., Álvarez-Ruiz, P. López-Álvarez, E.S., Vázquez-Montoya, N., López-Espinoza, M., Montoya-Mejía, M., Gómez-Peraza, R.L., Nava-Perez, E. 2020. Effect of stocking density and water exchange on performance and stress tolerance to low and high salinity by *Litopenaeus vannamei* postlarvae reared with biofloc in intensive nursery phase. *Aquaculture International*, 28:1473–1483. <https://doi.org/10.1007/s10499-020-00535-y>
- Fang, X., Wu, J., Wei, G., 1997. Irradiation-induced binding of metallothionein to DNA. *Radiat Phys Chem*, 50:471–473.
- FAO. 2020. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2020. La sostenibilidad en acción. Roma. <https://doi.org/10.4060/ca9229es>.
- Franceschini-Vicentini, I., Ribeiro, B., Papa, K., Marques-Junior, j., Vicentini, C.A., Valentini, P.M.C.M. 2009. Histoarchitectural features of the hepatopancreas of the Amazon river prawn *Macrobrachium amazonicum*. *International Journal Morphology*, 27(1):121–128. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022009000100022>
- Frías-Espericueta, M.G., Abad-Rosales, S., Nevárez-Velázquez, A.C., Osuna-López, I., Páez-Osuna, F., Lozano-Olvera, R., Voltolina, D. 2008. Histological effects of a combination of heavy metal son Pacific White shrimp *Litopenaeus vannamei* juveniles Aquatic. *Toxicology*, 89:152-157. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2008.06.010>
- Flegel, T.W., Sritunyalucksana, K. 2011. Shrimp molecular responses to viral pathogens. *Marine biotechnology*, 13(4):587–607. <https://doi.org/10.1007/s10126-010-9287-x>
- Flores-Chavarria, A.M. 2018. Alteraciones en tejidos y concentración de toxinas producidas por *Gymnodium catenatum* en juveniles de camarón (*Litopenaeus vannamei*). Tesis de Maestría en Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Fonseca-Moreno, E., González-Salas, R., Rico-Gutiérrez, R. 2013. Sistema inmune de los camarones. *AquaTIC*, 38:68–84.
- Fierro-Coronado, J.A., Luna-González, A., Caceres-Martínez, C.J., Álvarez-Ruiz, P., Escamilla-Montes, R., González-Ocampo, H.A., Peraza-Gómez, V. 2019. Effect of microbial immunostimulants on WSSV infection percentage and the expression of immune-related genes in white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 32(3):221–231. <https://doi.org/10.17533/udea.rccp.v32n3a07>
- Fuentes-Valencia, M.A., Fajer-Ávila, E.J., Chávez-Sánchez, M.C., Martínez-Palacios, C.A., Martínez-Chávez, C.C., Junqueira-Machado, G., Lara, H.H., Raggi, L., Gómez-Gil, B., Pestryakov, A., Bogdanchikova, N. 2020. Silver nanoparticles are lethal to the ciliate model Tetrahymena and safe to the pike silverside *Chirostoma estor*. *Experimental Parasitology*, 209:107825. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2019.107825>

- Galdiero, S., Falanga, A., Vitiello, M., Cantisani, M., Marra, V., Galdiero, M. 2011. Silver nanoparticles as potential antiviral agents. *Molecules*, 16(10):8894–8918. <https://doi.org/10.3390/molecules16108894>
- Galdiero, S., Rai, M., Gade, A., Falanga, A., Incoronato, N., Russo, L., Galdiero, M., Gaikwad, S., Ingle, A. 2013. Antiviral activity of mycosynthesized silver nanoparticles against herpes simplex virus and human parainfluenza virus type 3. *International Journal of Nanomedicine*, 8(1):4303–4314. <https://doi.org/10.2147/IJN.S50070>
- García-Palomo, J.D., Agüero-Balbín, J.A., Parra, B., Santos-Benito, M.F. 2010. Enfermedades Aspectos generales y específicos de las infecciones. *Medicine*, 10(49):3251-64.
- García-Rico, L., Robles-Burgueño, M.D.R., Valenzuela-Soto, E.M. 1999. Las metalotioneínas y su relación con la toxicidad del cadmio en los mamíferos. *Revista Internacional de Contaminacion Ambiental*, 15(2):113–120.
- García, J.C., Reyes, A., Salazar, M., Granja, C.B. 2009. Differential gene expression in White Spot Syndrome Virus (WSSV)-infected naïve and previously challenged Pacific white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. *Aquaculture*, 289:253–258. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.01.020>
- Granada-Ybern, M.L. 2006. Factor de crecimiento similar a la insulina y sus proteínas de transporte. *Endocrinología y Nutrición*, 53(7):467-475. [https://doi.org/10.1016/S1575-0922\(06\)71133-0](https://doi.org/10.1016/S1575-0922(06)71133-0)
- Gironella-Cos, M. 2010. Transcriptómica (mARN y miR). *Gastroenterología y Hepatología Continuada*, 9(4):160–164. [https://doi.org/10.1016/S1578-1550\(10\)70035-8](https://doi.org/10.1016/S1578-1550(10)70035-8)
- Gliga, A.R., Skoglund, S., Wallinder, I.O., Fadeel, B., Karlsson, H.L. 2014. Size-dependent cytotoxicity of silver nanoparticles in human lung cells: the role of cellular uptake, agglomeration and Ag release. *Particle and Fibre Toxicology*, 11:11.
- Gomes, T., Pereira, C.G., Cardoso, C., Sousa, V.S., Teixeira, M. R., Pinheiro, J.P., Bebianno, M.J. 2014. Effects of silver nanoparticles exposure in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Marine Environmental Research*, 101:208–214. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2014.07.004>
- Götz, S., García-Gómez, J.M., Terol, J., Williams, T.D., Nagaraj, S.H., Nueda, M.J., Robles, M., Talón, M., Dopazo, J., Conesa, A. 2008. High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. *Nucleic Acids Res*, 36(10):3420–35. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn176>
- Greulich, C., Diendorf, J., Simon, T., Eggeler, G., Epple, M., Köller, M. 2011. Uptake and intracellular distribution of silver nanoparticles in human mesenchymal stem cells. *Acta Biomaterialia*, 7(1):347-354. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.08.003>

- Gutiérrez-Dagnino, A., Fierro-Coronado, J.A., Álvarez-Ruíz, P., Flores-Miranda, M., Miranda-Saucedo, S., Medina-Beltrán, V., Escamilla-Montes, R. 2015. Efecto de la inulina y del ácido fúlvico en la supervivencia, crecimiento, sistema inmune y prevalencia de WSSV en *Litopenaeus vannamei*. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 43(5):912–921. <https://doi.org/10.3856/vol43-issue5-fulltext-11>
- Gutiérrez, A., Nieto, J., Pozo, F., VandenBosch, Van Soest, S., Schoofs, L. 2008. Characterization of Insulin-Like Peptides and Their Relation to Molt and Metabolism of the Shrimp *Litopenaeus vannamei*. 424-454 pp. Editores: L. Elizabeth Cruz Suárez, Denis Ricque Marie, Mireya Tapia Salazar, Martha G. Nieto López, David A. Villarreal Cavazos, Juan Pablo Lazo y Ma. Teresa Viana. Avances en Nutrición Acuícola IX. IX Simposio Internacional de Nutrición Acuícola. 24–27 noviembre. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México.
- Hamza-chaffai, A., Amiard, J.C., Pellerin, J., Joux, L., Berthet, B. 2000. The potential use of metallothionein in the clam *Ruditapes decussatus* as a biomarker of in situ metal exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 127:185–197. [https://doi.org/10.1016/s0742-8413\(00\)00147-x](https://doi.org/10.1016/s0742-8413(00)00147-x)
- Han, K., Chen, X., Wu, L., Zhang, Z., Ma, F., Huang, X., Zhang, Y., Ren, Q. 2018. Novel fibrinogen-related protein with single FReD contributes to the innate immunity of *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish and Shellfish Immunology*, 82:350–360. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.08.036>
- Han, J.E., Choi, S.K., Jeon, H.J., Park, J.K., Han, S.H., Jeong, J., Kim, J.H., Lee, J.M. 2021. Transcriptional response in the whiteleg shrimp (*Penaeus vannamei*) to short-term microplastic exposure. *Aquaculture Reports*, 20:100713. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100713>
- Hati, S., Bhattacharyya, S. 2020. Impact of thiol-disulfide balance on the binding of Covid-19 spike protein with angiotensin-converting enzyme 2 receptor. *ACS Omega*, 5:16292–16298. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c02125>
- Henry, R.P., Lucu, C.E., Onken, H., Weihrauch, D. 2012. Multiple functions of the crustacean gill: osmotic/ionic regulation, acid-base balance, ammonia excretion, and bioaccumulation of toxic metals. *Front Physiol*, 3(431):1–33. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00431>
- Hernández, M., Quijada, N.M., Rodríguez-Lázaro, D., Eiros, J.M. 2020. Bioinformatics of next generation sequencing in clinical microbiology diagnosis. *Revista Argentina de Microbiología*, 52(2):150-161. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.06.003>
- Hirono, I., Fagutao, F.F., Kondo, H., Aoki, T. 2011. Uncovering the Mechanisms of Shrimp Innate Immune Response by RNA Interference. *Marine Biotechnology*, 13(4):622–628. <https://doi.org/10.1007/s10126-010-9292-0>

- Horie, M., Kato, H., Fujita, K., Endoh, S., Iwahashi, H. 2012. *In vitro* evaluation of cellular response induced by manufactured nanoparticles. *Chemical Research in Toxicology*, 25:605–619. <https://doi.org/10.1021/tx200470e>
- Hsin, Y.H., Chen, C.F., Huang, S., Shih, T.S., Lai, P.S., Chueh, P.J. 2008. The apoptotic effect of nanosilver is mediated by ROS- and JNK dependent mechanism involving the mitochondrial pathway in NIH3T3 cells. *Toxicology Letters*, 179:130–139. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2008.04.015>
- Hu, R.L., Li, S.R., Kong, F.J., Hou, R.J., Guan, X.L., Guo, F. 2014. Inhibition effect of silver nanoparticles on herpes simplex virus 2. *Genetics and Molecular Research*, 13(3):7022–7028. <https://doi.org/10.4238/2014.March.19.2>
- Huang, Y.H., Kumar, R., Liu, Ch.H., Lin, S.S., Wang, H.C. 2022. A novel C-type lectin LvCTL 4.2 has antibacterial activity but facilitates WSSV infection in shrimp (*L. vannamei*). *Developmental and Comparative Immunology*, 126:104239. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2021.104239>
- Huy, T.Q., Hien-Thanh, N.T., Thuy, N.T., Van-Chung, P., Hung, P.N., Le, A.T., Hong Hanh, N.T. 2017. Cytotoxicity and antiviral activity of electrochemical – Synthesized silver nanoparticles against poliovirus. *Journal of Virological Methods*, 241:52–57. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2016.12.015>
- Isani, G., Carpenè, E. 2014. Metallothioneins, unconventional proteins from unconventional animals: a long journey from nematodes to mammals. *Biomolecules*, 4:435–457. <https://doi.org/10.3390/biom4020435>
- Ishwarya, R., Vaseeharan, B., Shanthi, S., Ramesh, S., Manogari, P., Dhanalakshmi, K., Vijayakumar, S., Benelli, G. 2016. Green synthesized silver nanoparticles: toxicity against *Poecilia reticulata* fishes and *Ceriodaphnia cornuta* crustaceans. *Journal of Cluster Science*, 28:519–527. <https://doi.org/10.1007/s10876-016-1126-4>
- Iwanaga, S., Lee, B.L. 2005. Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 38:128–150. <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2005.38.2.128>
- Jenkins, C.M., Yang, J., Sims, H.F., Gross, R.W., 2011. Reversible high affinity inhibition of phosphofructokinase-1 by Acyl-CoA: A mechanism integrating glycolytic flux with lipid metabolism. *J Biol Chem*, 286(14):11937-11950. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.203661>
- Jeremiah, S.S., Miyakawa, K., Morita, T., Yamaoka, Y., Ryo, A. 2020. Potent antiviral effect of silver nanoparticles on SARS-CoV-2. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 533(1):195–200. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.09.018>
- Jeswin, J., Anju, A., Thomas, P.C., Paulton, M.P., Vijayan, K.K. 2013. Survivability of *Penaeus monodon* during white spot syndrome virus infection and its correlation with immune

related genes. *Aquaculture*, 380-383:84–90.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.12.004>

Juárez-Moreno, K., Mejía-Ruiz, C.H., Díaz, F., Reyna-Verdugo, H., Re, A.D., Vazquez-Felix, E.F., Sánchez-Castrejón, E., Mota-Morales, J.D., Pestryakov, A., Bogdanchikova, N. 2017. Effect of silver nanoparticles on the metabolic rate, hematological response, and survival of juvenile white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Chemosphere*, 169:716–724.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.11.054>

Jiravanichpaisal, P., Lee, B.L., Söderhäll, K. 2006. Cell-mediated immunity in arthropods: Hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. *Immunobiology*. 211:213–236.
<https://doi.org/10.1016/j.imbio.2005.10.015>

Kanehisa, M., S. Goto, Y. Sato, M. Furumichi, M. Tanabe. 2012. KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular data sets. *Nucleic Acids Research*, 40:109–114.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkr988>

Kanehisa, M., Sato, Y., Morishima, K. 2016. BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG Tools for Functional Characterization of Genome and Metagenome Sequences. *J Mol Biol*, 428(4):726–731. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.11.006>

Kim, D., Langmead, B. Salzberg, S. 2015. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nat Methods*, 12:357–360. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3317>

Kim, Y.S., Song, M.Y., Park, J.D., Song, K.S., Ryu, H.R., Chung, Y.H., Chang, H.K., Lee, J.H., Oh, K.H., Kelman, B.J., Hwang, I.K., Yu, I.J., 2010. Subchronic oral toxicity of silver nanoparticles. *Particle and Fibre Toxicology*, 7:20. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-7-20>.

Kobos, L., Alqahtani, S., Xia, L., Coltellino, V., Kishman, R., McIlrath, D., Perez-Torres, C., Shannahan, J. 2020. Comparison of silver nanoparticle-induced inflammatory responses between healthy and metabolic syndrome mouse models. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues*, 83(7):249–268.
<https://doi.org/10.1080/15287394.2020.1748779>

Kohen, R., Nyska, A. 2002. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology*, 30:620–650. <https://doi.org/10.1080/01926230290166724>

Kondoh, M., Kamada, K., Kuronaga, M., Higashimoto, M., Takiguchi, M., Watanabe, Y., Sato, M., 2003. Antioxidant property of metallothionein in fasted mice. *Toxicology Letters*, 143(3):301–306. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(03\)00195-4](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(03)00195-4)

Kononenko, V., Narat, M., Drobne, D. 2015. Nanoparticle interaction with the immune system. *Arh Hig Rada Toksikol*, 66(2):97-108. <https://doi.org/10.1515/aiht-2015-66-2582>

- Kuballa, A.V., Elizur, A. 2008. Differential expression profiling of components associated with exoskeletal hardening in crustaceans. *BMC Genomics*, 9:1–14. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-575>
- Kulkarni, A., Krishnan, S., Anand, D., Kokkattunivarthil-Uthaman, S., Otta, S.K., Karunasagar, I., Kooloth-Valappil, R. 2021. Immune responses and immunoprotection in crustaceans with special reference to shrimp. *Reviews in Aquaculture*, 13(1):431–459. <https://doi.org/10.1111/raq.12482>
- Klaassen, C., Liu, J., Choudhuri, S., 1999. Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 39:267–294. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.39.1.267>
- Kyrychenko, A., Korsun, O.M., Gubin, I.I., Kovalenko, S.M., Kalugin, O.N. 2015. Atomistic Simulations of Coating of Silver Nanoparticles with Poly(vinylpyrrolidone) Oligomers: Effect of Oligomer Chain Length. *The Journal of Physical Chemistry C*, 119(14):7888–7899. <https://doi.org/10.1021/jp510369a>
- Khandelwal, N., Kaur, G., Kumar, N., Tiwari, A. 2014. Application of silver nanoparticles in viral inhibition: A new hope for antivirals. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 9(1):175-186.
- Khimmakthong, U., Kongmee, P., Deachamag, P., Leggat, U., Chotigeat, W. 2013. Activation of an immune response in *Litopenaeus vannamei* by oral immunization with phagocytosis activating protein (PAP) DNA. *Fish Shellfish Immunol*, 34(3):929–38. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.01.004>
- Khosravi-Katuli, K., Prato, E., Lofrano, G., Guida, M., Vale, G., Libralato, G. 2017. Effects of nanoparticles in species of aquaculture interest. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(21): 17326-17346. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9360-3>
- Lamarre, S., Frasse, P., Zouine, M., Labourdette, D., Sainderichin, E., Hu, G., Le Berre-Anton, V., Bouzayen, M., Maza, E. 2018. Optimization of an RNA-seq differential gene expression analysis depending on biological replicate number and library size. *Frontiers in Plant Science*, 9:108. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00108>
- Lara, H.H., Ayala-Nuñez, N.V., Ixtepan-Turrent, L., Rodriguez-Padilla, C. 2010. Mode of antiviral action of silver nanoparticles against HIV-1. *Journal of Nanobiotechnology*, 8:1–10. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-8-1>
- Lara-Espinoza, C.L., Espinosa-Plascencia, A., Rivera-Domínguez, M., Astorga-Cienfuegos, K.R., Acedo-Félix, E. 2015. Desarrollo de camarón *Litopenaeus vannamei* en un sistema de cultivo intensivo con biofloc y nulo recambio de agua. *aquaTIC*, 43:1-13.

- Lekamge, S., Miranda, A.F., Abraham, A., Li, V., Shukla, R., Bansal, V., Nuggeoda, D. 2018. The toxicity of silver nanoparticles (AgNPs) to three freshwater invertebrates with different life strategies; *Hydra vulgaris*, *daphnia carinata*, and *Paratya australiensis*. *Front Environ Sci*, 6:162. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2018.00152>
- Lekamge, S., Miranda, A.F., Pham, B., Ball, A.S., Shukla, R., Lekamge, S., 2020. The toxicity of non-aged and aged coated silver nanoparticles to the freshwater shrimp *Paratya australiensis*. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 82:(23–24):1207–1222. <https://doi.org/10.1080/15287394.2019.1710887>.
- Lemus, M., Salazar, R., Lapo, B., Chung, K. 2016. Metallothioneins in marine bivalves. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 44(2):202–215. <https://doi.org/10.3856/vol44-issue2-fulltext-2>.
- Levene, H. 1960. Robust tests for equality of variances. En Ingram Olkin, Harold Hotelling, et alia, ed. Stanford University Press. pp. 278-292.
- Leu, J.H., Yang, F., Zhang, X., Xu, X., Kou, G.H., and Lo, C.F. 2009. Whispovirus. 198-223 pp. In: James, L., Van Etten (ed.). 2009. Lesser Known Large dsDNA Viruses. Current Topics in Microbiology and Immunology. Springer Verlag Berlin Heidelberg. 328pp.
- Li, M., Li, C., Ma, C., Li, H., Zuo, H., Weng, S., Chen, X., Zeng, D., He, J., Xu, X. 2014. Identification of a C-type lectin with antiviral and antibacterial activity from pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Developmental and Comparative Immunology*, 46(2):231-240. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2014.04.014>
- Lightner, D.V. 1996. A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp (ed D.V., Lightner). *World Aquaculture Society*, Baton Rouge, Louisiana, USA.
- Lightner D.V. 2011. Virus diseases of farmed shrimp in the western Hemisphere (the Americas): A review. *Journal of Invertebrate Pathology*, 106:110–130. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2010.09.012>
- Lin, S.J., Lee, D.Y., Wang, H.C., Kang, S.T., Hwang, P.P., Kou, G.H., Huang, M.F., Chang, G.D. y Lo, C.F. 2015. White Spot Syndrome Virus Protein Kinase 1 Defeats the Host Cell's Iron-Withholding Defense Mechanism by Interacting with Host Ferritin. *Journal of Virology*, 89(2):1083–1093. <https://doi.org/10.1128/jvi.02318-14>
- Litwin, C.M., Calderwood, S.B. 1993. Role of iron in regulation of virulence genes. *Clinical Microbiology Reviews*, 6(2):137–149. <https://doi.org/10.1128/CMR.6.2.137>
- Liu, F., Li, F., Dong, B., Wang, X., Xiang, j. 2009. Molecular cloning and characterisation of a pattern recognition protein, lipopolysaccharide and beta-1,3-glucan binding protein (LGBP)

- from Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. *Mol Biol Rep*, 36(3):471–477. <https://doi.org/10.1007/s11033-007-9203-2>.
- López-Marín, L.M., Valdemar-Aguilar, C.M. 2018. Patrones moleculares asociados a patógenos: ¿héroes o villanos en nanomedicina?. *Mundo Nano*, 11(20):53–63. <http://dx.doi.org/10.22201/ceiich.24485691e.2018.20.62595>
- Lu, L., Sun, R.W., Chen, R., Hui, C.K., Ho, C.M., Luk, J.M., Lau, G.K., Che, C.M. 2008. Silver nanoparticles inhibit hepatitis B virus replication. *Antiviral Therapy*, 13(2):253–262.
- Luo, Y.H., Chang, L.W., Lin, P. 2015. Metal-Based Nanoparticles and the Immune System: Activation, Inflammation, and Potential Applications. *BioMed Research International*, 2015:1–12. <https://doi.org/10.1155/2015/143720>
- Luna-Gonzalez, A., Moreno-Herrera, J.T., Campa-Cordova, A.I., Gonzalez-Ocampo, H.A., Fierro-Coronado, J.A., Alvarez-Ruiz, P., Bueno-Ibarra, M.A. 2013. Respuesta inmune y expresion de genes en el camaron blanco (*Litopenaeus vannamei*) inducida por inmunoestimulantes microbianos. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 41(5):898–907. <https://doi.org/10.3856/vol41-issue5-fulltext-10>
- Luna-Vázquez-Gómez, R., Arellano-García, M.E., García-Ramos, J.C., Radilla-Chávez, P., Salas-Vargas, D.S., Casillas-Figueroa, F., Ruiz-Ruiz, B., Bogdanchikova, N., Pestryakov, A. 2021. Hemolysis of human erythrocytes by argovitTM AgNPs from healthy and diabetic donors: An in vitro study. *Materials*, 14: 2792. <https://doi.org/10.3390/ma14112792>
- Maldonado-Muñiz, M., Luna, C., Mendoza-Reséndez, R., Barriga-Castro, E.D., Soto-Rodríguez, S., Ricque-Marie, D., Cruz-Suarez, L.E. 2019. Silver nanoparticles against acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp and their depuration kinetics. *J Appl Phycol*, 32:431–2445. <https://doi.org/10.1007/s10811-019-01948-w>
- Marimuthu, S., Antonisamy, A.J., Malayandi, S., Rajendran, K., Tsai, P.C., Pugazhendhi, A., Ponnusamy, V.K. 2020. Silver nanoparticles in dye effluent treatment: A review on synthesis, treatment methods, mechanisms, photocatalytic degradation, toxic effects and mitigation of toxicity. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 205:111823. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.111823>
- Martin, G.G., Quintero, M., Quigley, M., Khosrovian, H. 2000. Elimination of sequestered material from the gills of decapod crustaceans. *J Crustac Biol*, 20:209–217. <https://doi.org/10.1163/20021975-99990>
- McShan, D., Ray, P.C., Yu, H. 2014. Molecular toxicity mechanism of nanosilver. *Journal of Food and Drug Analysis*, 22(1): 116-127. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2014.01.010>

- Mehrbod, P., Motamed, N., Tabatabaian, M., Soleimani-Estyar, R., Amini, E., Shahidi, M., Kheiri, M.T. 2009. *Vitro* antiviral effect of “nanosilver” on influenza virus. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 17(2):88–93.
- Mejía-Ruíz, C.H., Vega-Peña, S., Álvarez-Ruiz, P., Escobedo-Bonilla, C.M. 2011. Double-stranded RNA against white spot syndrome virus (WSSV) *vp28* or *vp26* reduced susceptibility of *Litopenaeus vannamei* to WSSV, and survivors exhibited decreased susceptibility in subsequent re-infections. *Journal of invertebrate pathology*, 107(1):65–68. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2011.02.002>
- Meneses-Márquez, J.C., Partida, A.H., Monroy-Dosta, M.C., Castro-Mejía, J., Bustos Martínez, J.A. 2018. Silver nanoparticles applications (AgNPs) in aquaculture. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 6(2):05-11.
- Milic, M.L., Pavicic, G., Zebic-Avdicevic, I., Dobrovic, M., Goessler, S., Vinkovic, W., Vrcek, I. 2015. Cellular uptake and toxicity effects of silver nanoparticles in mammalian kidney cells. *Journal of Applied Toxicology*, 35(6):581–92. <https://doi.org/10.1002/jat.3081>
- Monfared, A.L., Soltani, S. 2013. Effects of silver nanoparticles administration on the liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): histological and biochemical studies. *Pelagia Research Library*, 3(2):285-289
- Morales, V., Cuéllar-Anjel, J. 2014. Guía Técnica – Patología e Inmunología de Camarones Penaeidos. OIRSA, Panamá, Rep. de Panamá.
- Morales-Covarrubias, M.S. 2010. Enfermedades del camarón: detección mediante análisis en fresco e histopatología. 2ª ed. Editorial Trillas-CIAD. México. 180pp. ISSN: 978-607-17-0436-8.
- Morales-Covarrubias, M.S., García-Aguilar, N., Bolan-Mejía, M.D.C., Puello-Cruz, A.C. 2016. Evaluation of medicinal plants and colloidal silver efficiency against *Vibrio parahaemolyticus* infection in *Litopenaeus vannamei* cultured at low salinity. *Diseases of Aquatic Organisms*, 122(1):57–65. <https://doi.org/10.3354/dao03060>.
- Morales-Covarrubias, M.S., Alonso-Rodríguez, R., Velázquez-Garay, J.A., Flores-Chavarría, A.M.G., Alva-Martínez, A.F. 2016b. Efecto de *Microcystis aeruginosa* en órganos y tejidos de postlarvas de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) en agua de baja salinidad. *Revista Científica Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Zulia*, (3):181–187.
- Mori, Y., Ono, T., Miyahira, Y., Nguyen, V.Q., Matsui, T., Ishihara, M. 2013. Antiviral activity of silver nanoparticle/chitosan composites against H1N1 influenza A virus. *Nanoscale Research Letters*, 8(1):93. <https://doi.org/10.1186/1556-276x-8-93>

- Morozova, O., Hirst, M., Marra, M.A. 2009. Applications of New Sequencing Technologies for Transcriptome Analysis. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 10:135–151. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-082908-145957>
- Morris, D., Ansar, M., Speshock, J., Ivanciuc, T., Qu, Y., Casola, A., Garofalo, R. 2019. Antiviral and immunomodulatory activity of silver nanoparticles in experimental RSV infection. *Viruses*, 11(8):732. <https://doi.org/10.3390/v11080732>
- Moser, J.R., Galván, D.A., Mendoza, F., Encinas, T., Coronado, D.E., Portillo, G., Risoleta, M., Magallon-Barajas, F.J., Hernández-López, J. 2012. Water temperature influences viral load and detection of White Spot Syndrome Virus (WSSV) in *Litopenaeus vannamei* and wild crustaceans. *Aquaculture*, 326–329:9–14. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.10.033>
- Neurath, H. 1989. Proteolytic processing and physiological regulation. *Trends in Biochemical Sciences*, 14(7):268–271. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(89\)90061-3](https://doi.org/10.1016/0968-0004(89)90061-3)
- Nisar, U., Zhang, H., Navghan, M., Zhu, Y., Mu, Y. 2021. Comparative analysis of profitability and resource use efficiency between *Penaeus monodon* and *Litopenaeus vannamei* in India. *PLoS ONE*, 16:1-19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0250727>
- Oaten, J.F.P., Gibson, M.C., Hudson, M.D., Jensen, A.C., Williams, I.D. 2017. Metal Accumulation and Metallothionein Response in *Fucus Spiralis*. *International Journal of Environmental Pollution and Remediation*, 5:1–14. <https://doi.org/10.11159/ijepr.2017.001>
- Ochoa-Meza, A.R., Álvarez-Sánchez, A.R., Romo-Quiñonez, C.R., Barraza, A., Magallón-Barajas, F.J., Chávez-Sánchez, A., García-Ramos, J.C., Toledano-Magaña, Y., Bogdanchikova, N., Pestryakov, A., Mejía-Ruiz, C.H. 2019. Silver nanoparticles enhance survival of white spot syndrome virus infected *Penaeus vannamei* shrimps by activation of its immunological system. *Fish & Shellfish Immunology*, 84:1083–1089. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.10.007>
- Oliveira-Pinto, P.H., Lucas-Rocha, j., do Vale-Figueiredo, J.P., Siqueira-Carneiro, R.F., Damian, C., de Oliveira, L., Quadros-Seiffert, W. 2020. Culture of marine shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in biofloc technology system using artificially salinized freshwater: Zootechnical performance, economics and nutritional quality. *Aquaculture*, 520:734960. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.734960>
- Orlowski, P., Tomaszewska, E., Gniadek, M., Baska, P., Nowakowska, J., Sokolowska, J., Nowak, Z., Donten, M., Celichowski, G., Grobelny, J., Krzyzowska, M. 2014. Tannic acid modified silver nanoparticles show antiviral activity in herpes simplex virus type 2 infection. *PLoS ONE*, 9(8):e104113. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104113>

- Ostrakhovitch, E.A., Olsson, P.E., von Hofsten, J., Cherian, M.G. 2007. P53 mediated regulation of metallothionein transcription in breast cancer cells. *J Cell Biochem*, 102:1571–1583. <https://doi.org/10.1002/jcb.21381>
- Padhi, A. 2012. Adaptive evolution of crustin antimicrobial peptides in decapods. *Genetica*, 140:197–203. <https://doi.org/10.1007/s10709-012-9671-8>
- Pangestika, R., Ernawati, R. 2017. Antiviral Activity Effect of Silver Nanoparticles (AgNps) Solution Against the Growth of Infectious Bursal Disease Virus on Embryonated Chicken Eggs with Elisa Test. *KnE Life Sciences*, 3(6):536. <https://doi.org/10.18502/cls.v3i6.1181>
- Parveen, S., Misra, R., Sahoo, S.K. 2012. Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. *Nanomedicine*, 8:147–66. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2011.05.016>
- Park, E.J., Bae, E., Yi, J., Kim, Y., Choi, K., Lee, S.H., Yoon, J., Lee, B.C., Park, K. 2010. Repeated-dose toxicity and inflammatory responses in mice by oral administration of silver nanoparticles. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 30(2):162–168. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2010.05.004>
- Park, E.J., Choi, K., Park, K. 2011. Induction of inflammatory responses and gene expression by intratracheal instillation of silver nanoparticles in mice. *Archives of Pharmacal Research*, 34(2):299–307. <https://doi.org/10.1007/s12272-011-0216-y>
- Peraza-Gómez, V., Luna-González, A., Campa-Córdova, A., López-Meyer, M., Fierro-Coronado, A., Álvarez-Ruiz, P. 2009. Probiotic microorganisms and antiviral plants reduce mortality and prevalence of WSSV in shrimp (*Litopenaeus vannamei*) cultured under laboratory conditions. *Aquaculture Research*, 40(13):1481–1489. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02248.x>
- Pertea, M., Kim, D., Pertea, G.M., Leek, J.T., Salzberg S.L. 2016. Transcript-level expression analysis of RNA-seq experiments with HISAT, StringTie and Ballgown. *Nat Protoc*, 11:1650–1667. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.095>
- Pimentel-Acosta, C.A., Morales-Serna, F.N., Chavez-Sanchez, M.C., Lara, H.H., Pestryakov, A., Bogdanchikova, N., Fajer-Avila, E.J. 2019. Efficacy of silver nanoparticles against the adults and eggs of monogenean parasites of fish. *Parasitology Research*, 118(6):1741–1749. <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06315-9>
- Pilaquinga, F., Morey, J., Torres, M., Seqqat, R., Piña, M. 2021. Silver nanoparticles as a potential treatment against SARS-CoV-2: A review. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 13(5):1–19. <https://doi.org/10.1002/wnan.1707>

- Potnis, P.A., Dutta, D.K., Wood, S.C. 2013. Toll-like receptor 4 signaling pathway mediates proinflammatory immune response to cobalt-alloy particles. *Cellular Immunology*, 282(1):53-65. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2013.04.003>
- Pourmozaffar, S., Hajimoradloo, A., Miandare, H.K. 2017. Dietary effect of apple cider vinegar and propionic acid on immune related transcriptional responses and growth performance in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, 60:65-71. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.11.030>
- Pfaffl, M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 29(9):e45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
- Plant, K.P., Lapatra, S.E. 2011. Advances in fish vaccine delivery. *Developmental & Comparative Immunology*, 35(12):1256–1262. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.03.007>
- Rai, M., Yadav, A., Gade, A. 2009. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances*, 27:76–83. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.09.002>
- Rajkumar, K.S., Kanipandian, N., Thirumurugan, R. 2016. Toxicity assessment on haematology, biochemical and histopathological alterations of silver nanoparticles-exposed freshwater fish *Labeo rohita*. *Applied Nanoscience*, 6(1):19–29. <https://doi.org/10.1007/s13204-015-0417-7>
- RathnaKumari, P., Kolanchinathan, P., Siva, D., Abirami, B., Masilamani, V., George, J., Shanmugam, A., Balasundaram, A. 2018. Antibacterial efficacy of seagrass *Cymodocea serrulata*-engineered silver nanoparticles against prawn pathogen *Vibrio parahaemolyticus* and its combative effect on the marine shrimp *Penaeus monodon* Padmanabhan. *Aquaculture*, 493:158–164. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.04.061>
- Recordati, C., De Maglie, M., Cella, C., Argenti, S., Paltrinieri, S., Bianchessi, S., Losa, M., Fiordaliso, F., Corbelli, A., Milite, G., Aureli, F., D'Amato, M., Raggi, A., Cubadda, F., Soldati, S., Lenardi, C., Scanziani, E. 2021. Repeated oral administration of low doses of silver in mice: tissue distribution and effects on central nervous system. *Particle and Fibre Toxicology*, 18(1):1–18. <https://doi.org/10.1186/s12989-021-00418-x>
- Reed, L., Muench, H. 1938. A simple method of estimating 50 per cent end-point. *American Journal of Epidemiology*, 27:493–497.
- Rendón, L., Balcázar, J. 2003. Inmunología de camarones: Conceptos básicos y recientes avances. *AquaTIC*, 19:27–33.
- Ringwood, A.H., McCarthy, M., Bates, T.C., Carroll, D.L. 2010. The effects of silver nanoparticles on oyster embryos. *Marine Environmental Research*, 69:S49–S51. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2009.10.011>

- Ribeiro, F., Gallego-Urrea, J.A., Jurkschat, K., Crossley, A., Hassellöv, M., Taylor, C., Soares, A.M.V.M., Loureiro, S. 2014. Silver nanoparticles and silver nitrate induce high toxicity to *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Daphnia magna* and *Danio rerio*. *Science of the Total Environment*, 466-467:232–241. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.06.101>
- Robalino, J., Bartlett, T., Shepard, E., Prior, S., Jaramillo, G., Scura, E., Chapman, R.W., Gross, P.S., Browdy, C.L., Warr, G.W. 2005. Double-Stranded RNA Induces Sequence-Specific Antiviral Silencing in Addition to Nonspecific Immunity in a Marine Shrimp: Convergence of RNA Interference and Innate Immunity in the Invertebrate Antiviral Response?. *Journal of Virology*, 79(21):13561–13571. <https://doi.org/10.1128/jvi.79.21.13561-13571.2005>
- Robinson, M.D., McCarthy, D.J., Smyth, G.K. 2010. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, 26(1):139–40. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616>
- Rogers, J.V., Parkinson, C.V., Choi, Y.W., Speshock, J.L., Hussain, S.M. 2008. A preliminary assessment of silver nanoparticle inhibition of monkeypox virus plaque formation. *Nanoscale Research Letters*, 3(4):129–133. <https://doi.org/10.1007/s11671-008-9128-2>
- Rollano-Peñazola, O., Mollinedo-Portugal, P. 2017. Bioinformatic Analysis of RNA-Seq with a Perspective for Bolivia. *Revista Boliviana de Química*, 34(2):50-55
- Rosa, R.D., Barracco, M.A. 2010. Antimicrobial peptides in crustaceans. *Invertebrate Survival Journal*, 7: 262–284.
- Rosa, R.D., Vergnes, A., de Lorgeril, J., Goncalves, P., Perazzolo, L.M., Sauné, L., Romestand, B., Fievet, J., Gueguen, Y., Bachère, E., Destoumieux-Garzón, D. 2013. Functional Divergence in Shrimp Anti-Lipopolysaccharide Factors (ALFs): From Recognition of Cell Wall Components to Antimicrobial Activity. *PLOS ONE*, 8(7):e67937. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067937>
- Romo-Quiñonez, C.R. 2014. Diseño y construcción de un vector de dsRNA específico tipo hairpin expresado en la cepa de *Escherichia coli* HT115 (DE3) contra WSSV en camarón *Litopenaeus vannamei*. Tesis de Maestría en Ciencias en Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. La Paz, Baja California Sur, México.
- Romo-Quiñonez, C.R., Álvarez-Sánchez, A.R., Álvarez-Ruiz, P., Chávez-Sánchez, M.C., Bogdanchikova, N., Pestryakov, A., Mejía-Ruiz, C.H. 2020. Evaluation of a new Argovit as an antiviral agent included in feed to protect the shrimp *Litopenaeus vannamei* against white spot syndrome virus infection. *PeerJ*, 8:e8446. <https://doi.org/10.7717/peerj.8446>
- Ruiz-Ruiz, B., Arellano-García, M.E., Radilla-Chávez, P., Salas-Vargas, D.S., Toledano-Magaña, Y., Casillas-Figueroa, F., Luna-Vazquez-Gomez, R., Pestryakov, A., García-Ramos, J.C., Bogdanchikova, N. 2020. Cytokinesis-Block Micronucleus Assay Using Human Lymphocytes

as a Sensitive Tool for Cytotoxicity/Genotoxicity Evaluation of AgNPs. *ACS Omega*, 5(21):12005-12015. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c00149>

Roux, M.M., Pain, A., Klimpel, K.R., Dhar, A.K. 2002. The lipopolysaccharide and β -1,3-glucan binding protein gene is upregulated in white spot virus-infected shrimp (*Penaeus stylirostris*). *Journal of Virology*, 76(14):7140–7149. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.14.7140-7149.2002>

Ruttkay-Nedecky, B., Nejdil, L., Gumulec, J., Zitka, O., Masarik, M., Eckschlager, T., Stiborova, M., Adam, V., Kizek, R. 2013. The role of metallothionein in oxidative stress. *Int J Mol Sci*, 14:6044–6066. <https://doi.org/10.3390/ijms14036044>

Sánchez-Paz, A. 2010. In review, White spot syndrome virus: an overview on an emergent concern. *Veterinary research*, 41(6):43. <https://doi.org/10.1051/vetres/2010015>

Sato, M., Bremner, I., 1993. Oxygen free radicals and metallothionein. *Free Radical Biol Med*, 14:325–337. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(93\)90029-t](https://doi.org/10.1016/0891-5849(93)90029-t)

Serafim, A., Bebianno, M.J. 2010. Effect of a polymetallic mixture on metal accumulation and metallothionein response in the clam *Ruditapes decussatus*. *Aquatic Toxicology*, 19:370–378. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.05.016>.

Scown, T.M., Santos, E.M., Johnston, B.D., Gaiser B., Baalousha, M., Mitov, S., Lead, J.R., Stone, V., Fernandes, T.F., Jepson, M., van Aerle, R., Tyler, C.R. 2010. Effects of aqueous exposure to silver nanoparticles of different sizes in rainbow trout. *Toxicological Science*, 115(2):521–534. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfq076>.

Schurch, N.J., Schofield, P., Gierliński, M., Cole, C., Sherstnev, A., Singh, V., Wrobel, N., Gharbi, K., Simpson, G.G., Owen-Hughes, T., Blaxter, M., Barton, G.J. 2016. How many biological replicates are needed in an RNA-seq experiment and which differential expression tool should you use?. *Rna*, 22(6):839–851. <https://doi.org/10.1261/rna.053959.115>

Sharker, M.R., Kim, S.C., Hossen, S., Kho, K.H. 2020. Characterization of Insulin-Like Growth Factor Binding Protein 7 (Igfbp7) and Its Potential Involvement in Shell Formation and Metamorphosis of Pacific Abalone, *Haliotis discus hannai*. *Biology*, 9(8):1-15. <https://doi.org/10.3390/biology9080216>

Sharma, V., Kaushik, S., Pandit, P., Dhull, D., Yadav, J.P., Kaushik, S. 2019. Green synthesis of silver nanoparticles from medicinal plants and evaluation of their antiviral potential against chikungunya virus. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(2):881-891. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9488-1>

Shapiro, S.S., Wilk, M.B. 1965. An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika*, 52(3-4):591-611. <https://doi.org/10.1093/biomet/52.3-4.591>.

- Shestivska, V., Adam, V., Prasek, J., Macek, T., Mackova, M., Havel, L., Diopan, V., Zehnalek, J., Hubalek, J., Kizek, R., 2011. Investigation of the antioxidant properties of metallothionein in transgenic tobacco plants using voltammetry at a carbon paste electrode. *International Journal of Electrochemical Science* 6(7):2869–2883.
- Shekhar, M.S., Dillikumar, M., Vinaya Kumar, K., Gopikrishna, G., Rajesh, S., Kiruthika, J., Ponniah, A.G. 2012. Transcript analysis of white spot syndrome virus latency and phagocytosis activating protein genes in infected shrimp (*penaeus monodon*). *Indian Journal of Virology*, 23(3):333-343. <https://doi.org/10.1007/s13337-012-0119-7>
- Shockey, J., Schnurr, J., Browns, J. 2000. Characterization of the AMP-binding protein gene family in *Arabidopsis thaliana*: will the real acyl-CoA synthetases please stand up?. *Biochemical Society Transactions*, 28(6):955–957. <https://doi.org/10.1042/bst0280955>
- Sivaramasamy, E., Zhiwei, W. 2016. Enhancement of Vibriosis Resistance in *Litopenaeus vannamei* by Supplementation of Biomastered Silver Nanoparticles by *Bacillus subtilis*. *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology*, 07:1–10. <https://doi.org/10.4172/2157-7439.1000352>
- Söderhäll, I., Wu, C., Novotny, M., Lee, B.L., Soderhall, K. 2009. A novel protein acts as a negative regulator of prophenoloxidase activation and melanization in the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *J Biol Chem*, 284:6301–6310. <https://doi.org/10.1074/jbc.M806764200>
- Soto-Alcalá, J., Álvarez-Ruiz, P., Audelo-Naranjo, J. M., Esparza-Leal, H.M., Luis-Villaseñor, I.E., Estrada-Godínez, J.A., Luna-González, A., Gámez-Jiménez, C, Diarte-Plata, G. 2018. Transcriptional response of immune-related genes in *Litopenaeus vannamei* post-larvae cultured in recirculating aquaculture systems with and without biofloc. *Aquaculture International*, 27:209–225. <https://doi.org/10.1007/s10499-018-0317-4>
- Somboonwivat, K., Bachère, E., Rimphanitchayakit, V., Tassanakajon, A. 2008. Localization of anti-lipopolysaccharide factor (ALFPm3) in tissues of the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, and characterization of its binding properties. *Dev Comp Immunol*, 32:1170–1176. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2008.03.008>
- Soiza, R.L., Donaldson, A.I.C., Myint, P.K. 2018. Vaccine against arteriosclerosis: An update. *Therapeutic Advances in Vaccines*, 9(6):259–261. <https://doi.org/10.1177/2051013617693753>
- Speshock, J.L., Murdock, R.C., Braydich-Stolle, L.K., Schrand, A.M., Hussain, S.M. 2010. Interaction of silver nanoparticles with Tacaribe virus. *Journal of Nanobiotechnology*, 8:1–9. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-8-19>
- Sritunyalucksana K, Söderhäll K. 2000. The proPO and clotting system in crustaceans. *Aquaculture*, 191(1-3):53–69. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00411-7](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00411-7)

- Stephano-Hornedo, J.L., Torres-Gutiérrez, O., Toledano-Magaña, Y., Gradilla-Martínez, I., Pestryakov, A., Sánchez-González, A., García-Ramos, J.C., Bogdanchikova, N. 2020. Argovit™ silver nanoparticles to fight Huanglongbing disease in Mexican limes (: Citrus aurantifolia Swingle). *RSC Advances*, 10(11):6146–6155. <https://doi.org/10.1039/c9ra09018e>
- Suresh, U., Murugan, K., Benelli, G., Nicoletti, M., Barnard, D.R., Panneerselvam, C., Kumar, P.M., Subramaniam, J., Dinesh, D., Chandramohan, B. 2015. Tackling the growing threat of dengue: Phyllanthus niruri-mediated synthesis of silver nanoparticles and their mosquitocidal properties against the dengue vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*, 114(4):1551–1562. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4339-9>
- Sun, B., Wang, Z., Zhu, F. 2017. The crustin-like peptide plays opposite role in shrimp immune response to *Vibrio alginolyticus* and white spot syndrome virus (WSSV) infection. *Fish & Shellfish Immunology*, 66:487–496. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.05.055>
- Sung, H.H., Yang, Y.L., Song, Y.L. 1996. Enhancement of microbicidal activity in the tiger shrimp *Penaeus monodon* via Immunostimulation. *Journal of Crustacean Biology*, 16(2):278–284. <https://doi.org/10.1163/193724096X00063>
- Tang, S., Zheng, J. 2018. Antibacterial activity of silver nanoparticles: structural effects. *Adv Healthc Mater*, 7(13):e1701503. <https://doi.org/10.1002/adhm.201701503>.
- Taengchaiyaphum, S., Nakayama, H., Srisala, J., Khiev, R., Aldama-Cano, D.J., Thitamadee, S., Sritunyalucksana, K. 2017. Vaccination with multimeric recombinant VP28 induces high protection against white spot syndrome virus in shrimp. *Developmental and Comparative Immunology*, 76:56–64. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.05.016>
- Tello-Olea, M., Rosales-Mendoza, S., Campa-Córdova, A.I., Palestino, G., Luna-González, A., Reyes-Becerril, M., Velazquez, E., Hernandez-Adame, L., Angulo, C. 2019. Gold nanoparticles (AuNP) exert immunostimulatory and protective effects in shrimp (*Litopenaeus vannamei*) against *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 84:756–767. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.10.056>
- Turner, A.J., Nalivaeva, N.N. 2011. Post-Translational Modifications in Health and Disease. 13: 457–482. In metalloproteases and proteolytic processing. 2011. Guest Editor (s): Cecilio J. Vidal Depto. Química Inorganica, Universidad Murcia, Murcia, Spain. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6382-6_19
- Thi Ngoc Dung, T., Nang-Nam, V., Thi-Nhan, T., Ngoc, T.T.B., Minh, L.Q., Nga, B.T.T., Phan-Le, V., Viet-Quang, D. 2020. Silver nanoparticles as potential antiviral agents against African swine fever virus. *Materials Research Express*, 6(12):1250g9. <https://doi.org/10.1088/2053-1591/ab6ad8>

- Thummabancha, K., Onparn, N., Srisapoome, P. 2016. Analysis of hematologic alterations, immune responses and metallothionein gene expression in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to silver nanoparticles. *Journal of Immunotoxicology*, 13(6):909–917. <https://doi.org/10.1080/1547691X.2016.1242673>
- Trickler, W.J., Lantz, S.M., Murdock, R.C., Schrand, A.M., Robinson, B.L., Newport, G.D., Schlager, J.J., Oldenburg, S.J., Paule, M.G., Slikker, W., Hussain, S.M., Ali, S.F. 2010. Silver nanoparticle induced blood-brain barrier inflammation and increased permeability in primary rat brain microvessel endothelial cells. *Toxicological Sciences*, 118(1):160–170. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfq244>
- Udompetcharaporn, A., Junkunlo, K., Senapin, S., Roytrakul, S., Flegel, T.W., Sritunyalucksana, K. 2014. Identification and characterization of a QM protein as a possible peptidoglycan recognition protein (PGRP) from the giant tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Dev Comp Immunol*, 46:146–54. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2014.04.003>
- United Nations, 2016. Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos (SGA). Sexta Edición. Nueva York y Ginebra. <https://doi.org/10.18356/be64f775-es>
- Van Veldhoven, P.P., Baes, M. 2013. Peroxisome deficient invertebrate and vertebrate animal models. *Front Physiol*, 4:335. <https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00335>
- Vaseeharan, B., Anand, P.T., Murugan, T., Chen, J.C. 2006. Shrimp vaccination trials with the VP292 protein of white spot syndrome virus. *Letters in Applied Microbiology*, 43:137–142. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.01941.x>
- Vaseeharan, B., Ramasamy, P., Chen, J.C. 2010. Antibacterial activity of silver nanoparticles (AgNps) synthesized by tea leaf extracts against pathogenic *Vibrio harveyi* and its protective efficacy on juvenile *Fenneropenaeus indicus*. *Lett Appl Microbiol*, 50:352–356. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02799.x>
- Vazquez, L., Alpuche, J., Maldonado, G., Agundis, C., Pereyra-Morales, A., Zenteno, E. 2009. Immunity mechanisms in crustaceans. *Innate Immunity*, 15(3):179–188. <https://doi.org/10.1177/1753425909102876>
- Vazquez-Muñoz, R., Avalos-Borja, M., Castro-Longoria, E. 2014. Ultrastructural analysis of *Candida albicans* when exposed to silver nanoparticles. *PLoS One*, 9(10):e108876. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108876>
- Vazquez-Muñoz, 2017. Evaluación de las interacciones entre las nanopartículas de plata y microorganismos patógenos. Tesis de doctorado en Ciencia en Física de Materiales. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California, México.

- Wang, K.C., Tseng, C.W., Lin, H.Y., Chen, I.T., Chen, Y.H., Chen, Y.M., Chen, T.Y., Yang, H.L. 2010. RNAi knock-down of the *Litopenaeus vannamei* Toll gene (*LvToll*) significantly increases mortality and reduces bacterial clearance after challenge with *Vibrio harveyi*. *Developmental and Comparative Immunology*, 34(1):49–58. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2009.08.003>
- Wang, Y.C., Chang, P.S., Chen, H.Y. 2007. Tissue expressions of nine genes important to immune defense of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, 23:1161–1177. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2007.04.004>
- Wang, W.X., Rainbow, P.S. 2005. Influence of metal exposure history on trace metal uptake and accumulation by marine invertebrates. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 61(2):145–159. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.01.008>
- Wang, X.W., Wang, J.X. 2013. Diversity and multiple functions of lectins in shrimp immunity. *Developmental and Comparative Immunology*, 39(1–2):27–38. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2012.04.009>
- Wolfe, M.S. 2009. Intramembrane proteolysis. *Chem Rev*, 109:1599–1612. <https://doi.org/10.1021/cr8004197>
- Wu, C., Soderhall, K., Soderhall, I. 2011. Two novel ficolin-like proteins act as pattern recognition receptors for invading pathogens in the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Proteomics*, 11:2249–2264. <https://doi.org/10.1002/pmic.201000728>
- Xue, S.X., Liu, Y.C., Zhang, Y.C., Sun, Y., Geng, X.Y., Sun, J.S. 2013. Sequencing and De Novo analysis of the hemocytes transcriptome in *Litopenaeus vannamei* response to white spot syndrome virus infection. *PLoS One*, 8:e76718. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076718>
- Yang, X.X., Li, C.M., Huang, C.Z. 2016. Curcumin modified silver nanoparticles for highly efficient inhibition of respiratory syncytial virus infection. *Nanoscale*, 8(5):3040–3048. <https://doi.org/10.1039/C5NR07918G>
- Ye, T., Zong, R., Zhang, X. 2012. The role of white spot syndrome virus (WSSV) VP466 protein in shrimp antiviral phagocytosis. *Fish & Shellfish Immunology*, 33:350–358. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.05.017>
- Ye, T., Tang, W., Zhang, X. 2012. Involvement of Rab6 in the Regulation of Phagocytosis against Virus Infection in Invertebrates. *J. Proteome Res*, 11(10):4834–4846. <https://doi.org/10.1021/pr300274k>
- Yen, C.W., de Puig, H., Tam, J.O., Gómez-Márquez, J., Bosch, I., Hamad-Schifferli, K., Gehrke, L. 2015. Multicolored silver nanoparticles for multiplexed disease diagnostics: Distinguishing

dengue, yellow fever, and Ebola viruses. *Lab on a Chip*, 15(7):1638–1641. <https://doi.org/10.1039/C5LC00055F>

Yount, N.Y., Bayer, A.S., Xiong, Y.Q., Yeaman, M.R. 2006. Advances in antimicrobial peptide immunobiology. *Biopolymers*, 84:435–458. <https://doi.org/10.1002/bip.20543>

Zahr, A.S., Davis, C.A., Pishko, M.V. 2006. Macrophage Uptake of Core–Shell Nanoparticles Surface Modified with Poly(ethylene glycol). *Langmuir*, 22(19):8178–8185. <https://doi.org/10.1021/la060951b>

Zhao, Z., Jianga, C., Zhang, X. 2011. Effects of immunostimulants targeting ran GTPase on phagocytosis against virus infection in shrimp. *Fish & Shellfish Immunology*, 31:1013–1018. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2011.08.022>

Zhao, Z.Y., Yin, Z.X., Xu, X.P., Weng, S.P., Rao, X.Y., Dai, Z.X., Luo, Y.W., Yang, G., Li, Z.S., Guan, H.J., Li, S.D., Chan, S.M., Yu, X.Q., He, J.G., 2009. A novel C-type lectin from the shrimp *Litopenaeus vannamei* possesses anti-white spot syndrome virus activity. *J Virol*, 83:347–356. <https://doi.org/10.1128/JVI.00707-08>

Zhang, K., Koiwai, K., Kondo, H., Hirono, I. 2018. White spot syndrome virus (WSSV) suppresses penaeidin expression in *Marsupenaeus japonicus* hemocytes *Fish & Shellfish Immunology*, 78:233–237. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.04.045>