



**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A.C.**

**EFFECTOS TÓXICOS Y MOLECULARES DE
NANOPARTÍCULAS DE PLATA EN PARÁSITOS
MONOGENEOS**

Por:

M. C. Citlalic Altagracia Pimentel Acosta

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN EN ACUACULTURA Y MANEJO AMBIENTAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de la M.C. Citlalic Altagracia Pimentel Acosta, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Doctora en Ciencias.

Dra. Emma Josefina Fajer Ávila
Directora de tesis

Dra. María Cristina Chávez Sánchez
Integrante del comité de tesis

Dra. Silvia Alejandra García Gasca
Integrante del comité de tesis

Dr. Francisco Neptalí Morales Sema
Integrante del comité de tesis

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis “Efectos Tóxicos y Moleculares de Nanopartículas de Plata en Parásitos Monogéneos” es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial de la autora Citlalic Altagracia Pimentel Acosta, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director(a) de tesis.



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.
Coordinación de Programas Académicos

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Pablo Wong González", is written over a horizontal line.

Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo otorgado con la beca para la realización del doctorado.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C., por el apoyo económico y brindarme sus instalaciones, equipos y capital humano.

Al proyecto CONACyT No. 258607 “Estudio del efecto de nanopartículas de plata en virus, bacterias y parásitos de organismos acuáticos” y Redes CONACyT No. 293418.

A mi directora de tesis, la Dra. Emma Josefina Fájér Ávila por sus enseñanzas, orientación, confianza, paciencia y apoyo brindado para mi formación profesional.

A mi comité de tesis, Dra. María Cristina Chávez Sánchez, Dra. Silvia Alejandra García Gasca y Dr. Francisco Neptalí Morales Serna por su asesoría, apoyo, guía y enseñanzas. Gracias Dra. Cristina por invitarme al proyecto.

A la Biol. Rosa María Medina Guerrero, la M. C. Rubí Hernández Cornejo, la M. C. Selene Abad Rosales y la M. C. Irma Eugenia Martínez Rodríguez por su asesoría y apoyo técnico en los laboratorios del CIAD.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de parasitología por su apoyo.

DEDICATORIA

A Ti,

Por lograr tus sueños y metas, no rendirte y continuar en el maravilloso camino de la ciencia.

A mi familia,

Por ser mi apoyo incondicional y pilar para lograr mis objetivos, los amo.

A mis amigos,

Por todos los momentos compartidos y hacer de este proceso una bonita experiencia.

CONTENIDO

APROBACIÓN	2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	3
AGRADECIMIENTOS	4
DEDICATORIA	5
CONTENIDO	6
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE CUADROS	10
RESUMEN	11
ABSTRACT	13
1. INTRODUCCIÓN	14
2. ANTECEDENTES	16
2.1 Nanopartículas de Plata.....	16
2.1.1 Características de las Nanopartículas de Plata.....	17
2.1.2. Mecanismos de Acción de AgNPs	18
2.1.2.1. Adhesión y daño a la membrana celular.....	19
2.1.2.2 Internalización de AgNPs en la célula.....	20
2.1.2.3 Toxicidad celular.....	21
2.1.2.4 Señalización celular.....	21
2.1.3 Nanopartículas de Plata para Eliminar Microorganismos Patógenos.....	22
2.1.4 Efecto de las AgNPs en Helminthos.....	24
2.1.5 Nanopartículas de Plata para Eliminar Patógenos en Acuicultura	29
2.2 Parásitos Monogéneos.....	30
2.2.1 Anatomía General de los Monogéneos.....	30
2.2.2 Ciclo de Vida.....	32
2.2.3 Anatomía de los Parásitos <i>Cichlidogyrus</i>	33
2.2.4 Problemas en Cultivo de Peces Ocasiónados por Monogéneos.....	36
2.2.5 Antihelmínticos en Peces.....	37
3. HIPÓTESIS	40
4. OBJETIVOS	41
4.1 Objetivo General.....	41
4.2 Objetivos Específicos.....	41
5. MATERIALES Y MÉTODOS	42
5.1 Nanopartículas de Plata.....	42
5.2 Parásitos Monogéneos.....	42
5.3 Evaluación Antihelmíntica <i>in vitro</i>	44
5.3.1 Actividad Antihelmíntica en Parásitos Adultos	44

CONTENIDO (continuación)

5.3.2 Actividad Antihelmíntica en Huevos de Parásitos <i>Cichlidogyrus</i>	45
5.3.3. Determinación de la Concentración Letal Media (CL ₅₀) de AgNPs	47
5.4 Alteraciones Ultraestructurales en Individuos de <i>Cichlidogyrus</i>	47
5.5 Alteraciones Moleculares en Parásitos <i>Cichlidogyrus</i> Expuestos a Nanopartículas de Plata.....	49
5.5.1 Diseño Experimental y Obtención de Muestras	49
5.5.2 Extracción de ARN.....	50
5.5.3 Análisis con Microarreglos Heterólogos	50
5.5.3.1 Hibridación de microarreglos	51
5.5.3.2 Análisis de imágenes de los microarreglos.....	51
5.5.3.3 Análisis de datos	51
5.6 Revisión Bibliográfica Sobre los Efectos Patológicos que Ocasionan las AgNPs en Peces	52
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	54
6.1 Evaluación Antihelmíntica <i>in vitro</i>	54
6.1.1 Actividad Antihelmíntica de AgNPs en Parásitos Adultos.....	54
6.1.2 Actividad Antihelmíntica de AgNPs en Huevos de Parásitos <i>Cichlidogyrus</i>	58
6.2 Alteraciones Ultraestructurales de Nanopartículas de Plata en <i>Cichlidogyrus</i>	61
6.3 Alteraciones Moleculares en Parásitos <i>Cichlidogyrus</i> Expuestos a Nanopartículas de Plata.....	64
6.3.1 Hibridación de Microarreglos Heterólogos.....	64
6.3.2 Expresión Diferencial de Genes en Parásitos Expuestos a Nanopartículas de Plata	67
6.3.3 Procesos Biológicos y Rutas Moleculares Inducidas por las Nanopartículas de Plata	67
6.3.3.1 Alteración en la organización del tegumento	72
6.3.3.2 Las AgNPs activan mecanismos de detoxificación.....	73
6.3.3.3 Las AgNPs afectan el sistema nervioso.....	75
6.3.3.4 Las AgNPs activan rutas de señalización celular.....	79
6.3.3.5 Las AgNPs ocasionan daño al ADN y muerte celular	81
6.3.3.6 AgNPs intervienen en la reproducción y desarrollo embrionario	82
6.4 Efectos Patológicos Ocasionados por las Nanopartículas de Plata en Peces	83
7. CONCLUSIONES	94
8. RECOMENDACIONES.....	95
9. REFERENCIAS	96

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Mecanismos generales del modo de acción antimicrobial de las AgNPs.....	19
2	TEM-Disrupción de membrana en la bacteria <i>Staphylococcus aureus</i> expuesta a AgNPs.....	20
3	Ultraestructura del tegumento de <i>Gigantocotyle explanatum</i>	26
4	SEM de <i>Caenorhabditis elegans</i> expuestos a cAgNPs.....	27
5	Diversidad de parásitos monogeneos.....	31
6	Ciclo de vida de monogeneos.....	33
7	Estructuras esclerosadas de <i>Cichlidogyrus sclerosus</i>	34
8	Desarrollo de huevos del parásito <i>Cichlidogyrus sclerosus</i>	35
9	Diagrama de la Ultraestructura general del tegumento de <i>Cichlidogyrus halli typicus</i> en sección longitudinal.....	36
10	Especies de parásitos del género <i>Cichlidogyrus</i> y sus estructuras esclerosadas.....	43
11	Diseño experimental para probar <i>in vitro</i> el efecto antihelmíntico de las AgNPs en <i>Cichlidogyrus</i> adultos.....	45
12	Parásito <i>Cichlidogyrus</i> después de ovopositar observado en el estereoscopio.....	45
13	Etapas de desarrollo de huevos de parásitos <i>Cichlidogyrus</i>	46
14	Equipos utilizados para la preparación de muestras de parásitos para observarse por microscopía electrónica de barrido.....	49
15	Electroforesis de ARN de parásitos expuestos a nanopartículas de plata (6 y 36 µg/L) y grupo control.....	50
16	Modelo de hibridaciones experimentales.....	51
17	Mortalidad de parásitos <i>Cichlidogyrus</i> adultos expuestos a diferentes concentraciones de AgNPs ARGOVIT.....	54
18	Mortalidad de parásitos <i>Cichlidogyrus</i> adultos expuestos a diferentes concentraciones de AgNPs UTSA.....	55
19	Etapas de desarrollo de huevos de <i>Cichlidogyrus</i> expuestos a AgNPs.....	58
20	Tiempo de eclosión en huevos de <i>Cichlidogyrus</i> expuestos a AgNPs.....	59
21	SEM de parásito <i>Cichlidogyrus</i> adulto sin nanopartículas de plata.....	61

LISTA DE FIGURAS (continuación)

22	SEM de región anterior de parásito <i>Cichlidogyrus</i> adulto sin nanopartículas de plata.....	62
23	SEM de región media de parásitos <i>Cichlidogyrus</i> expuestos a 6 µg/L de AgNPs UTSA.....	62
24	SEM de parásitos <i>Cichlidogyrus</i> expuestos a 36 µg/L y 60 µg/L de AgNPs UTSA.....	63
25	Expresión diferencial de genes expresados en parásitos <i>Cichlidogyrus spp.</i> expuestos a concentración baja (6 µg/L) y alta (36 µg/L) de nanopartículas de plata.....	66
26	Diagramas de Venn mostrando los genes diferencialmente sobre-expresados y sub-expresados con la concentración de 6 µg/L (Low) y de 36 µg/L (High) de nanopartículas de plata.....	67
27	Rutas moleculares activadas por las AgNPs en los parásitos <i>Cichlidogyrus</i>	68
28	Respuesta a nanotoxicidad de las nanopartículas de plata en parásitos monogéneos.....	72
29	Mecanismos de detoxificación en los parásitos <i>Cichlidogyrus</i> expuestos una hora a 6 y 36 µg/L de AgNPs.....	75
30	Esquema de sistema nervioso de monogéneo (<i>M. congolensis</i>) donde se representan los probables efectos de las AgNPs.....	76
31	Imágenes histopatológicas de branquias de peces con alteraciones por AgNPs.....	89
32	Imágenes histológicas de alteraciones en hígado de peces expuestos a AgNPs.....	91
33	Alteraciones histopatológicas ocasionadas por AgNPs en intestino de carpa común (<i>Cyprinus carpio</i>).....	92
34	Histopatologías en epitelio de <i>Acipenser baerii</i> ocasionadas por AgNPs.....	93

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Actividad Antiviral de AgNPs.....	23
2	Efectividad de AgNPs en larvas de mosquitos.....	23
3	Estudios de Nanopartículas de plata en <i>Caenorhabditis elegans</i>	28
4	Principales compuestos utilizados como antihelmínticos contra parásitos monogéneos.....	38
5	Principales características de las nanopartículas de plata.....	42
6	Concentraciones experimentales de AgNPs.....	44
7	Concentraciones de AgNPs aplicadas para determinar la CL ₅₀ en parásitos <i>Cichlidogyrus</i>	47
8	Concentraciones letales (CL ₁₀ -CL ₉₉) de nanopartículas de plata en parásitos <i>Cichlidogyrus</i> adultos.....	55
9	Genes (top 30) sobre-expresados y sub-expresados en parásitos <i>Cichlidogyrus</i> expuestos una hora a 6 µg/L AgNPs.....	69
10	Genes (top 30) sobre-expresados y sub-expresados en parásitos <i>Cichlidogyrus</i> expuestos una hora a 36 µg/L AgNPs.....	70
11	Efectos patológicos de las AgNPs en tejidos de peces.....	84

RESUMEN

Las nanopartículas de plata (AgNPs) han mostrado tener una alta actividad antimicrobiana contra patógenos que afectan a los humanos, por esta razón recientemente se ha investigado la efectividad de las AgNPs como antimicrobiano para controlar patógenos en la acuicultura. Los monogeneos son un grupo diverso de parásitos que se encuentran comúnmente en peces. Algunas especies de este grupo de parásitos son altamente patógenos en los cultivos de peces. Para controlarlos se han desarrollado diferentes productos antihelmínticos, sin embargo estos no son 100% efectivos. En este estudio el objetivo fue determinar *in vitro* los efectos de las nanopartículas de plata (AgNPs) contra adultos y huevos de parásitos monogeneos de agua dulce, utilizando individuos del género *Cichlidogyrus* spp. como modelo de estudio. Se evaluaron dos tipos de AgNPs con diferentes características: ARGOVIT (35 nm y recubiertas con PVP) y UTSA (1-3 nm). Mediante microscopía electrónica de barrido se observaron los daños en el tegumento, mientras que los mecanismos de acción se investigaron mediante la hibridación de microarreglos heterólogos utilizando la información genómica del nemátodo *Caenorhabditis elegans*. Los resultados indican que las AgNPs tienen propiedades antihelmínticas, las AgNPs UTSA son más efectivas que las AgNPs ARGOVIT; en ambos casos se presentó un efecto concentración-dependiente. Una concentración de 36 µg/L AgNPs UTSA por una hora de exposición fue 100% efectiva contra los huevos y parásitos adultos, causando hinchamiento, pérdida de corrugaciones y rompimiento en el tegumento de los parásitos. Los análisis de microarreglos revelaron que ambas concentraciones de AgNPs UTSA (6µg/L y 36 µg/L) activan procesos biológicos similares aunque mediante diferentes mecanismos. Los perfiles de expresión génica involucraron genes relacionados en procesos de detoxificación, neurotoxicidad, modulación de la señalización celular, reproducción, desarrollo embrionario y organización del tegumento como los principales procesos biológicos desregulados por las AgNPs. Dos procesos importantes como el daño al ADN y muerte celular fueron mayormente activados en los parásitos expuestos a concentraciones bajas de AgNPs. Este es el primer estudio que provee información de la actividad antihelmíntica, efectos ultraestructurales, sub-celulares y moleculares de la exposición de las AgNPs en parásitos metazoarios de peces.

Palabras clave: nanopartículas de plata, antihelmínticos, parásitos monogéneos, toxicidad, mecanismos de acción.

ABSTRACT

Silver nanoparticles (AgNPs) have shown high antimicrobial activity on pathogens that affect humans, for this reason, the effectiveness of AgNPs as antimicrobials in controlling pathogens in aquaculture has recently been investigated. Monogeneans are a diverse group of parasites that are commonly found on fish. Some monogenean species are highly pathogenic to cultured fish. Different anthelmintics have been developed, however none are 100% effective. The present study aimed to determine the in vitro effects of silver nanoparticles (AgNPs) against adults and eggs of monogeneans in freshwater using *Cichlidogyrus spp.* as a model organism. We tested two types of AgNPs with different characteristics: ARGOVIT (35 nm and PVP coated) and UTSA (1–3 nm) nanoparticles. Damage to the parasite tegument was observed by scanning electron microscopy, while the mechanisms of action were investigated through a microarray hybridization approach using genomic information from the nematode *Caenorhabditis elegans*. AgNPs have anthelmintic properties, UTSA nanoparticles were more effective than ARGOVIT; in both cases, a concentration-dependent effect was observed. A concentration of 36 µg/L UTSA AgNPs for 1 h was 100% effective against eggs and adult parasites, causing swelling, loss of corrugations, and disruption of the parasite's tegument. Microarray analysis revealed that concentrations of AgNPs UTSA (6µg/L and 36 µg/L) activated similar biological processes, although by different mechanisms. Expression profiles included genes involved in detoxification, neurotoxicity, modulation of cell signaling, reproduction, embryonic development, and tegument organization as the main biological processes dysregulated by AgNPs. Two important processes (DNA damage and cell death) were mostly activated in parasites exposed to the lower concentration of AgNPs. This is the first study providing information on anthelmintic activity, ultrastructural, sub-cellular and molecular effects of exposure to AgNPs in metazoan parasites of fish.

Key words: silver nanoparticles, anthelmintic, parasites monogeneans, toxicity

1. INTRODUCCIÓN

El control de patógenos en los sistemas de cultivo de organismos acuáticos ha sido un gran reto desde los inicios de la actividad acuícola, debido a que estos pueden ocasionar mortalidades masivas y generar grandes pérdidas económicas. Los patógenos que afectan a los peces son bacterias, virus y parásitos, estos últimos pueden ir desde organismos unicelulares como los protozoarios hasta organismos más especializados como los helmintos y crustáceos. Los helmintos son un grupo muy diverso de parásitos los cuales comúnmente conocemos como gusanos, taxonómicamente se clasifican en nemátodos, tremátodos, céstodos y monogeneos. Particularmente, los monogeneos se caracterizan por tener un ciclo de vida simple con un solo hospedero, la mayoría son ectoparásitos y suelen tener una especificidad especie-hospedero. Algunas especies de los géneros *Dactylogyrus*, *Gyrodactylus*, *Ancyrocephalus* y *Benedenia* son altamente patógenos tanto para peces marinos como de agua dulce (García-Vásquez *et al.*, 2010; Akoll *et al.*, 2012; Francis-Floyd *et al.*, 2019); en la salmonicultura, *Gyrodactylus salaris* ha sido el responsable de altas tasas de mortalidad, a *Benedenia seriola* y *Neobenedenia melleni* se le han atribuido elevadas mortalidades en la maricultura, en los cultivos de tilapia las infestaciones de parásitos *Cichlidogyrus* ocasionan daños en las branquias y las heridas pueden permitir la entrada de bacterias y hongos, que en sinergia ocasionan altas mortalidades. Por lo cual se han establecido varios productos para tratar de erradicar o aminorar el grado de infestación de parásitos en los cultivos de peces, algunos de los compuestos más efectivos han sido la formalina y cloruro de sodio, entre otros; sin embargo, no suelen tener alta efectividad porque no logran cortar el ciclo de vida, ya que pueden afectar a los adultos pero no a los huevos, por lo que las infestaciones pueden seguir en los cultivos (Fájer-Ávila *et al.*, 2007). Por lo tanto, se siguen evaluando productos que puedan cortar el ciclo de vida de los monogeneos.

Las nanopartículas de plata (AgNPs) podrían ser una opción eficiente para eliminar a los parásitos monogeneos, ya que las AgNPs tienen propiedades antimicrobianas, pueden eliminar bacterias, virus y parásitos que causan enfermedades principalmente en humanos, por lo que en los últimos años se han expandido los estudios para analizar su potencial uso para controlar enfermedades en animales y organismos acuáticos (Saleh *et al.*, 2017; Ochoa-Meza *et al.*, 2019; Rehman *et al.*, 2019;

Fuentes-Valencia *et al.*, 2020; Romo-Quiñonez *et al.*, 2020). Hasta el momento, sólo se ha evaluado la actividad antiprotozoaria de las AgNPs para eliminar parásitos acuáticos, no existe información sobre la capacidad de las AgNPs para matar helmintos de peces como los parásitos monogeneos. En algunos estudios se ha determinado que las AgNPs tienen potencial para actuar como antihelmínticos en parásitos terrestres (Rashid *et al.*, 2016; Taha y Abo-Shady, 2016; Kumari *et al.*, 2019; Shelar *et al.*, 2019) la mayoría de estos estudios se enfocan en determinar las concentraciones efectivas para matar a los parásitos, sin embargo es importante realizar investigaciones donde se evalúen los mecanismos de acción de las AgNPs y sus efectos a nivel estructural y molecular, debido a que la toxicidad y mecanismos de acción dependen del tipo de nanopartícula, tamaño, forma y concentración (Nguyen *et al.*, 2013; Ahn *et al.*, 2014; Dakal *et al.*, 2016; Cho *et al.*, 2018; Ferdous y Nemmar, 2020).

Por lo anterior, la presente investigación se centró en determinar el potencial uso de las AgNPs como antihelmíntico en la acuicultura, evaluamos la toxicidad de dos tipos de AgNPs, utilizando parásitos monogeneos del género *Cichlidogyrus* como modelo de estudio. Además, a nivel molecular obtuvimos perfiles genéticos para entender los mecanismos de respuesta de los monogeneos al ser expuestos a las AgNPs. Los cuáles pueden proveer información interesante sobre los mecanismos de respuesta de los monogeneos a xenobióticos para implementar técnicas de control seguras.

2. ANTECEDENTES

2.1 Nanopartículas de Plata

En las últimas décadas la nanotecnología ha potencializado la utilización de materiales a nivel nanoescala (1-100 nm). Este tamaño nanométrico le confiere propiedades como una mayor relación entre área y volumen, alta reactividad, la habilidad para penetrar distintas membranas biológicas, entre otros. Los nanomateriales se utilizan ampliamente en áreas como la medicina, biotecnología, fotónica, microelectrónica, en la industria de los alimentos, cosméticos, etc. (Shaan *et al.*, 2015; Ferdous y Nemmar, 2020).

A pesar de las ventajas que tiene el uso de nanomateriales, aún no están bien definidos los posibles riesgos que pueden ocasionar en la salud de los organismos al ser descargados al ambiente. Por lo tanto, cada día se fabrican diversos tipos de nanopartículas, requiriendo investigaciones en nanotoxicología para evaluar el impacto en el ambiente. Algunos de los nanomateriales más estudiados son los nanotubos de carbón (CNTs), nanopartículas de oro (AuNPs), nanopartículas de óxido de titanio (TiO₂), nanopartículas de óxido de zinc, nanopartículas de sílice y nanopartículas de plata (AgNPs) (Ferdous y Nemmar, 2020). Estas últimas, las AgNPs, son el objeto de estudio del presente trabajo.

Las nanopartículas de plata han sido ampliamente estudiadas por sus propiedades únicas como agentes antimicrobianos, desde hace cientos de años se sabe que los iones de plata tienen efectos bactericidas, por lo cual se han utilizado como desinfectantes (Ayala-Núñez, 2010). En la actualidad las AgNPs se utilizan en la fabricación de utensilios domésticos, textiles, en aplicaciones biomédicas (curación de heridas, desinfectantes, instrumentos quirúrgicos), entre otros (Syafiuddin *et al.*, 2017; Zivic *et al.*, 2018; Ferdous y Nemmar, 2020).

2.1.1 Características de las Nanopartículas de Plata

Las primeras investigaciones de las AgNPs estaban enfocadas en la síntesis y caracterización de las nanopartículas. Los estudios más recientes están orientados en determinar los efectos biológicos y propiedades para su potencial aplicación, dado que las propiedades de las AgNPs están relacionadas con sus componentes y características fisicoquímicas como el tamaño pequeño, mayor relación área-volumen, morfología, recubrimiento, liberación de iones y tipo de agentes reductores para su elaboración.

El tamaño es una característica importante vinculada con los efectos de las AgNPs. Las nanopartículas más pequeñas tienen mayor actividad antimicrobiana y citotóxica (Lu *et al.*, 2013; Jeong *et al.*, 2014; Cho *et al.*, 2018), generalmente las nanopartículas menores de 50 nm suelen ser más efectivas para eliminar microorganismos (Dakal *et al.*, 2016), además mientras más pequeño es el tamaño de la partícula se incrementa el área y es mayor el número de átomos que actúan en la superficie de las células (Bakand y Hayes, 2016). La toxicidad de las AgNPs también está estrechamente relacionada con el tipo de recubrimiento que incide en la carga eléctrica, solubilidad y liberación de iones. Algunas AgNPs son recubiertas para darles mayor estabilidad y biocompatibilidad, los compuestos más utilizados son polivinilpirrolidona (PVP) y citrato de sodio (CT). En algunos estudios se ha analizado que el efecto de las AgNPs depende del tipo de recubrimiento, siendo más tóxicas las nanopartículas sin recubrimiento (Zhao y Wang, 2012; Nguyen *et al.*, 2013; Ahn *et al.*, 2014). Así mismo, los efectos de las AgNPs también dependen de la forma de las nanopartículas, las triangulares suelen ser más tóxicas que las redondas (Ferdous y Nemmar, 2020). Además de las características físico-químicas, la concentración de AgNPs a la que son expuestos los organismos también es determinante en los efectos toxicológicos. Por tal motivo, son varios los estudios enfocados en analizar diferentes tipos de AgNPs que varían desde el método de elaboración, con o sin recubrimiento, forma y tamaño.

2.1.2. Mecanismos de Acción de AgNPs

La efectividad de las AgNPs para eliminar microorganismos depende principalmente del tipo de nanopartículas, la concentración y tiempo de exposición, así como la organización estructural de los organismos. Por lo tanto, los mecanismos de acción de las AgNPs no están bien establecidos aún, sin embargo existen varios estudios donde se han determinado los principales modos de acción de las AgNPs principalmente en bacterias. A nivel molecular se han reconocido cuatro principales rutas de acción de las AgNPs: 1) adhesión a la membrana celular, 2) internalización a la célula y núcleo, 3) toxicidad celular y generación de especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés), y 4) modulación de la señalización celular (Figura 1) (Dakal *et al.*, 2016; Roy *et al.*, 2019). La actividad antimicrobiana de las AgNPs está asociada con la liberación de iones de plata (Ag^+), varios autores sugieren que la actividad citotóxica de las AgNPs es debido a la sinergia de las AgNPs y los iones de plata liberados (Dakal *et al.*, 2016; Möhler *et al.*, 2018). La plata se puede considerar como un ácido suave y por tendencia química suelen reaccionar con bases suaves, las células contienen mayormente fósforo y sulfuros, los cuales son bases suaves. La interacción de las AgNPs con los grupos sulfuros y fósforo de las membranas celulares, proteínas y ácidos nucleicos pueden provocar alteraciones que lleven a la muerte de los organismos (Morones *et al.*, 2005; Prabhu y Poulouse, 2012).

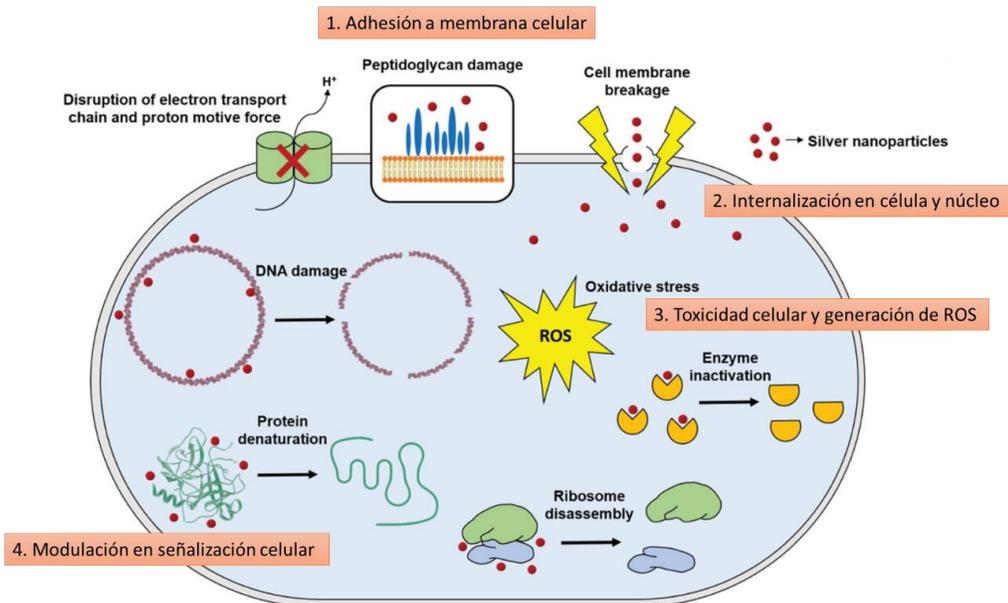


Figura 1. Mecanismos generales del modo de acción antimicrobiana de las AgNPs. (Modificado de Roy *et al.*, 2019).

2.1.2.1. Adhesión y daño a la membrana celular. La interacción entre los microorganismos y las AgNPs comienza con la adhesión de las nanopartículas a las membranas celulares debido a la atracción electrostática entre la carga positiva de las nanopartículas y la carga negativa de las membranas celulares (Abbaszadegan *et al.*, 2015). Además las AgNPs también interactúan con los grupos sulfuro de las proteínas en las membranas causando daños irreversibles, desestabilizando la estructura de la membrana (Ghosh *et al.*, 2012; Prabhu y Poulouse, 2012). Mediante microscopia de transmisión electrónica de transmisión (TEM por sus siglas en inglés) se ha observado la ruptura de la membrana celular en las bacterias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y del hongo *Candida albicans* a pocos minutos de ser expuestos a las AgNPs (Figura 2) (2008; Lara *et al.*, 2015). Las AgNPs también pueden incidir en la integridad de la bicapa lipídica e incrementar la permeabilidad de la membrana celular, que afecta la regulación del transporte extra e intracelular de componentes como iones, proteínas, etc., por lo tanto se afecta la integridad celular y la muerte de la célula (Li *et al.*, 2013). Adicionalmente, los efectos de las AgNPs dependen del tipo y composición de las membranas o recubrimiento de los microorganismos, por ejemplo las bacterias Gram-negativo son más susceptibles a las AgNPs, debido a que contienen una capa de lipopolisacáridos en la membrana celular que le confieren una carga negativa y mayor atracción electrostática con las AgNPs y iones de plata cargados positivamente (Pal *et al.*, 2007). Por lo tanto,

en microorganismos metazoarios es probable que los efectos dependan de la composición y estructura de la dermis.

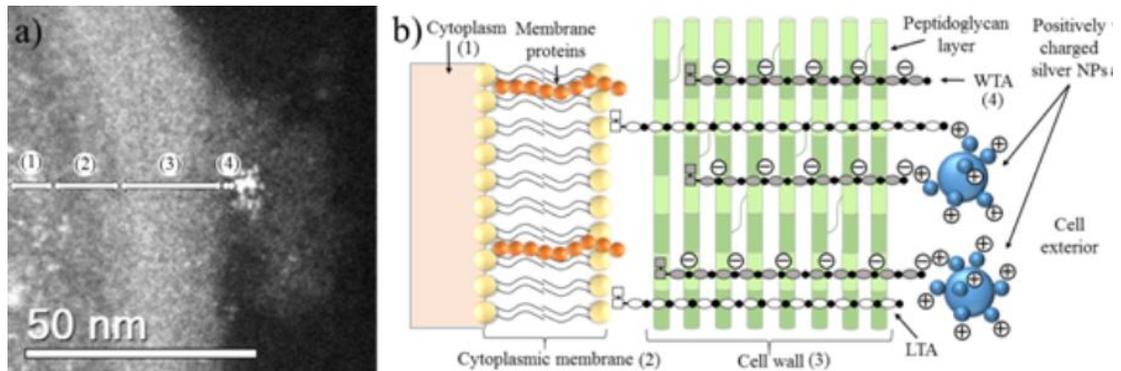


Figura 2. a) Microscopía electrónica de transmisión (TEM por sus siglas en inglés)-Disrupción de membrana en la bacteria *Staphylococcus aureus* expuesta a AgNPs. (1) Citoplasma, (2) membrana citoplasmática, (3) pared celular y (4) ácidos teicoicos. b) Diagrama hipotético de la interacción entre las AgNPs y los ácidos teicoicos de la pared celular (WTA=ácidos teicoicos en pared celular; LTA= ácidos lipoteicoicos) (Lara *et al.*, 2015).

2.1.2.2 Internalización de AgNPs en la célula. Las nanopartículas que no causan un daño letal en las membranas celulares y logran introducirse en la célula interactúan con el material intracelular, principalmente con las proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Las AgNPs pueden interactuar con los grupos fosfato de las bases nucleotídicas del ADN causando la ruptura de la doble cadena por la desestabilización de los puentes de hidrógeno (Kumar *et al.*, 2016; Sadoon *et al.*, 2020). Así mismo, las AgNPs pueden disminuir la capacidad de replicación de la célula, al propiciar que la molécula del ADN cambie de su estado relajado a la forma condensada (Feng *et al.*, 2000). Dentro de las células, las AgNPs también pueden ocasionar la desnaturalización de ribosomas causando inhibición en la síntesis de proteínas (Jung *et al.*, 2013). Las AgNPs y los iones de plata tienen una tendencia a reaccionar con los grupos thiol de las proteínas, que se encuentran en el grupo funcional del aminoácido cisteína, que es muy importante en las reacciones biológicas debido a su alta afinidad a la unión con metales y la habilidad de formar puentes disulfuro importantes para la organización tridimensional de las proteínas (Roy *et al.*, 2019).

2.1.2.3 Toxicidad celular. Otro mecanismo de acción de las AgNPs es la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés), en condiciones normales la producción de ROS y la capacidad antioxidante de las células están en equilibrio, pero cuando hay un desbalance por la excesiva producción de ROS se favorece la oxidación generando estrés oxidativo en las células (Roy *et al.*, 2019). El incremento de estrés oxidativo es un indicador de los efectos tóxicos causados por metales pesados como la plata (Dakal *et al.*, 2016), en diversos organismos se ha observado la generación de estrés oxidativo en organismos expuestos a AgNPs (Sadoon *et al.*, 2020) debido a que el potencial antimicrobiano de las AgNPs se relaciona con la capacidad de producir ROS y especies de radicales libres como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), anión superóxido (O_2^-), radical hidroxil (OH) y ácido hipocloroso (HOCl) (Kim *et al.*, 2011). Durante la fosforilación oxidativa en las mitocondrias también se generan ROS de forma normal, pero la presencia de iones de plata puede bloquear la función de las mitocondrias durante el proceso de respiración, afectando la cadena transportadora de electrones por la inhibición de enzimas, generando una cantidad excesiva de radicales libres que pueden dañar la membrana mitocondrial causando necrosis y eventualmente la muerte de la célula (Dakal *et al.*, 2016). La producción de ROS en las células está relacionada con la concentración de AgNPs a las que son expuestos los organismos, en un estudio con bacterias *Nitrosomonas europaea* y *Azotobacter vinelandii* se observó mayor producción de ROS con 10 mg/L (Zhang *et al.*, 2019).

2.1.2.4 Señalización celular. Las rutas de la señalización celular dependen de diversos mecanismos como la glicosilación, metilación y acetilación, así como la cascada de fosforilación y desfosforilación de proteínas o enzimas que son esenciales en los procesos celulares, las AgNPs pueden interactuar con los grupos fosfato y modular la transducción de señal en los organismos, la cual es importante para el crecimiento, procesos metabólicos y actividades celulares incluyendo el ciclo celular y replicación de ADN (Roy *et al.*, 2019;). En bacterias las AgNPs modulan la señalización celular desfosforilando residuos de tirosina en sustratos de péptidos bacterianos, inhibiendo de esta manera el crecimiento bacteriano (Shrivastava, 2008).

2.1.3 Nanopartículas de Plata para Eliminar Microorganismos Patógenos

Aunque las AgNPs tienen una variedad de aplicaciones, la utilización en el área médica ha tenido mucha atención debido al incremento de enfermedades infecciosas en el mundo y a la resistencia que los microorganismos generan a los fármacos o sustancias que se utilizan para tratar de erradicarlos. Por tal motivo se han realizado varios estudios para determinar las propiedades biomédicas de las AgNPs como antibacterianas, antivirales e insecticidas (Shanmuganathan *et al.*, 2019). Se ha demostrado que las AgNPs pueden eliminar distintas especies de bacterias que provocan enfermedades en humanos; *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, y *Vibrio cholerae* (Bhatia *et al.*, 2016; Benakashani *et al.*, 2016; Buszewski *et al.*, 2018). Las AgNPs no sólo actúan contra las bacterias sino también pueden desintegrar las asociaciones que algunas de ellas generan para ser más resistentes o patogénicas, el biofilm. Se ha determinado que las AgNPs tienen actividad antibiofilm, pueden desintegrar el biofilm conformado por bacterias *Klebsiella pneumoniae*, las cuales tienen gran importancia clínica por su alto grado de patogenicidad (Shanmuganathan *et al.*, 2019). En lo que respecta a la capacidad de las AgNPs para combatir hongos patógenos son pocos los estudios al respecto, sin embargo se ha evaluado que las AgNPs pueden actuar contra *Penicillium citrinum*, *Aspergillus niger*, *Trichophyton Mentagrophytes* y *Candida albicans* (Galdiero *et al.*, 2011).

Los virus son microorganismos que causan enfermedades altamente contagiosas y letales para los seres vivos como el síndrome respiratorio agudo grave (SARS), la influenza, VIH/SIDA, hepatitis, Chikunguña, etc., la dificultad para erradicarlos se debe a su alta habilidad de adaptación en los hospederos y variadas estrategias para escapar de los antivirales, por lo cual, constantemente se están desarrollando antivirales. Se ha determinado que las AgNPs pueden actuar contra los virus, en el cuadro 1 se muestran los principales virus y mecanismos de acción sobre los que actúan las AgNPs.

Cuadro 1. Actividad Antiviral de AgNPs (Galdiero *et al.*, 2011)

Virus	Familia	Tipo de AgNPs	Mecanismos de acción	Referencias
Hepatitis B	Hepadnaviridae	10-50 nm	Interacción con partículas virales	Lu <i>et al.</i> , 2013
Monkeypox virus	Poxviridae	10-80 nm	Bloqueo de la unión y penetración celular	Rogers <i>et al.</i> , 2008
Virus sincitial respiratorio	Paramyxoviridae	69 nm PVP	Interferencia en la unión viral	Sun <i>et al.</i> , 2008
HSV-1 (Herpes simple)	Herperviridae	4 nm	Inhibición de la unión del virus con la célula	Baram-Pinto <i>et al.</i> , 2010
VIH-1	Retroviridae	1-10 nm PVP	Interacción con gp120	Lara <i>et al.</i> , 2010
Tacaribe virus	Arenaviridae	10 nm	Inactivación de partículas virales	Speshock <i>et al.</i> , 2010

Así mismo, algunas investigaciones han demostrado que las AgNPs pueden ser efectivas como larvicidas ya que eliminan diferentes estadios de larvas de mosquitos (Cuadro 2). Las larvas de mosquito se han considerado como uno de los principales vectores de enfermedades mortales como la malaria, el dengue, zika, chikunguya, fiebre amarilla, entre otras.

Cuadro 2. Efectividad de AgNPs en larvas de mosquitos.

Concentración	Tamaño nm	Especies	Tiempo mortalidad	Autores
25 mg/L	25-60	<i>Anopheles subpictus</i> <i>Culex quinquefasciatus</i>	100% mortalidad a las 24 hrs.	Velayutham <i>et al.</i> , 2013
50 mg/L	250	<i>C. quinquefasciatus</i> <i>C. gelidus</i>		
5 mg/L	60-150	<i>Haemaphysalis bispinosa</i> <i>H. maculata</i>	100% mortalidad después de 24 h.	Jayaseelan <i>et al.</i> , 2012
30 µg/ml	38-41	<i>A. subpictus</i> <i>A. albopictus</i> <i>Culex sp.</i>	95-99% mortalidad en 24 hrs.	Govindarajan y Benelli, 2015

En la agricultura, las plagas producidas por insectos son un problema que durante años se ha combatido desarrollando plaguicidas químicos, sin embargo los plaguicidas suelen disminuir su

efectividad por la resistencia que pueden generar los insectos, además pueden ocasionar daños a los ecosistemas, por lo tanto también se ha evaluado la actividad de las AgNPs sintetizadas con extractos de plantas con propiedades insecticidas. AgNPs sintetizadas a partir de *Euphorbia prostrata* poseen actividad insecticida contra el coleóptero *Sitophilus oryzae* que es responsable de provocar plagas en cultivos de arroz, trigo y granos de maíz (Zahir *et al.*, 2012). En la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*, se han dirigido varios estudios donde además de evaluar el efecto de las AgNPs como insecticida, también se han determinado mecanismos de acción a nivel molecular como la acumulación de ROS en tejidos que ocasionan apoptosis, daño al ADN, autofagia y activan mecanismos antioxidantes (Philbrook *et al.*, 2011; Armstrong *et al.*, 2013; Ávalos *et al.*, 2015). En el gusano del algodón o gusano del tabaco, *Spodoptera litura*, se observó que las AgNPs también generan estrés oxidativo y una reducción de enzimas de la microbiota intestinal; amilasa, peptidasa y lipasa (Yasur y Usha-Rani, 2015; Bharani y Namasivayam, 2017).

2.1.4 Efecto de las AgNPs en Helmintos

Existen pocos estudios donde se evalúa el efecto antihelmíntico de las AgNPs, la mayoría de ellos utilizan AgNPs sintetizadas a partir de extractos de plantas o frutas con la finalidad de utilizar AgNPs que causen el menor daño posible al ambiente, además de que algunas de estas plantas poseen propiedades antihelmínticas.

Priya y Santhi (2015) evaluaron la actividad antihelmíntica de AgNPs (9 nm) en gusanos de tierra *Eudrilus eugeniae* y *Eisenia fétida* obteniendo un efecto dosis-dependiente, registraron el 100% de mortalidad en 90 min, 69 min y 23 min con 10, 20 y 50 mg/ml de AgNPs respectivamente. Rashid *et al.*, (2016) evaluaron AgNPs sintetizadas a partir de extracto de la fruta *Momordica charantia* (78-100 nm) en el gusano de tierra *Pheretima posthuma*, la sinergia de las AgNPs y el extracto redujeron el tiempo de mortalidad en los gusanos por lo que sugieren el potencial uso de ambos compuestos para eliminar parásitos en humanos. En otro estudio se analizaron otro tipo de AgNPs (10-40 nm) en *P. posthuma*, obteniendo una mortalidad del 100% con la concentración de 2 mg/ml, así como desprendimiento del tegumento (Shelar *et al.*, 2019). De igual manera en el nematodo

Ancylostoma caninum se determinó el efecto nematicida de AgNPs (14.5 nm) y la capacidad de las nanopartículas para penetrar la cutícula de las larvas causando alteraciones en el tegumento y por consecuencia la muerte (Barbosa *et al.*, 2019).

Taha y Abo-Shady (2016) evaluaron diferentes concentraciones de AgNPs (1500, 500, 200, 40 y 20 ppm) en la mortalidad de nemátodos *Heterorhabditis indica*, *Steinernema arenarium* y *S. abbasi*, mostrando que las AgNPs son efectivas para eliminar a estos parásitos de manera dosis-dependiente y el tiempo de exposición, así como una disminución en la reproducción con las concentraciones de 500 y 1500 ppm. De igual forma en el nemátodo *Haemonchus contortus* se inhibió la motilidad de los parásitos y se determinó la LC₅₀ con una concentración de 7.89 µg/ml de AgNPs (15-25 nm) (Tomar y Preet, 2017). Kumari *et al.*, (2019) evaluaron diferentes concentraciones de AgNPs (10, 20 y 50 ppm) sintetizadas con extracto de *Mentha piperita* en el cestodo *Raillietina sp* y el nemátodo *Ascaridia galli*, sus resultados indican un efecto dosis-dependiente, con la concentración más alta se redujo el tiempo de mortalidad; 11 min para *Raitillienia sp* y 9 min en *A. galli* en comparación con el grupo control (50 min).

Rehman *et al.*, (2019) determinaron el efecto de las AgNPs (8 nm) en el trematodo *Gigantocotyle explanatum*, a partir de las 8 horas registraron un decremento en la motilidad con 50 µg/ml de AgNPs, también registraron la producción del anión superóxido como un indicador de generación de ROS y la actividad de superóxido dismutasa y glutatión como respuesta del sistema antioxidante e inducción de apoptosis por la fragmentación del ADN. Adicionalmente, con Microscopia electrónica de barrido (SEM por sus siglas en inglés) observaron que las AgNPs causaron un daño evidente en la pérdida de la arquitectura normal del tegumento de los parásitos, lesiones severas y deformación del cuerpo, así como la formación de ampollas (Fig. 3).

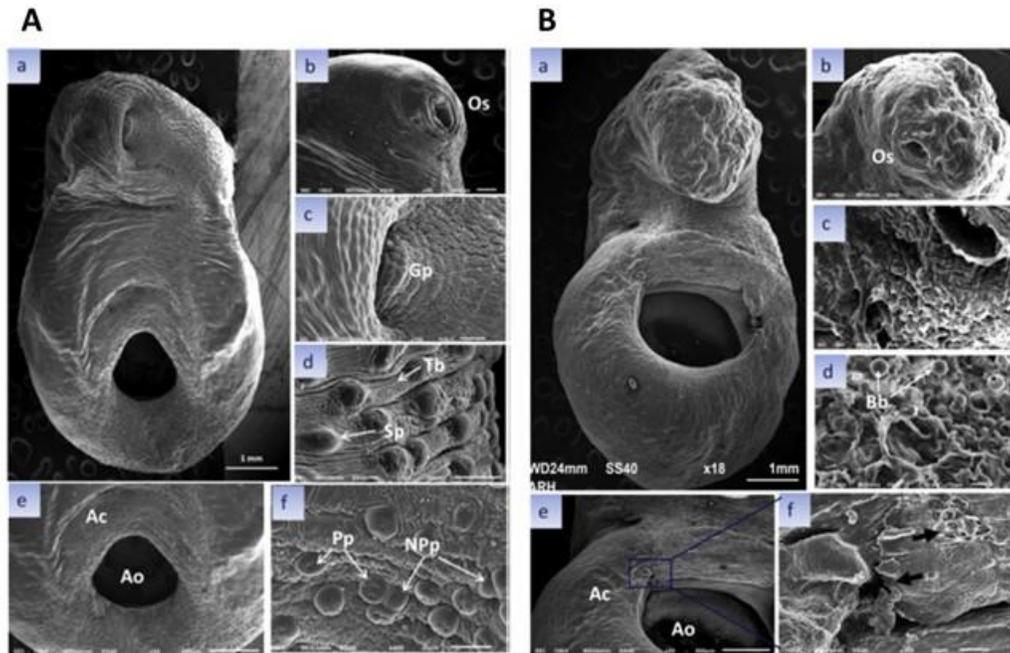


Figura 3. Ultraestructura del tegumento de *Gigantocotyle explanatum*, A) Regiones del cuerpo normales, B) Regiones del cuerpo con daños en tegumento por exposición a AgNPs (50.50 µg/ml). a) región anterior, b) ventosa oral, c) papilas y pliegues tegumentales alrededor del genoporo, d) superficie lateral con papilas y tubérculos sensoriales, e) región posterior mostrando el acetábulo y f) superficie ventral con papilas prominentes. Ac: acetábulo, Ao: abertura acetabular, Bb: burbujas, Gp: genoporo, Os: ventosa oral, Pp: papilas picadas, NPp: papilas no picadas, Sp: papila sensorial, Tb: tubérculos, flechas: daño severo (Rehman *et al.*, 2019).

La mayoría de los estudios en helmintos se enfocan en determinar el tiempo y concentración de AgNPs a la que mueren los parásitos, pocos autores evalúan los mecanismos de acción, no obstante hay algunas investigaciones donde se analizan los efectos de las AgNPs en organismos modelo como el nematodo *C. elegans*.

Las AgNPs tienen un efecto tóxico en *Caenorhabditis elegans*, pueden reducir el porcentaje de supervivencia, así como afectar la reproducción. Kim *et al.*, (2012) analizaron la interacción de nanopartículas de plata recubiertas con citrato (cAgNPs) en la superficie del nemátodo *C. elegans*, observaron un efecto dosis-dependiente en la supervivencia con concentraciones hasta 100 mg/L, también obtuvieron la disminución en la viabilidad reproductiva con 10 mg/L cAgNPs. Mediante microscopía electrónica de barrido (SEM por sus siglas en inglés) se evidenciaron fisuras en la epidermis en los gusanos expuestos a 10 mg/L y daños mayores como estallamiento epidermal con 100 mg/L de cAgNPs (Figura 4).

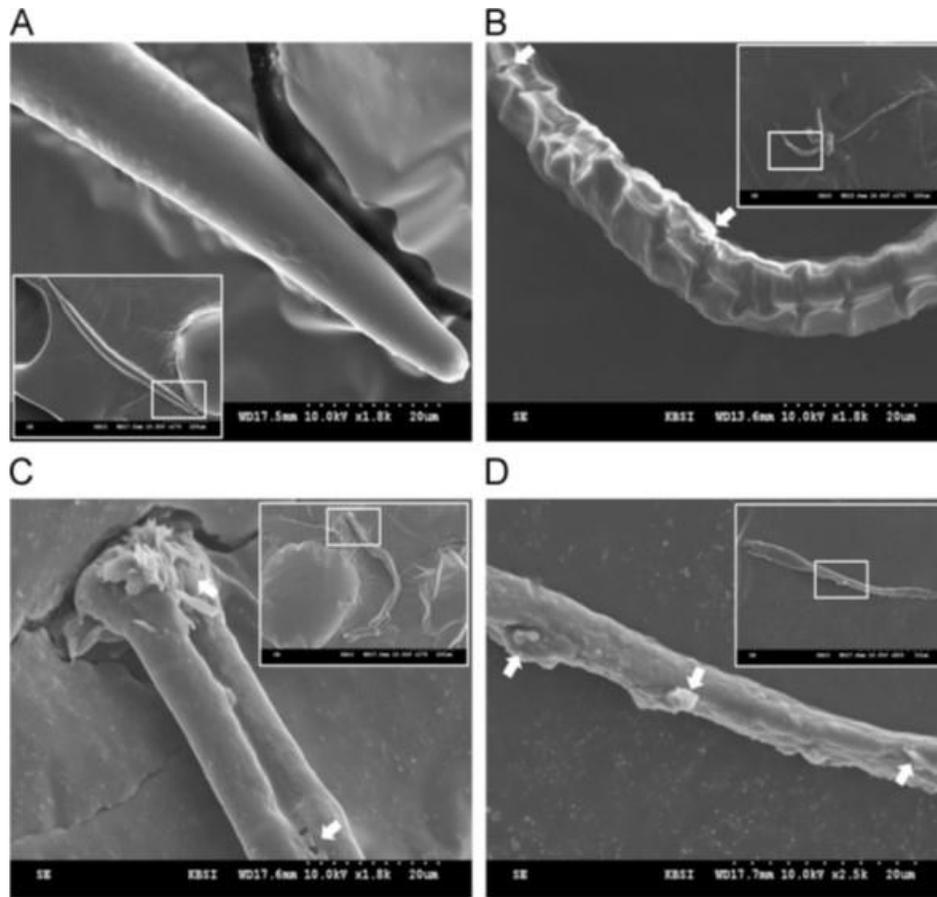


Figura 4. Microscopía electrónica de barrido de *Caenorhabditis elegans* expuestos a cAgNPs: A) control, B) 10 mg/L, C) y D) 100 mg/L. Flechas blancas indican división epidermal y necrosis (Kim *et al.*, 2012).

En otro estudio se analizó la toxicidad molecular de AgNPs recubiertas con PVP y sin recubrimiento en *C. elegans*. Con las AgNPs-PVP se reduce significativamente la toxicidad y las AgNPs de menor tamaño fueron más tóxicas. Las AgNPs indujeron la expresión de los genes relacionados al estrés metabólico (*aak-2*, *sir-2.1*), apoptosis (*ced-3*) y respuesta inmune (*pmk-1*). Se observó mediante microscopia de fluorescencia la formación de ROS indicando que las AgNPs inducen estrés oxidativo en el nematodo, así como un decremento en el potencial de la membrana mitocondrial sugiriendo que las AgNPs pueden alterar la permeabilidad de la membrana mitocondrial. El daño en el ADN se determinó por el incremento del marcador de daño oxidativo (8-OHdG) (Ahn *et al.*, 2014).

Wu y colaboradores (2019) realizaron una revisión sobre las principales evaluaciones de la

toxicidad de las AgNPs en *C. elegans* (Cuadro 3), concluyendo que la exposición a concentraciones subletales de AgNPs inducen alteraciones en el desarrollo, la función intestinal, respuesta inmune, función neuronal y reproducción.

Cuadro 3. Estudios de nanopartículas de plata en *Caenorhabditis elegans* (Tomado de Wu *et al.*, 2019)

Tamaño nm	Concentración	Tiempo	Estadio	Toxicidad	Referencias
<100	0.026-0.607 mg/L	24 h	L1	Letalidad, estrés oxidativo, daño al ADN	Ahn <i>et al.</i> , 2014
12±9.2 49.3±22.5	2 mg Ag/L	24 h 24 h	L4	Crecimiento	Bone <i>et al.</i> , 2014
2.2 ± 0.8 4.7 ± 0.9 8.9 ± 1.9	1-100 gm Ag/L		L1	Fertilidad, tiempo de vida, crecimiento, letalidad	Contreras <i>et al.</i> , 2014
	0.2-500 µg/mL	2-24 h	L4	Tiempo de vida, locomoción, letalidad, estrés oxidativo	Soria <i>et al.</i> , 2015
58.3 ± 12.9 64.5 ± 19.4	50-100 µg Ag/L 1000-4500 µg Ag/L	24 h 48 h	L4	Letalidad, crecimiento, reproducción	Starnes <i>et al.</i> , 2015
8	0.0625-4mg Ag/L	48-72 h	L2	Reproducción, tiempo de vida	Tyne <i>et al.</i> , 2015
	52-85 µg Ag/L	24 h	L3	Metabolismo, estrés oxidativo, expresión de genes.	Starnes <i>et al.</i> , 2016
25, 75	1-25 µg/mL	12 h	L4	Reproducción, tiempo de vida	Luo <i>et al.</i> , 2016
25 ± 9	0.1-1.5 mg Ag/L	24-48 h	L1	Crecimiento	Maurer <i>et al.</i> , 2016
58.3 ± 12.9	0.75-24 mg Ag/L	24 h	L1	Reproducción, tiempo de vida, crecimiento	Schultz <i>et al.</i> , 2016
<100	0.01-10 µg/mL	24-72 h	L4	Reproducción, tiempo de vida, crecimiento, apoptosis, estrés oxidativo	Luo <i>et al.</i> , 2017
96.4 ± 35.6	0.005-1 mg/L	6-24 h	L4	Desarrollo, crecimiento, expresión de proteínas	Kim <i>et al.</i> , 2017
16.7 ± 6.5	0.2-10 mg/L	20-96 h	L1	Reproducción	Kleiven <i>et al.</i> , 2018
17.24 ± 3.17	1-100 µg/mL	26 h	L4	Tiempo de vida, locomoción, neurodegeneración	Walczynska <i>et al.</i> , 2018

2.1.5 Nanopartículas de Plata para Eliminar Patógenos en Acuicultura

Las AgNPs tienen un gran potencial antimicrobiano, sin embargo no se había explorado su utilización para eliminar patógenos en sistemas acuáticos, son pocos los estudios con este enfoque. La mayoría de los trabajos se han centrado en evaluar las AgNPs en bacterias y virus que causan enfermedades en camarones de cultivo, los diseños experimentales han sido variables, se han aplicado distintos tipos de AgNPs, tamaño, forma, concentración y tipo de administración, en todos los estudios se ha determinado que las AgNPs son viables para eliminar o disminuir la carga bacteriana de *Vibrio harvey*, *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* y *Rickettsia spp.*, así como la carga viral del virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV) (Vaseeharan *et al.*, 2010; Kandasamy *et al.*, 2013; Sivaramasamy *et al.*, 2016; Acedo-Valdez *et al.*, 2017; Juárez-Moreno *et al.*, 2017; Ochoa-Meza *et al.*, 2019; Romo-Quiñonez *et al.*, 2020).

En lo que se refiere a parásitos, solamente se han desarrollado dos trabajos donde analizan el efecto de las AgNPs. En el ectoparásito ciliado *Ichthyophthirius multifiliis* que provoca la enfermedad de “puntos blancos” en peces de agua dulce y es el responsable de severas epizootias en cultivos acuáticos, se determinó que a 10 ng/ml de AgNPs eliminan el 100% de los terontes (ciliado de vida libre) e inhiben la reproducción de los tomites (quistes) (Saleh *et al.*, 2017). Fuentes-Valencia *et al.*, (2020) utilizaron el protozoario ciliado *Tetrahymena sp.* como modelo de estudio para evaluar el efecto antiprotozoario de las AgNPs en ectoparásitos ciliados de peces. Utilizaron dos tipos de AgNPs con características diferentes: ARGOVIT (recubiertas con PVP, 35 nm) y UTSA (sin recubrimiento, 1-3 nm). Determinaron que ambos tipos de AgNPs son efectivas para eliminar al 100% de los protozoarios, 3300 ng/L Argovit a los 15 min y 10.6 ng/L UTSA AgNPs en 60 min, además las AgNPs UTSA no ocasionaron daños en los tejidos de peces *Chirostoma estor* expuestos a la concentración letal por 96 horas.

Aunque en estos estudios se sugiere la aplicación de AgNPs para eliminar parásitos protozoarios en los cultivos de peces, hasta el momento no existen estudios enfocados en determinar la efectividad de las AgNPs en helmintos parásitos como los monogeneos.

2.2 Parásitos Monogeneos

Los monogeneos son un grupo de parásitos del Phylum Platyhelminthes, representado por aproximadamente 5000 especies. Están distribuidos en todas las latitudes, sus principales hospederos son peces marinos y dulceacuícolas pero también parasitan anfibios y tortugas, pueden ser generalistas, aunque una característica es la especialización que tienen con algunos hospederos. La mayoría son ectoparásitos, se encuentran generalmente en la piel (aletas o escamas) y/o branquias de los peces, los endoparásitos se pueden encontrar en la vejiga de peces y anfibios, el celoma y otras cavidades. Su tamaño puede variar entre 0.3 mm hasta 20 mm aproximadamente (Frasca *et al.*, 2018).

Los monogeneos del género *Cichlidogyrus* pertenecen a la familia Ancyrocephalidae, son un grupo de ectoparásitos que se hospedan en las branquias de peces cíclidos y ciprínidos principalmente, estos helmintos tienen una distribución mundial pero mayormente habitan en ambientes tropicales y subtropicales. La presencia de estos helmintos en México fue gracias a la introducción de mojarra exóticas posiblemente provenientes del continente Sudafricano (Salgado-Maldonado y Rubio-Godoy, 2014). Flores y Flores (2003), realizaron un listado donde hay reportes de *Cichlidogyrus* en cultivos de tilapia (*Oreochromis* spp) en México, mayormente en la región del Golfo de México y Mar Caribe, así como en Guerrero, Morelos, Distrito Federal, Nuevo León, Chiapas y Jalisco. En Sinaloa también hay registros de la presencia de parásitos *Cichlidogyrus* en los cultivos de tilapias (Morales-Serna *et al.*, 2018).

2.2.1 Anatomía General de los Monogeneos

La anatomía general externa de los monogeneos consiste en una región cefálica donde se localizan los ocelos, las glándulas adhesivas y la boca, la parte media o tronco, y la región posterior o el haptor que es la estructura de fijación de forma variable y puede estar dotada de ganchos grandes o pequeños, ventosas, grapas o varias a la vez. La superficie dorsal del cuerpo es convexa y la

ventral cóncava de color incoloro pero por el alimento puede observarse rojizo, amarillento o parduzco (Figura 5) (Drago y Núñez, 2017).

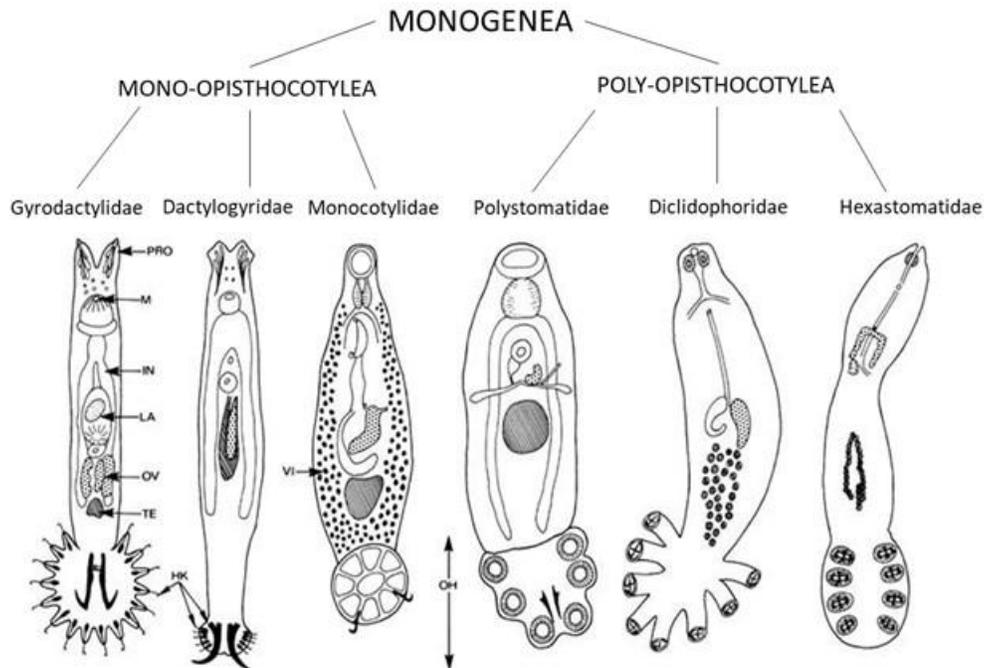


Figura 5. Diversidad de parásitos monogeneos. (PRO; prohaptor, M; boca, IN; intestino, OV; ovario, TE; testículo, HK; ganchos del opistoháptor). Modificado de Drago y Núñez, 2017.

La anatomía interna consiste en el tegumento; los helmintos en general poseen un tegumento que recubre los tejidos internos de los parásitos, tiene una epidermis de naturaleza sincitial, sin cilios pero con micro vellosidades, a menudo protuberancias con o sin espinas, una lámina basal que por debajo se encuentra una capa de músculos circulares y longitudinales. Los músculos en el haptor están bien desarrollados para su función de anclaje en los tejidos del hospedador. El aparato digestivo está formado por la boca ubicada en la parte anterior continúa con la prefaringe y una faringe muscular y las glándulas faríngeas, dos ciegos intestinales y nefriductos que desembocan en el poro excretor. El sistema nervioso está compuesto por dos ganglios cefálicos en la parte anterior del cuerpo, de estos ganglios se ramifican varios nervios que recorren la región dorsal, lateral y ventral. El opistohaptor tiene muchas inervaciones y posee papilas mecanorreceptoras (Drago y Núñez, 2017).

Los monogéneos son hermafroditas y la fecundación ocurre por fecundación cruzada, el espermatozoide de un parásito fertiliza al óvulo de otro. El sistema reproductor femenino está compuesto por un ovario unido al oviducto comunicado con los ductos vitelínicos, vaginal y genitointestinal. La vagina puede estar ausente o presente y en este caso ser simple o doble, puede tener una dilatación, el receptáculo seminal, en donde se almacenan los espermatozoides de otro individuo hasta el momento de la fecundación. Las glándulas vitelógicas están formadas por pequeños folículos dispuestos lateralmente, de cada uno de ellos surge un pequeño ducto, los cuales se unen formando dos conductos vitelínicos. Existen dos tipos básicos de sistema reproductor, distinguiéndose por las conexiones de la vagina, conductos vitelínicos y presencia o ausencia de canal genitointestinal. La fecundación suele ocurrir en el oviducto, luego las cigotas pasan al ootipo reuniéndose con las células vitelínicas y los productos de las glándulas de Mehlis. En las especies que no presentan vagina la cópula se realiza a través del poro uterino o por impregnación hipodérmica. Todas las especies de monogéneos son ovíparos excepto los *Gyrodactylus*. El número de huevos que producen varía de acuerdo a la especie y condiciones del hábitat, entre 5 y hasta 60 huevos. Las condiciones ambientales adversas como una mala calidad del agua y la defensa de los hospederos aceleran la ovoposición (Whittington, 2011). Casi todos los huevos de monogéneos poseen largos filamentos que les permite mantenerse adheridos a la cavidad branquial o a sustratos en el agua.

2.2.2 Ciclo de Vida

El ciclo de vida de los monogéneos es directo, sólo tienen un hospedero, de ahí el nombre de monogéneo. Las tres fases importantes de los parásitos son: el huevo, oncomiracidio y el adulto (Figura 6). Cuando ocurre la fertilización cruzada algunos monogéneos almacenan los huevos a nivel del ootipo (una expansión muscular del conducto femenino), para posteriormente liberarlos al exterior a través de un poro. Sin embargo, la mayoría de los monogéneos transfiere los huevos del ootipo hacia el útero. Los huevos son liberados en cuerpos de agua, un parásito maduro puede liberar de 10 a 22 huevos, el tiempo de incubación es dependiente a la temperatura del agua. Existen especies que producen huevos que pueden permanecer a temperaturas de 6°C en estado latente y permanecen en el fondo de los tanques y se reactivan para completar su ciclo de vida

cuando las temperaturas son cálidas. Los parásitos adultos se hospedan principalmente en branquias, piel, aletas y cavidad bucal de los peces (Cable *et al.*, 2003), donde ponen los huevos y mueren, por lo que el desarrollo de los huevos se realiza directamente en el huésped, y en su forma larvaria pueden nadar libremente hasta encontrar otro hospedero (Whittington, 2011). Estas características permiten a los monogeneos alcanzar altos niveles de infección en peces en cultivo, en especial cuando las densidades de siembre son altas.

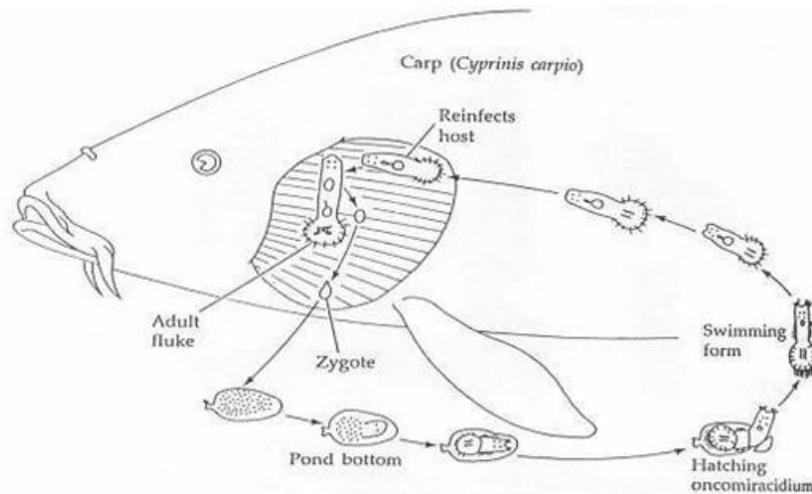


Figura 6. Ciclo de vida de monogeneos.

2.2.3 Anatomía de los Parásitos *Cichlidogyrus*

Las características particulares del género *Cichlidogyrus* son: presentan tres pares de glándulas cefálicas y dos ocelos con lentes cristalinos. El haptor tiene varias estructuras esclerosadas; un par de ganchos centrales y otro transversal y dos barras transversales con una barra dorsal con dos aurículas y una barra ventral cuya forma y número de ganchos marginales pueden variar dependiendo de la especie. La forma y tamaño del órgano copulador masculino puede variar y tener una pieza accesoria esclerotizadas al igual que la vagina, estas estructuras esclerosadas se utilizan para la diferenciación e identificación de las especies de *Cichlidogyrus* (Figura 7) (Agos *et al.*, 2016).

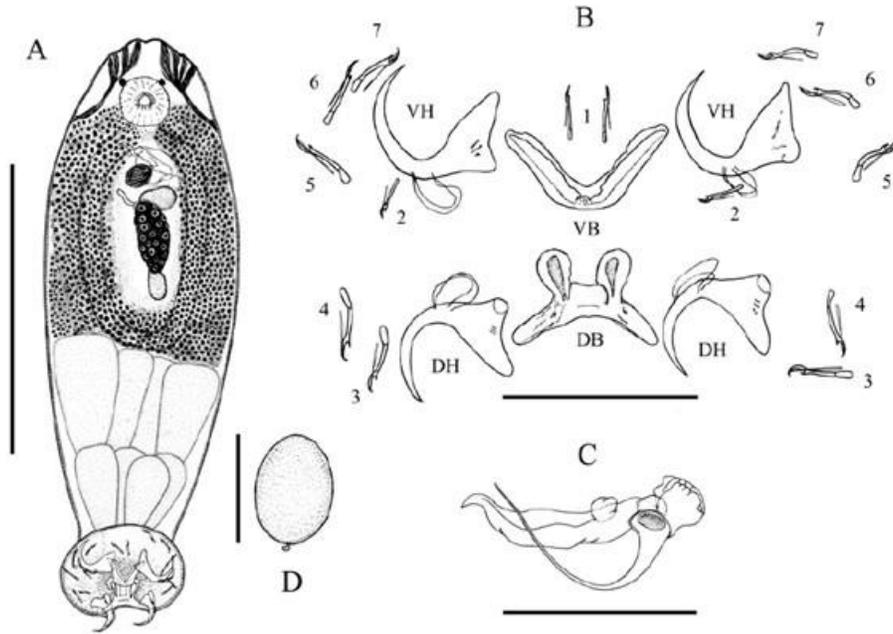


Figura 7. Estructuras esclerosadas de *Cichlidogyrus sclerosus*. A; organismo completo, B; piezas del haptor, C; órgano copuladorio, D; huevo. VH; hamulus ventral, DH; hamulus dorsal, VB; barra ventral, DB; barra dorsal.

El ciclo de vida de los *Cichlidogyrus* es igual al de cualquier monogeneo. Los huevos de los parásitos *Cichlidogyrus* tienen la anatomía y funcionamiento común de los *Dactylogyridos*, poseen un filamento rudimentario por lo que los huevos al ser ovopositados se van al fondo de los sistemas acuáticos de cultivo (Imada y Muroga, 1978). Los huevos eclosionan entre 2 y 6 días a temperaturas entre 20 y 28°C (Figura 8) (Hutson *et al.*, 2018). Emerge una larva de vida libre, el oncomiracidio, recubierta de cilios y con dos ojos pigmentados (ocelos) y el haptor con los ganchos marginales desarrollados. El tiempo de vida del oncomiracidio es entre 12 y 48 horas, pero en las primeras seis horas son más activas para encontrar a su hospedero y fijarse en la piel y/o branquias de los peces (Paperna, 1963).

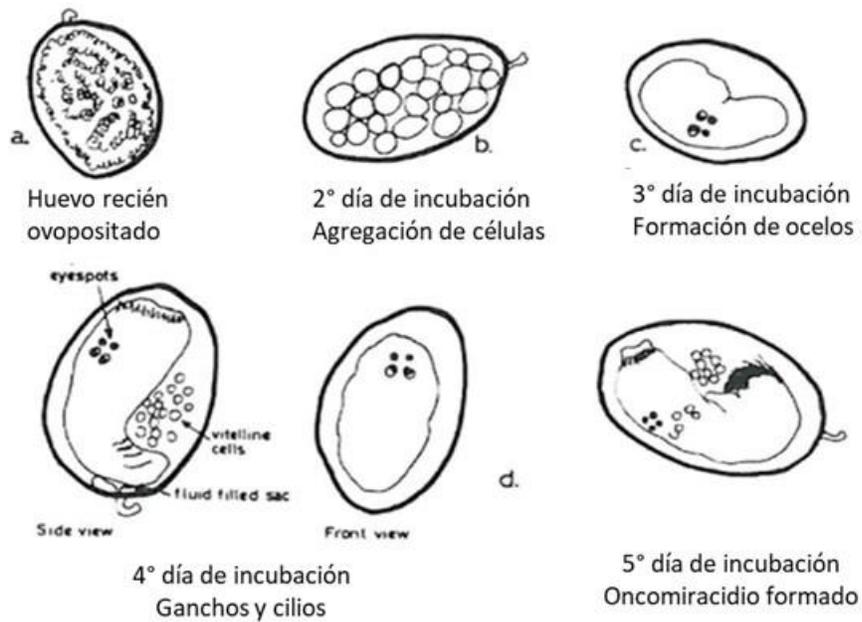


Figura 8. Desarrollo de huevos del parásito *Cichlidogyrus sclerosus*. Modificado de Shaharom-Harrison, 1982

El tegumento en los parásitos del género *Cichlidogyrus* se ha descrito para la especie *C. halli typicus*. Se ha observado que la capa externa del tegumento tiene una membrana exterior simple, sin ornamentaciones o cutícula protectora, un citoplasma o sincitio continuo y denso con regiones de citoplasma granular, muchas mitocondrias y vesículas secretoras distribuidas a lo largo del sincitio. Seguido de una membrana y lámina basal y capas inferiores de fibras de músculo circular y fibras de músculo longitudinal. El núcleo de las células se encuentra en los citones que traspasan la capa de los músculos longitudinales (Figura 9). El tegumento tiene roles importantes para la homeostasis de los parásitos, funciones de absorción de nutrientes, locomoción, excreción, regulación de gradientes osmóticos y electroquímicos, así como estructuras de soporte y protección (Thompson y Geary, 1995).

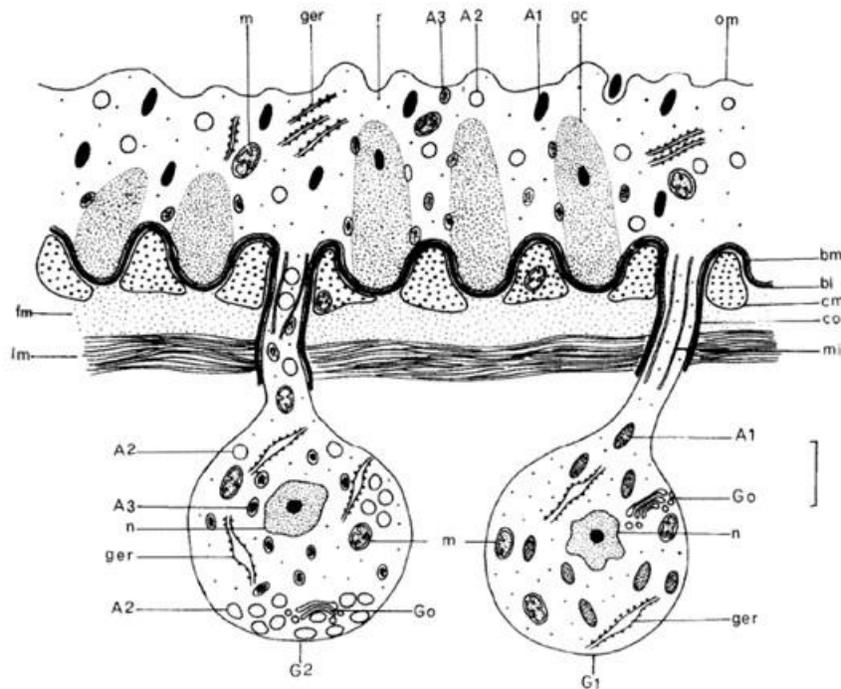


Figura 9. Diagrama de la Ultraestructura general del tegumento de *Cichlidogyrus halli typicus* en sección longitudinal (El-Naggar *et al.*, 1991). A1, A2, A3, vesículas secretoras; bl, lámina basal; bm, membrana basal; cm, fibras musculares circulares; co, conexiones citoplasmáticas; fm, material fibroso; ge, región de citoplasma granular homogéneo; G1, cyton produciendo cuerpos A1; G2, cyton produciendo vesículas A2 y A3; ger, retículo endoplasmático granular; Go, cuerpo de Golgi; lm, fibras musculares longitudinales; m, mitocondria; mi, microtúbulos; n, núcleos; om, membrana exterior; r, ribosomas.

2.2.4 Problemas en Cultivo de Peces Ocasionados por Monogeenos

Los parásitos monogeenos pueden causar graves problemas de salud tanto en peces en cautiverio como en silvestres, sin embargo, los mayores problemas se presentan en los sistemas de cultivo, debido a los estresores propios del cautiverio como el hacinamiento, pobres condiciones nutricionales y mala calidad del agua que pueden impactar en deprimir el sistema inmune de los peces y provocar la fácil infestación de parásitos (Francis-Floyd *et al.*, 2019). Algunas especies de monogeenos pueden causar graves problemas en los sistemas de cultivo y ocasionar la muerte masiva de peces, por ejemplo *Gyrodactylus salaris* ha ocasionado grandes mortandades en los salmones del Atlántico, *Salmo salar*, tanto en cautiverio como en estado silvestre.

Los peces infestados con parásitos monogeneos pueden volverse letárgicos y presentar deficiencias nutricionales. Infestaciones altas pueden provocar enfermedades respiratorias, las branquias pueden sufrir heridas provocadas por los ganchos del haptor de los parásitos y provocar hemorragias que impidan el correcto intercambio gaseoso, si la infestación se prolonga puede causar grandes mortalidades en los sistemas de cultivo. Así mismo, los monogeneos pueden proveer la entrada a infecciones secundarias de bacterias y hongos en los tejidos dañados por los parásitos, entonces la mortalidad en los peces puede darse por una sinergia entre los monogeneos y bacterias u hongos (Francis-Floyd *et al.*, 2019). Algunas especies pueden ser más patógenas que otras, por ejemplo los monogeneos del género *Gyrodactylus* han sido los responsables de graves mortalidades de peces a nivel mundial (García-Vásquez *et al.*, 2010; Akoll *et al.*, 2012). Especies del género *Benedenia* y *Neobenedenia* infectan piel y branquias de peces marinos. En el caso de infestaciones por *Dactylogyrus* no hay reportes de que causen daños letales en peces cíclidos, sin embargo en Asia se ha reportado que la especie *Cichlidogyrus sclerosus* que parasita a *Oreochromis niloticus*, ocasiona daños en los peces.

En general, los monogeneos como los parásitos *Cichlidogyrus*, pueden ocasionar lesiones leves como pequeñas erosiones o úlceras e inflamación en los tejidos donde se adhieren, pero en peces con altas infestaciones se pueden presentar lesiones más severas como hiperplasia del epitelio lamelar, necrosis e infecciones secundarias por bacterias y hongos, ocasionando problemas serios de salud al presentar imbalance en la osmoregulación, dificultad para respirar e incluso la muerte en infestaciones severas (Frasca *et al.*, 2018).

2.2.5 Antihelmínticos en Peces

Existen grupos de compuestos químicos y naturales que destruyen los estadios adultos de los monogeneos; sin embargo la eficiencia es baja porque no mata a los huevos, por lo tanto, la reinfección se mantiene en los estanques. Por lo anterior, desde hace varios años se han utilizado compuestos para tratar de erradicar las infestaciones de parásitos monogeneos en peces, algunos de ellos han resultado eficaces en la eliminación de los parásitos o disminuyen la prevalencia, pero

estos no son 100% efectivos para detener la infestación en los tanques de cultivo dado que los huevos de los monogéneos quedan en latencia y tienen la capacidad de reactivar su ciclo de vida cuando las condiciones ambientales le son favorables. En el siguiente cuadro se mencionan los tratamientos más utilizados para tratar de erradicar estos parásitos.

Cuadro 4. Principales compuestos utilizados como antihelmínticos contra parásitos monogéneos (Molnar, 1995).

Tratamiento	Efectos
Formalina al 37% en concentraciones de 20-25 ml en 100 l de agua.	Resultados positivos para el control de Dactylogíridos y Gyrodactílicos.
Cloruro de sodio 40 g/l, permanganato de potasio a 30 ppm y triclorfon a 0.5 ppm	Control de <i>Cichlidogyrus sclerosus</i>

Para eliminar ectoparásitos monogéneos se han establecido algunos compuestos como la formalina, sulfato de cobre, permanganato de potasio, cloruro de sodio, administrados mediante tratamientos de baños (Fájer-Ávila *et al.*, 2007), sin embargo estos productos pueden ser tóxicos para los peces al ser expuestos en tratamientos prolongados (Roberts y Powell, 2003). Además también es cuestionable el uso de estos compuestos por el impacto que pueden tener en el ambiente (Ohashi *et al.*, 2007). Por lo tanto, se necesitan novedosas tecnologías para la exterminación de monogéneos que sean seguras para los peces y el ambiente.

Recientemente, la generación de genomas de parásitos han brindado la posibilidad de implementar técnicas moleculares mediante análisis transcriptómicos y proteómicos para generar información genómica sobre los “targets” para vacunas o fármacos (Manzano-Román *et al.*, 2012). Así mismo, el silenciamiento de genes utilizando RNA de interferencia (RNAi) ha posibilitado una ventana para establecer métodos de control mediante el silenciamiento de genes para la reproducción de los parásitos o genes específicos para el reconocimiento de hospederos, entre otros. En el monogéneo *Neobenedenia girellae* utilizando RNAi se logró el silenciamiento de genes *vasa-vas* (*Ngvlg1* y *Ngvlg2*) implicados en la producción de gránulos en las líneas germinales, posibilitando así una nueva técnica de control al inhibir la gametogénesis de los parásitos (Ohashi *et al.*, 2007).

Sin embargo, existen desventajas en la aplicación de técnicas moleculares en parásitos monogéneos, la mayoría de los estudios moleculares se centran en determinar marcadores moleculares evolutivos para determinar su filogenia o descripción molecular, para lo cual no se requiere tener el genoma completo de los parásitos.

La complicación para obtener genomas completos de las especies de parásitos radica en la dificultad de cultivo *in vitro* de estos organismos, por lo que es complicada la disponibilidad de material genético (Manzano-Román *et al.*, 2012). No obstante, la información de organismos modelos como *C. elegans* nos pueden proveer las bases y punto de partida para obtener información molecular relevante para monogéneos.

3. HIPÓTESIS

Las nanopartículas de plata (AgNPs) son efectivas como antihelmíntico contra los parásitos *Cichlidogyrus* y su efectividad depende del tamaño de la nanopartícula, a menor tamaño mayor toxicidad.

Las AgNPs inducen cambios morfológicos y ultraestructurales como resultado de una cascada de eventos bioquímicos y fisiológicos en la homeostasis celular de parásitos del género *Cichlidogyrus*.

Las AgNPs activarán mecanismos moleculares relacionados con el daño celular (disrupción de membranas, daño en ácidos nucleicos, rutas de señalización celular, entre otras) en los parásitos *Cichlidogyrus*.

Concentraciones bajas de AgNPs (6 $\mu\text{g/L}$) activarán procesos biológicos relacionados con la adaptación y asimilación a la nanotoxicidad en *Cichlidogyrus*. Mientras que concentraciones altas (36 $\mu\text{g/L}$) inducen procesos letales para los organismos.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Evaluar los mecanismos de respuesta molecular y cambios morfológicos del parásito *Cichlidogyrus* expuesto a nanopartículas de plata.

4.2 Objetivos Específicos

1. Determinar *in vitro* el efecto antihelmíntico de las nanopartículas de plata en adultos y huevos del género *Cichlidogyrus*.
2. Observar a nivel ultraestructural el efecto de las nanopartículas de plata en el tegumento de *Cichlidogyrus*.
3. Analizar las respuestas moleculares inducidas por la exposición a nanopartículas de plata en *Cichlidogyrus*.
4. Describir el estado del arte de los efectos patológicos que las nanopartículas de plata pueden provocar en *Oreochromis niloticus*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Nanopartículas de Plata

Se utilizaron dos tipos de nanopartículas de plata: ARGOVIT y UTSA, en el cuadro 5 se muestran las principales características de ambas. Las AgNPs ARGOVIT fueron donadas por la Dra. Nina Bogdanchikova de la Red de Bionanotecnología de la UNAM. El Dr. Humberto Lara del laboratorio de Astronomía y Física de la Universidad de Texas donó las AgNPs UTSA.

Cuadro 5. Principales características de las nanopartículas de plata (Juárez-Moreno *et al.*, 2017; Lara *et al.*, 2015).

Nanopartículas	ARGOVIT	UTSA
Contenido de plata metálica (mg/ml)	12	0.016
Tamaño (nm)	35±16	1-3
Recubrimiento	PVP	No
Forma	Esféricas	Esféricas
Síntesis	Química	Física

Los stocks originales de las AgNPs se mantuvieron a 4°C en oscuridad. Al momento de realizar los experimentos se prepararon diluciones de AgNPs en agua destilada a partir de las cuales se tomaron las cantidades necesarias para alcanzar las concentraciones experimentales.

5.2 Parásitos Monogéneos

Se utilizaron parásitos monogéneos del género *Cichlidogyrus*. Los parásitos se colectaron de las branquias de *Oreochromis niloticus* provenientes de una granja comercial al sur de Sinaloa,

México. Los peces (20—120 g; 8-17 cm) se sacrificaron con una punción en el cerebro de acuerdo a la guía de la AVMA (2013) para la eutanasia de los animales. Se disectaron las branquias y pusieron en cajas de Petri con agua para observarlas en el estereoscopio y recolectar los monogeneos presentes preservándolos en alcohol al 70%.

Se identificaron las especies de monogeneos utilizando la técnica de digestión de tejidos con proteinasa K. Con esta técnica es posible observar al microscopio las características morfométricas de las estructuras esclerosadas (haptor y complejo del órgano copulador). Se identificaron 4 especies de parásitos del género *Cichlidogyrus*: *C. sclerosus*, *C. tilapie*, *Scutogyrus longycornis* y *C. dossoui* (Figura 10). Durante los experimentos se reunieron grupos de individuos vivos de estos monogeneos, pero no fue posible discriminar entre especies, para esto es necesario matar a los parásitos. Además, experimentar con grupos de varias especies puede representar la situación real de infección en tilapia *Oreochromis niloticus* en condiciones de cultivo comercial.

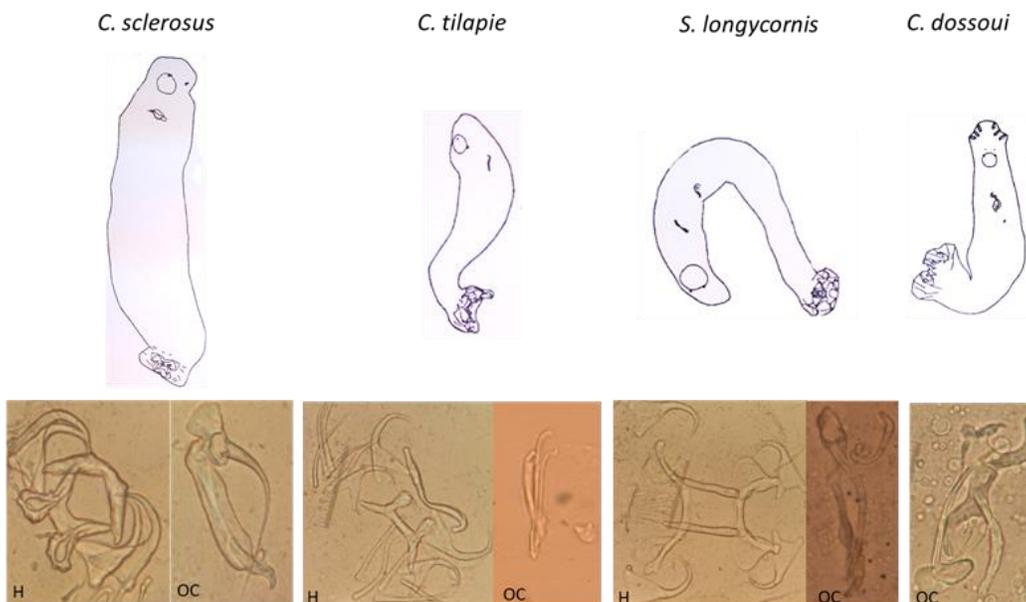


Figura 10. Especies de parásitos monogeneos y sus estructuras esclerosadas. Piezas del haptor (H) y órgano copulador (OC)

5.3 Evaluación Antihelmíntica *in vitro*

5.3.1 Actividad Antihelmíntica en Parásitos Adultos

Se realizaron pruebas preliminares con las AgNPs ARGOVIT y UTSA para determinar el intervalo de las concentraciones experimentales. Se probaron 10 concentraciones (Cuadro 6) de cada tipo de nanopartículas en parásitos adultos. Para esto se emplearon placas de cultivo de 6 pozos. En cada pozo se colocaron 10 parásitos en 5 ml de agua destilada y la cantidad de AgNPs que se deseaba probar. Un control consistió en mantener a los parásitos sólo en agua destilada. En otro control, los parásitos se expusieron en PVP para evaluar el efecto tóxico del recubrimiento de las nanopartículas ARGOVIT. Con fines comparativos, también hubo parásitos expuestos a formalina (250 µL/L) y cloruro de sodio (36 g/L). Se realizaron cinco réplicas para cada tratamiento, considerando a cada pozo como una réplica (Figura 11). Los parásitos se observaron en el estereoscopio cada 30 minutos para registrar cambios en apariencia y supervivencia hasta llegar al 100% de mortalidad.

Cuadro 6. Concentraciones experimentales de AgNPs

ARGOVIT (µg/L)	6000	12000	18000	24000	30000	36000	42000	48000	54000	60000
UTSA (µg/L)	6	12	18	24	30	36	42	48	54	60

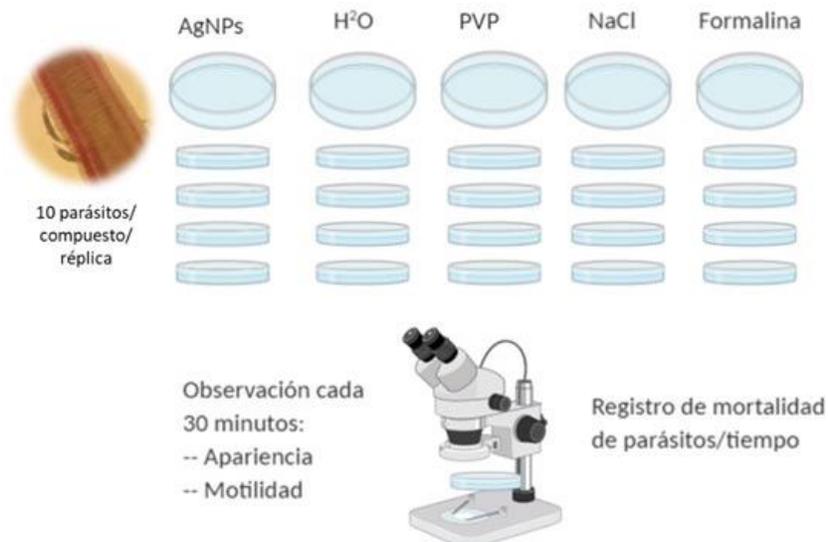


Figura 11. Diseño experimental para probar *in vitro* el efecto antihelmíntico de las AgNPs en individuos adultos de *Cichlidogyrus* adultos.

5.3.2 Actividad Antihelmíntica en Huevos de Parásitos *Cichlidogyrus*

Para evaluar la actividad antihelmíntica de las AgNPs en los huevos de parásitos *Cichlidogyrus*, se colocaron parásitos vivos adheridos a las lamelas branquiales en agua destilada, después de 6 horas se observaron en el estereoscopio para buscar los huevos ovopositados y extraerlos con una pipeta Pasteur (Khidr, 1989) (Figura 12).

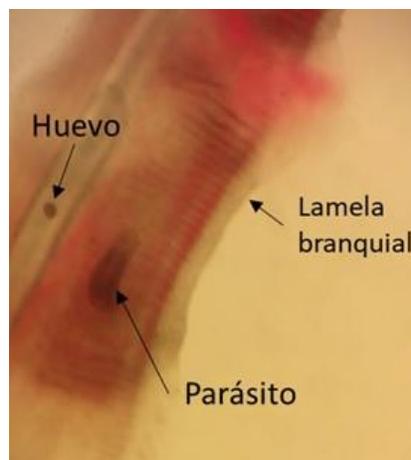


Figura 12. Parásito *Cichlidogyrus* después de ovopositar observado en el estereoscopio.

De acuerdo a los resultados del experimento con los parásitos adultos, se seleccionó la concentración efectiva para matar a los parásitos en una hora de exposición, así como la concentración más alta y la más baja de AgNPs. Las pruebas se realizaron en placas de cultivo de 6 pozos. En cada pozo se colocaron 10 huevos en 5 ml de agua destilada. Las concentraciones experimentales fueron: 6,000, 48,000 y 60,000 $\mu\text{g/L}$ de AgNPs ARGOVIT; 6, 36 y 60 $\mu\text{g/L}$ de AgNPs UTSA; 250 $\mu\text{L/L}$ de formalina; 36 g/L de cloruro de sodio y agua destilada como control.

Por cada grupo experimental con seis réplicas, después 1 hora de exposición, los huevos fueron transferidos a agua limpia y se examinaron cada 24 h en un microscopio invertido (Zeiss Axio Vert. A1) para observar y contar los huevos de acuerdo a las diferentes etapas de desarrollo (dañado, embrionado, desarrollado y eclosionado) (Figura 13). Para mantener las condiciones óptimas para el desarrollo de los huevos, se realizó un recambio del 50% de agua diariamente para mantener la oxigenación, la temperatura varió entre 24 y 25°C durante los siete días que duró el experimento. Diariamente se realizó un conteo de los huevos en las diferentes etapas de desarrollo.

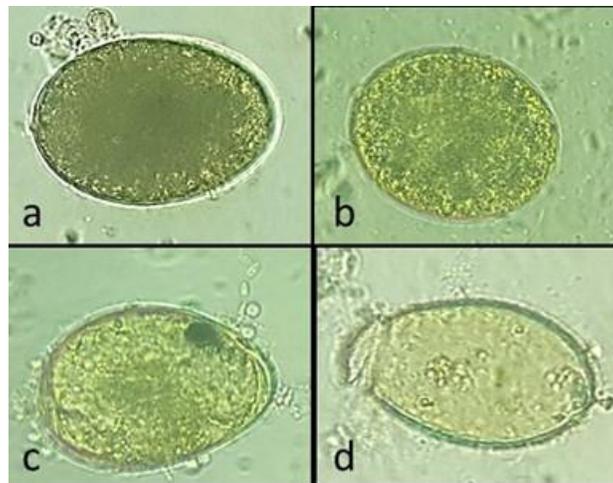


Figura 13. Etapas de desarrollo de huevos de parásitos *Cichlidogyrus*. a) Dañado. b) Embrionado. c) Desarrollado. d) Eclosionado.

5.3.3. Determinación de la Concentración Letal Media (CL₅₀) de AgNPs

Para determinar la Concentración Letal Media (CL₅₀) de las AgNPs UTSA y ARGOVIT, se probaron siete concentraciones escaladas logarítmicamente (Cuadro 7) con base en los resultados de la prueba *in vitro* con los parásitos adultos. Se realizaron tres réplicas con 10 parásitos adultos por concentración y agua destilada como grupo control. Se registró la mortalidad a diferentes tiempos: 0, 15, 30, 40, 45, 60, 120 y 180 minutos. Con los datos obtenidos de mortalidad se realizó un análisis PROBIT para determinar la CL₅₀ en el programa Statgraphics Centurion.

Cuadro 7. Concentraciones de AgNPs aplicadas para determinar la CL₅₀ en parásitos *Cichlidogyrus*.

UTSA µg/L	ARGOVIT µg/L	Tiempo (minutos)
1	6,000	0
1.8	7,800	15
3.4	10,300	30
6.3	13,400	45
11.7	17,500	60
21.6	22,900	120
40	30,000	180

5.4 Alteraciones Ultraestructurales en Individuos de *Cichlidogyrus*

Para observar los cambios ultra-estructurales en el tegumento de los parásitos *Cichlidogyrus*, 20 individuos adultos se expusieron por 1 hora a una de las tres concentraciones de nanopartículas UTSA (6, 36 y 60 µg/L). En el grupo control los parásitos se mantuvieron solo en agua destilada.

Los parásitos con AgNPs se extrajeron “moribundos” después de la exposición a las nanopartículas, y para el grupo control se seleccionaron los parásitos desprendidos de las lamelas branquiales. El proceso de fijación y preparación de muestras consistió en lo siguiente:

1. Se realizaron dos lavados con buffer de cacodilato de sodio 0.1 M, pH 7.4, mediante agitación suave para retirar restos de mucus y/o materia orgánica.
2. Los parásitos se fijaron con 1 ml de glutaraldehído 2.5% en buffer de cacodilato de sodio 0.1 M, pH 4, en condiciones frías (4°C) por 24 horas.
3. Se realizaron dos lavados con buffer de cacodilato de sodio 0.1 M, pH 7.4
4. Se realizó una postfijación y tinción con tetraóxido de osmio (OsO_4) 1%, por 2 h.
5. Se realizaron dos lavados con buffer de cacodilato de sodio 0.1 M, pH 7.4
6. Los parásitos se deshidrataron con una serie de grados de etanol (25, 50 y 75 %) 15 minutos en cada concentración.
7. Se secaron con dióxido de carbono en un “Critical Point Dryer” Quorum K850 (Figura 14)
8. Los especímenes se montaron en laminillas de metal y fueron cubiertos con oro en un dispositivo de recubrimiento automático por pulverización, “Sputter coating” Quorum Q150R ES (Figura 14)
9. Los parásitos se observaron en un Microscopio Electrónico de Barrido (SEM) (Hitachi Stereoscan SU1510) (Figura 14).



Figura 14. Equipos utilizados para la preparación de muestras de parásitos para observarse por microscopía electrónica de barrido.

Los procedimientos 7-9 se realizaron en el Laboratorio de Microscopía y Fotografía de la Biodiversidad 1 del Instituto de Biología de la UNAM a cargo de la M. en C. María Berenit Mendoza Garfias. Se observaron las alteraciones en el tegumento comparando los parásitos del grupo control contra los parásitos expuestos a las AgNPs.

5.5 Alteraciones Moleculares en Parásitos *Cichlidogyrus* Expuestos a Nanopartículas de Plata

5.5.1 Diseño Experimental y Obtención de Muestras

Se determinó el perfil de expresión génica de los parásitos *Cichlidogyrus* expuestos a dos concentraciones de AgNPs UTSA (6 y 36 $\mu\text{g/L}$) por 1 hora. Los parásitos control estuvieron sólo en agua destilada. Para cada concentración y control se utilizaron aproximadamente 1800 individuos parásitos. Se colectaron los parásitos vivos y fijaron en RNAlater, almacenándolos en refrigeración hasta su procesamiento para análisis moleculares.

5.5.2 Extracción de ARN

La extracción de ARN de los parásitos se realizó con el kit RNeasy® Plus Micro Kit (QIAGEN) siguiendo los protocolos establecidos por el fabricante. Se contabilizó la cantidad de ARN en cada muestra utilizando el espectrofotómetro NanoDrop DeNovix® DS-11 y la calidad fue analizada por electroforesis con un gel de agarosa 1% (Figura 15).



Figura 15. Electroforesis de ARN de parásitos expuestos a nanopartículas de plata (6 y 36 µg/L) y grupo control.

5.5.3 Análisis con Microarreglos Heterólogos

Debido a la información genómica escasa de los parásitos *Cichlidogyrus*, se realizó la técnica de microarreglos heterólogos utilizando microarreglos del organismo modelo más cercano filogenéticamente a los parásitos monogéneos, el nemátodo *C. elegans*, los cuales se obtuvieron y analizaron en la Unidad de Microarreglos del Instituto de Fisiología de la UNAM

5.5.3.1 Hibridación de microarreglos. Para la síntesis y marcado del cDNA se utilizaron por cada grupo experimental 5 μ g del ARN total, se utilizó el kit First-Strand cDNA (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) incorporando dUTP-Alexa555 o dUTP-Alexa647. La incorporación de fluoróforos se analizó por absorbancia a 555 nm para Alexa555 y 650 nm para Alexa647. Para la hibridación se utilizaron cantidades iguales del cDNA marcado utilizando la solución de hibridación UniHyb (TeleChem International Inc.) para las 22,000 matrices de oligos contenidos en los microarreglos de *C. elegans* por 14 h a 42°C. Las hibridaciones se realizaron para las tres condiciones: parásitos control (sin nanopartículas), parásitos tratados con 6 μ g/L y parásitos tratados con 36 μ g/L (Figura 16).

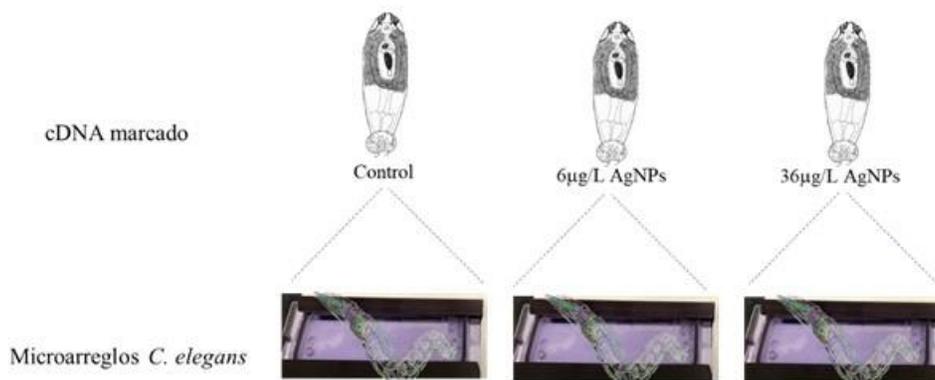


Figura 16. Modelo de hibridaciones experimentales.

5.5.3.2 Análisis de imágenes de los microarreglos. Para obtener las imágenes, después de la hibridación los microarreglos se leyeron en el Escáner de microarreglos GenePix 4100-A. El análisis de las imágenes se realizó con el software GenePiX para dispositivos moleculares. Con el software ArrayPro Analyzer, Media Cybernetics (Rockville,MD, USA) se calcularon para cada “spot” de Alexa555 y Alexa647 el valor de la densidad media, el valor promedio del “background” y el valor de normalización inferior del canal transversal de señal.

5.5.3.3 Análisis de datos. El análisis de los datos de los microarreglos se realizó con el programa de software libre genArise desarrollado en la Unidad de Cómputo del Instituto de Fisiología Celular

de la UNAM (<http://www.ifc.unam.mx/genarise/>). Este programa realiza un número de transformaciones, como la corrección del background, reduce la normalización, intensifica el filtro y replica el análisis para seleccionar los genes expresados diferencialmente. La selección de estos genes se genera calculando una intensidad dependiente del valor z-score, el cual se calcula con un algoritmo para calcular la media y desviación estándar para cada punto de datos. Define una puntuación z, donde z mide la número de desviaciones estándar de un punto de datos de la media.

$$z_i = (R_i - \text{mean}(R))/\text{sd}(R)$$

Donde z_i es el valor de z-score para cada elemento, R es la relación logarítmica, log, para cada elemento, y $\text{sd}(R)$ es la desviación estándar de R. Con este criterio, los elementos con un valor de la desviación estándar de z-score >2 es considerado con una expresión de genes diferencialmente significativa.

Para interpretar los genes expresados y determinar los procesos metabólicos alterados por las AgNPs mediante la expresión diferencial de genes, se consideraron los genes expresados con un z-score ≥ 2 ($p \leq 0.05$) para identificar los genes sobre y sub expresados. Para determinar las rutas metabólicas se utilizó el programa de libre software DAVID Bioinformatics Resources 6.8.

5.6 Revisión Bibliográfica Sobre los Efectos Patológicos que Ocasianan las AgNPs en Peces

Se realizó una búsqueda exhaustiva de literatura relevante de investigaciones sobre el efecto patológico de las nanopartículas de plata en peces durante los últimos 12 años (2008-2020) en las plataformas Google Scholar, PubMed y Scopus con los términos, “silver nanoparticles”, “pathologies”, “histopathologies”, “fish” y “*Oreochromis spp*”.

Se seleccionaron los artículos con información relevante sobre los efectos patológicos que

provocan las AgNPs con especial énfasis en los estudios realizados con tilapia nilótica (*Oreochromis spp.*).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Evaluación Antihelmíntica *in vitro*

6.1.1 Actividad Antihelmíntica de AgNPs en Parásitos Adultos

Las AgNPs ARGOVIT y UTSA fueron efectivas para matar a los parásitos *Cichlidogyrus* con un efecto concentración-dependiente (Figura 17 y 18). Para las nanopartículas ARGOVIT, las concentraciones más altas (48,000; 54,000 y 60,000 $\mu\text{g/L}$) mataron el 100% de los parásitos a los 60 minutos de exposición, mientras que la concentración más baja (6,000 $\mu\text{g/L}$) los mató en 300 minutos. Para el caso de las nanopartículas UTSA, las concentraciones 36, 42, 48, 54 y 60 $\mu\text{g/L}$ mataron en 60 minutos a todos los parásitos, en cambio las concentraciones más bajas (6 y 12 $\mu\text{g/L}$) los mataron en 180 minutos. El 100% de mortalidad de los parásitos expuestos a formalina y cloruro de sodio fue hasta los 180 minutos. En los grupos control y expuestos a PVP la mortalidad fue de 20% a los 300 minutos.

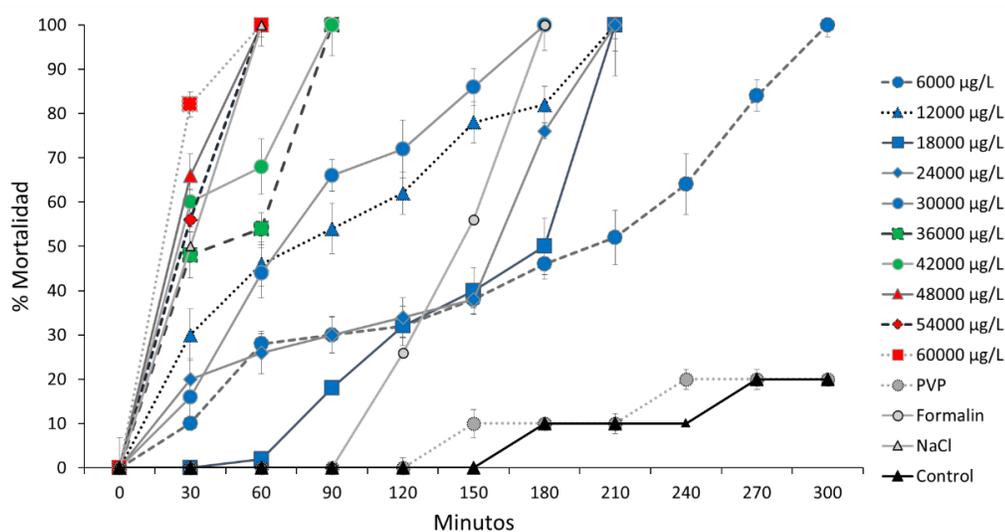


Figura 17. Mortalidad de parásitos *Cichlidogyrus* adultos expuestos a diferentes concentraciones de AgNPs ARGOVIT

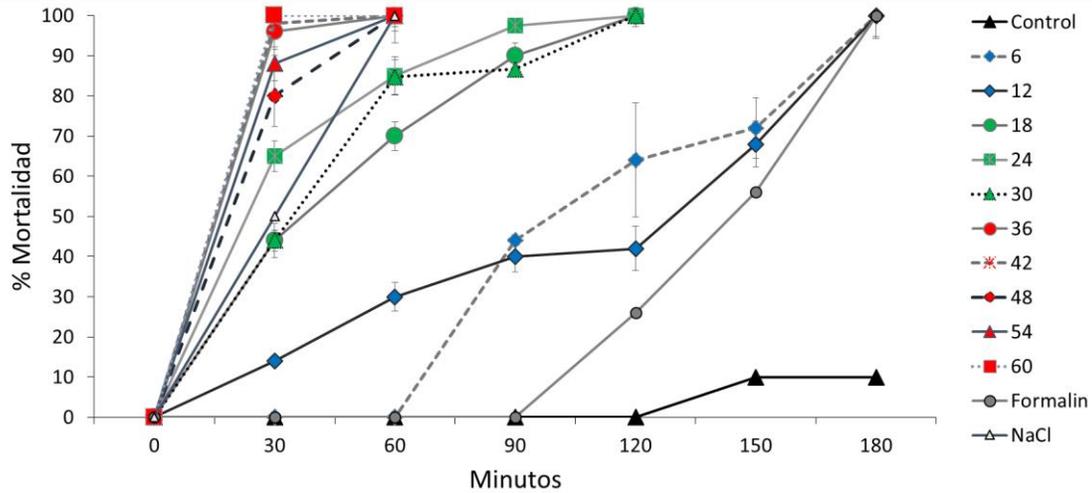


Figura 18. Mortalidad de parásitos *Cichlidogyrus* adultos expuestos a diferentes concentraciones de AgNPs UTSA

La concentración letal media (CL₅₀) de las AgNPs UTSA y ARGOVIT fue 29.4 μg/L y 20,200 μg/L, respectivamente, después de 1 hora de exposición de los parásitos. En el cuadro 8 se presentan diferentes concentraciones letales a distintos tiempos y porcentajes de mortalidad.

Cuadro 8. Concentraciones letales (CL₁₀-CL₉₉) de nanopartículas de plata en parásitos *Cichlidogyrus* adultos

AgNPs UTSA						
μg/L	15 min	30 min	60 min	90 min	120 min	180 min
CL10	19,9	16,5	12,8	11,4	10,8	7,8
CL30	25,3	19,6	16,7	15,4	14,1	11,6
CL50	29	21,7	29,4	19,2	16,3	14,2
CL70	32,7	23,8	22,1	20,3	18,6	16,8
CL90	38,1	26,9	26,1	23,4	21,9	20,6
CL99	50,8	34,2	35,4	31,5	29,7	29,6
AgNPs ARGOVIT						
μg/L	15 min	30 min	60 min	90 min	120 min	180 min
CL10	20,600	7,500	5,600	4,400	4,600	2,100
CL30	35,000	20,900	14,200	12,500	10,100	7,800
CL50	45,000	30,200	20,200	18,200	14,000	11,700
CL70	55,000	39,500	26,300	23,800	17,800	15,700
CL90	69,400	52,900	35,000	32,000	23,400	21,400
CL99	89,300	71,400	46,900	43,200	31,000	29,200

En la acuicultura la aplicación de productos antihelmínticos mediante baños de inmersión para eliminar ectoparásitos en peces es una técnica usual, el tiempo de exposición puede variar dependiendo de la tolerancia de los peces. Por lo tanto, elegimos la concentración más baja que logró eliminar al 100% de los parásitos en una hora; 48,000 $\mu\text{g/L}$ ARGOVIT y 36 $\mu\text{g/L}$ UTSA AgNPs como concentración potencial para aplicar en parásitos infestados.

La diferencia en el orden de magnitud de las concentraciones efectivas de los dos tipos de AgNPs se debe a las características físico-químicas de las nanopartículas, las ARGOVIT son de mayor tamaño en diámetro (35 nm) y están recubiertas con PVP, mientras que las UTSA no tienen recubrimiento y presentan menor tamaño (1-3 nm). En varios estudios se ha observado que las nanopartículas de menor tamaño y sin recubrimiento son más letales.

Ivask *et al.*, (2014) demostraron que las AgNPs de 10 nm son más tóxicas que las de 20 a 80 nm, argumentando que las nanopartículas de tamaño menor suelen liberar más iones de plata en la dilución, por lo que la toxicidad está asociada a la sinergia entre los iones de plata y las AgNPs. Adicionalmente, los autores hipotetizaron que con las AgNPs de menor tamaño (10 nm) se puede incrementar la biodisponibilidad de la plata e inducir la formación de ROS en las células. Así mismo, Ayala-Núñez, (2010) observaron que las AgNPs de menor tamaño (< 10 nm) son más tóxicas debido a su habilidad para internalizarse en estructuras que no son posibles para las nanopartículas más grandes. También se sabe que la letalidad de las AgNPs está asociada al recubrimiento de las nanopartículas; por ejemplo, en un estudio con *Daphnia magna* la concentración letal media de las AgNPs recubiertas de lactato, PVP y sulfonato dodecibenceno sódico, fue 28.7, 2.0 y 1.1 $\mu\text{g/L}$, respectivamente, después de 48 h de exposición (Zhao y Wang, 2012). En otro estudio, en el que se analizó la viabilidad celular de macrófagos y células epiteliales, las AgNPs sin recubrimiento fueron más citotóxicas, los efectos se produjeron a niveles a concentraciones menores a 1 $\mu\text{g/ml}$, mientras que con las AgNPs con PVP la letalidad fue comparable a 25 $\mu\text{g/ml}$, observándose un efecto dosis dependiente con ambos tipos de nanopartículas (Nguyen *et al.*, 2013), estos resultados coinciden con la respuesta obtenida en el presente estudio.

Varias investigaciones han demostrado el efecto de las AgNPs contra bacterias, hongos, virus e insectos (Gorth *et al.*, 2011; Ivask *et al.*, 2014; Franci *et al.*, 2015; Govindarajan y Benelli, 2015;

Lara *et al.*, 2015; Aderibigbe, 2017); sin embargo, son pocos los que han evaluado la efectividad de las AgNPs contra parásitos de peces. Saleh y colaboradores (2017) evaluaron el efecto de AgNPs (21 nm) contra el parásito ciliado *Ichthyophthirius multifiliis*, causante de la enfermedad de “puntos blancos”, la cual puede ser mortal para los peces, ellos determinaron que 10 µg/L de AgNPs son 100% efectivas para eliminar a los ciliados después de 2 horas, por lo que recomiendan que las AgNPs pueden utilizarse como agente antiprotozoario en la acuicultura de peces. En el presente estudio, se obtuvo un resultado similar con la concentración de 6 µg/L de AgNPs UTSA, donde se observó una mortalidad del 100% de los parásitos a las 3 horas de aplicación. Además, obtuvimos mayor eficacia en menos tiempo (60 minutos) con las concentraciones entre 36 y 60 µg/L de AgNPs UTSA. Sin embargo, no podemos comparar los resultados con las AgNPs ARGOVIT debido a que se requirieron concentraciones más altas para eliminar a los parásitos (48,000 – 60,000 µg/L en una hora).

El presente estudio es el primero en evaluar el efecto antihelmíntico de las AgNPs en helmintos parásitos acuáticos, hasta el momento sólo existen evaluaciones de las AgNPs en helmintos terrestres. En el nemátodo *Haemonchus contortus*, 30 µg/ml de AgNPs (28-44 nm) indujeron el 93% de mortalidad después de 24 h de exposición (Tomar y Preet, 2017). Así mismo, Rashid y colaboradores (2016) probaron AgNPs (78.5-100 nm) en el gusano de tierra *Pheretima posthuma*, obteniendo la concentración efectiva de 50 mg/ml en 24 h de exposición. Como podemos observar las concentraciones que se requieren para matar a los parásitos terrestres son mayores comparando con los resultados de nuestros análisis, las AgNPs ARGOVIT y UTSA que se requieren para matar al 100% de los monogéneos después de 5 horas de exposición son 6,000 y 6 µg/L respectivamente. Estas diferencias probablemente se deben a las características estructurales de la cutícula de los nemátodos y el tegumento de los monogéneos, la cutícula es más resistente dado a que es más compleja y variada en su estructura que incluye tres capas principales; cortical, media y basal, la capa exterior es más dura al estar compuesta por cutícula de colágeno (Lee, 1967; Davies y Curtis, 2011), esta cutícula provee a los nemátodos gran protección contra la entrada de agentes externos (Johnstone, 1993; Page y Johnstone, 2007). En contraste, los monogéneos poseen una delgada membrana exterior seguida de una densa capa de epidermis citoplasmática (sincitio) y una lámina basal, así como una capa de fibras musculares circulares y longitudinales (Lee, 1967; El-Naggar *et al.*, 1991).

6.1.2 Actividad Antihelmíntica de AgNPs en Huevos de Parásitos *Cichlidogyrus*

Las nanopartículas de plata ARGOVIT y UTSA inhibieron el desarrollo de los huevos de *Cichlidogyrus*. Las tres concentraciones de AgNPs ARGOVIT (6,000; 36,000 y 60,000 $\mu\text{g/L}$) inhibieron al 100% de los huevos al igual que 36 $\mu\text{g/L}$ y 60 $\mu\text{g/L}$ de las AgNPs UTSA, sin embargo la concentración de 6 $\mu\text{g/L}$ UTSA, dañó sólo el 50% de los huevos. La formalina inhibió en un 90% el desarrollo de los huevos, mientras que el éxito de eclosión para el grupo control y cloruro de sodio (salinidad) fue del 90% (Figura 19).

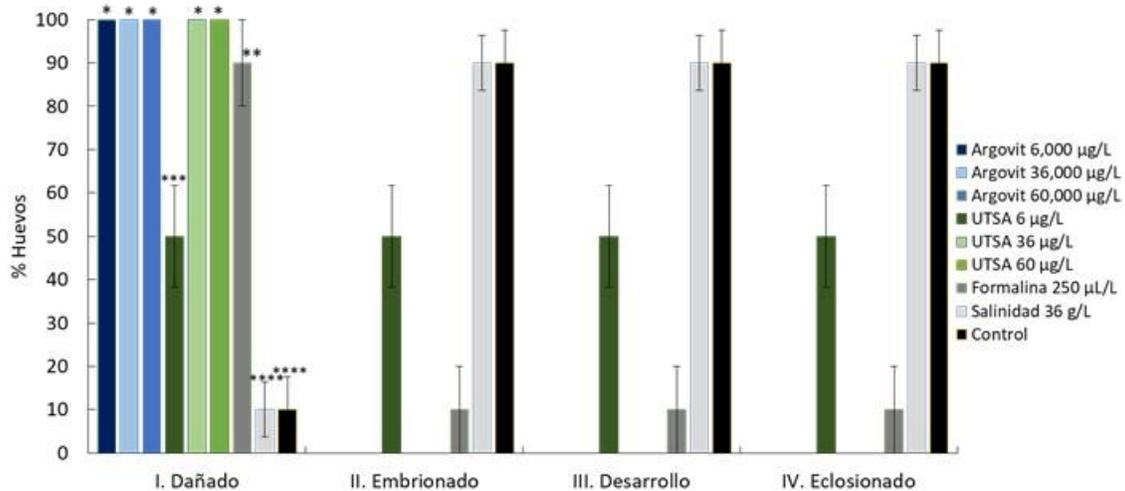


Figura 19. Etapas de desarrollo de huevos de *Cichlidogyrus* expuestos a AgNPs

Aunque la concentración más baja de las AgNPs UTSA (6 $\mu\text{g/L}$) solo dañaron el 50% de los huevos, estas afectaron el tiempo de desarrollo de los parásitos, la eclosión se presentó a los 7 días, en comparación con el grupo control donde el tiempo de desarrollo y eclosión fue a los 4 días (Figura 20).

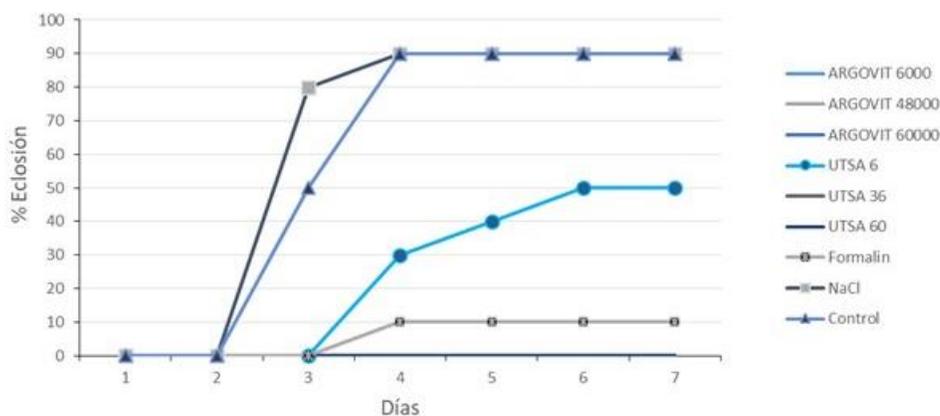


Figura 20. Tiempo de eclosión en huevos de *Cichlidogyrus* expuestos a AgNPs

De acuerdo con estos resultados, las concentraciones efectivas de AgNPs que eliminan a los parásitos adultos, también pueden dañar a los huevos del parásito *Cichlidogyrus* en condiciones *in vitro*; 48000 $\mu\text{g/L}$ ARGOVIT y 36 $\mu\text{g/L}$ UTSA. Este es un resultado interesante dado que comúnmente los huevos de los monogeneos son tolerantes a los compuestos antihelmínticos (Zhang *et al.*, 2014; Morales-Serna *et al.*, 2018).

Existen pocos estudios donde evalúan el efecto de las AgNPs en huevos de helmintos parásitos. Gherbawy *et al.*, (2013), observaron que la combinación de AgNPs-Triclabendazol (4.66 nm) inhibe 90.6% la eclosión de huevos de *Fasciola hepática* en comparación con sólo Triclabendazol que inhibe 70.6%. En huevos del nemátodo *Haemonchus contortus* se determinó que 1 $\mu\text{g/ml}$ de AgNPs (15-25 nm) inhibe 85% de eclosión después de 48 horas de exposición (Tomar y Preet, 2017). Así mismo, Kalaiselvi *et al.*, (2019) evaluaron AgNPs (20–30 nm) sintetizadas a partir del látex de la planta *Euphorbia tirucalli* en huevos de nemátodos *Meloidogyne incognita*, ellos determinaron que los porcentajes de inhibición en la eclosión fueron 5.34%, 87.51%, 99.59% y 100% con las concentraciones 100, 250, 500 y 1000 ng/ml de AgNPs, respectivamente. En el presente estudio, de igual forma las AgNPs ARGOVIT y UTSA inhibieron el desarrollo de los huevos de los parásitos monogeneos, incluso las AgNPs UTSA mostraron mayor eficiencia dado a que se requieren concentraciones menores (36 y 60 $\mu\text{g/L}$) para eliminar el 100% de los huevos, lo cual puede atribuirse a que son nanopartículas de menor tamaño (1-3 nm) y sin recubrimiento.

Mediante imágenes de microscopía electrónica se ha observado que las AgNPs provocan daños en la superficie de los huevos de los helmintos, perforación, encogimiento y desintegración del embrión (Gherbawy *et al.*, 2013; Tomar y Preet, 2017). Lara *et al.*, (2015) observaron que las AgNPs UTSA causan disrupción y permeabilización en la membrana del hongo *Candida albicans*. Las AgNPs logran penetrar en la célula, rompiendo la membrana a pesar de la rigidez, lo cual provoca la salida de los componentes celulares y por consecuencia la muerte. Esta situación podría pasar en los huevos de parásitos monogéneos expuestos a las AgNPs. Los huevos de los monogéneos están recubiertos por una capa o membrana compuesta por lípidos, proteínas y carbohidratos provenientes de las células vitelógenas, las cuales pasan por un proceso enzimático de esclerotización para formar un tipo de cascarón resistentes para proteger al embrión de agentes físicos y químicos externos (Kearn, 1986; Whittington y Kearn 2011). Estas características son similares a las características estructurales de la pared celular de las bacterias en las cuales se ha determinado que las AgNPs se adhieren a la superficie de la pared celular y membrana causando permeabilización, penetran al interior y dañan las estructuras intracelulares (Dakal *et al.* 2016).

También observamos que la inhibición en el porcentaje de eclosión de los huevos expuestos a las AgNPs se presentó desde el día 1, donde todos los huevos se dañaron con las tres concentraciones de las nanopartículas ARGOVIT (6,000; 36,000 y 60,000 $\mu\text{g/L}$) y dos concentraciones de las nanopartículas UTSA (36 $\mu\text{g/L}$ y 60 $\mu\text{g/L}$), la concentración de 6 $\mu\text{g/L}$ sólo inhibió el 50% de la eclosión de los huevos. No obstante, esta concentración también tuvo un efecto antihelmíntico en los huevos de los parásitos *Cichlidogyrus* al retardar el tiempo de desarrollo y eclosión el cual fue mayor comparado con el grupo control, 7 y 4 días respectivamente.

La efectividad de las AgNPs para eliminar huevos y adultos de los monogéneos es importante, ya que otros agentes terapéuticos como la formalina, cloruro de sodio y algunos fármacos pueden eliminar a los adultos pero no al 100% de los huevos (Fájer-Ávila *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2014; Morales-Serna *et al.*, 2018), permitiendo así que continúe la propagación de los parásitos. Por lo tanto, consideramos que las nanopartículas de plata pueden ser una buena opción para el control de ectoparásitos monogéneos en el cultivo de peces. Este estudio puede ser el punto de partida para explorar la opción de la aplicación de nanopartículas de plata para eliminar monogéneos que causan mortalidades en los cultivos de peces con importancia comercial, por ejemplo *Gyrodactylus* en la salmonicultura.

6.2 Alteraciones Ultraestructurales de Nanopartículas de Plata en *Cichlidogyrus*

La exposición de los parásitos a las AgNPs mostró diferentes efectos a nivel ultraestructural, la exposición a concentraciones altas provocó alteraciones mayores en la arquitectura del tegumento de los parásitos.

Cabe señalar que antes de esta investigación, no había registro de imágenes SEM del tegumento de los parásitos *Cichlidogyrus*, la organización ultraestructural normal del tegumento es similar a la estructura básica de otros monogeneos, desde la región anterior hasta la posterior (haptor) (Figura 21A). En la región anterior presenta corrugaciones y pliegues, con algunas protuberancias o papilas sensoriales (Figura 22A-C). La región media del cuerpo se observa con estrías o corrugaciones anulares, que son típicas de la musculatura del tegumento para la contracción de los parásitos (Figura 21C). En la parte posterior donde se localizan las estructuras del haptor, el tegumento es liso con algunas ornamentaciones (Figura 21B).

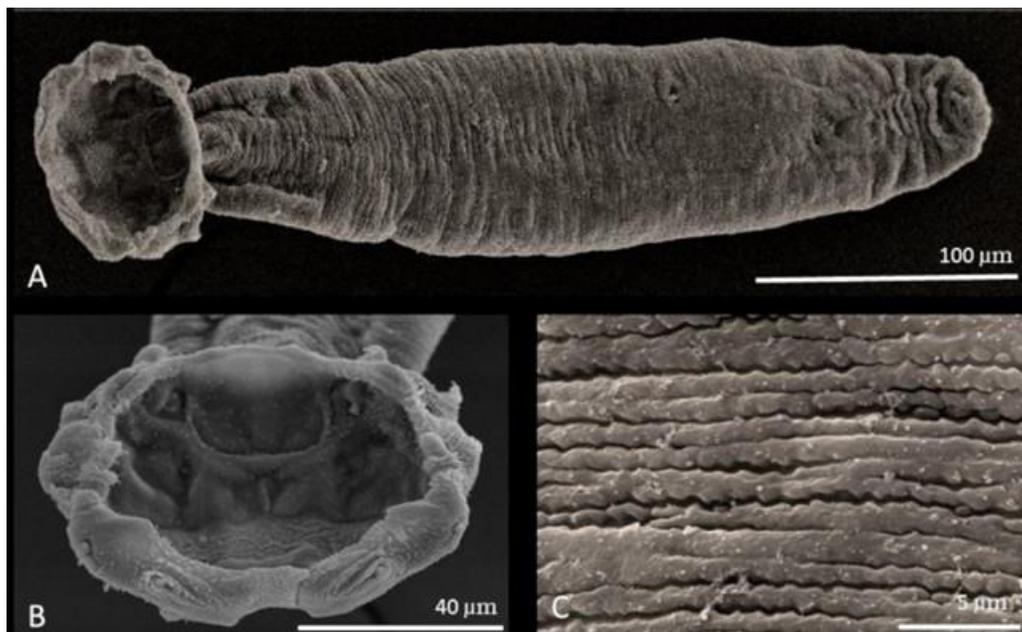


Figura 21. SEM de parásito *Cichlidogyrus* adulto sin nanopartículas de plata. A) Cuerpo entero, B) Haptor y C) región media con estriaciones o corrugaciones normales.



Figura 22. SEM de región anterior de parásito *Cichlidogyrus* adulto sin nanopartículas de plata. A) Corrugaciones B) Protuberancias y C) Papilas sensoriales.

Las AgNPs UTSA ocasionaron daños en el tegumento de los parásitos de acuerdo a la concentración a la que fueron expuestos, con la concentración más baja (6 µg/L) no se observaron daños en la morfología normal pero presentaron alteraciones ligeras como hinchamiento del tegumento y la formación de vacuolas o “burbujas” como resultado de una probable respuesta fisiológica (Figura 23). En cambio los parásitos expuestos a las concentraciones de 36 y 60 µg/L presentaron cambios más notables en la arquitectura del tegumento, la epidermis se observó más hinchada, las corrugaciones normales se perdieron, así como una ruptura del tegumento en algunas áreas (Figura 24C), con la concentración más alta se observó un daño total en todo el cuerpo de los parásitos, se perdió la anatomía normal de las regiones del cuerpo, no sólo hubo destrucción del tegumento, también se observó un daño en el haptor (Figura 24A-B).

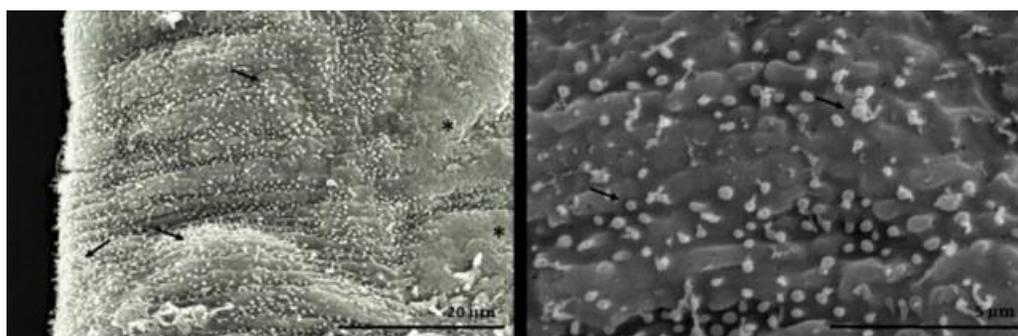


Figura 23. SEM de región media de parásitos *Cichlidogyrus* expuestos a 6 µg/L de AgNPs UTSA. Las flechas indican vacuolas o burbujas en el tegumento, asteriscos indican hinchazón del tejido.

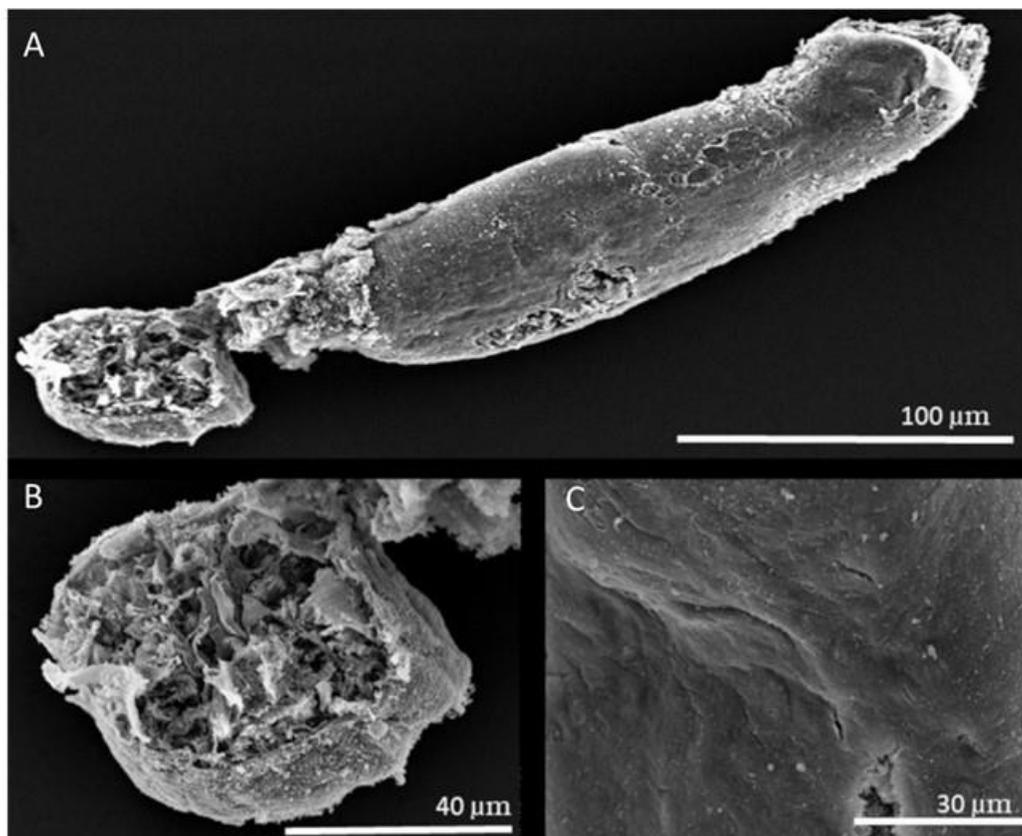


Figura 24. SEM de parásitos *Cichlidogyrus* expuestos a 36 µg/L (C) y 60 µg/L (A y B) de AgNPs UTSA. A) Destrucción de la anatomía externa, pérdida de corrugaciones. B) Haptor dañado y C) región media con hinchamiento, ruptura del tegumento y pérdida de corrugaciones.

El tegumento es la epidermis de los parásitos, por lo que es el primer sitio de contacto de las AgNPs. El tegumento de los monogéneos cumple funciones que son esenciales para su estilo de vida como ectoparásitos, funciones como absorción y secreción de sustancias, osmoregulación, soporte mecánico y protección contra daños de agentes tóxicos (Dalton *et al.* 2004; Hodová *et al.*, 2018). Por lo tanto, un daño severo en el tegumento puede ocasionar la muerte de los parásitos. En el presente estudio se observaron cambios mayores en el tegumento de los parásitos expuestos a 36 y 60 µg/L de AgNPs UTSA. Kar *et al.*, (2014) obtuvieron resultados similares aplicando 1 mg/ml de nanopartículas de oro al cestodo *Raillietina* sp., los autores concluyeron que los cambios ultraestructurales en el tegumento están ligados a la posible inhibición de la síntesis de proteínas como resultado de la exposición a las nanopartículas. Barbosa *et al.*, (2019) determinaron el efecto de AgNPs en la cutícula de larvas del nemátodo *Ancylostoma caninum*, la cutícula presentó cambios estructurales en la morfología de los parásitos. También la exposición de nemátodos

Brugia malayi a AgNPs indujo cambios a nivel ultraestructural mostrando cambios y ruptura de la vaina que recubre a estos nemátodos (Singh *et al.*, 2012). Sin embargo, en otro estudio donde se aplicaron concentraciones entre 15 y 1000 $\mu\text{g/ml}$ de AgNPs, éstas no ocasionaron daños en el tegumento del tremátodo *Schistosoma cercarie*, probablemente debido a la inestabilidad de las AgNPs en el agua, por lo tanto sólo una pequeña fracción pudo ser funcional (Cheng *et al.*, 2013).

En el presente estudio, incluso con la concentración más baja de AgNPs (6 $\mu\text{g/L}$), los monogéneos exhibieron una respuesta fisiológica expresada por la presencia de vesículas o burbujas. En parásitos helmintos es común la formación de estas vesículas inducida por la detoxificación y respuesta al estrés inducido por agentes xenobióticos (Toner *et al.*, 2008; O'Neill *et al.*, 2015; De la Torre-Escudero *et al.*, 2016).

Para entender los procesos fisiológicos que desencadenan las AgNPs en los parásitos es necesario investigar los mecanismos de acción a nivel molecular, así como daños internos a nivel ultraestructural que conducen a la muerte de los parásitos.

6.3 Alteraciones Moleculares en Parásitos *Cichlidogyrus* Expuestos a Nanopartículas de Plata

6.3.1 Hibridación de Microarreglos Heterólogos

Se utilizaron microarreglos de *C. elegans* por ser el organismo modelo más cercano filogenéticamente a los parásitos monogéneos *Cichlidogyrus* spp. El análisis de los microarreglos reveló la hibridación de genes que fueron compatibles entre las dos especies, los resultados mostraron la hibridación de 19,539 genes con la concentración baja de AgNPs UTSA (6 $\mu\text{g/L}$) y 19,472 genes con la concentración alta (36 $\mu\text{g/L}$), de los 20,000 genes contenidos en los microarreglos de *C. elegans* (Figura 25).

La técnica de microarreglos se ha utilizado con éxito para estudios de expresión de genes para identificar mecanismos de enfermedades y modos de acción de xenobióticos, sin embargo este tipo de estudios en especies no modelo representa un reto debido a la precaria disponibilidad de información genética. Los microarreglos heterólogos con información genómica de especies modelo proveen información suficiente para determinar perfiles de expresión y analizar los mecanismos de acción en los organismos expuestos a xenobióticos (Degletagne *et al.*, 2010; Ruíz-Laguna *et al.*, 2015; Roy, 2017). En el presente estudio la hibridación de microarreglos heterólogos proveen información suficiente para determinar los principales mecanismos de acción de las AgNPs en los parásitos monogéneos.

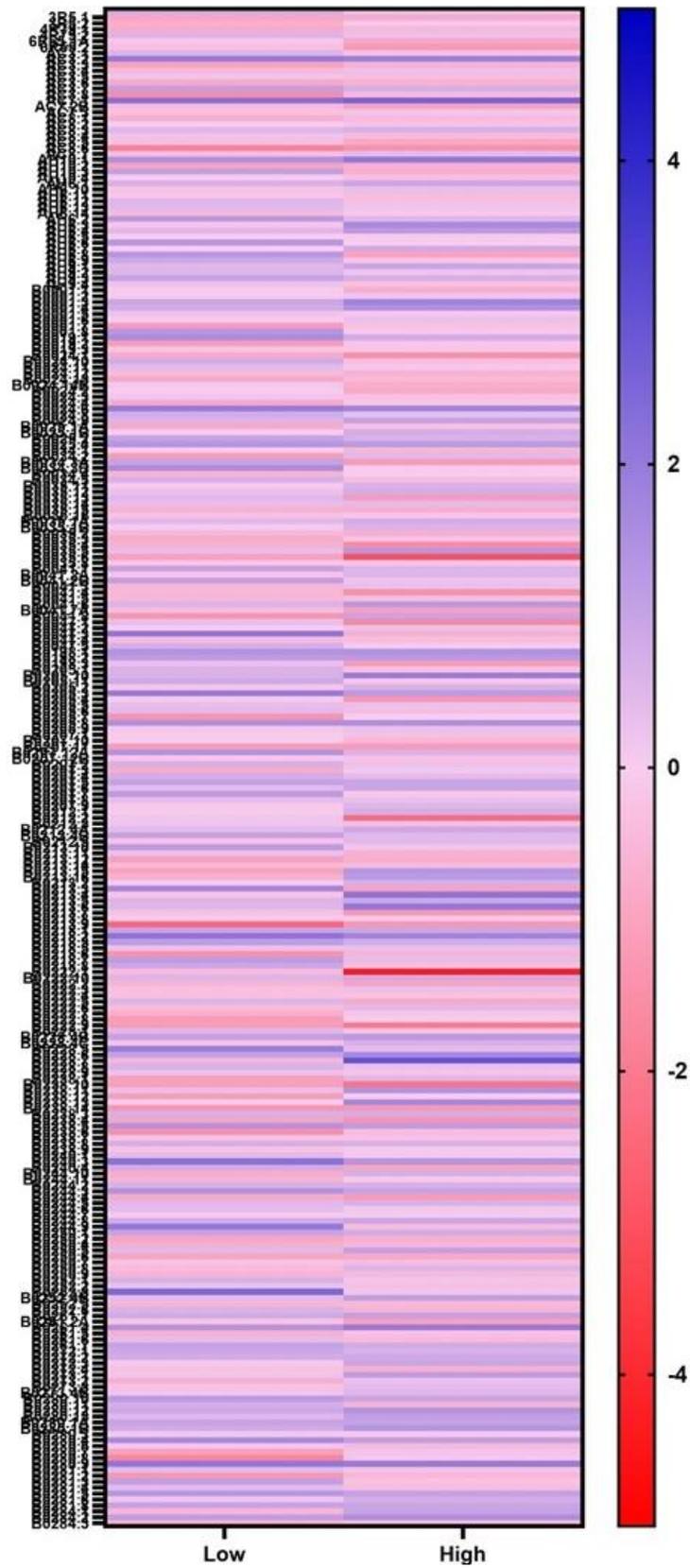


Figura 25. Perfil de expresión diferencial de genes en parásitos *Cichlidogyrus* spp. expuestos a concentración baja (6 µg/L) y alta (36 µg/L) de nanopartículas de plata

6.3.2 Expresión Diferencial de Genes en Parásitos Expuestos a Nanopartículas de Plata

Para identificar la expresión diferencial de genes sobre y sub expresados se estableció un límite para analizar los genes con un valor de z-score ≥ 2 ($p \leq 0.05$). El perfil de expresión génica mostró algunas diferencias dependiendo de la concentración de AgNPs a la que fueron expuestos los parásitos. En la concentración baja (6 $\mu\text{g/L}$) se obtuvieron 424 genes sobre expresados y 328 genes sub expresados, mientras que en la concentración alta (36 $\mu\text{g/L}$) se sobre y sub expresaron 422 y 387 genes respectivamente. Así mismo, en ambas concentraciones se sobre-expresaron 36 genes y 80 genes se sub-expresaron (Figura 26).

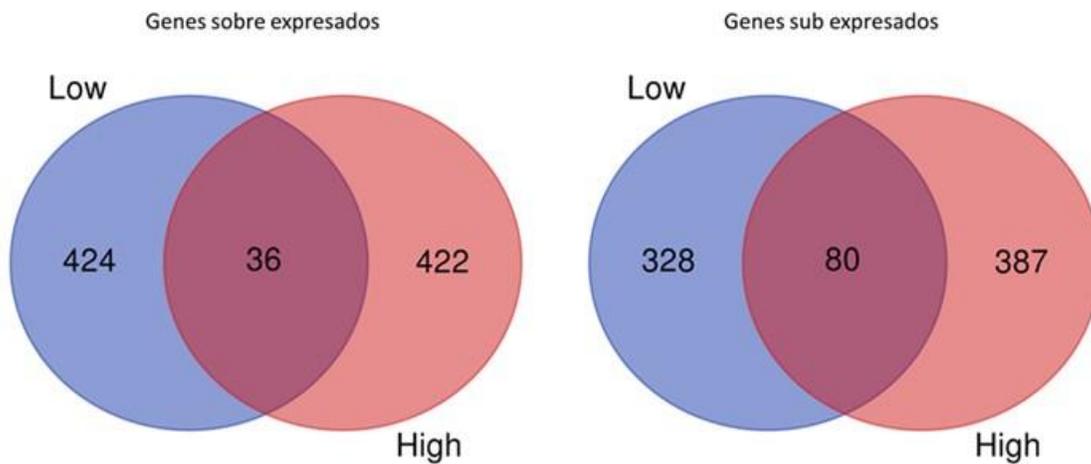


Figura 26. Diagramas de Venn mostrando el número de genes diferencialmente sobre-expresados y sub-expresados con las concentraciones de 6 $\mu\text{g/L}$ (Low) y de 36 $\mu\text{g/L}$ (High) de nanopartículas de plata.

6.3.3 Procesos Biológicos y Rutas Moleculares Inducidas por las Nanopartículas de Plata

Se identificaron las rutas moleculares en las que participan los genes expresados diferencialmente con ambas concentraciones de AgNPs (6 $\mu\text{g/L}$ y 36 $\mu\text{g/L}$). Interesantemente al parecer las AgNPs activan procesos biológicos similares en los parásitos expuestos a la concentración baja y alta, aunque el perfil de expresión fue diferente (Figura 27).

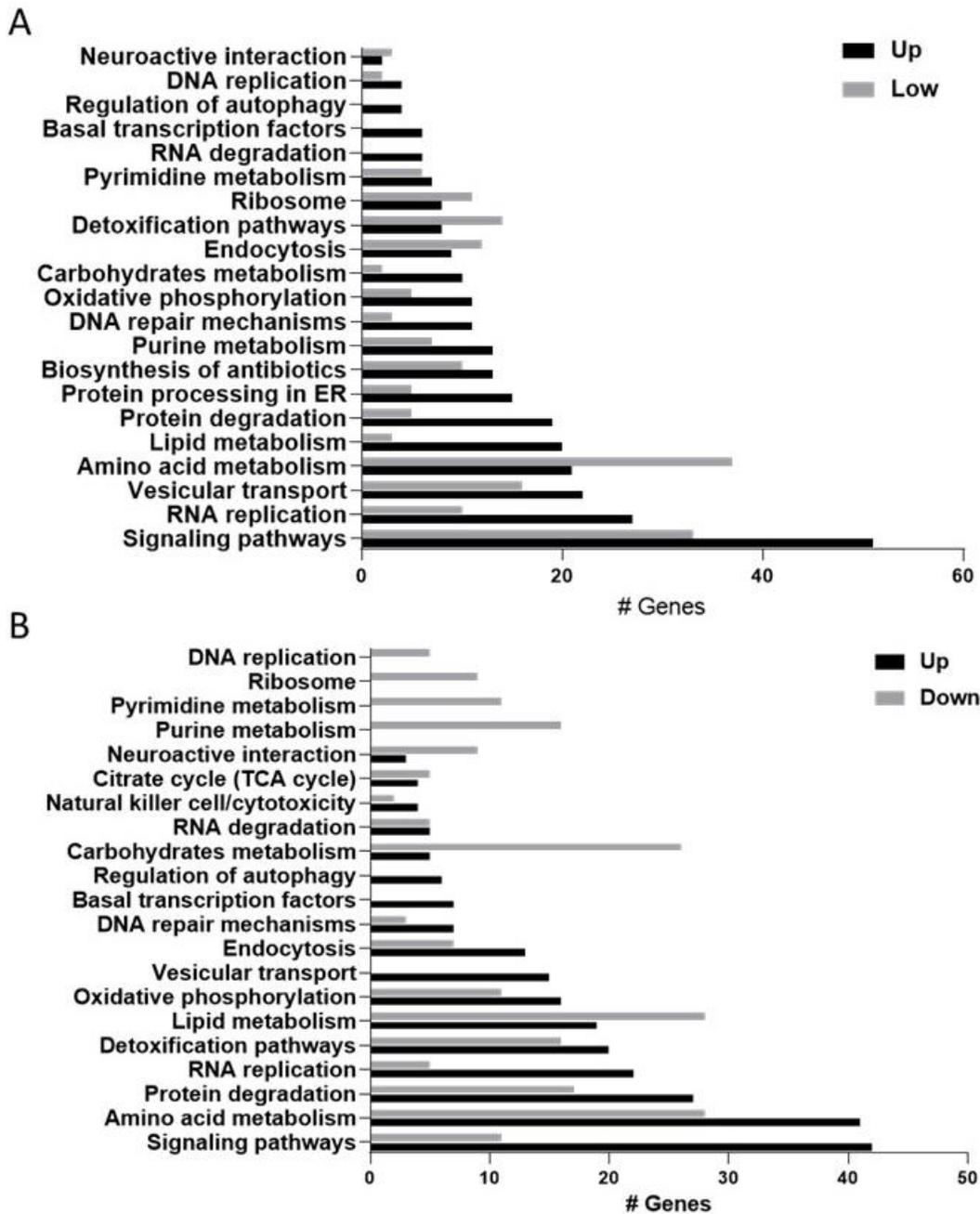


Figura 27. Rutas moleculares activadas por las AgNPs en los parásitos *Cichlidogyrus*. A) 6 µg/L AgNPs y B) 36 µg/L AgNPs

Para acotar los principales procesos biológicos en los que incidieron las AgNPs en los parásitos monogéneos se seleccionaron los 30 genes mayormente sobre y sub expresados que cuentan con anotación.

El listado de genes para la concentración baja (6 µg/L) se muestra en el cuadro 9. Estos genes están involucrados en diferentes procesos como detoxificación (*mrp-4*, *nhr-49*), neurotoxicidad (*zig-5*, *zag-1*, *ahr-1*, *cfz-2*, *unc-11*, *fat-3*, *unc-26*), modulación de la señalización celular (*akt-2*, *pqm-1*, *pdl-1*), muerte celular (*pqn-41*, *rfc-2*, *hsr-9*), reproducción y desarrollo embrionario (*lin-9*, *syp-3*, *lap-1*, *hmr-1*, *cyb-2.1*, *spe-11*, *nhr-23*, *spe-29*, *rrf-3*, *nhr-40*, *hpl-2*, *pat-6*) y organización del tegumento (*ifb-1*, *cut-1*) (Figura 28).

Cuadro 9. Genes (top 30) sobre-expresados y sub-expresados en parásitos *Cichlidogyrus* expuestos una hora a 6 µg/L AgNPs (+ genes sobre-expresados, - genes sub-expresados)

ID	Símbolo	Z-score	Función	Referencia
Y48A6A.1	zig-5	+4.75	Adhesion de células neuronales	Dégletagne <i>et al.</i> , 2010
ZK637.7B	lin-9	+4.67	Diferenciación gonadal, formación de órganos sexuales	Ruíz-Laguna <i>et al.</i> , 2015
F21G4.2	mrp-4	+4.28	Detoxificación, transportadores de membrana vía lisosoma.	Roy, 2017
F53A3.4	pqn-41	+4.15	Muerte celular programada	Kinet y Shaham, 2014
C27H5.1	pdl-1	+3.51	Rutas de señalización celular, (FOXO)/DAF-16	Park y Lee, 2018
F39H2.4	syp-3	+2.93	Meiosis, segregación de cromosomas	Smolikov <i>et al.</i> , 2007
ZK353.6	lap-1	+2.83	Desarrollo larval, degradación de cutícula, enzima digestiva	Joshua, 2001
W02B9.1B	hmr-1	+2.81	Desarrollo embrionario	Padmanabhan <i>et al.</i> , 2017
Y43E12A.1	cyb-2.1	+2.8	Desarrollo embrionario	Rabilotta <i>et al.</i> , 2015
F48C1.7	Spe-11	+2.47	Desarrollo embrionario	Browning y Strome, 1996
C01H6.5B	nhr-23	+2.45	Desarrollo larval, muda	Kouns <i>et al.</i> , 2015
F28H6.1B	akt-2	+2.23	Rutas de señalización celular, (FOXO)/DAF-16	Nakagawa <i>et al.</i> , 2015
F25H8.7	spe-29	+2.21	Actividad antiapoptótica	
F10C1.2B	ifb-1	+2.19	Reproducción	Nance <i>et al.</i> , 2000
F10B5.7	rrf-3	+2.14	Unión muscular a cutícula	Kaminsky <i>et al.</i> , 2009
F28F9.1	zag-1	-3.08	Espermatogénesis	Gent <i>et al.</i> , 2009
C41G7.5	ahr-1	-2.96	Diferenciación neuronal	Wacker <i>et al.</i> , 2003
F58F6.4	rfc-2	-2.87	Neurotransmisión	Zhang <i>et al.</i> , 2016
F27E11.3A	cfz-2	-2.67	Embriogénesis	
C32E8.10C	unc-11	-2.66	Reparación de ADN por escisión de nucleótidos	Lans y Vermeuken, 2011
T03G6.2B	nhr-40	-2.57	Organización neuronal	Zinovyeva y Forrest, 2005
C47G2.1	cut-1	-2.53	Biogénesis de vesículas sinápticas	Nonet <i>et al.</i> , 1999; Burbea <i>et al.</i> , 2002
F40F8.7	pqm-1	-2.48	Morfogénesis, desarrollo de células musculares en el epitelio	Brožová <i>et al.</i> , 2006
			Formación de cutícula	Sapio <i>et al.</i> , 2005
			La sub-expresión de pqm-1 suprime la expresión de daf-2 y ocasiona un desarrollo lento	Tepper <i>et al.</i> , 2013

W08D2.4	fat-3	-2.42	Biogénesis y reciclaje de vesículas sinápticas	Lesá <i>et al.</i> , 2003; Watts <i>et al.</i> , 2003
K10C3.6A	nhr-49	-2.42	Detoxificación fase II	Hu <i>et al.</i> , 2018
K01G5.2A	hpl-2	-2.41	Resistencia al estrés	Kozłowski <i>et al.</i> , 2014
JC8.10B	unc-26	-2.35	Reciclaje de vesículas sinápticas	Harris <i>et al.</i> , 2000
C50C3.9	unc-36	-2.24	Actividad funcional de neuronas mecanosensoriales	Lainé <i>et al.</i> , 2011
T05F1.6A	hsr-9	-2.06	Apoptosis, reparación de ADN	Ryu <i>et al.</i> , 2013
T26E3.3	Par-6	-2.06	Embriogénesis	Nance <i>et al.</i> , 2000

En el mismo sentido, los 30 genes mayormente sobre y sub-expresados en la concentración alta (36 µg/L) se observan en el cuadro 10. La mayoría de los genes son diferentes a los expresados con la concentración baja, sin embargo están involucrados en los mismos procesos biológicos; detoxificación (*pcs-1*), neurotoxicidad (*str-2*, *rab-3*, *zag-1*, *smp-1*, *ldb-1*, *ehs-1*), modulación de la señalización celular (*akt-1*, *vhp-1*, *jkk-1*), daño al ADN (*ceh-30*) reproducción y desarrollo embrionario (*pal-1*, *goa-1*, *cdc-25.1*, *ptl-1*, *lag-1*, *tra-2*, *nhr-40*, *msi-1*, *lev-11*, *efn-2*) y organización del tegumento (*pat-6*, *ajm-1*, *lon-3*, *cut-1*) (Figura 28).

Cuadro 10. Genes (top 30) sobre-expresados y sub-expresados en parásitos *Cichlidogyrus* expuestos una hora a 36 µg/L AgNPs (+ genes sobre-expresados, - genes sub-expresados)

ID	Símbolo	Z-score	Función	Referencia
C50C10.7	str-2	+4,79	Desarrollo neural	Zhang <i>et al.</i> , 2016
C12D8.10B	akt-1	+3,38	Señalización celular-FOXO/DAF-16 Actividad antiapoptótica	Quevedo <i>et al.</i> , 2007
C38D4.6	pal-1	+3,31	Desarrollo embrionario	Baugh <i>et al.</i> , 2005
T21D12.4	pat-6	+3,02	Adhesión de células musculares durante la maduración	Lin <i>et al.</i> , 2003
ZK75.3	ins-3	+2,9	Resistencia al estrés	Hung <i>et al.</i> , 2014
C25A11.4A	ajm-1	+2,68	Unión apical del epitelio	Köppen <i>et al.</i> , 2001
C26C6.2	goa-1	+2,65	Desarrollo embrionario	Minaba <i>et al.</i> , 2006
C33D12.7	ceh-30	+2,65	Biogénesis de vesículas sinápticas	Schwartz y Horvitz, 2007
K06A5.7	cdc-25.1	+2,55	Desarrollo embrionario	Kim <i>et al.</i> , 2004
C08B11.2	hda-2	+2,45	Organización y remodelación de la cromatina	Pothof <i>et al.</i> , 2003
F42G9.9D	ptl-1	+2,37	Desarrollo embrionario y neuronas mecanosensoriales	Chew <i>et al.</i> , 2013
K08B4.1A	lag-1	+2,36	Regulador transcripcional, señalización en el desarrollo de nemátodos	Christensen <i>et al.</i> , 1996

F08B1.1A	vhp-1	+2,34	Regulador negativo de la señalización celular JNK-MAPK. Regulador negativo de la tolerancia al estrés	Mizuno <i>et al.</i> , 2004
F35C8.3	jkk-1	+2,33	Activa la ruta JNK	Kawasaki <i>et al.</i> , 1999
C15F1.3B	tra-2	+2,31	Determinación sexual en machos	Mapes <i>et al.</i> , 2010
F54D5.1	pcs-1	+2,3	Detoxificación de metales pesados	Vatamaniuk <i>et al.</i> , 2001; Essig <i>et al.</i> , 2016
C18A3.6A	rab-3	+2,28	Regulación de vesículas en endocitosis y exocitosis	Nonet <i>et al.</i> , 1999
T03G6.2B	nhr-40	-3,76	Morfogénesis, desarrollo de células musculares en el epitelio	Brožová <i>et al.</i> , 2006
C50F2.10	abf-2	-3,57	Respuesta inmune	Tenor y Aballay, 2008
R10E9.1	msi-1	-3,43	Reproducción	Yoda <i>et al.</i> , 2000
F08B1.2	gcy-12	-3,11	Regula el tamaño del cuerpo	Fujiwara <i>et al.</i> , 2015
F28F9.1	zag-1	-3,03	Desarrollo neuronal	Wacker <i>et al.</i> , 2003
Y105E8B.1D	lev-11	-2,85	Diferenciación sexual	Watabe <i>et al.</i> , 2018
ZC302.1	mre-11	-2,39	Reparación de ADN	Yin y Smolikove, 2013
ZK836.1	lon-3	-2,22	Formación de cutícula	Suzuki <i>et al.</i> , 2002
C43F9.8	efn-2	-2,16	Desarrollo embrionario	Wang <i>et al.</i> , 1999
F46B6.3B	smg-4	-2,15	Corrección de transcripciones aberrantes	Aronoff <i>et al.</i> , 2001
Y54E5B.1B	smp-1	-2,12	Embriogénesis	Dalpe <i>et al.</i> , 2012
C06G4.2B	clp-1	-2,11	Distrofia muscular	Joyce <i>et al.</i> , 2012
F58A3.1C	ldb-1	-2,1	Desarrollo neuronal	Cassata <i>et al.</i> , 2000
ZK1248.3A	ehs-1	-2,07	Reciclaje de vesículas sinápticas	Salcini <i>et al.</i> , 2001
C47G2.1	cut-1	-2,06	Formación de anillos longitudinales en cutícula	Sapio <i>et al.</i> , 2005

Estos resultados indican que las dos concentraciones de AgNPs inducen procesos biológicos similares en los parásitos *Cichlidogyrus* a través de diferentes mecanismos.

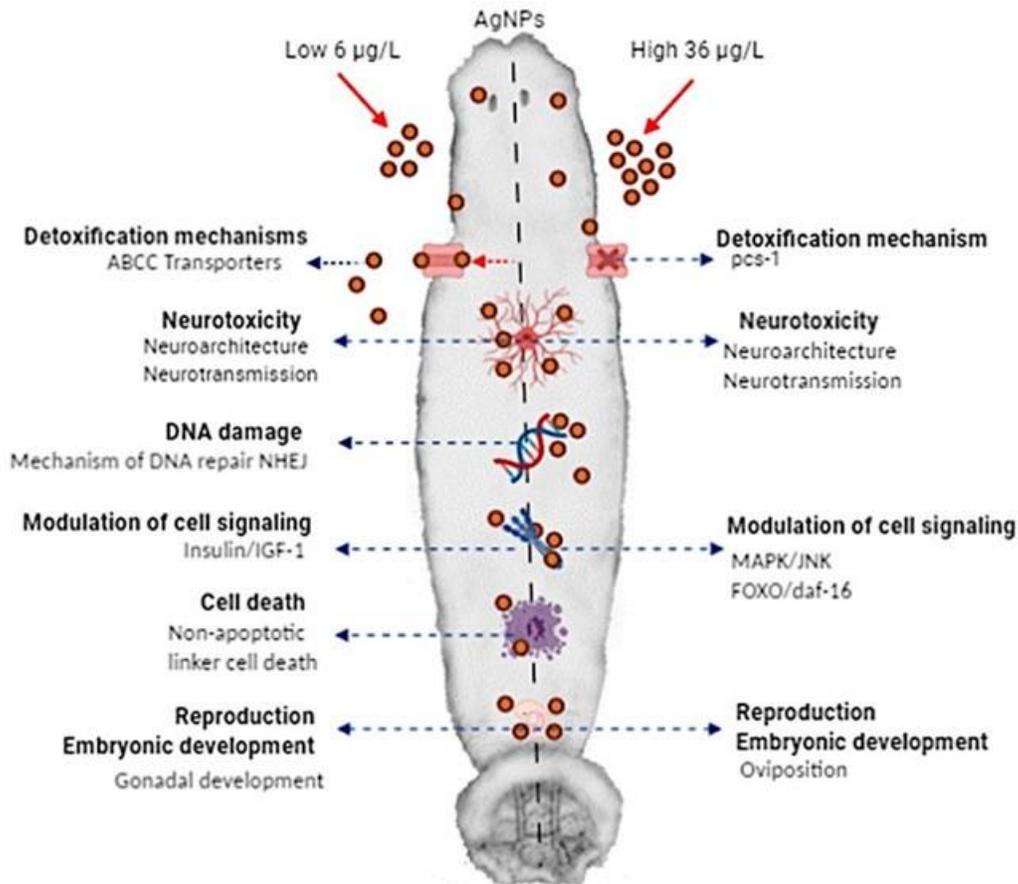


Figura 28. Respuesta molecular de los parásitos monogéneos a nanotoxicidad por nanopartículas de plata. Descripción de los procesos y genes involucrados en el texto.

6.3.3.1 Alteración en la organización del tegumento. El tegumento es la epidermis de los monogéneos, el cual tiene diversas funciones como la absorción y secreción de sustancias, osmoregulación, soporte mecánico y protección contra agentes xenobióticos (Hodová *et al.*, 2018). Como observamos con las imágenes SEM, el primer sitio de contacto de las AgNPs es en el tegumento de los parásitos provocándole daños en su ultraestructura. Las AgNPs activaron genes que actúan en la epidermis como *cut-1*, *nhr-23*, *ifb-1*, *pat-6*, *ajm-1* y *lon-3*. Específicamente con la concentración baja de AgNPs se observó una sobre-expresión en el gen intermediario en los filamentos de proteína (*ifb-1*), el cuál es importante en la formación del citoesqueleto en las células de muchos metazoarios para proveer resistencia mecánica (Liu *et al.*, 2012). En *C. elegans*, *ifb-1* tiene un papel importante en la unión muscular con la cutícula y para el mantenimiento de la organización y unión de la hipodermis con el tejido muscular; deficiencias en el gen *ifb-1* causan

defectos morfológicos y en las células excretoras (Qing *et al.*, 2018). Al mismo tiempo, los parásitos expuestos a la concentración alta de AgNPs mostraron sobre-expresión de genes que actúan en la unión muscular con el tegumento; *pat-6*/actopaxina (Lin *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2012) y *ajm-1* que se localizan en el dominio de unión apical del epitelio basal de *C. elegans* en el complejo caderina-catenina (HMR-HMP), el cual es importante para el mantenimiento estructural del epitelio (Köppen *et al.*, 2001; Armenti y Nance, 2012), así como *lon-3* que es secretado por la hipodermis y se requiere para la regularización en el tamaño del cuerpo de los helmintos (Suzuki *et al.*, 2002; Soete *et al.*, 2007). El gen *cut-1* (cuticlin-1) se sub-expresó con ambas concentraciones de AgNPs, *cut-1* codifica para un componente de la cutícula de *C. elegans* que contribuye a la formación de envolturas extracelulares que protegen al organismo del medio ambiente (Sebastiano *et al.*, 1991). Deficiencia de *cut-1* ocasionan un incremento en el diámetro, reducción del tamaño y pérdida de las corrugaciones en larvas de *C. elegans* (Sapio *et al.*, 2005). Por lo tanto, podemos deducir que la exposición de los parásitos a las AgNPs afecta la organización del tegumento, la concentración baja causa problemas asociados con la resistencia mecánica, mientras que la concentración alta afecta la integridad estructural.

6.3.3.2 Las AgNPs activan mecanismos de detoxificación. La exposición a la concentración baja de AgNPs induce la expresión del gen *mrp-4* (proteína 4 asociada a la resistencia a múltiples fármacos), un miembro de la subfamilia C de los transportadores ABC, este gen actúa en la membrana plasmática de diferentes tipos celulares, especialmente en tejidos que tienen una función de barrera, como el tegumento de los parásitos, intestino, hígado y capilares cerebrales. Mrp-4 expulsa a los xenobióticos fuera de las células protegiéndola de compuestos citotóxicos (Borst *et al.*, 2007; Russel *et al.*, 2008). Los transportadores ABC están presentes en gusanos platelmintos, específicamente en los parásitos monogéneos la subfamilia C de los transportadores ABC está bien representada (Caña-Bozada *et al.*, 2019). La sub-expresión de *mrp-4* sugiere que las AgNPs entran al parásito a través del tegumento y activan procesos de detoxificación celular para expulsar las nanopartículas fuera de las células como un mecanismo de defensa. Sin embargo, la sub-expresión del gen receptor de hormona nuclear, *nhr-49*, nos indica un decremento en la respuesta de detoxificación. En *C. elegans*, bajo condiciones normales, *nhr-49* es esencial para la expresión del gen *gst-4* (glutathion transferasa) el cual participa en la fase II en el proceso de detoxificación (Hu

et al., 2018). Por lo tanto, el decremento en la expresión de *nhr-49* nos indica que las AgNPs no están siendo expulsadas completamente y algunas nanopartículas logran pasar a través de la epidermis.

Con la concentración alta de AgNPs (36 $\mu\text{g/L/h}$) se sub-expresó el gen *pcs-1* que codifica para la enzima fitoquelatina sintasa, la cual está relacionada en procesos de detoxificación de metales pesados y actúa a nivel de la hipodermis, faringe y músculos de la pared del cuerpo de los organismos (Vatamaniuk *et al.*, 2001). El incremento en la expresión de *pcs-1* aumenta la tolerancia a los metales pesados (Wojas *et al.*, 2010). En un estudio realizado con *C. elegans* se observó que la desregulación o knockout de *pcs-1* provoca una hipersensibilidad de los parásitos al cadmio, lo que ocasiona retardo en el desarrollo y muerte temprana del parásito (Essig *et al.*, 2016), por lo tanto, la sub-expresión de *pcs-1* en los parásitos *Cichlidogyrus* puede indicar que las AgNPs a 36 $\mu\text{g/L/h}$ no son expulsadas y es mayor la concentración de plata que interactúa en el interior del parásito (Figura 29). Además se ha observado que *pcs-1* es más sensible a la toxicidad por cadmio que por otros metales, siendo *pcs-1* una ruta de detoxificación por este metal a diferencia de las expresiones usuales de metaloproteínas (Hughes *et al.*, 2009), en los resultados no se identificó la expresión de metaloproteínas como medio de detoxificación de metales en el parásito, sin embargo es probable que *pcs-1* sea una ruta importante para detoxificar a las AgNPs.

En los parásitos *Cichlidogyrus* expuestos a la concentración alta (36 $\mu\text{g/L/h}$) no se expresaron genes ABC por lo que las AgNPs también pueden estar inhibiendo la resistencia de los parásitos a las nanopartículas. Sin embargo, en la concentración baja si se expresaron los genes *mrp-4* y *nhr-49* involucrados en el transporte de xenobióticos. De tal forma que los mecanismos de resistencia como la detoxificación en los parásitos *Cichlidogyrus* pueden ser activados de acuerdo a la concentración de AgNPs a los que estén expuestos.

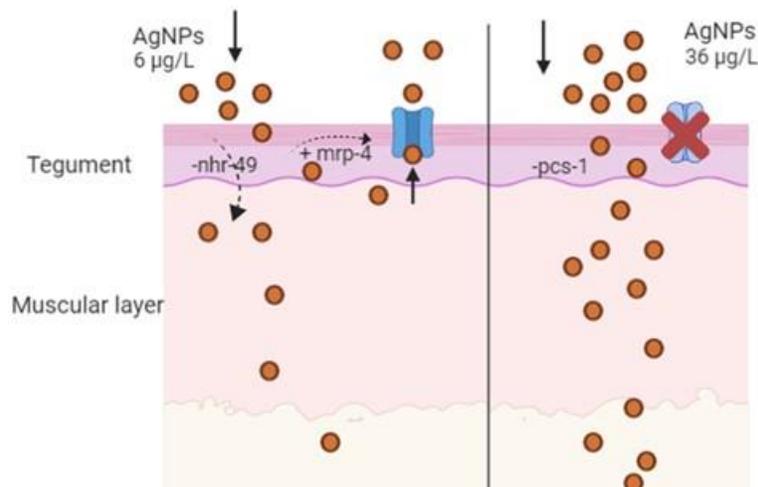


Figura 29. Mecanismos de detoxificación en los parásitos *Cichlidogyrus* expuestos una hora a 6 y 36 µg/L de AgNPs por 1 hora.

6.3.3.3 Las AgNPs afectan el sistema nervioso. Las AgNPs causan alteraciones en el sistema nervioso de los parásitos, afectando la neuroarquitectura y neurotransmisión. Las AgNPs que logran atravesar el tegumento de los parásitos y que no son expulsadas por mecanismos de detoxificación, pueden interactuar directamente con tejidos como las capas musculares que se encuentran debajo del tegumento, los cuales tienen conexiones neuronales, después de la capa muscular se encuentran otro tipo de tejidos como el nervioso. Los resultados sugieren que las AgNPs provocan alteraciones en el sistema nervioso de los parásitos. En los monogeneos el órgano cerebral se localiza entre los lóbulos de la cabeza y la faringe, de este órgano se conecta ramificaciones neuronales compuestas por neuronas y axones (Figura 30). El-Naggar y colaboradores (2001) observaron en los monogeneos *Macrogryodactylus clarii* y *M. congolensis* que el sistema nervioso tiene afinidad con el nitrato de plata, describiendo procesos dendríticos y células neuronales. Por lo tanto, es posible que la plata de las AgNPs se ligue a las estructuras neuronales y provoque daños.

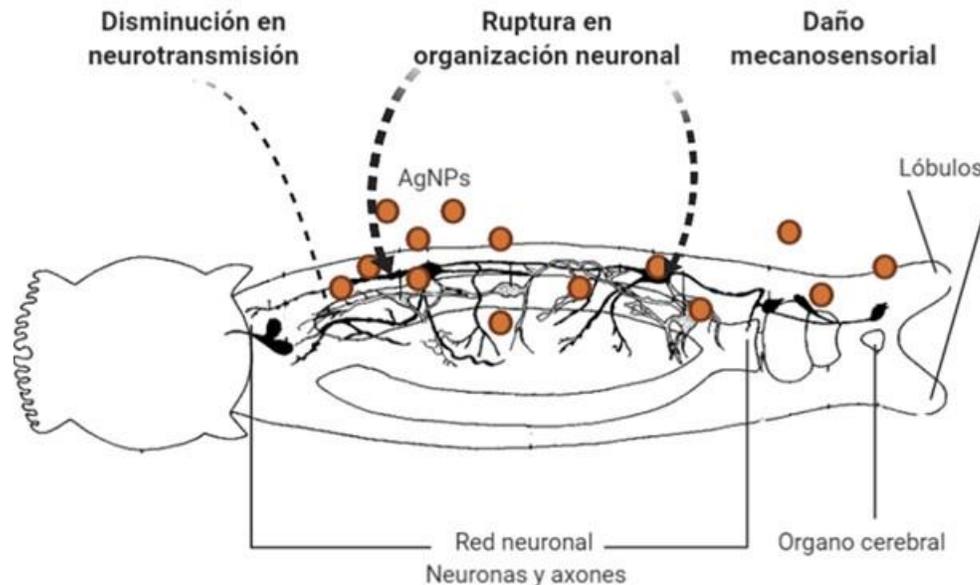


Figura 30. Esquema de sistema nervioso de un monogeneo (*M. congolensis*) donde se representan los probables efectos de las AgNPs (Modificado de El-Naggar *et al.*, 2001).

Los parásitos expuestos a la concentración baja (6 $\mu\text{g/L}$) activaron genes relacionados con la estructura y organización del sistema nervioso en *C. elegans*. *zig-5* fue uno de los genes más sobreexpresados (4.75 z-score), el cual es necesario para mantener la integridad estructural de la posición del soma y axones neuronales. En *C. elegans* se ha observado que genes *zig* (*zig-5* y *zig-8*) son necesarios para mantener la neuroanatomía en los parásitos a través de la inhibición de *sax-7* y sus isoformas (Benard *et al.*, 2012). Así mismo, los parásitos presentaron la sub-expresión del gen *zag-1* (-3.08 z-score), el cual tiene un rol en la diferenciación de células neuronales, deficiencias en *zag-1* provocan defectos en la guía axonal (Wacker *et al.*, 2003). *zag-1* también interviene en la expresión de otros factores como *ceh-28* el cual a su vez activa una serie de neuropéptidos como *dbl-1*, *egl-17* y *flp-5* (Ramakrishnan y Okkema 2014). La sub-expresión de *zag-1* en los parásitos *Cichlidogyrus* sugiere afectación en procesos de diferenciación neuronal y en la activación de factores para la correcta neurotransmisión. La sub-expresión de *zag-1* reduce la frecuencia e intensidad de expresión del factor de transcripción de homeodominio, *ceh-28*, y reduce o elimina la expresión de marcadores regulados por *ceh-28* que afectan el funcionamiento de células neuromotoras como M4 (neurona faríngea) que es una célula multifuncional que actúa como una neurona motora colinérgica para estimular la contracción del músculo faríngeo peristáltico y como una célula neuroendocrina que secreta neuropéptidos y factores de crecimiento para afectar a otros

células tanto dentro como fuera de la faringe (Duerr *et al.*, 2008). Las AgNPs (6µg/L) también activaron la expresión del gen *ahr-1*, el cual está relacionado con la diferenciación y desarrollo neuronal (Qin y Powell-Coffman, 2004), *ahr-1* es un ortólogo del receptor de hidrocarburos de arilo (AhR) en mamíferos, un factor de transcripción que media los efectos tóxicos de ciertos contaminantes ambientales (Qin *et al.*, 2006; Gu *et al.*, 2008). La sub-expresión de *ahr-1* en los parásitos *Cichlidogyrus* puede indicar un daño neuronal como efecto tóxico por la exposición a las AgNPs. *hmr-1* también mostró sobre-expresión en los parásitos expuestos a las AgNPs, este gen es una cadherina que interviene en procesos en las neuronas motoras para la regulación del patrón axonal, así como en la morfogénesis epitelial (Broadbent y Pettitt, 2002; Klompstra *et al.*, 2005). La sub-expresión de *cfz-2* también indica un daño en la organización neuronal, en estudios con mutantes de *cfz-2* se han observado defectos en el desarrollo de los axones neuronales y la organización de las neuronas se interrumpe (Zinovyeva y Forrest, 2005).

Así mismo, las AgNPs provocaron la sub-expresión de genes involucrados en la señalización neuronal, la comunicación correcta entre neuronas se origina con la sinapsis que involucra a las vesículas sinápticas que contienen a los neurotransmisores que son liberados hacia la hendidura sináptica que comunica al axón o soma de otras neuronas. Una vez liberados los neurotransmisores, las proteínas de las vesículas se recuperan de la membrana plasmática y son recicladas en nuevas vesículas sinápticas para mantener la transmisión neuronal. El reciclaje inicia con la activación de clatrina en las zonas de la membrana que contiene a las proteínas de las vesículas sinápticas. El mecanismo principal del reciclaje de vesículas sinápticas es la endocitosis mediada por clatrina donde intervienen proteínas como sinaptojanina, dinamina, y endofilina (Gu *et al.*, 2008).

Los parásitos *Cichlidogyrus* presentaron una sub-expresión de genes relacionados con la formación y reciclaje de vesículas sinápticas, *unc-26* (sinaptojanina), *unc-11* (sinaptobrevina) y *fat-3* (D6-desaturasa) En *C. elegans* se ha observado que la inactivación de *unc-26* provoca disminución en las vesículas sinápticas, dada la función de este gen en el reciclaje y recubrimiento de las vesículas (Yu *et al.*, 2018; Harris *et al.*, 2000). *unc-11* se expresa en las terminales presinápticas, mutantes de *unc-11* presentan afectaciones en la biogénesis de vesículas sinápticas por la reducción de sinaptobrevina, lo cual disminuye la liberación de neurotransmisores (Nonet *et al.*, 1999; Burbea *et al.*, 2002). Así mismo, *fat-3*, es esencial en la biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados de

cadena larga (LC-PUFAs) importantes en la formación de membranas neuronales. Los organismos carentes de *fat-3* no sintetizan LC-PUFAs mostrando anormalidades en la puesta de huevos, lo cual se asocia a deterioro neuronal. En *C. elegans* la ausencia de *fat-3* disminuye la presencia de vesículas sinápticas y por consiguiente niveles bajos de neurotransmisores en las uniones neuromusculares (Lesa *et al.*, 2003; Watts *et al.*, 2003). De igual forma se activó el gen *unc-36* involucrado en la señalización neuronal mediada por los canales de calcio. Los genes *unc* afectan fuertemente la magnitud y dependencia del voltaje de los canales transitorios de calcio. *unc-36* se expresa en la mayoría de las neuronas y tejidos musculares principalmente en la membrana o pared que recubre al cuerpo (tegumento) y músculos faríngeos. Específicamente se ha identificado la expresión de *unc-36* en neuronas mecanosensoriales, así como en neuronas de la cabeza y cola.

Probablemente las AgNPs puedan provocar alta actividad neuronal, en parásitos se ha reportado que la exposición a xenobióticos puede provocar efectos neurotóxicos (Boyd *et al.*, 2009; Rajini *et al.*, 2008; Ju *et al.*, 2014). Durante los períodos de alta actividad neuronal, las vesículas sinápticas deben fusionarse con la membrana plasmática a altas velocidades. Las tasas sostenidas de fusión de vesículas a su vez se ven facilitadas por un mecanismo eficiente de reciclaje de vesículas sinápticas (Murthy y Camilli, 2003). Por consiguiente, la sub-expresión de genes relacionados con la formación y reciclaje de vesículas sinápticas puede provocar la disminución de éstas alterando la correcta neurotransmisión y un desequilibrio en los procesos homeostáticos de los parásitos.

Por otra parte, concentraciones altas de AgNPs (36µg/L/h) también tienen un efecto en el sistema nervioso de los parásitos, específicamente el gen receptor de olor *str-2* presentó sobre-expresión (+4.79 z-score), este gen está relacionado con neuronas quimio-sensoriales implicadas en la respuesta a estímulos ambientales. *str-2* se expresa principalmente en las neuronas olfatorias AWC que son críticas para la quimiotaxis de olores volátiles, la inactivación del gen *str-2* confiere deficiencia en la sensibilidad a químicos (Zhang *et al.*, 2016). Aunque en los parásitos monogéneos no se han descrito neuronas AWC, estos parásitos cuentan con sistemas sensoriales (El-Naggar *et al.*, 1991). La activación de *str-2* puede indicar que las AgNPs tienen una respuesta quimiosensorial en los parásitos.

Al igual que en la concentración baja de AgNPs, en la concentración alta también se registró la sub-expresión del gen *zag-1*, afectando el correcto funcionamiento de células neuromotoras y secreción de neuropéptidos (Duer *et al.*, 2008). Las AgNPs a una concentración de 36µg/L involucraron la sub-expresión del gen *ehs-1*, una baja actividad de este gen disminuye el número de vesículas sinápticas y ocasiona movimientos descoordinados producto de defectos presinápticos en la neurotransmisión (Salcini *et al.*, 2001). De igual forma las AgNPs disminuyeron la expresión del gen *ldb-1*, la inactivación de este gen en *C. elegans* provoca defectos en la motilidad como letargia en los gusanos probablemente debido a la pérdida mecano sensorial (Cassata *et al.*, 2000).

Por lo anterior, los resultados obtenidos muestran que las AgNPs causan alteraciones en la arquitectura neuronal y en la neurotransmisión de las señales sinápticas, esto puede provocar un desbalance en la homeostasis de los parásitos *Cichlidogyrus* (Figura 30). Los parásitos expuestos a ambas concentraciones de AgNPs presentaron letargo y contracciones corporales anormales antes de morir, en estudios toxicológicos esta respuesta motora es común debido al daño neurológico que provocan los tóxicos (Martínez-Finley y Ascher, 2011). Akter y colaboradores (2018) mencionan que las AgNPs pueden actuar como una neurotoxina, en varios estudios realizados con ratones reportan efectos como inflamación, incremento de la permeabilidad, daño neuronal y degeneración en la sinapsis. El incremento en los niveles de ROS provocado por las AgNPs genera estrés oxidativo que puede causar neurodegeneración en células neuronales (Zieminska *et al.*, 2014).

6.3.3.4 Las AgNPs activan rutas de señalización celular. Genes involucrados en señalización celular fueron activados en los parásitos como mecanismo de defensa contra el daño causado por las AgNPs. En parásitos expuestos a la concentración alta de AgNPs (36 µg/L) se sobre-expresó el gen *jdk-1* (mitógeno activador de la proteína quinasa 7; ortólogo de MAP2K7), este gen es miembro de la superfamilia MAP quinasa y tiene una función específica como activador de la ruta JNK (c-Jun N-terminal quinasa). En vertebrados, la cascada JNK puede activar mecanismos de resistencia a la toxicidad por metales pesados u otros estresores ambientales para extender el tiempo de vida de los organismos (Kawasaki *et al.*, 1999; Pothof *et al.*, 2003; Wang, 2018). JNK actúa como un regulador positivo en la señalización insulina/DAF-16 que regula la longevidad y resistencia al

estrés (Oh *et al.*, 2005; Wolf *et al.*, 2007). El gen *jkk-1* se expresa en la mayoría de las neuronas de *C. elegans*, y su inactivación puede causar defectos en la locomoción. Además, la ruta JNK trabaja en las neuronas motoras, modula la coordinación en la locomoción (Villanueva *et al.*, 2001; Mapes *et al.*, 2010). Los parásitos *Cichlidogyrus* mostraron letargia en sus movimientos después de la exposición a las AgNPs, por lo tanto, la expresión de *jkk-1* también podría indicar el efecto de las AgNPs en la neurolocomoción. Interesantemente, el gen *vhp-1* también se sobre-expresó, este gen actúa negativamente en la señalización JNK. *vhp-1* codifica para un homólogo de MPK7, el cual fosforila a p38 y a la ruta JNK MAPKS. La pérdida en la función de estas rutas resulta en una hipersensibilidad de *C. elegans* a los metales pesados (Kawasaki *et al.*, 1999; Tanoue *et al.*, 2001).

Ambas concentraciones de AgNPs activaron genes kinasa serina/treonina, *akt-1* y *akt-2*. Estas rutas de señalización celular están involucradas en varios procesos celulares; metabolismo de glucosa (insulina/IGF-1), síntesis de proteínas (mTOR), proliferación celular y supervivencia (FOXO) (Diehl y Schaal, 2013). En *C. elegans*, *akt-1* y *akt-2* actúan en rutas de señalizaciones de factores de crecimiento (IIS) que regulan el tiempo de vida, desarrollo, metabolismo y resistencia al estrés (Nance *et al.*, 2000). También se ha observado que *akt-1* y *akt-2* regulan el desarrollo de *C. elegans* en respuesta a las condiciones ambientales mediante el control de FOXO/DAF-16 (Baugh *et al.*, 2005). Los genes *akt-1* y *akt-2* también actúan como proteínas antiapoptóticas para modular la muerte celular programada en líneas germinales de *C. elegans* por daño al ADN. Este proceso se ha observado en varias especies, por lo tanto, la habilidad de AKT para prevenir la apoptosis generada por daño al ADN parece ser un proceso conservado en las especies (Baugh *et al.*, 2005). La expresión de estos genes en los parásitos *Cichlidogyrus* podría indicar que las AgNPs ocasionan daño al ADN. En varios estudios se ha determinado que las AgNPs pueden interactuar con el ADN y romper la doble cadena (González-Moragas *et al.*, 2017; Benelli, 2018; Liao *et al.*, 2019).

Los parásitos expuestos a la concentración baja de AgNPs mostraron sub-expresión del gen *pqm-1*, el cual está involucrado en señalización celular como un activador transcripcional en el control de genes asociados a DAF-16. La pérdida de *pqm-1* suprime la actividad de DAF-2, el cual a su vez inactiva la transcripción de *daf-16*, probablemente afectando la resistencia de los parásitos a la exposición de AgNPs, así y acelerando la muerte celular. La sub-expresión de *pqm-1* está relacionado con procesos de envejecimiento (Lesa *et al.*, 2003; Zečić y Braeckman, 2020). De igual

manera, el gen fosfolipasa D, *pdl-1*, presentó sub-expresión con un z-score de 3.51, este gen también está involucrado en la ruta DAF-16. Park y Lee (2018) observaron que la sub-expresión de *pdl-1* ocasiona la acumulación de ROS y disminuye la longevidad. Entonces, el incremento en la expresión de *pdl-1* puede indicarnos una respuesta al daño por las AgNPs en los parásitos *Cichlidogyrus*.

6.3.3.5 Las AgNPs ocasionan daño al ADN y muerte celular. La exposición a concentraciones bajas de AgNPs activan genes involucrados en la muerte celular. Los mecanismos de muerte celular son activados en los organismos con la finalidad de reparar las células dañadas (Malin *et al.*, 2016). La sub-expresión del gen *hsr-9* (p53 proteína de unión 1; homólogo de 53BP1) sugieren que las AgNPs a bajas concentraciones pueden dañar el ADN de los parásitos *Cichlidogyrus*; *hsr-9* tiene un rol importante en los “checkpoints” del ciclo celular, en la reparación del ADN y la apoptosis. En *C. elegans*, *hsr-9* está involucrado en la reparación del ADN mediante el mecanismo NHEJ (non-homologous end-joining, por sus siglas en inglés) y suprime la recombinación homóloga (HR) (Quevedo *et al.*, 2007). El daño al ADN ocasionado por las AgNPs ha sido bien establecido (Dakal *et al.*, 2016; Slavín *et al.*, 2017), por lo tanto, la expresión de *hsr-9* puede indicarnos la activación de mecanismos de reparación celular, sin embargo la sub-expresión de este gen puede indicarnos que los parásitos presentaron una baja eficiencia en la reparación al ADN dañado, lo que desencadena procesos de muerte celular.

Los parásitos expuestos a la concentración baja de AgNPs también tuvieron una sobre-expresión del gen *pqn-41* (4.15 z-score); este gen participa en mecanismos de muerte celular programada a través de procesos no apoptóticos independientes de caspasas (Kinet y Shaham, 2014). Este tipo de procesos se ha observado en las “linker cells” durante el desarrollo reproductivo en machos de *C. elegans* (Blum *et al.*, 2012). En invertebrados, este tipo de muerte celular programada no apoptótica ha sido observado en el desarrollo normal de neuronas en el cordón espinal y ganglios ciliares (Borsello *et al.*, 2002). Así mismo, se han observado neuronas con núcleos deformes y mitocondrias y retículo con inflamación en pacientes con enfermedades neurodegenerativas asociadas a la poliglutamina *pqn-41* (Blum *et al.*, 2012; Kinet y Shaham, 2014). Procesos de neurodegeneración se han observado en nemátodos expuestos a AgNPs (Blum *et al.*, 2012),

entonces, la expresión de *pqn-41* en los parásitos *Cichlidogyrus* puede estar relacionado con el daño causado por las AgNPs en el sistema nervioso.

6.3.3.6 AgNPs intervienen en la reproducción y desarrollo embrionario. Las AgNPs en ambas concentraciones activaron genes que regulan la reproducción y desarrollo embrionario, esta respuesta puede ser una estrategia de supervivencia de los parásitos. Se ha documentado el incremento en la reproducción, ovoposición y desarrollo embrionario como una respuesta de parásitos nemátodos a xenobióticos (Cronin *et al.*, 1997). En algunos vertebrados, la respuesta a tóxicos ambientales produce cambios en la reproducción, en algunas especies de hiedras los tóxicos inducen a la reproducción sexual (Austad, 1997). Estudios han mostrado que las AgNPs causan efectos adversos en la reproducción de diversos organismos modelo no mamífero (Zhang *et al.*, 2014).

Los parásitos expuestos a 6 µg/L/h de AgNPs sobre-expresaron genes relacionados con la reproducción como la activación espermiática (*spe-29*, *rrf-3*), desarrollo embrionario (*spe-11*, *cyb-2.1*, *hmr-1*) y diferenciación gonadal (*lin-9*). Específicamente el gen *lin-9* se sobre-expresó en niveles altos (4.67 z-score); en *C. elegans* se ha observado que *lin-9* es requerido para el desarrollo de las gónadas hermafroditas y para el desarrollo del sistema reproductivo masculino, desarrollo de la espícula masculina, los rayos y las gónadas (Beitel *et al.*, 2000; Harrison *et al.*, 2006). De igual manera, el gen *syp-3* regula la sinapsis a lo largo de los cromosomas, lo que contribuye a la progresión meiótica en la profase temprana durante la reproducción (Smolikov *et al.*, 2007). Concentraciones altas de AgNPs (36 µg/L) también activaron genes involucrados en procesos como el desarrollo embrionario y ovoposición de los parásitos (*pal-1*, *goa-1*, *cdc-25.1* y *ptl-1*). El gen *pal-1* es necesario para mantener el desarrollo del blastómero C en las células multipotentes en embriones de *C. elegans* (Lin *et al.*, 2003). El gen *tra-2* presentó sub-expresión en los parásitos *Cichlidogyrus*, este gen interviene en procesos durante la determinación sexual de *C. elegans* (Essig *et al.*, 2016). En estudios donde se expuso al nemátodo *C. elegans* a AgNPs se observó que las nanopartículas pueden disminuir el funcionamiento correcto en procesos reproductivos (Zieminska *et al.*, 2014; Mashock *et al.*, 2016).

En resumen, los resultados sugieren que los parásitos expuestos a 6 µg/L de AgNPs expresaron un conjunto de genes implicados en los procesos de adaptación y compensación en un intento por sobrevivir y restablecer la homeostasis, mientras que los parásitos expuestos a 36 µg/L de AgNPs expresaron un conjunto de genes involucrados en procesos compensatorios y de adversidad; sin embargo, los parásitos no logran disminuir la toxicidad de las nanopartículas y éstas logran ser letales después de una hora de exposición como lo observamos en las pruebas *in vitro*. Por lo tanto, los procesos biológicos se superpusieron en ambas concentraciones, pero fueron impulsados por diferentes conjuntos de genes dependiendo de la capacidad de los organismos para hacer frente a la toxicidad.

6.4 Efectos Patológicos Ocasionados por las Nanopartículas de Plata en Peces

Para poder determinar si las AgNPs pueden ser viables como antihelmíntico para eliminar parásitos monogéneos en peces de cultivo, es necesario determinar los posibles efectos patológicos que las AgNPs pueden causar en los peces de acuerdo al tipo y concentración de nanopartículas. En la presente investigación no fue posible evaluar *in vivo* el efecto antihelmíntico de las AgNPs en tilapias infestadas con parásitos *Cichlidogyrus* y determinar los posibles efectos patológicos en los peces. Sin embargo, se realizó una revisión literaria de estudios donde se han probado diferentes tipos de AgNPs en varias especies de peces. De acuerdo al sistema de búsqueda de artículos científicos, se encontraron 57 artículos donde se registran daños en los peces ocasionados por las AgNPs, de los cuáles sólo se seleccionaron 32 artículos de acuerdo a la información proporcionada. Cabe destacar que son pocos los estudios enfocados en la tilapia nilótica (Cuadro 11).

Cuadro 11. Efectos patológicos de las AgNPs en tejidos de peces.

Especie	AgNPs/tiempo	Alteraciones histopatológicas en órganos	Autores
<i>Danio rario</i>	1000 mg/L 27 nm 48 h	<i>Branquias</i> : alteraciones leves, ligero engrosamiento de filamento branquial.	Griffitt <i>et al.</i> , 2009
Medaka <i>Oryzias latipes</i>	15 mg Ag/L 21 días	<i>Piel</i> : Alteraciones en epidermis, adelgazamiento de epidermis, decremento en la densidad nuclear, retardo en el desarrollo de escamas y desarrollo de epitelio superficial.	Kwok <i>et al.</i> , 2012
<i>Cyprinus carpio</i>	50, 100 y 200 µg/L 15 nm 48 y 96h	<i>Piel</i> : 50 µg/L; incremento en tamaño y número de células de moco. 100 µg/L; incremento significativo de células club de moco en epidermis, aumento de tamaño de células de moco. 200 µg/L; hiperplasia en epidermis. <i>Branquias</i> : 100 µg/L; incremento de células de moco, 200 µg/L; hiperplasia de epitelio <i>Hígado</i> : 100 µg/L; atrofia en núcleos de hepatocitos, 200 µg/L; atrofia en núcleos de hepatocitos y acumulación de gránulos eosinófilos.	Lee <i>et al.</i> , 2012
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	3, 300 y 1000 mg/L 8 semanas	<i>Hígado</i> : Reducción en el peso del hígado e HIs index. Congestión local en el parénquima hepático, disminución en tamaño de hepatocitos, aumento en la talla de sinusoides.	Monfared y Soltani, 2013
<i>Oryzias latipes</i>	0.05, 0.1, 0.25 y 0.5 mg/L 50 - 63 nm 14 días	<i>Branquias</i> : aneurisma en lamelas primarias, hiperplasia epitelial, incremento de mucus, fusión lamelar, disminución de células de cloro, epitelio hinchado, desprendimiento de epitelio en lamelas primarias. <i>Hígado</i> : concentraciones bajas de AgNPs; acumulación de hemocitos en vasos sanguíneos, agrandamiento de hepatocitos, desprendimiento de parénquima hepático. Concentraciones altas mostraron daños más severos, desorganización de hepatocitos, necrosis focal, infiltración de linfocitos y vacuolización de hepatocitos.	Wu y Zhou, 2013
<i>O. mykiss</i>	3, 300-1000 mg/L 8 semanas	<i>Branquias</i> : aneurisma, hiperplasia en epitelio, adhesión lamelar. <i>Riñón</i> : disminución del tamaño de glomérulos, vacuolación en citoplasma celular y degeneración hialina.	Monfared <i>et al.</i> , 2015
<i>Pimephales promelas</i>	50 µg/L 20 nm	<i>Branquias</i> : desprendimiento epitelial, deformación de lamelas, hiperplasia epitelial, degeneración de células globet	Hawkins <i>et al.</i> , 2014
Pez dorado <i>Carassius auratus</i>	5 ppm 5 nm 14 días	<i>Branquias</i> : hiperplasia, edema y desprendimiento epitelial y fusión lamelar. <i>Hígado</i> : hemosiderosis, hemorragia, degeneración hídrica y núcleos picnóticos en hepatocitos.	Abarghoe <i>i et al.</i> , 2016

<i>Danio rario</i>	0.0015, 0.00375, 0.0075, y 0.015 mg/l 17 nm 4 días	El daño en branquias aumenta conforme la concentración de AgNPs. <i>Branquias</i> : vacuolización, puntas dilatadas y golpeadas, aneurisma, hiperplasia, edema, fusión, hinchamiento de mucositos, hipertrofia y necrosis. <i>SEM</i> : alargamiento de los filamentos del epitelio, lamelas secundarias delgadas.	Mansouri y Johari, 2016
<i>Labeo rohita</i>	5, 10, 25, 50 y 100 mg kg-1 50-100 nm 7 días	<i>Branquias</i> : proliferación de células de cloro formando fusión lamelar y aneurisma. Vasos sanguíneos con aneurisma, hemorragia. <i>Hígado</i> : congestión de liposomas que conllevan a degeneración vacuolar. Necrosis en niveles altos. <i>Músculo</i> : acomodo inusual de fibras musculares, vacuolización e inflamación en fibras musculares.	Rajkumar <i>et al.</i> , 2016
Esturión <i>Acipenser baerii</i>	0.1, 0.5, 1.5 mg/L 4-13 nm 21 días	<i>Piel</i> : efecto dosis dependiente. En la epidermis células con forma irregular y núcleos cariopicnóticos. Espacios intercelulares en la dermis, núcleos con cromatina irregular. Hiperplasia e hipertrofia de células de moco y globet. <i>Branquias</i> : fusión lamelar, reducción en el tamaño de lamelas primarias y secundarias, hipertrofia de epitelio, degeneración hialina, telangiectasis, necrosis epitelial. <i>Hígado</i> : cariopicnosis, degeneración hialina, dilatación del espacio sinusidal, agregación de células sanguíneas en vasos sanguíneos, vacuolización y encogimiento de hepatocitos.	Ostaszewska <i>et al.</i> , 2016
Pez gato <i>Mystus gulio</i>	0.4 mg/L 40-60 nm 15 días	<i>Branquias</i> : necrosis en el arco branquial, fusión de lamelas primarias y secundarias, hiperplasia y aneurisma. <i>Hígado</i> : cubierto de una membrana serosa, y tejido conectivo extendido en el parénquima, gránulos de glicógeno, necrosis de hepatocitos, vacuolización. <i>Músculo</i> : desintegración de miofibrillas, núcleos picnóticos.	Abirami <i>et al.</i> , 2017
<i>Labeo rohita</i>	10, 20, 30, 45, y 55 mg/L 16 nm 28 días	<i>Branquias</i> : Proliferación de células de cloro, fusión de lamelas secundarias, separación del epitelio, deformación de células lamelares, necrosis, acumulación de cuerpos apoptóticos, acumulación de macrófagos, aneurisma. <i>Hígado</i> : degeneración del tejido, necrosis, reducción de tamaño de las células y núcleo, condensación nuclear, cuerpos picnóticos, necróticos y apoptóticos, esto indica que las AgNPs entraron a través de la sangre y llegaron al hígado dado la severidad del daño.	Khan <i>et al.</i> , 2017
Sábalo <i>Prochilodus lineatus</i>	2.5 µg/L 25 µg/L 30 nm 15 días	<i>Branquias</i> : Hemorragia, aneurisma, hipertrofia y fusión lamelar, aumento en las células de mucus.	Ale <i>et al.</i> , 2018

<i>Cyprinus carpio</i>	0.4 mg/L 20 nm 21 días	<i>Branquias</i> : Desprendimiento de epitelio, telangiectasis y necrosis. <i>Hígado</i> : carriorex, degeneración nuclear, vacuolización en citoplasma e hipertrofia de hepatocitos. <i>Intestino</i> : vacuolas y vellosidades hinchadas.	Khosravik atuli <i>et al.</i> , 2018
	0.8 mg/L	<i>Branquias</i> : Aneurisma, acortamiento y destrucción de lamelas secundarias. <i>Hígado</i> : Degeneración turbia en hepatocitos, necrosis focal, degeneración nuclear y estrechamiento de sinusoides. <i>Intestino</i> : erosión de la mucosa e infiltración de células inflamatorias.	
<i>Danio rario</i>	10 µg Ag/L 21 días	<i>Branquias</i> : prevalencia del 90% de inflamación en lamelas secundarias, 20% hiperplasia.	Lacave <i>et al.</i> , 2018
<i>Carpa Labeo rohita</i>	2.5 µg/L 5 µg/L 50 nm 35 días	<i>Branquias</i> : degeneración lamelar, aneurisma, necrosis, ruptura del epitelio, fusión lamelar, tejido cartilaginoso anormal. <i>Hígado</i> : necrosis, formación de vacuolas, núcleos picnóticos, centros melanomacrófagos e hiperimía. <i>Riñón</i> : núcleos picnóticos, vacuolización, incremento del espacio intracelular, contracción de glomérulos, degeneración de células epiteliales y necrosis severa.	Shobana <i>et al.</i> , 2018
<i>Labeo rohita</i>	40±6 nm 25 mg/L 21 días	<i>Riñón</i> : descamación del epitelio en túbulos renales, glomérulos encogidos. <i>Hígado</i> : vasos sanguíneos condensados	Kanwal <i>et al.</i> , 2019
<i>Danio rario</i>	100 mg/L 20 nm 80 nm 2 semanas	Biomarcadores de estrés oxidativo, señalización neural y homeostasis celular de iones en intestino sólo con las AgNPs de menor tamaño	Bao <i>et al.</i> , 2020
<i>Persian sturgeon</i>	0.2 mg/L 16.6 nm 14 días	Daños en los pliegues y vellos del intestino, infiltración celular de la lámina propia. <i>Branquias</i> : hiperplasia, inflamación y necrosis. <i>Hígado</i> : agregación de células sanguíneas, degeneración en núcleos y necrosis	Banan <i>et al.</i> , 2020
<i>Labeo rohita</i>	10, 20 y 30 mg 3 días	<i>Branquias</i> : fusión lamelar, aneurisma, ruptura de tejido causando hemorragia. <i>Hígado</i> : degeneración vacuolar, necrosis. <i>Músculo</i> : inflamación de fibras musculares	Jeyasree <i>et al.</i> , 2020
<i>Danio rario</i>	10.09 µg/L 77 nm 96 h	Acumulación de plata en epitelio branquial, en piel: epidermis y epitelio. Cerebro e hígado.	Khoshna mvand <i>et al.</i> , 2020
<i>Clarias garepinus</i>	10 µg/L 20 nm 15 días	<i>Hígado</i> : daño severo, deformación de hepatocitos, células inflamatorias en los vasos sanguíneos y en la vena central agrupación de centros melanocróforos. Núcleos picnóticos y apoptosis	Naguib <i>et al.</i> , 2020
<i>Clarias garepinus</i>	10-100 µg/ 20-40 nm 15 días	<i>Branquias</i> : hiperplasia de células epiteliales, edema, desprendimiento de epitelio, encorvamiento de	Sayed <i>et al.</i> , 2020

		lamelas secundarias, necrosis de células epiteliales, incremento de células de moco. Músculo: degeneración muscular, necrosis, células inflamatorias, rompimiento de miofibrillas, adelgazamiento de fibras musculares.	
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	8.9 mg/L 10-40 nm 96h	Branquias: aneurisma, fusión e hiperplasia lamelar, encorvamiento de lamelas secundarias, hiperplasia lamelar y desprendimiento de epitelio. Hígado: hepatocitos necróticos (1 día)	Shabrang harehdash t <i>et al.</i> , 2020
<i>Cyprinus carpio</i>		Daño en branquias: hiperplasia e hipertrofia de células epiteliales y desprendimiento del epitelio. Riñón: necrosis y alteraciones en tejido hemapoyético.	Thangam y Kowsalya, 2020
<i>Cyprinus carpio</i>	11 nm 96h	Daño en branquias; telangiectasis, descamación, hiperplasia del epitelio,	Xiang <i>et al.</i> , 2020
Tilapia <i>Oreochromis spp.</i>	25, 50 y 75 mg/L 60-80 nm 8 días	<i>Branquias</i> : congestión moderada en vasos sanguíneos de lamelas primarias, fusión de lamelas primarias e hiperplasia marcada en arco branquial, necrosis epitelial, desprendimiento epitelial, edema, fusión lamelar, encorvamiento de lamelas secundarias <i>Hígado</i> : hinchazón turbia de hepatocitos, degeneración vacuolar, cariolisis, carriorexis, dilatación de sinusoides e hipertrofia nuclear. <i>Piel y músculo</i> no mostraron daños a 50 mg/L, sin embargo a 25 mg/L se observó distrofia del tejido muscular, engrosamiento y separación de fibras musculares, edema intramuscular.	Govindas amy y Rahuman, 2012
	1, 10 y 100 ppm 10-20 nm 1-4 días	<i>Branquias</i> : desintegración de epitelio branquial, infiltración de células eosinófilos en lamelas, acortamiento y fusión lamelar. <i>Hígado</i> : Pérdida de almacenamiento de grasa <i>Riñón</i> : degeneración hialina y de túbulos. <i>Bazo</i> : Incremento de centros melanomacrófagos <i>Las alteraciones fueron evidentes desde el primer día de exposición, a mayor concentración de AgNPs el daño fue más evidente.</i>	Srinonate <i>et al.</i> , 2015
	0.4 mg/L 0.8 mg/L 13-19 nm 21 días	Pocas variaciones entre el control y peces tratados. <i>Intestino</i> : Adelgazamiento del epitelio intestinal, engrosamiento de células de mucus, bloqueo parcial del lumen.	Sarkar <i>et al.</i> , 2015
	100 nm PVP 100 mg/kg 4 semanas	Alargamiento de hepatocitos, congestión sanguínea en la zona sinoidal y vena central, degeneración de grasa, infiltración de células Kupffer y necrosis. Adelgazamiento de la capa de la capsula en el bazo.	Thummab ancha <i>et al.</i> , 2016

Como se observa en los resultados de los trabajos del cuadro 11, las AgNPs tuvieron un efecto patológico en todas las especies de peces evaluadas, las patologías asociadas a las AgNPs variaron moderadamente de acuerdo al tiempo de exposición y tipo de nanopartículas desde 4 a 100 nm de diámetro, con recubrimiento o sin recubrimiento, sin embargo en todos los casos se presentó alguna alteración. Wang *et al.*, (2015) concluyen que las AgNPs tienen la capacidad para penetrar barreras y tejidos de resistencia para incidir en las células y moléculas de los organismos ocasionando patologías agudas o subletales en los órganos de los peces. Las branquias, hígado, riñones y piel son considerados como órganos blancos o diana para la evaluación del efecto de tóxicos en el ambiente.

Las branquias son un órgano diana para la toxicidad en ambientes acuáticos, por su continuo contacto con el agua y por lo tanto con los contaminantes suspendidos en ella, son la ruta principal de entrada de los contaminantes en general y de las nanopartículas suspendidas en el agua (Lead *et al.*, 2018). La principal función de las branquias es la respiración por medio del intercambio gaseoso, la oxigenación de la sangre y es la vía de entrada de compuestos en el torrente sanguíneo. Por esta razón es uno de los órganos más estudiados.

Las AgNPs causan en las branquias patologías como: incremento en células de moco, fusión lamelar, degeneración hialina, hiperplasia de epitelio, telangiectasis, hemorragia, aneurisma, desprendimiento del epitelio, acortamiento de lamelas y necrosis (Figura 31). Los grados de severidad incrementan con el tiempo de exposición, en los estudios donde se expusieron los peces a 48 y 96 h tuvieron alteraciones principalmente en el incremento de las células de moco e hiperplasia lamelar (Lee *et al.*, 2012), la generación de mucus es un mecanismo de defensa, actuando como una barrera atrapando a los agentes tóxicos. Las AgNPs pueden quedar atrapadas en el mucus y disminuir su absorción por las branquias (Ale *et al.*, 2018). Por lo tanto si los peces son expuestos a concentraciones subletales (2.5—25 µg/L) de AgNPs en el agua por periodos cortos, es probable que sufran alteraciones reversibles como la acumulación de mucus y no llegar a dañar permanentemente los tejidos branquiales, así como sus funciones fisiológicas.

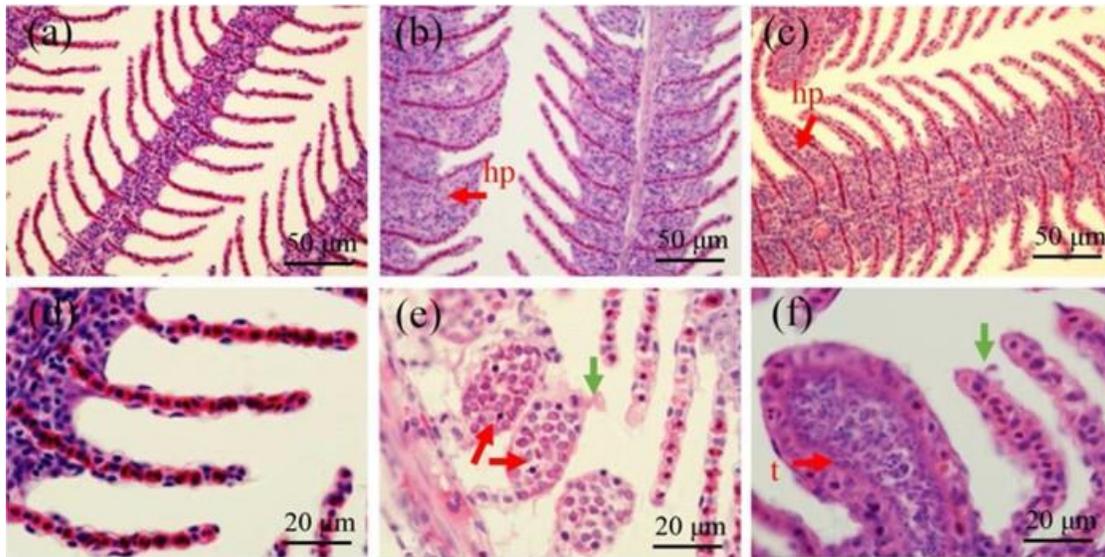


Figura 31. Imágenes histopatológicas de branquias de peces con alteraciones por nanopartículas de plata. Branquias normales (a y d), branquias expuestas a AgNPs (b, c, e y f). telangiectasis (t), hiperplasia epitelial (hp), flechas verdes (descamación epitelial) y flechas rojas (telangiectasis en lamelas secundarias). Tomado de Xiang *et al.*, 2020

La inflamación y fusión lamelar se ha relacionado con la protección de las branquias contra los contaminantes, la hiperplasia en las branquias puede ser un mecanismo de defensa para reducir la superficie respiratoria (Cengiz y Unlu, 2006) lo cual puede provocar problemas en la disminución del intercambio gaseoso y oxigenación de la sangre que puede provocar estrés oxidativo así como acelerar la absorción tóxicos en el cuerpo (Hao *et al.*, 2009). La hiperplasia y fusión lamelar puede ser inducida por diversos irritantes en las branquias, sin embargo puntos focales de hipertrofia celular y necrosis seguido de ruptura epitelial son producto del efecto de metales pesados en las branquias (Mazon *et al.*, 2002). El desprendimiento del epitelio también se puede considerar como una respuesta inmune para bloquear la entrada de los tóxicos, separando a las AgNPs del sistema circulatorio (Farmen *et al.*, 2012). Este desprendimiento epitelial puede ser resultado de la presencia de edema, el cuál es común observar en las branquias de los peces expuestos a nanometales (Pane *et al.*, 2004). Las branquias de los peces son órganos vitales para la respiración y osmoregulación, las respuestas patológicas que ocasionan las AgNPs en las branquias como la fusión lamelar y formación de aneurismas pueden incrementar el riesgo de la ruptura de los tejidos branquiales que pueden causar hemorragias severas provocando otras complicaciones que lleven a la muerte a los peces.

El hígado es un órgano vital involucrado en los mecanismos del metabolismo y detoxificación (Khosravikatuli *et al.*, 2018). La histopatología del hígado de los peces puede ser considerado como un indicador de toxicidad, evaluando los efectos de la exposición de los peces a las toxinas presentes en el medio acuático, como pueden ser las nanopartículas (Fernandes *et al.*, 2008). Algunas de las alteraciones histopatológicas en el hígado de los peces ocasionados por las AgNPs son hipertrofia de hepatocitos, degeneración nuclear (carriorexix, picnosis, apoptosis), centros melanomacrófagos, inflamación, vacuolización, hemosiderosis, congestión en vasos sanguíneos, estrechamiento de sinusoides, necrosis y atrofia de hepatocitos (Figura 32). Los centros melanomacrófagos pueden presentarse en el hígado por diversos factores naturales como el envejecimiento, la inanición e enfermedades infecciosas, sin embargo varios autores sugieren que la aparición de los melanomacrófagos también puede ser causado por el estrés generado por tóxicos en el ambiente acuático. Los centros melanomacrófagos son los responsables de destruir, detoxificar o reciclar materiales endógenos y exógenos (Agius y Roberts 2003). Las vacuolas en los hepatocitos pueden producirse por una acumulación anormal de triglicéridos y otros lípidos e ir acompañado de lesiones patológicas como la necrosis, así mismo la presencia de alteraciones en los núcleos de las células (picnósis, carriorexix) también pueden ser indicadores tempranos de necrosis (Hao *et al.*, 2009).

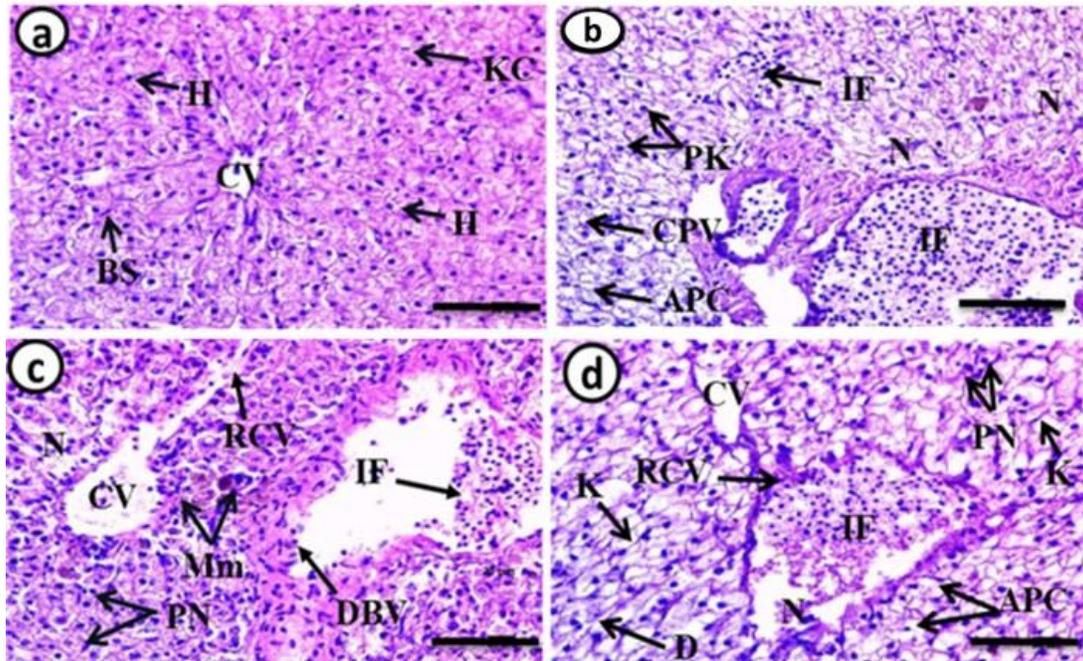


Figura 32. Imágenes histológicas de alteraciones en hígado de peces expuestos a AgNPs. Hígado normal sin AgNPs (a), hígado con AgNPs (b, c y d). BS: sinusoides, CV: vena central, H: hepatocitos, KC: células Kupffer, IF: células inflamatorias, Mm: melanomacrófagos, DBV: vaso sanguíneo dilatado, N: necrosis, RCV: ruptura de vena central, PK: núcleos picnóticos, APC: células apoptóticas, D: hepatocitos degenerados, CPV: vacuolización citoplasmática. (Tomado de Naguib *et al.*, 2020)

Algunas de las patologías en el hígado como la hemosiderosis, vacuolización e hipertrofia de hepatocitos pueden ser reversibles sin llegar a tener un daño permanente que condicionen la homeostasis y funcionamiento del órgano, sin embargo cuando se observa daño al núcleo de las células (picnosis, cariorexis, necrosis) éste es irreversible y si es muy severo se puede perder todo el órgano, lo que puede conllevar a la muerte de los peces, Sin el correcto funcionamiento del hígado los peces no logran metabolizar compuestos ni almacenar sustancias como grasas y carbohidratos para la producción de energía.

El intestino también se considera un órgano diana de las afectaciones de las AgNPs presentes en el agua. Los tóxicos suspendidos en la columna del agua pueden ser absorbidos por los peces en la ingesta de alimento, cuando beben agua o a través del flujo sanguíneo, lo cual tiene un efecto directo en la acumulación de nanometales en la estructura del tejido del sistema digestivo (Lacave *et al.*, 2018). Son pocos los estudios donde evalúan el daño de las AgNPs en el intestino de los

peces. Johari *et al.*, (2014) proponen que la presencia de AgNPs en el intestino puede deberse a la ingesta de agua de los peces como respuesta al estrés. En el trabajo realizado por Khosravikatuli *et al.*, (2018) las AgNPs ocasionaron vacuolas en el intestino, erosión de mucosa, presencia de células inflamatorias e hinchamiento de las microvellosidades (Figura 33). Además el intestino tiene funciones importantes en los procesos digestivos, contribuyen a la absorción y excreta de sustancias del alimento. En el caso donde las AgNPs se expusieron en tilapias por alimentación, también desarrollaron patologías como adelgazamiento del epitelio intestinal y aumento de células de mucus (Sarkar *et al.*, 2015). Al igual que en las branquias las alteraciones en las células mucosas es un mecanismo de respuesta para tratar de protegerse contra los agentes xenobióticos, la pérdida o adelgazamiento del epitelio intestinal puede disminuir la capacidad de absorción de nutrientes que puede causar desnutrición de los peces.

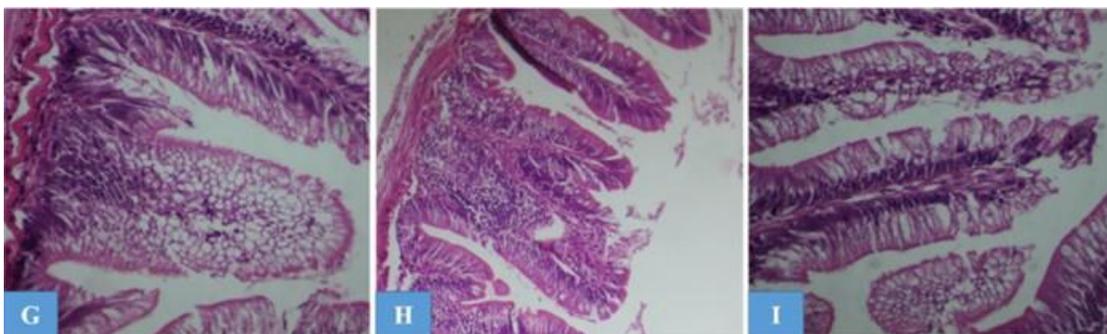


Figura 33. Alteraciones histopatológicas ocasionadas por AgNPs en intestino de carpa común (*Cyprinus carpio*). G: vellosidades inflamadas con vacuolización, H: erosión de mucosa e infiltración de células inflamatorias, I: destrucción de vellosidad.

La piel de los peces es un órgano importante que participa en la osmoregulación y respiración, también juega un papel importante como barrera protectora del organismo contra condiciones adversas del exterior (Ostaszewska *et al.*, 2016). Las AgNPs producen patologías en la piel como incremento en las células de moco, hiperplasia de células epidermales, hiperplasia e hipertrofia de células globet y de moco, deformidades en el núcleo de las células (Figura 34). La mucosa y células club localizadas en la epidermis de la piel, son las responsables de la excreción de desperdicios, respiración, osmoregulación, resistencia a las enfermedades, comunicación y otras funciones de protección. Un incremento en el número y tamaño de estas células puede producirse como

respuesta de los peces para contrarrestar los efectos de agentes exógenos como las nanopartículas, sin embargo, si la concentración y tiempo de exposición de las nanopartículas excede a la capacidad de resistencia de la piel y el sistema excretor, pueden tener efectos letales en las células (Shephard, 1994).

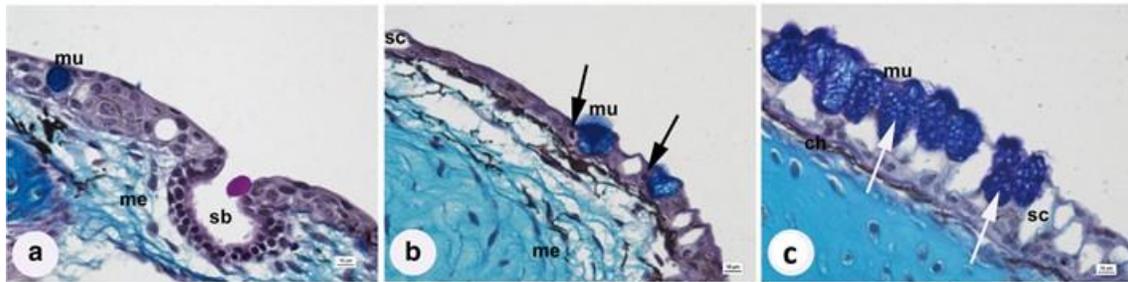


Figura 34. Histopatologías en epitelio de *Acipenser baerii* ocasionadas por AgNPs. Epitelio normal (a), epitelio con alteraciones (b y c). mu: células moco, sc: células cerosas, sb: bulbo sensorial, ch: cromatóforos, me: mesénquima. Flechas blancas indican mucosa con forma irregular, flechas negras indican núcleos picnóticos (Ostaszewska *et al.*, 2016).

Particularmente, los daños que ocasionan las AgNPs en tejidos de tilapias es similar a los presentados en otras especies de peces, mostrando alteraciones en piel, branquias, intestino, hígado y riñones principalmente, sin embargo en las investigaciones el tiempo de exposición a las AgNPs es prolongado, desde 1 a 21 días, así mismo las concentraciones son mayores a las concentraciones efectivas que determinamos *in vitro* para eliminar a los parásitos *Cichlidogyrus*, 36 $\mu\text{g/L}$ AgNPs UTSA y 48,000 $\mu\text{g/L}$ AgNPs ARGOVIT. Así mismo es importante el periodo de exposición, comúnmente en los peces se realizan baños cortos (1 hora) donde se sumergen a los peces en agua con los antihelmínticos. En el caso de las AgNPs UTSA se ha determinado que éstas no causan daños en juveniles del pez blanco *Chirostoma estor*, expuestos a dosis letales (10.6 ng/L) y altas dosis (31.8 y 95.4 ng/L) después de 96 h, los peces no presentan daños histológicos ni variaciones en el microbioma (Fuentes-Valencia *et al.*, 2020). Aunque la concentración de 36 $\mu\text{g/L}$ es mucho mayor a 95.4 ng/L , la exposición de las tilapias a las AgNPs serían por periodos de tiempo más cortos, máximo una hora, por lo que podemos considerar la posibilidad de que las AgNPs no causarán daños en los tejidos de peces o sus efectos serán mínimos.

7. CONCLUSIONES

La presente investigación es la primera en evaluar y determinar el efecto antihelmíntico de las AgNPs en parásitos de peces. Las AgNPs de menor tamaño y sin recubrimiento (UTSA) son más tóxicas que las nanopartículas de mayor tamaño y recubiertas (ARGOVIT), se requiere menor cantidad de AgNPs UTSA para matar a los huevos y parásitos adultos. La aplicación de AgNPs mediante baños de inmersión en peces parasitados puede ser una opción eficiente para eliminar la presencia de parásitos sin causar daños patológicos en los peces, los resultados obtenidos proponen el potencial uso de las AgNPs como antihelmíntico para erradicar parásitos en los sistemas de cultivo.

Las AgNPs provocaron alteraciones en la ultraestructura del tegumento de los parásitos *Cichlidogyrus spp.* mediante un efecto concentración-dependiente, concentraciones subletales (6 $\mu\text{g/L}$) indujeron una respuesta fisiológica de defensa mediante la formación de burbujas, concentraciones letales (36 y 60 $\mu\text{g/L}$) provocaron destrucción de las estructuras del tegumento.

Los datos transcriptómicos proporcionaron información sobre los procesos biológicos afectados por la exposición de las AgNPs en los parásitos monogeneos. La exposición a concentraciones bajas (6 $\mu\text{g/L}$) y altas (36 $\mu\text{g/L}$) de AgNPs activó genes involucrados en la detoxificación, neurotoxicidad, señalización celular, muerte celular, daño al ADN, reproducción y desarrollo embrionario. Ambas concentraciones de AgNPs inducen procesos biológicos similares en los parásitos *Cichlidogyrus* pero mediante diferentes mecanismos.

8. RECOMENDACIONES

Es necesario realizar ensayos in vivo para evaluar el efecto antihelmíntico de las AgNPs en peces infestados considerando la bioacumulación de las nanopartículas, bioseguridad e impacto al medio ambiente, así como análisis costo beneficio para evaluar la rentabilidad del uso de las nanopartículas de plata en la acuicultura.

9. REFERENCIAS

- Abarghoei S., Hedayati A., Ghorbani R., Miandareh H.K., Bagheri T. 2016. Histopathological effects of waterborne silver nanoparticles and silver salt on the gills and liver of goldfish *Carassius auratus*. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* doi: 10.1007/s13762-016-0972-9
- Abbaszadegan A., Ghahramani Y., Gholami A., Hemmateenejad B., Dorostkar S., Nabavizadeh M. 2015. The effect of charge at the surface of silver nanoparticles on antimicrobial activity against gram-positive and gram-negative bacteria: a preliminary study. *J. Nanomater.* 720654. doi:10.1155/2015/720654
- Abirami T., Alen J.R., Bavani G., Karthikeyan J. 2017. Ecotoxicology of green synthesized silver nanoparticles on fresh water fish *mystus julio*. *Int. J. Pharm. Sci.* (9) 192-198.
- Acedo-Valdez J.M., Grijalva-Chon E., Larios-Rodríguez A.D., Maldonado-Arce F., Mendoza-Cano C. 2017. Antibacterial effect of biosynthesized silver nanoparticles in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) infected with necrotizing hepatopancreatitis bacterium (NHP-B) *Lat. Am. J. Aquat. Res.* 45: 421-430. doi: 10.3856/vol45-issue2-fulltext-17
- Aderibigbe B.A. 2017. Metal-based nanoparticles for the treatment of infectious diseases. *Molecules* 22(1370):1-37
- Agos S.M., Shaharom-Harison F., Zakariah M.I., Hassan M. 2016. Morphological Study of *Cichlidogyrus mbirizei* (Ancyrocephalidae) Monogenean Gill Parasite on Red Tilapia (*Oreochromis sp.*) from Como River Kenyir Lake, Terengganu Malaysia. *J. Fish Aquatic. Sci.* 11: 432-436.
- Agius C., Roberts R.J. 2003. Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. *J. Fish Dis.* 26(9):499-509. doi: 10.1046/j.1365-2761.2003.00485.x.
- Ahn J.M., Eom H.J., Yang X., Meyer J. N., Choi J. 2014. Comparative toxicity of silver nanoparticles on oxidative stress and DNA damage in the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Chemosphere*, 108, 343-352. doi:10.1016/j.chemosphere.2014.01.078
- Akoll P., Konecny R., Mwanja W.W., Schiemer F. 2012. Risk assessment of parasitic helminths on cultured Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*, L.) *Aquaculture*, 356-357:123-127.
- Akter M., Sikder M.T., Rahman M.M., et al. 2018. A systematic review on silver nanoparticles-induced cytotoxicity: Physicochemical properties and perspectives. *J. Adv. Res.* 9:1-16. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2017.10.008>
- Ale A., Bacchetta C., Rossi A.S., Galdopórrpora J., Desimone M.F., De la Torre F., Gervasio S., Cazenave J. 2018. Nanosilver toxicity in gills of a neotropical fish: Metal accumulation, oxidative stress, histopathology and other physiological effects. *Ecotox. Environ. Safe.* (148), 976-984
- Armenti S.T., Nance J. 2012. Adherents junctions in *C. elegans* embryonic morphogenesis. *Adherens Junctions: From Molecular Mechanisms to Tissue Development and Disease*, 279-299. https://doi.org/10.1007/978-94-007-4186-7_12
- Armstrong N., Ramamoorthy M., Lyon D., Jones K., Duttaroy A. 2013. Mechanism of silver

- nanoparticles action on insect pigmentation reveals intervention of copper homeostasis. *PLoS One*, 8(1):e53186. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053186>
- Aronoff R., Baran R., Hodgkin J. 2001. Molecular identification of smg-4, required for mRNA surveillance in *C. elegans*. *Gene*, 268(1-2):153–164. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(01\)00414-0](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(01)00414-0)
- Austad S.N. 1997. Post reproductive survival. In *Between Zeus and the Salmon: The Biodemography of Longevity* (eds. K. W. Wachter and C. E. Finch), pp. 161–174. National Academy Press, Washington DC.
- Ávalos A., Haza A.I., Drosopoulou E., Mavragani-Tsipidou P., Morales P. 2015. In vivo genotoxicity assessment of silver nanoparticles of different sizes by the Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) on *Drosophila*. *Food Chem. Toxicol.* 85:114–119
- AVMA (2013) Guidelines for the euthanasia of animal: 2013 edition. American Veterinary Association, 102
- Ayala-Núñez N.V. 2010. Nanopartículas de plata como microbicidas: Actividad y Mecanismos de acción contra la infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y diferentes bacterias resistentes a antibióticos. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas.
- Bao S., Tang W., Fang T. 2020. Sex-dependent and organ-specific toxicity of silver nanoparticles in livers and intestines of adult zebrafish. *Chemosphere*, 249:126172. doi: 10.1016/j.chemosphere.2020.126172
- Bakand S., Hayes A. 2016. Toxicological considerations, toxicity assessment, and risk management of inhaled nanoparticles. *Int. J. Mol. Sci.* 17, 929.
- Banan A., Kalbassi M.R., Bahmani M., Sotoudeh E., Johari S.A., Ali J.M., Kolok A.S. 2020. Salinity modulates biochemical and histopathological changes caused by silver nanoparticles in juvenile Persian sturgeon (*Acipenser persicus*). *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 27(10):10658-10671. doi: 10.1007/s11356-020-07687-7
- Barbosa A.C.M.S., Silva L.P.C., Ferraz C.M., 2019. Nematicidal activity of silver nanoparticles from the fungus *Duddingtonia flagrans*. *Int. J. Nanomedicine.* 14:2341-2348. DOI: 10.2147/ijn.s193679.
- Bhatia D., Mittal A., Malik D.K. 2016. Antimicrobial activity of PVP coated silver nanoparticles synthesized by *Lysinibacillus varians* 3. *Biotech.* 6: 196.
- Baugh L.R., Hill A.A., Claggett J.M., Hill-Harfe K., Wen J.C., Slonim D.K., Brown E.L., Hunter C.P. 2005. The homeodomain protein PAL-1 specifies a lineage-specific regulatory network in the *C. elegans* embryo. *Development*, 132(8), 1843–1854. <https://doi.org/10.1242/dev.01782>
- Beitel G.J., Lambie E.J., Horvitz H.R. 2000. The *C. elegans* gene lin-9, which acts in an Rb-related pathway, is required for gonadal sheath cell development and encodes a novel protein. *Gene*, 254(1-2):253–263. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(00\)00296-1](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(00)00296-1)
- Benakashani F., Allafchian A., Jalali S. 2016. Biosynthesis of silver nanoparticles using *Capparis spinosa* L. leaf extract and their antibacterial activity. *KIJOMS.* 2: 251-8. doi:10.1016/j.kijoms.2016.08.004
- Benard C.Y., Blanchette C., Recio J., Hobert O. 2012. The Secreted Immunoglobulin Domain

Proteins ZIG-5 and ZIG-8 Cooperate with L1CAM/SAX-7 to Maintain Nervous System Integrity. *Plos Genetics*, 8:7. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002819>

- Benelli G. 2018. Mode of action of nanoparticles against insects. *Environ Sci. Pollut. Res. Int.* 25(13):12329–12341. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1850-4>
- Bharani R.A., Namasivayam S.K.R. 2017. Biogenic silver nanoparticles mediated stress on developmental period and gut physiology of major lepidopteran pest *Spodoptera litura* (Fab.)(Lepidoptera: Noctuidae)—An eco-friendly approach of insect pest control. *J. Environ. Chem. Eng.* 5(1): 453-467
- Blum E.S., Abraham M.C., Yoshimura S., Lu Y., Shaham S. 2012. Control of nonapoptotic developmental cell death in *Caenorhabditis elegans* by a polyglutamine-repeat protein. *Science*, 335, 970–973. <https://doi.org/10.1126/science.1215156>
- Borsello T., Mottier V., Castagné V., Clarke P.G. 2002. Ultrastructure of retinal ganglion cell death after axotomy in chick embryos. *J. Comp. Neurol.* 453(4):361–371. <https://doi.org/10.1002/cne.10411>
- Borst P., De Wolf C., Van de Wetering K. 2007. Multidrug resistance-associated proteins 3, 4, and 5. *Eur. J. Appl. Physiol.* 453(5):661–673. <https://doi.org/10.1007/s00424-006-0054-9>
- Boyd W.A., Cole R.D., Anderson G.L., Williams P.L. 2009. The effects of metals and food availability on the behavior of *Caenorhabditis elegans*. *Environ. Toxicol. Chem.* 22:12. <https://doi.org/10.1897/02-565>
- Browning H., Strome S. 1996. A sperm-supplied factor required for embryogenesis in *C. elegans*. *Development.* 122(1):391-404.
- Brozová E., Simecková K., Kostrouch Z., Rall J.E., Kostrouchová M. 2006. NHR-40, a *Caenorhabditis elegans* supplementary nuclear receptor, regulates embryonic and early larval development. *Mech. Dev.* 123(9):689-701. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2006.06.006>
- Burbea M., Dreier L., Dittman J.S., Grunwald M.E., Kaplan J.M. 2002. Ubiquitin and AP180 Regulate the Abundance of GLR-1 Glutamate Receptors at Postsynaptic Elements in *C. elegans*. *Neuron.* 35, 107–120. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)00749-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)00749-3)
- Buszewski B., Railean-Plugaru V., Pomastowski P. 2018. Antimicrobial activity of biosilver nanoparticles produced by a novel *Streptacidiphilus durhamensis* strain. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 51(1): 45-54.
- Cable J., Scott E.C., Tinsley R.C., Harris P.D. 2003. Behavior favoring transmission in the viviparous monogenean *Gyrodactylus turnbulli*. *J. Parasitol.* (1): 183-184
- Caña-Bozada V., Morales-serna F.N., García-Gasca A., Llera-herrera R., Fájér-Ávila E.J. 2019. Genome-wide identification of ABC transporters in monogeneans. *Mol. Biochem. Parasitol.* 234. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2019.111234Hu>
- Cassata G., Rohrig S., Kuhn F., Hauri H.P., Baumeister R., Burglin T.R. 2000. The *Caenorhabditis elegans* Ldb/NLI/Clim orthologue ldb-1 is required for neuronal function. *Develop. Biol.* 226, 45–56. <https://doi.org/10.1006/dbio.2000.9846>
- Cengiz E.I., Unlu E. 2006. Sublethal effects of commercial deltamethrin on the structure of the gill, liver and gut tissues of mosquitofish, *Gambusia affinis*: amicroscopic study. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 21, 246–253.

- Cheng Y., Chen X., Song W., Kong Z., Li P., Liu Y. 2013. Contribution of silver ions to the inhibition of infectivity of *Schistosoma japonicum* cercariae caused by silver nanoparticles. *Parasitol.* 140:617–625
- Chew Y.L., Fan X., Götz J., Nicholas H.R. 2013. PTL-1 regulates neuronal integrity and lifespan in *C. elegans*. *J. Cell. Sci.* 126(9):2079–2091. <https://doi.org/10.1242/jcs.jcs124404>
- Cho Y.M., Mizuta Y., Akagi J.I., Toyoda T., Sone M., Ogawa K. 2018. Size-dependent acute toxicity of silver nanoparticles in mice. *J. Toxicol. Pathol.* 31, 73–80.
- Christensen S., Kodoyianni V., Bosenberg M., Friedman L., Kimble J. 1996. lag-1, a gene required for lin-12 and glp-1 signaling in *Caenorhabditis elegans*, is homologous to human CBF1 and *Drosophila* Su(H). *Development.* 122(5):1373–1383.
- Cronin D., Moenne-Loccoz Y., Dunne C., Gara F.O. 1997. Inhibition of egg hatch of the potato cyst nematode *Globoderarosto chiensis* by chitinase-producing bacteria. *Eur. J. Plant Pathol.* 103:433-440
- Dakal T.C., Kumar A., Majumdar R.S., Yadav V. 2016. Mechanistic basis of antimicrobial actions of silver nanoparticles. *Front. Microbiol.* 7:1831. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01831>
- Dalpe G., Zheng H., Brown L., Culotti J. 2012. Semaphorin-1 and netrin signal in parallel and permissively to position the male ray 1 sensillum in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics.* 192(3):959–971. <https://doi.org/10.1534/genetics.112.144253>
- Dalton J.P., Skelly P., Halton D.W. 2004. Role of the tegument and gut in nutrient uptake by parasitic platyhelminths. *Can. J. Zool.* 82:211–232. <https://doi.org/10.1139/Z03-213>
- Davies K.G., Curtis R.H.C. 2011. Cuticle surface coat of plant-parasitic nematodes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 49:135–156
- De la Torre-Escudero E., Bennett A.P.S., Clarke A., Brennan G.P., Robinson M.W. 2016. Extracellular vesicle biogenesis in helminths: more than one route to the surface? *Trends Parasitol.* 32:921–929. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.09.001>
- Degletagne C., Keime C., Rey B., Dinechin M., Forcheron F., Chuchana P., Jouventin P., Gautier C., Duchamp C. 2010. Transcriptome analysis in non-model species: a new method for the analysis of heterologous hybridization on microarrays. *BMC Genomics*, 11:344. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-344>
- Diehl N., Schaal H. 2013. Make yourself at home: viral hijacking of the PI3K/Akt signaling pathway. *Viruses.* 5(12):3192–3212 (2013). <https://doi.org/10.3390/v5123192>
- Drago F.B., Núñez V. 2017. Macroparásitos: Diversidad y biología. Clase Monogenea. Universidad Nacional de la Plata. Buenos Aires, Argentina. Pp 68-82. <https://www.researchgate.net/publication/320551800>
- Duerr J.S., Han H.P., Fields .S.D., Rand J.B. 2008. Identification of major classes of cholinergic neurons in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J. Comp. Neurol.* 506:398–408
- El-Naggar M.M., Khidr A.A., Kearn G. C. 1991. Ultrastructural Observations on the Tegument and Associated Structures of the Monogenean *Cichlidogyrus halli typicus* (Price y Kirk, 1967) Paperna, 1979. *Int. J. Parasitol.* Vol. 21, No, 6, pp, 707-713, 1991
- El-Naggar M.M., Arafa S.Z., El-Abbassy S.A., Kearn G.C. 2001. Chaetotaxy of the monogeneans *Macrogyrodactylus clarii* and *m. congolensis* from the gills and skin of the catfish *Clarias*

- gariepinus* in Egypt, with a note on argentophilic elements in the nervous system. *Folia Parasitol (Praha)*, 48(3):201–208. <https://doi.org/10.14411/fp.2001.033>
- Essig Y.J., Webb S.M., Stürzenbaum S.R. 2016. Deletion of phytochelatin synthase modulates the metal accumulation pattern of cadmium exposed *C. elegans*. *Int. J. Mol. Sci.* 17, 257. <https://doi.org/10.3390/ijms17020257>
- Fájer-Ávila E.J., Velásquez-Medina S.P., Betancourt-Lozano M. 2007. Effectiveness of treatments against eggs, and adults of *Haliotrema sp.* and *Euryhaliotrema sp.* (Monogenea: Ancyrocephalinae) infecting red snapper, *Lutjanus guttatus*. *Aquaculture*. 264:66–72
- Farmen E., Mikkelsen H., Evensen Ø., Einset J., Heier L., Rosseland B., Salbu B., Tollefsen K., Oughton D. 2012. Acute and sub-lethal effects in juvenile Atlantic salmon exposed to low µg/L concentrations of Ag nanoparticles. *Aquat. Toxicol.* 108:78–84
- Feng Q.L., Wu J., Chen G.Q., Cui F.Z., Kim T.N., Kim J. O. 2000. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J. Biomed. Mater. Res.* 52,662–668. doi:10.1002/1097-4636(20001215)52:4<662::AID-JBM10>3.0.CO;2-3
- Ferdous Z., Nemmar A. 2020. Health Impact of Silver Nanoparticles: A Review of the Biodistribution and Toxicity Following Various Routes of Exposure. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 2375, 2-31. doi:10.3390/ijms21072375
- Fernandes C., Fonta´inhas-Fernandes A., Rocha E., Salgado M. A. 2008. Monitoring pollution in Esmoriz–Paramos lagoon, Portugal: liver histological and biochemical effects in *Liza saliens*. *Environ Monit Asses.* 145(1- 3): 315–322.
- Flores J., Flores R. 2003. Monogeneos parásitos de peces en México: estudio recapitulativo. *Téc Pecú Méx.* 41 (2): 175-192
- Franci G., Falanga A., Galdiero S., Palomba L., Rai M., Morelli G., Galdiero M. 2015. Silver nanoparticles as potential antibacterial agents. *Molecules.* 20:8856–8874
- Francis-Floyd R.; Klinger R.E., Pett D., Poudel D. 2019. Monogenean parasites of fish. Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, FA–28
- Frasca, S., Wolf J.C., Kinsel M.J., Camus A.C., Lombardini E.D. 2018. Osteichthyes. *Pathol. Wild Zoo Anim.* 953–1001. doi:10.1016/b978-0-12-805306-5.00039-0
- Fuentes-Valencia M.A., Fajer-Ávila E.J., Chávez-Sánchez M.C., Martínez-Palacios C.A., Martínez-Chávez C.C., Junqueira-Machado G., Bogdanchikova, N. 2020. Silver nanoparticles are lethal to the ciliate model *Tetrahymena* and safe to the pike silverside *Chirostoma estor*. *Exp. Parasitol.* 209, 107825. doi:10.1016/j.exppara.2019.107825
- Fujiwara M, Hino T, Miyamoto R, et al. 2015. The Importance of cGMP Signaling in Sensory Cilia for Body Size Regulation in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics.* 201(4):1497–1510. <https://doi.org/10.1534/genetics.115.177543>
- Galdiero S., Falanga A., Vitiello M., Cantisani M., Marra V., Galdiero M. 2011. Silver nanoparticles as potential antiviral agents. *Molecules.* 16(10):8894-8918. doi:10.3390/molecules16108894
- García-Vásquez A., Hansen K.W., Rubio-Godoy M., Bron J.E., Shinn A.P. 2010. Gyrodactylids (Gyrodactylidae, Monogenea) infecting *Oreochromis niloticus niloticus* (L.) and *O. mossambicus* (Peters) (Cichlidae): a pan-global survey. *Acta Parasitologica* 55:215–229.

- Gent J.I., Schvarzstein M., Villeneuve A.M., *et al.* 2009. A *Caenorhabditis elegans* RNA-directed RNA polymerase in sperm development and endogenous RNA interference. *Genetics*. 183(4):1297-1314. <https://doi.org/10.1534/genetics.109.109686>
- Gherbawy Y.A., Shalaby I.M., El-sadek M.S.A., Elhariry H.M., Banaja A.A. 2013. The anti fasciolasis properties of silver nanoparticles produced by *Trichoderma harzianum* and their improvement of the anti-fasciolasis drug triclabendazole. *Int. J. Mol. Sci.* 14:21887–21898 <https://doi.org/10.3390/ijms141121887>
- Ghosh S., Patil S., Ahire M., Kitture R., Kale S., Pardesi K., *et al.* 2012. Synthesis of silver nanoparticles using *Dioscorea bulbifera* tuber extract and evaluation of its synergistic potential in combination with antimicrobial agents. *Int. J. Nanomedicin.* 7:483-96. doi: 10.2147/IJN.S24793
- González-Moragas L., Yu S.M., Benseny-Cases N., Stürzenbaum S., Roig A., Laromaine A. 2017. Toxicogenomics of iron oxide nanoparticles in the nematode *C. elegans*. *Nanotoxicology*. 11, 1–11.
- Gorth D.J., Rand D.M., Webster T.J. 2011. Silver nanoparticle toxicity in *Drosophila*: size does matter. *Int. J. Nanomedicine* 6:343–350. <https://doi.org/10.2147/IJN.S16881>
- Govindarajan M., Benelli G. 2015. Facile biosynthesis of silver nanoparticles using *Barleria cristata*: mosquitocidal potential and biotoxicity on three non-target aquatic organism. *Parasitol. Res.* 115:925–935. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4817-0>
- Govindasamy R., Rahuman A.A. 2012. Histopathological studies and oxidative stress of synthesized silver nanoparticles in Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Int. J. Environ. Sci.* 24(6) 1091–1098.
- Griffitt R.J., Hyndman K., Denslow N.D., Barber D.S. 2009. Comparison of Molecular and Histological Changes in Zebrafish Gills Exposed to Metallic Nanoparticles. *Toxicol. Sci.* 107 (2), 404-415
- Gu M., Schuske K., Watanabe S., Liu Q., Baum P., Garriga G., Jorgensen E.M. 2008. 2 adaptin facilitates but is not essential for synaptic vesicle recycling in *Caenorhabditis elegans*. *J. Cell Biol.* 183 (5) 881–892. <https://doi.org/10.1083/jcb.200806088>
- Hao L., Wang Z., Xing B. 2009. Effect of sub-acute exposure to TiO₂ nanoparticles on oxidative stress and histopathological changes in juvenile carp (*Cyprinus carpio*). *J. Environ. Sci.* 21:1459-1466
- Harris T.W., Hartweg E., Horvitz H.R., Jorgensen E.M. 2000. Mutations in synaptojanin disrupt synaptic vesicle recycling. *J. Cell. Biol.* 150 (3)589–599. <https://doi.org/10.1083/jcb.150.3.589>
- Harrison M.M., Ceol C.J., Lu X., Horvitz H.R. 2006. Some *C. elegans* class B synthetic multivulva proteins encode a conserved LIN-35 Rb-containing complex distinct from a NuRD-like complex. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 103(45):16782–16787. <https://doi.org/10.1073/pnas.0608461103>
- Hawkins A.D., Bednar A.J., Cizdziel J.V., Bu K., Steevens J.A., Willett K.L. 2014. Identification of silver nanoparticles in *Pimephales promelas* gastrointestinal tract and gill tissues using flow field flow fractionation ICP-MS. *RSC Adv.* 4(78), 41277–41280. doi:10.1039/c4ra08630a

- Hodová I., Sonnek R., Gelnar M., Valigurová A. 2018. Architecture of *Paradiplozoon homoion*: a diplozoid monogenean exhibiting highly-developed equipment for ectoparasitism. *PLoS ONE* 13(2): e0192285. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192285>
- Hu Q., D'Amora D.R., MacNeil L.T., Walhout A.J.M., Kubiseski T.J. 2018. The *Caenorhabditis elegans* oxidative stress response requires the NHR-49 transcription factor. *Genes genomes genetics*, 8. <https://doi.org/10.1534/g3.118.200727>
- Hughes S.L., Bundy J.G., Want E.J., Kille P., Stürzenbaum S.R. 2009. The metabolomics responses of *Caenorhabditis elegans* to cadmium are largely independent of metallothionein status, but dominated by changes in cystathionine and phytochelatins. *J. Proteome. Res.* 8(7):3512–3519. <https://doi.org/10.1021/pr9001806>
- Hung W.L., Wang Y., Chitturi J., Zhen M. 2014. A *Caenorhabditis elegans* developmental decision requires insulin signaling-mediated neuron-intestine communication. *Develop.* 141(8):1767-1779. <https://doi.org/10.1242/dev.103846>
- Hutson K.S., Brazenor A.K., Vaughan D.B., Trujillo-González A. 2018. Monogenean Parasite Cultures: Current Techniques and Recent Advances. *Adv. Parasitol.* 99:61-91. doi: 10.1016/bs.apar.2018.01.002
- Ivask A., Kurvet I., Kasemets K., Blinova I., Aruoja V., Suppi S. 2014. Size dependent toxicity of silver nanoparticles to bacteria, yeast, algae, crustaceans and mammalian cells in vitro. *PLoS One* 9(7):e102108.<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102108>
- Jayaseelan C., Rahuman A.A., Rajakumar G., Santhoshkumar T., Kirthi A.V., Marimuthu S., *et al.* 2012. Efficacy of plant-mediated synthesized silver nanoparticles against hematophagous parasites. *Parasitol. Res.* 111(2):921-33. doi: 10.1007/s00436-011-2473-6
- Jeong Y., Lim D.W., Choi J. 2014. Assessment of size-dependent antimicrobial and cytotoxic properties of silver nanoparticles. *Adv. Mater. Sci. Eng.* 6.
- Jeyasree J., Bupesh G., Vasanth S., Beulah J., Pandian K., *et al.* 2020, In-vivo Toxicological (Acute) Characterization of Bio-synthesized Silver Nanoparticles in *Labeo rohita*. *Nano Biomed. Eng.* 12(2): 115-123. doi: 10.5101/nbe.v12i2.p115-123.
- Johnstone I.L. 1993. The cuticle of the nematode *Caenorhabditis elegans*: a complex collagen structure. *BioEssays* 16(3):171–178
- Joshua G.W.P. 2001. Functional analysis of leucine aminopeptidase in *Caenorhabditis elegans*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 113, 223–232. [https://doi.org/10.1016/s0166-6851\(01\)00221-3](https://doi.org/10.1016/s0166-6851(01)00221-3)
- Joyce P.I., Satija R., Chen M., Kuwabara P.E. 2012. The atypical calpains: evolutionary analyses and roles in *Caenorhabditis elegans* cellular degeneration. *PLoS Genet.* 8(3):e1002602. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002602>
- Ju J., Lieke T., Saul N., Pu Y., Yin L., Kochan C., Putschew A., Baberscke N., Steinberg E.W. 2014. Neurotoxic evaluation of two organobromine model compounds and natural AOB-containing surface water samples by a *Caenorhabditis elegans* test. *Ecotox. Environ. Safe.* 104, 194–201. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.03.009>
- Juárez-Moreno C.H., Mejía-Ruiz F., Díaz H., Reyna-Verdugo A., Denisse E.F., Vazquez-Felix N., Bogdanchikova. 2017. Effect of silver nanoparticles on the metabolic rate, hematological response, and survival of juvenile white shrimp *Litopenaeus vannamei* *Chemosphere*, 169:716-724. doi:10.1016/j.chemosphere.2016.11.054

- Jung W.K., Koo H.C., Kim K.W., Shin S., Kim S.H., Park Y. Kandasamy N.M., Alikunhi. 2013. Synthesis of silver nanoparticles by coastal plant *Prosopis chilensis* (L.) and their efficacy in controlling vibriosis in shrimp *Penaeus monodon*. *Appl. Nanosci.* 65-73. doi:10.1007/s13204-012-0064-1
- Kalaiselvi D., Mohankumar A., Shanmugam G., Nivitha S., Sundararaj P. 2019. Green synthesis of silver nanoparticles using latex extract of Euphorbia tirucalli: A novel approach for the management of root knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *Crop Protection*, 117, 108–114. doi:10.1016/j.cropro.2018.11.020
- Kaminsky R., Denison C., Bening-Abu-Shach U., Chisholm A.D., Gygi S.P., Broday L. 2009. SUMO regulates the assembly and function of a cytoplasmic intermediate filament protein in *C. elegans*. *Dev Cell*. 17(5):724–735. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.10.005>
- Kandasamy K., Alikunhi N.M., Manickaswami G. *et al.* 2013. Synthesis of silver nanoparticles by coastal plant *Prosopis chilensis* and their efficacy in controlling vibriosis in shrimp *Penaeus monodon*. *Appl Nanosci.* 3, 65–73. <https://doi.org/10.1007/s13204-012-0064-1>
- Kanwal Z., Raza M.A., Manzoor F., Riaz S., Jabeen G., Fatima S., Naseem S. 2019. A Comparative Assessment of Nanotoxicity Induced by Metal (Silver, Nickel) and Metal Oxide (Cobalt, Chromium) Nanoparticles in *Labeo rohita*. *Nanomaterials (Basel)*, 25;9(2):309. doi: 10.3390/nano9020309
- Kar P.K., Murmu S., Saha S., Tandon V., Acharya K. 2014. Anthelmintic efficacy of gold nanoparticles derived from a phytopathogenic fungus, *Nigrospora oryzae*. *PLoS One* 9(1): <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084693>
- Kawasaki M., Hisamoto N., Lino Y., Yamamoto M., Ninomiya-Tsuji J., Matsumoto K. 1999. A *Caenorhabditis elegans* JNK signal transduction pathway regulates coordinated movement via type-D GABAergic motor neurons. *EMBO Journal*. 18 (13), 3604–3615. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.13.3604>
- Kearn G.C. 1986. The eggs of monogeneans. *Adv. Parasitol.* 25:175–273. [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(08\)60344-9](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(08)60344-9)
- Khan M.S., Qureshi N.A., Jabeen F., Shakeel M., Asghar M.S. 2017. Assessment of Waterborne Amine-Coated Silver Nanoparticle (Ag-NP)-Induced Toxicity in *Labeo rohita* by Histological and Hematological Profiles. *Biol. Trace. Elem. Res.* doi: 10.1007/s12011-017-1080-5
- Khidr A.A. 1989. Observations on egg production in *Cichlidogyrus halli typicus* (Monogenea: Ancyrocephalinae). *Delta J. Sci.* 13(2):1145–1156
- Khoshnamvand M., Hao Z., Fadare O.O., Hanachi P., Chen Y., Liu J. 2020... Toxicity of biosynthesized silver nanoparticles to aquatic organisms of different trophic levels. *Chemosphere*. doi: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127346>
- KhosraviKatuli K., Shabani A., Paknejad H., Reza M. 2018. Comparative toxicity of silver nanoparticle and ionic silver in juvenile common carp (*Cyprinus carpio*): Accumulation, physiology and histopathology. *J. Hazar. Mater.* (359), 373–381.
- Kim D.H., Liberati N.T., Mizuno T., *et al.* 2004. Integration of *Caenorhabditis elegans* MAPK pathways mediating immunity and stress resistance by MEK-1 MAPK kinase and VHP-1 MAPK phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 101(30):10990–10994.

<https://doi.org/10.1073/pnas.0403546101>

- Kim J.H., Lee S.H., Cha Y.J., Hong S.J., Chung S.K., Park T.H., Choi S.S. 2017. *C. elegans*-on-a-chip for in situ and in vivo Ag nanoparticles' uptake and toxicity assay. *Sci. Rep.* 7
- Kim S.H., Lee H.S., Ryu D.S., Choi S.J., Lee D.S. 2011. Antibacterial Activity of Silver-nanoparticles Against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* 39,77–85.
- Kim S.W., Nam S.H., An Y.J. 2012. Interaction of Silver Nanoparticles with Biological Surfaces of *Caenorhabditis elegans*. *Ecotox. Environ. Safe.* 77, 64–70. doi:10.1016/j.ecoenv.2011.10.023
- Kinet M.J., Shaham S. 2014. Noncanonical cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Methods. Enzymol.* 545:157–180. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801430-1.00007-X>
- Klompstra D., Anderson D., Yeh J. *et al.* 2015. An instructive role for *C. elegans* E-cadherin in translating cell contact cues into cortical polarity. *Nat Cell Biol* 17, 726–735. <https://doi.org/10.1038/ncb3168>
- Köppen M., Simske J., Sims P. *et al.* 2001. Cooperative regulation of AJM-1 controls junctional integrity in *Caenorhabditis elegans* epithelia. *Nat. Cell Biol.* 3, 983–991. <https://doi.org/10.1038/ncb1101-983>
- Kouns N.A., Nakielna, J., Behensky F., Krause M., Kostrouch Z., Kostrouchova M. 2015. NHR-23 dependent collagen and hedgehog-related genes required for molting. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 413, 515–520.
- Kozlowski L., Garvis S., Bedet C., Palladino F. 2014. The *Caenorhabditis elegans* HP1 family protein HPL-2 maintains ER homeostasis through the UPR and hormesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 111(16):5956-5961. <https://doi.org/10.1073/pnas.1321698111>
- Kumar N., Das S., Jyoti A., Kaushik S. 2016. Synergistic effect of silver nanoparticles with doxycycline against *Klebsiella pneumoniae*. *Int. J. Pharm. Sci.* 8,183–186.
- Kumari Y.S., Sunitha A.K., Sucharitha G. 2019. Synthesis of silver nanoparticles from leaf extract of *Mentha piperita*, and evaluation of anthelmintic activity on cestode and nematode parasites of country fowl. *Int. J. Innov. Sci. Eng. Technol.* 6 (10). 71-76.
- Kwok K.W., Auffan M., Badireddy AR., Nelson C.M. Wiesner M.R., Chilkotic A., Liu J., Marinakos S.M. Hinton D.E. 2012. Uptake of silver nanoparticles and toxicity to early life stages of Japanese medaka (*Oryzias latipes*): Effect of coating materials. *Aquat. Toxicol.* (120), 59– 66.
- Lacave J.M., Vicario-Parés U., Bilbao E., Gilliland D., Mura F., Dini L., Cajaraville M.P., Orbea A. 2018. Waterborne exposure of adult zebrafish to silver nanoparticles and to ionic silver results in differential silver accumulation and effects at cellular and molecular levels. *Sci. Tot. Environ.* (642), 1209–1220.
- Lainé V., Frøkjær-Jensen C., Couchoux H., Jospin M. 2011. The alpha1 subunit EGL-19, the alpha2/delta subunit UNC-36, and the beta subunit CCB-1 underlie voltage-dependent calcium currents in *Caenorhabditis elegans* striated muscle. *J. Biol. Chem.* 286(42):36180-36187. <https://doi.org/doi:10.1074/jbc.M111.256149>
- Lans H., Vermeulen W. 2011. Nucleotide Excision Repair in *Caenorhabditis elegans*. *Mol. Biol. Inter.* ID 542795. <https://doi.org/10.4061/2011/542795>

- Lara H.H., Ayala-Nuñez N.V., Ixtepan-Turrent L., Rodriguez-Padilla C. 2010. Mode of antiviral action of silver nanoparticles against HIV-1. *J. Nanobiotech.* 20;8:1. doi: 10.1186/1477-3155-8-1
- Lara H.H., Velázquez-Salazar J., Arellano-Jiménez M.J., Larios E., Srinivasan A., López-Ribot J.L., Yacamán M.J. 2015. Ultrastructural changes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* induced by positively charged silver nanoparticles. *Beilstein J. Nanotechnol.* 6, 2396-2405. doi: 10.3762/bjnano.6.246
- Lee B., Duong C.N., Cho J., Lee J., Kim K., Seo Y., Kim P., Choi K., Yoon J. 2012. Toxicity of Citrate-Capped Silver Nanoparticles in Common Carp (*Cyprinus carpio*). *J. Biomed. Biotechnol.* (12) 1-15.
- Lee D.L. 1967. The structure and composition of the helminth cuticle. *Adv. Parasitol.* 4:187–254
- Lesa G.M., Palfreyman M., Hall D.H., Clandinin M.T., Rudolph C., Jorgensen E., Schiavo G. 2003. Long chain polyunsaturated fatty acids are required for efficient neurotransmission in *C. elegans*. *J. Cell Sci.* 116 (24), 4965–4975. <https://doi.org/10.1242/jcs.00918>
- Li J., Rong K., Zhao H., Li F., Lu Z. Chen R. 2013. Highly selective antibacterial activities of silver nanoparticles against *Bacillus subtilis*. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 13, 6806-6813. doi:10.1166/jnn.2013.7781
- Liao C., Li Y., Tjong S.C. 2019. Bactericidal and Cytotoxic Properties of Silver Nanoparticles. *Int. J. Mol. Sci.* 20(2):449. <https://doi.org/10.3390/ijms20020449>
- Lin X., Qadota H., Moerman D.G., Williams D. 2003. *C. elegans* PAT-6/Actopaxin plays a critical role in the assembly of integrin adhesion complexes in vivo. *Current Biology*, 13, 922–932. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(03\)00372-5](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(03)00372-5)
- Liu Q., Jones T.I., Bachmann R.A. 2012. *C. elegans* PAT-9 is a nuclear zinc finger protein critical for the assembly of muscle attachments. *Cell Biosci.* 2, 18. <https://doi.org/10.1186/2045-3701-2-18>
- Lu Z., Rong K., Li J., Yang H., Chen R. 2013. Size-dependent antibacterial activities of silver nanoparticles against oral anaerobic pathogenic bacteria. *J. Mater. Sci.* 24, 1465–1471.
- Malin J.A., Kinet M.J., Abraham M.C., Blum E.S., Shaham S. 2016. Transcriptional control of non-apoptotic developmental cell death in *C. elegans*. *Cell Death Differ.* 23(12):1985–1994. <https://doi.org/10.1038/cdd.2016.77>
- Mansouri B., Johari S.A. 2016. Effects of Short-Term Exposure to Sublethal Concentrations of Silver Nanoparticles on Histopathology and Electron Microscope Ultrastructure of Zebrafish (*Danio Rerio*) Gills. *Iranian Journal of Toxicology* (10)
- Manzano-Román R., Oleaga A., Pérez-Sánchez R., Siles-Lucas M. 2012. Gene Silencing in Parasites. *Advan Parasitol*, 78, 1–55. doi:10.1016/b978-0-12-394303-3.00002-5
- Mapes J., Chen J.T., Yu J.S., Xue D. 2010. Somatic sex determination in *Caenorhabditis elegans* is modulated by SUP-26 repression of tra-2 translation. *PNAS* 107 (42); 18022–18027. <https://doi.org/10.1073/pnas.1004513107>
- Martínez-Finley E.J., Aschner M. 2011 Revelations from the nematode *Caenorhabditis elegans* on the complex interplay of metal toxicological mechanisms. *J. Toxicol.* 895236. <https://doi.org/10.1155/2011/895236>

- Mashock M.J., Zanon T., Kappell A.D., Petrella L.N., Andersen E.C., Hristova K.R. 2016. Copper oxide nanoparticles impact several toxicological endpoints and cause neurodegeneration in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One*. 11 e0167613. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167613.s002>
- Mazon A.F., Cerqueira C.C.C., Fernandes M.N. 2002. Gill cellular changes induced by copper exposure in the South American tropical freshwater fish *Prochilodus scrofa*. *Environ. Res. Sect. A* 88:52–63
- Minaba M, Ichiyama S, Kojima K, Ozaki M, Kato Y. 2006. Activation of nematode G protein GOA-1 by the human muscarinic acetylcholine receptor M2 subtype. Functional coupling of G-protein-coupled receptor and G protein originated from evolutionarily distant animals. *FEBS J.* 273(24):5508-5516. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05542.x>
- Mizuno T., Hisamoto N., Terada T., Kondo T., Adachi M., Nishida E., Kim D.H., Ausubel F.M., Matsumoto K. 2004. The *Caenorhabditis elegans* MAPK phosphatase VHP-1 mediates a novel JNK-like signaling pathway in stress response. *J EMBO*. 23(11), 2226–2234. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600226>
- Möhler J.S., Sim W., Blaskovich M.A., Cooper M.A., Ziora Z.M. 2018. Silver bullets: a new lustre on an old antimicrobial agent. *Biotechnol. Adv.* 36(5):1391–1411
- Molnar K. 1995. Effect of exposure to malachite Green solution on common carp fry with *Dactylogyrus vastator* (Monogenea). *Int. J. Parasitol.* 24 (8): 1227-1271
- Monfared A.L., Soltani S. 2013. Effects of silver nanoparticles administration on the liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): histological and biochemical studies. *Eur. J. Exp. Biol.* 3(2):285-289.
- Monfared A.L., Bahrami A.M., Hosseini E., Soltani S., Shaddel M. 2015. Effects of Nano-particles on Histo-pathological changes of the fish. *J. Environ. Health Sci. Eng.* 29;13:62. doi: 10.1186/s40201-015-0216-9.
- Morales-Serna F.N., Medina-Guerrero R.M., Pimentel-Acosta C., Ramírez-Tirado J.H., Fajer-Ávila E.J. 2018. Parasite infections in farmed Nile tilapia *Oreochromis niloticus* in Sinaloa, Mexico. *Comp. Parasitol.* 85:212–216
- Morones J.R., Elechiguerra J.L., Camacho A., Holt K., Kouri J.B., Ramirez J.T., Yacaman M.J. 2005. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotech.* 16, 2346–2353
- Murthy V.N., Camilli P.D. 2003. Cell Biology of The Presynaptic Terminal. *Annual Review of Neuroscience*, 26(1), 701–728. doi:10.1146/annurev.neuro.26.041002.131445
- Naguib M., Mahmoud U.M., Mekawy I.A., Sayed A.E. 2020. Hepatotoxic effects of silver nanoparticles on *Clarias gariepinus*: Biochemical, histopathological, and histochemical studies. *Toxicol. Reports.* 7, 133 - 141.
- Nakagawa A., Sullivan K.D., Xue D. 2015. Caspase-activated phosphoinositide binding by CNT-1 promotes apoptosis by inhibiting the AKT pathway. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 21, 1082–1090.
- Nance J., Davis E.B., Ward S. 2000. Spe-29 encodes a small predicted membrane protein required for the initiation of sperm activation in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 156, 1623–1633.
- Nguyen K.C., Seligy V.L., Massarsky A., Moon T.W., Rippstein P., Tan J., Tayabali A.F. 2013. Comparison of toxicity of uncoated and coated silver nanoparticles. *J. Phys.* 429, 012025.

- Nonet M.L., Holgado A.M., Brewer F., Serpe C.J., Norbeck B.A., Holletan J., Wei L., Hartwig E., Jorgensen M., Alfonso A. 1999. UNC-11, a *Caenorhabditis elegans* AP180 Homologue, Regulates the Size and Protein Composition of Synaptic Vesicles. *Mol. Biol. Cell*, 10, 2343–2360. <https://doi.org/10.1091/mbc.10.7.2343>
- Ohashi H., Umeda N., Hirazawa N., Ozaki Y., Miura C., Miura T. 2007. Expression of vasa (vas)-related genes in germ cells and specific interference with gene functions by double-stranded RNA in the monogenean, *Neobenedenia girellae*. *Int. J. Parasitol.* 37(5), 515–523. doi:10.1016/j.ijpara.2006.11.003
- O’Neill J.F., Johnston R.C., Halferty L., Brennan G.P., Fairweather I. 2015. Ultrastructural changes in the tegument and gut of adult *Fasciola hepatica* following in vivo treatment with artesunate. *Exp. Parasitol.* 154:143–154. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2015.04.012>
- Ochoa-Meza A.R., Álvarez-Sánchez C.R., Romo-Quiñonez A., Barraza Y., Toledano-Magaña N., Bogdanchikova A., Pestryakov. 2019. Silver nanoparticles enhance survival of white spot syndrome virus infected *Penaeus vannamei* shrimps by activation of its immunological system Fish Shellfish *Immunol.* 84 doi: 1083-1089, 10.1016/j.fsi.2018.10.007
- Oh S.W., Mukhopadhyay A., Svrzikapa N., Jiang F., Davis R.J., Tissenbaum H.A. 2005. JNK regulates lifespan in *Caenorhabditis elegans* by modulating nuclear translocation of forkhead transcription factor/DAF-16. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 102(12):4494–4499. <https://doi.org/10.1073/pnas.0500749102>
- Ostaszewska T., Chojnacki M., Kamaszewski M. 2016. Histopathological effects of silver and copper nanoparticles on the epidermis, gills, and liver of Siberian sturgeon. *Environ. Sci. Pollut. Res.* (23) 1621–1633
- Padmanabhan A., Ong H.T., Zaidel-Bar R. 2017. Non-junctional E-Cadherin Clusters Regulate the Actomyosin Cortex in the *C. elegans* Zygote. *Curr. Biol.* 27(1):103-112. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.10.032>
- Page A.J., Johnstone I.L. 2007. The cuticle WormBook. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.138.1>, <http://www.wormbook.org>
- Pal S., Tak Y.K., Song J.M. 2007. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram- negative bacterium *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73,1712–1720. doi:10.1128/AEM.02218-06
- Park J., Lee J. 2018. Role of phospholipase D in the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Exp. Mol. Med.* 50, 8. <https://doi.org/10.1038/s12276-017-0015-8>
- Philbrook N.A., Winn L.M., Afrooz A.N., Saleh N.B., Walker V.K. 2011. The effect of TiO₂ and Ag nanoparticles on reproduction and development of *Drosophila melanogaster* and CD-1 mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 257:429–436
- Pothof J., van Haaften G., Thijssen K., *et al.* 2003. Identification of genes that protect the *C. elegans* genome against mutations by genome-wide RNAi. *Genes Dev.* 17(4):443-448. <https://doi.org/10.1101/gad.1060703>
- Prabhu S., Poulouse E.K. 2012. Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. *Int. Nano Lett.* 2, 32. <https://doi.org/10.1186/2228-5326-2-32>
- Priya S., Santhi S. 2015. Biosynthesis and in vitro anthelmintic activity of silver nanoparticles

using aqueous leaf extracts of *Azadirachta indica*. *World J. Pharm. Pharm. Sci.* 4:10. 2105-2116.

- Qin H., Zhai Z., Powell-Coffman J.A. 2006. The *Caenorhabditis elegans* AHR-1 transcription complex controls expression of soluble guanylate cyclase genes in the URX neurons and regulates aggregation behavior. *Dev. Biol.*, 298, 606–615. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.07.017>
- Qin H., Powell-Coffman A.J. 2004. The *Caenorhabditis elegans* aryl hydrocarbon receptor, AHR-1, regulates neuronal development. *Dev. Biol.*, 270, 64–75. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.02.004>
- Qing Y.; Cheng L.; Li R.; Liu G.; Zhang Y.; Tang X.; Wang J.; Liu H.; Qin Y. 2018. Potential antibacterial mechanism of silver nanoparticles and the optimization of orthopedic implants by advanced modification technologies. *Int. J. Nanomed.* 13, 3311–3327.
- Quevedo C., Kaplan D.R., Derry W.B. 2007. AKT-1 Regulates DNA-Damage induced germline apoptosis in *C. elegans*. *Cur. Biol.* 17, 286–292. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.12.038>
- Rabilotta A., Desrosiers M., Labbé J.C. 2015. CDK-1 and two B-type cyclins promote PAR-6 stabilization during polarization of the early *C. elegans* embryo. *PLoS One.* 10(2):e0117656. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117656>
- Rajini P.S., Melstrom P., Williams P.L. 2008. A comparative study on the relationship between various toxicological endpoints in *Caenorhabditis elegans* exposed to organophosphorus Insecticides, *J. Toxicol. Environ. A*, 71:15, 1043–1050. <https://doi.org/10.1080/15287390801989002>
- Rajkumar K.S., Kanipandian N., Thirumurugan R. 2016. Toxicity assessment on haematology, biochemical and histopathological alterations of silver nanoparticles-exposed freshwater fish *Labeo rohita*. *Appl. Nanosci.* (6) 19–29.
- Ramakrishnan K., Okkema P.G. 2014. Regulation of *C. elegans* neuronal differentiation by the ZEB-family factor ZAG-1 and the NK-2 homeodomain factor CEH-28. *PLoS ONE* 9(12): e113893. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113893>
- Rashid M.M.O., Ferdous J., Banik S., Islam M.R., Uddin A.H.M.M., Robel F.N. 2016. Anthelmintic activity of silver-extract nanoparticles synthesized from the combination of silver nanoparticles and *M. charantia* fruit extract. *BMC Complement Altern. Med.* 16(1). doi:10.1186/s12906-016-1219-5
- Rehman A., Ullah R., Uddin I., Zia I., Rehman L., Abidi, S.M.A. 2019. In vitro anthelmintic effect of biologically synthesized silver nanoparticles on liver amphistome, *Gigantocotyle explanatum*. *Exp. Parasitol.* doi:10.1016/j.exppara.2019.02.005
- Romo-Quiñonez A.R. Álvarez-Sánchez P. M., Álvarez-Ruiz M.C., Chávez-Sánchez M.C., Bogdanchikova N., Pestryakov A. 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 *Peer.J.* 8: 1-22, 10.7717/peerj.8446
- Roy A.K. 2017. Microarray analysis of fish genomic data for enhancing aquaculture productivity of India. *Ann. Proteom. Bioinform.* 1, 6–17.
- Roy A., Bulut O., Some S., Mandal A.K., Yilmaz M.D. 2019. Green synthesis of silver nanoparticles: biomolecule-nanoparticle organizations targeting antimicrobial activity. *RSC*

Advances. 9(5), 2673–2702. doi:10.1039/c8ra08982e

- Ruíz-Laguna J., Vélez J.M., Pueyo C., Abril N. 2015. Global gene expression profiling using heterologous DNA microarrays to analyze alterations in the transcriptome of *Mus spretus* mice living in a heavily polluted environment. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 5853–5867.
- Russel G.M.F., Koenderink J.B., Masereeuw R. 2008. Multidrug resistance protein 4 (MRP4/ABCC4): a versatile efflux transporter for drugs and signalling molecules. *Trends Pharmacol. Sci.* 29:4. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2008.01.006>
- Ryu J.S., Kang S.J., Koo H.S. 2013. The 53BP1 homolog in *C. elegans* influences DNA repair and promotes apoptosis in response to ionizing radiation. *PLoS ONE* 8(5): e64028. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064028>
- Sadoon A.A., Khadka P., Freeland J., Gundampati R.K., Manso R.H., Ruiz M., Krishnamurthi V.R., Thallapuranam S.K., Chen J., Wang Y. 2020. Silver ions caused faster diusive dynamics of histone-like nucleoid-structuring proteins in live bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 86, 1–16.
- Salcini A.E., Hilliard M.A., Croce A., Arbucci S., Luzzi P., Tacchetti C., Daniells L., De Camillis P., Pelicci P.G., Di Fiore P.P., Bazzicalupo P. 2001. The Eps15 *C. elegans* homologue EHS-1 is implicated in synaptic vesicle recycling. *Nat. Cell Biol.* (3), 751–760. <https://doi.org/10.1038/35087075>
- Saleh M., Abdel-Baki A.A., Dkhil M.A., El-Matbouli M., Al-Quraishy S. 2017. Antiprotozoal effects of metal nanoparticles against *Ichthyophthirius multifiliis*. *Parasitol.* 144:1802–1810. <https://doi.org/10.1017/S0031182017001184>
- Salgado-Maldonado G., Rubio-Godoy M. 2014. Helmintos parásitos de peces de agua dulce introducidos. En R. Mendoza y P. Koleff (Eds.), *Especies acuáticas invasoras en México* (pp. 269-285). Mexico D.F.: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.
- Sapio M.R., Hilliard M.A., Cermola M., Favré R., Bazzicalupo P. 2005. The Zona Pellucida domain containing proteins, CUT-1, CUT-3 and CUT-5, play essential roles in the development of the larval alae in *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* 282; 231–245. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.03.011>
- Sarkar B., Jaisai M., Mahanty A., Pand P., Sadique M., Nayak B., Gallardo G., Thakur D., Bhattacharjee S., Dutta J. 2015. Optimization of the sublethal dose of silver nanoparticle through evaluating its effect on intestinal physiology of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). *J. Environ. Sci Health. A* (50), 814–823.
- Sayed A.E., Mekkawy I.A., Mahmoud U.M., Nagiub, M. 2020. Histopathological and histochemical effects of silver nanoparticles on the gills and muscles of African catfish (*Clarias farreri*). *Scientific African*, 7, e00230. doi:10.1016/j.sciaf.2019.e00230
- Schwartz H.T., Horvitz H.R. 2007. The *C. elegans* protein CEH-30 protects male-specific neurons from apoptosis independently of the Bcl-2 homolog CED-9. *Genes Dev*, 21, 3181–3194
- Sebastiano M, Lassandro F, Bazzicalupo P. 1991. cut-1 a *Caenorhabditis elegans* gene coding for a dauer-specific noncollagenous component of the cuticle. *Dev. Biol.* 146(2):519–30. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(91\)90253-y](https://doi.org/10.1016/0012-1606(91)90253-y)
- Shalan M, Saleh M, El-Mahdy M, El-Matbouli M. 2015. Recent progress in applications of nanoparticles in fish medicine: A review. *Nanomedicine: NMB*, 12(3), 701–710.

<https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.11.005>

- Shabrangharehdasht M., Mirvaghefi A., Farahmand H. 2020. Effects of nanosilver on hematologic, histologic and molecular parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicol.* 105549. doi:10.1016/j.aquatox.2020.105549
- Shaharom-Harrison, 1982. Fish Parasites of Lake Kenyir Peninsular Malaysia. University Malaysia
- Shanmuganathan R, Karuppusamy I, Saravanan M, Muthukumar H, Ponnuchamy K, Ramkumar VS, Pugazhendhi A. 2019. Synthesis of Silver Nanoparticles and their Biomedical Applications - A Comprehensive Review. *Curr. Pharm. Des.* 25(24):2650-2660. doi: 10.2174/1381612825666190708185506
- Shelar A., Sangshetti J., Chakraborti S., Singh A.V., Patil R., Gosavi S. 2019. Helminthocidal and Larvicidal Potentials of Biogenic Silver Nanoparticles Synthesized from Medicinal Plant *Momordica charantia*. *Med. Chem.* 15(7):781-789. doi:10.2174/1573406415666190430142637.
- Shobana C., Rangasamy B., Poopal R.K., Renuka S., Ramesh M. 2018. Green synthesis of silver nanoparticles using *Piper nigrum*: tissue-specific bioaccumulation, histopathology, and oxidative stress responses in Indian major carp *Labeo rohita*. *Environ. Sci. Poll. Res.* <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1454-z>.
- Shrivastava S. 2008. Nanomedicine:physiological principle of distribution. *Dig. J. Nanomater. Bios.* 3,303–308.
- Singh S.K., Goswami K., Sharma R.D., Reddy M.V.R., Dash D. 2012. Novel microfilaricidal activity of nanosilver. *Int. J. Nanomed.* 7. doi: 1023-30. 10.2147/IJN.S28758
- Sivaramasamy E., Zhiwei W., Li F., Xiang J. 2016. Enhancement of Vibriosis resistance in *Litopenaeus vannamei* by supplementation of biomastered silver nanoparticles by *Bacillus subtilis* *J. Nanomed. Nanotechnol.* 7:1-10. doi: 10.4172/2157-7439.1000352
- Slavin Y.N., Asnis J., Häfeli U.O., Bach H. 2017. Metal nanoparticles: Understanding the mechanisms behind antibacterial activity. *J. Nanobiotech.* 15(1):65. <https://doi.org/10.1186/s12951-017-0308-z>
- Smolikov S., Eizinger A., Schild-Prufert K., Hurlburt A., McDonald K., Engebrecht J., Villeneuve A.M., Colaiácovo M.P. 2007. SYP-3 restricts synaptonemal complex assembly to bridge paired chromosome axes during meiosis in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, 176(4), 2015–2025. <https://doi.org/10.1534/genetics.107.072413>
- Soete G., Betist M.C., Korswagen H.C. 2007. Regulation of *Caenorhabditis elegans* body size and male tail development by the novel gene lon-8. *BMC Dev. Biol.* 7, 20. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-7-20>
- Srinonate A., Banlunara W., Maneewattanapinyo P., Thammacharoen C., Ekgasit S., Kaewamatawong T. 2015. Acute Toxicity Study of Nanosilver Particles in Tilapia (*Oreochromis niloticus*): Pathological Changes, Particle Bioaccumulation and Metallothionien Protein Expression. *Thai J. Vet. Med.* 45(1): 81-89.
- Suzuki Y., Morris G.A., Han M., Wood W.B. 2002. A cuticle collagen encoded by the lon-3 gene may be a target of TGF-beta signaling in determining *Caenorhabditis elegans* body shape. *Genetics*, 162(4), 1631–1639 (2002). PMID: 12524338
- Syafiuddin A., Salim M.R., Beng Hong Kueh A., Hadibarata T., Nur H. 2017. A review of silver

nanoparticles: Research trends, global consumption, synthesis, properties, and future challenges. *J. Chin. Chem. Soc.* 64, 732–756.

- Taha E.H., Abo-Shady N.M. 2016. Effect of Silver Nanoparticles on the Mortality Pathogenicity and Reproductivity of Entomopathogenic Nematodes. *Int. J. Zool. Res.* 12: 47-50. doi: 10.3923/ijzr.2016.47.50
- Tanoue T., Yamamoto T., Maeda R., Nishida E. 2001. A Novel MAPK phosphatase MKP-7 acts preferentially on JNK/SAPK and p38 alpha and beta MAPKs. *J. Biol. Chem.* 276(28):26629–26639. <https://doi.org/10.1074/jbc.M101981200>
- Tenor J.L., Aballay A. 2008. A conserved Toll-like receptor is required for *Caenorhabditis elegans* innate immunity. *EMBO Rep.* 9(1):103–109. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7401104>
- Tepper R.G., Ashraf J., Kaletsky R., Kleemann G., Murphy C.T., Bussemaker H.J. 2013. PQM-1 complements DAF-16 as a key transcriptional regulator of DAF-2-mediated development and longevity. *Cell.* 154(3):676–690 <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.07.006>
- Thangam Y., Kowsalya S. 2020. Review of Silver nanoparticles in Freshwater fish “*Cyprinus carpio*”. *J. Enviro. Sci. Tox. Food. Tech.* 14:7, 28-36.
- Thompson D.P., Geary T.G. 1995. The Structure and Function of Helminth Surfaces. Biochemistry and Molecular Biology of Parasites. Academic Press Harcourt Brace and Company, Publishers. 209-216.
- Thummabancha K, Onparn N, Srisapoom P. 2016. Molecular characterization and expression analyses of cDNAs encoding the thioredoxin-interacting protein and selenoprotein P genes and histological changes in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in response to silver nanoparticle exposure. *Gene*, 577(2):161-73. doi: 10.1016/j.gene.2015.11.031
- Tomar R., Preet S. 2017. Evaluation of anthelmintic activity of biologically synthesized silver nanoparticles against the gastrointestinal nematode, *Haemonchus contortus*. *J. Helminthol.* 91(4), 454-461. doi:10.1017/S0022149X16000444
- Toner E., Brennan G.P., Wells K., McGeown J.G., Fairweather I. 2008. Physiological and morphological effects of genistein against the liver fluke, *Fasciola hepatica*. *Parasitol.* 135:1189–1203. <https://doi.org/10.1017/S0031182008004630>
- Vaseeharan P., Ramasamy J.C., Chen 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, 10.1111/j.1472765X.2010.02799.x
- Vatamaniuk O.K., Bucher E.A., Ward J.T., Rea P.A. 2001. A new pathway for heavy metal detoxification in animals. *J. Biol. Chem.* 276:24, 20817–20820. <https://doi.org/10.1074/jbc.C100152200>
- Velayutham K., Rahuman A.A., Rajakumar G., Roopan S.M., Elango G., Kamaraj C., Siva, C. 2013. Larvicidal activity of green synthesized silver nanoparticles using bark aqueous extract of *Ficus racemosa* against *Culex quinquefasciatus* and *Culex gelidus*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 6(2), 95–101. doi:10.1016/s1995-7645(13)60002-4
- Villanueva A., Lozano J., Morales A., et al. 2001. jkk-1 and mek-1 regulate body movement coordination and response to heavy metals through jnk-1 in *Caenorhabditis elegans*. *EMBO J.* 20(18):5114-5128. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.18.5114>

- Wacker I., Schwarz V., Hedgecock E.M., Hutter H. 2003. zag-1, a Zn-finger homeodomain transcription factor controlling neuronal differentiation and axon outgrowth in *C. elegans*. *Develop.* 130, 3795–3805. <https://doi.org/10.1242/dev.00570>
- Wang D. 2018. Nanotoxicology in *Caenorhabditis elegans*. Springer ISBN 978-981-13-02336 eBook. 115–116. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-0233-6>
- Wang X., Roy P.J., Holland S.J., Zhang *et al.* 1999. Multiple Ephrins Control Cell Organization in *C. elegans* Using Kinase-Dependent and Independent Functions of the VAB-1 Eph Receptor. *Mol. Cell.* 4: 903–913.
- Wang Z., Wang Y., Yu C., Zhao Y., Fan M., Gao B. 2015. The removal of silver nanoparticle by titanium tetrachloride and modified sodium alginate composite coagulants: floc properties, membrane fouling, and floc recycle. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25:21058–21069
- Watabe E., Ono S., Kuroyanagi H. 2018. Alternative splicing of the *Caenorhabditis elegans* lev-11 tropomyosin gene is regulated in a tissue-specific manner. *Cytoskeleton (Hoboken)*. 75(10):427–436. <https://doi.org/10.1002/cm.21489>
- Watts J.L., Phillips E., Griffing K.R., Browse J. 2003. Deficiencies in C20 polyunsaturated fatty acids cause behavioral and developmental defects in *Caenorhabditis elegans* fat-3 Mutants. *Genetics*, 163: 581–589. <https://doi.org/10.3410/f.1014103.192728>
- Whittington I.D. 2011. *Benedenia seriola* and *Benedenia* Species. Fish Parasites, Pathobiology and Protection. ISBN 978-1-84593-806.
- Whittington I.D., Kearn G.C. 2011. Hatching strategies in monogenean (Platyhelminth) parasites that facilitate host infection. Symposium BEnvironmentally Cued Hatching Across Taxa presented at the annual meeting of the Society for Integrative and Comparative Biology at Salt Lake City, Utah. <https://doi.org/10.1093/icb/icr003>
- Wolf M., Nunes F., Henkel A., Heinick A., Paul R.J. 2007. The MAP kinase JNK-1 of *Caenorhabditis elegans*: location, activation, and influences over temperature-dependent insulin-like signaling, stress responses, and fitness. *J. Cell Physiol.* 214(3):721–729. <https://doi.org/10.1002/jcp.21269>
- Wu Y., Zhou Q. 2013. Silver nanoparticles cause oxidative damage and histological changes in medaka (*Oryzias latipes*) after 14 days of exposure. *Env. Tox. Chem.* (32), 165–173.
- Wu T., Xu H., Liang X., Tang M. 2019. *Caenorhabditis elegans* as a complete model organism for biosafety assessments of nanoparticles. *Chemosphere*, 221, 708–726. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.01.021>
- Yasur J., Usha-Rani P. 2015. Lepidopteran insect susceptibility to silver nanoparticles and measurement of changes in their growth, development and physiology. *Chemosphere*, 124:92–102
- Yin Y., Smolikove S. 2013. Impaired resection of meiotic double-strand breaks channels repair to nonhomologous end joining in *Caenorhabditis elegans*. *Mol. Cell Biol.* 33(14), 2732–2747. <https://doi.org/10.1128/MCB.00055-13>
- Yoda A., Sawa H., Okano H. 2000. MSI-1, a neural RNA-binding protein, is involved in male mating behaviour in *Caenorhabditis elegans*. *Genes Cells.* 5(11):885–895. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.2000.00378.x>
- Yu S., Jánosi B., Liewald J.F., Wabnig S., Gottschalk A. 2018. Endophilin A and B join forces

- with clathrin to mediate synaptic vesicle recycling in *Caenorhabditis elegans*. *Front. Mol. Neurosci.* 11:196 (2018). <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00196>
- Zahir A.A., Bagavan A., Kamaraj C., Elango G., Rahuman A.A. 2012. Efficacy of plant-mediated synthesized silver nanoparticles against *Sitophilus oryzae*. *J. Biopesticides.* 288: 95-102.
- Zečić A, Braeckman B.P. 2020. DAF-16/FoxO in *Caenorhabditis elegans* and its role in metabolic remodeling. *Cells.* 9(1):109. <https://doi.org/10.3390/cells9010109>
- Zhang X.P., Li W.X., Ai T.S., Zou H., Wu S.G., Wang G.T. 2014. The efficacy of four common anthelmintic drugs and traditional Chinese medicinal plant extracts to control *Dactylogyrus vastator* (Monogenea). *Aquaculture* 420:302–307
- Zhang C., Zhao N., Chen Y., *et al.* 2016. The signaling pathway of *Caenorhabditis elegans* mediates chemotaxis response to the attractant 2-heptanone in a trojan horse-like pathogenesis. *J. Biol. Chem.* 291(45) 23618–23627 <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.741132>
- Zhang L., Wu L., Mi Y., Si Y. 2019. Silver nanoparticles induced cell apoptosis, membrane damage of *Azotobacter vinelandii* and *Nitrosomonas europaea* via generation of reactive oxygen species. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 103, 181–186.
- Zhao C., Wang W. 2012. Importance of surface coatings and soluble silver in silver nanoparticles toxicity to *Daphnia magna*. *Nanotoxicol.* 6:361–370. doi:10.3109/17435390.2011.579632
- Zieminska E., Stafiej A., Strużyńska L. 2014. The role of the glutamatergic NMDA receptor in nanosilver-evoked neurotoxicity in primary cultures of cerebellar granule cells. *Toxicol.* 315, 38–48. doi:10.1016/j.tox.2013.11.008
- Zinovyeva A.Y., Forrest W.C. 2005. The *C. elegans* Frizzled CFZ-2 is required for cell migration and interacts with multiple Wnt signaling pathways. *Develop. Biol.* 285:2, 447–461 <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.07.014>
- Zivic F., Grujovic N., Mitrovic S., Ahad I.U., Brabazon D. 2018. Characteristics and applications of silver nanoparticles. *Commercialization of Nanotechnologies—A Case Study Approach*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany. 227–273.