



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

**INFLUENCIA DE COMPUESTOS ANTI-PARASITARIOS
DE ORIGEN NATURAL EN LA RESPUESTA INMUNE Y
CONTROL DE LA INFECCIÓN CON *Neobenedenia sp.*
EN *Seriola lalandi*.**

TESIS

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

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

Presenta

Ana Gabriela Trasviña Moreno

La Paz, Baja California Sur, septiembre de 2018.

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 12 horas del día 14 del Mes de Septiembre del 2018, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"Influencia de compuestos anti-parasitarios de origen natural en la respuesta inmune y control de la infección con *Neobenedenia* sp en *Seriola lalandi*"


Presentada por el alumno:

Ana Gabriela Trasviña Moreno

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

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

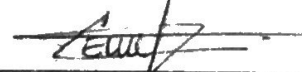
LA COMISIÓN REVISORA



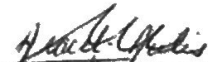
Dr. Juan Carlos Pérez Urbioia
Co-Director de Tesis



Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle
Co-Director




Dr. Carlos Angulo Valadez
Co-Tutor



Dra. Araceli Avilés Quevedo
Co-Tutor



Dra. Mirve Maldonado García
Co-Tutor



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

COMITÉ TUTORIAL

Dr. Juan Carlos Pérez Urbiola. Co-Director de Tesis. CIBNOR

Dr. Felipe Ascencio Valle. Co-director CIBNOR

Dr. Carlos Angulo Valadez. Co-tutor CIBNOR

Dra. Araceli Avilés Quevedo. Co-tutor. INAPESCA

Dra. Kate Hutson. Co-tutor. Universidad de James Cook, Australia

COMITÉ REVISOR

Dr. Juan Carlos Pérez Urbiola.

Dr. Felipe Ascencio Valle.

Dr. Carlos Angulo Valadez.

Dra. Araceli Avilés Quevedo.

Dra. Minerva Maldonado García.

JURADO DE EXAMEN

Dr. Juan Carlos Pérez Urbiola.

Dr. Felipe Ascencio Valle.

Dr. Carlos Angulo Valadez.

Dra. Araceli Avilés Quevedo.

Dra. Minerva Maldonado García.

SUPLENTE

Dr. Dariel Tovar Ramirez

RESUMEN

El cultivo en jaulas de *Seriola* sp. (Pisces: Carangidae) a nivel internacional reporta serios problemas con parásitos monogéneos en piel, afectando severamente el crecimiento y provocando mortandad en los cultivos. Los tratamientos actualmente utilizados contra ectoparásitos monogéneos, resultan ser costosos de difícil aplicación, no aptos para consumo humano, implican un esfuerzo laboral considerable, y además, son muy estresantes para los peces (Militz *et al.*, 2013; Sharp *et al.*, 2004). El uso de extractos naturales de dieta surge como una alternativa para control y tratamiento de parásitos. La herbolaria, es una fuente biológica rica en productos activos con propiedades antibacteriales, antiinflamatorias y antihelmínticas (Hutson *et al.*, 2012). A partir de esta necesidad surge el objetivo de esta tesis, evaluar la eficacia de 6 extractos (ajo, jengibre, albahaca, chapararro amargo, cebolla y papaya) de origen natural con actividad anti-parasitaria, para ser utilizados en el tratamiento contra el ectoparásito *Neobenedenia* sp en cultivos de *S. lalandi*. Primeramente, realizamos la evaluación *in vitro* de los extractos naturales en tres diluciones (1:100, 1:50 y 1:10) contra *Neobenedenia* sp y determinamos que el extracto con mayor actividad anti-parasitaria es el jengibre ya que reduce la supervivencia de los adultos, el tiempo de sujeción a la placa de cultivo, la producción de huevos y supervivencia larvaria. Evaluamos la toxicidad del extracto de jengibre suministrado en la dieta de juveniles de jurel, demostrando que, en los parámetros de crecimiento, hematológicos y expresión relativa de los genes IL 1- β y TNF en timo y riñón cefálico, no hay diferencias estadísticas al compararlos con los parámetros obtenidos en el grupo control. Seguido a esto, evaluamos la respuesta inmune de *S. lalandi* infectado con *Neobenedenia* sp y determinamos, que a una intensidad promedio de 64.44 ± 12.83 parásitos/pez, significativamente: incrementa la producción de mucus ($P < 0.05$), es menor la ganancia en peso ($P = 0.034$), disminuyen el porcentaje de linfocitos, se incrementa el porcentaje de monocitos, neutrófilos y eosinófilos, así como se incrementa la expresión relativa de TNF a las 24h post-infección en riñón cefálico. Finalmente, al retar a los peces con *Neobenedenia* sp y alimentarlos con las dietas adicionadas con jengibre (1g/k y 0.5g/kg), los tratamientos con jengibre, tuvieron el mejor crecimiento, la producción de mucus fue mayor conforme la infección avanzó y a partir del día 15 post infección la expresión relativa de ambas citoquinas es mayor tanto en riñón cefálico como en timo. Los resultados sugieren que los peces alimentados con la dieta con jengibre presentan una mayor respuesta inmune ante la infección. Nuestro estudio demuestra el potencial del extracto de jengibre como anti-parasitario para tratar infestaciones con *Neobenedenia* sp en el jurel *S. lalandi*.

Palabras clave: *Neobenedenia*, *S. lalandi*, extractos naturales.

Dr.  Juan Carlos Pérez Urbiola

Vo. Bo.


Dr. Felipe Ascencio Valle

SUMMARY

The sea cage culture of *Seriola* sp. (Pisces: Carangidae) internationally reports serious problems with monogeneans skin parasites, affecting growth and causing mortality in the cultures. The currently used treatments against monogeneans ectoparasites (formalin, Praziquantel, Hydrogen Peroxide, copper sulfate, among others) are expensive, difficult to apply and unfit for human consumption, they considerable work effort and are very stressful for fish (Militz *et al.*, 2013; Sharp *et al.*, 2004). The use of natural extracts incorporated into the diet appears as an alternative for the control and treatment of parasites. Herbalism, including seaweed species, is a biological source rich in active compounds with antibacterial, anti-inflammatory and anthelmintic properties (Hutson *et al.*, 2012). The objective of this thesis arises from this need, thereby we evaluate the effectiveness of 6 plants extracts (garlic, ginger, basil, bitter chaparro, onion and papaya) with anti-parasitic activity, to be used in the treatment against the ectoparasite *Neobenedenia* sp in *S. lalandi* cultures. Firstly, we evaluated *in vitro* the plant extracts in three dilutions (1: 100, 1:50 and 1:10) against *Neobenedenia* sp and we determined that ginger is the extract with the highest anti-parasitic activity, it reduces the survival of adults, time of attachment to the culture plate, egg production, as well as larval survival. From these results, we evaluated the toxicity of ginger extract supplied through the diet in juvenile of *S. lalandi* (dose1: 1 g of ginger / kg fish), demonstrating that there is no statistical differences, in the growth parameters, hematological and relative expression of the genes IL 1- β and TNF in thymus and head kidney, when compared with the parameters obtained in the control group. Following this, we evaluated the immune response of *S. lalandi* infected with *Neobenedenia* sp and determined that *S. lalandi* in response to this parasitic infestation (average intensity 64.44 ± 12.83 parasites per fish) it significantly: increased mucus production ($P < 0.05$), the gain in weight is lower ($P = 0.034$), the percentage of lymphocytes decreases, the percentage of monocytes, neutrophils and eosinophils increases and 24h post-infection the relative expression of TNF increases in head kidney tissue. Finally, we challenged the fish with *Neobenedenia* sp and fed them with the diets added with ginger (1g / k and 0.5g / kg), although the results are not statistically significant, the fish fed with the ginger diet, showed the best growth, mucus production increases as the infection progresses, and 15 post infection the relative expression of both cytokines (IL1- β and TNF), is higher in both organs, suggesting that the fish fed with the ginger diet had higher immune response then the control group. This study demonstrates the potential of ginger extract as an natural anti-parasitic treatment against *Neobenedenia* sp infections in *S. lalandi*.

Key words: *Neobenedenia*, *S. lalandi*, natural extracts.


Dr. Juan Carlos Pérez Urbiola

Vo. Bo.


Dr. Felipe Ascencio Valle

DEDICATORIA.

Este trabajo lo dedico a mi familia.

Gerardo, esta tesis es un logro mutuo. Vivo infinitamente agradecida por tu apoyo incondicional, paciencia, amor, dedicación a nuestra familia y constante motivación para llegar a la meta. Fueron muchos sacrificios que sin tu apoyo no lo hubiera logrado.

A mis amadas hijas Ana María y Elena que, a tan corta edad, me han tenido paciencia y apapachos interminables en los momentos complicados. Son mi mayor motivación y deseo de todo corazón que esta experiencia, les transmita que en la vida se debe de luchar y trabajar duro para llegar a las metas planteadas y a nunca darse por vencidas.

A mis padres Armando y Gaby, que siempre me apoyan y motivan a luchar para conseguir todas mis metas. A mis hermanos Diego y Carlos que sin importar la distancia siempre están conmigo echándome porras.

A mis suegros Manolo y Mary, gracias por sus consejos, palabras de aliento y cariño.

A toda mi familia, todos en alguna parte de esta etapa de mi vida llamada “doctorado”, han formado una pieza crucial de este gran rompecabezas.

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste por las facilidades otorgadas en equipo, infraestructura y apoyo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada No. 164850.

A mis directores de tesis, Dr. Juan Carlos Pérez Urbiola y al Dr. Felipe Ascencio, por todo el apoyo y tiempo brindado. Por sobre todo por su paciencia.

A mi comité tutorial, Dra. Kate Hutson, Dra. Araceli Avilés Quevedo y Dr. Carlos Angulo Valadez por su supervisión, consejos y dedicación a este trabajo de tesis.

A la M. en C. Roxana B. Inohuye y a la Dra. Carmen Rodríguez Jaramillo por todo el apoyo, consejos, supervisión, capacitación y tiempo invertido, muchas, muchas, gracias.

A todos los colaboradores:

Dra. Martha C. Reyes Becerril del Laboratorio de Patogénesis Microbiana, Arturo P. Sierra Beltrán del Laboratorio de Proteómica, Al Dr. Marcos Quiñones y Francisco Encarnación Ramírez del Laboratorio de Peces, José G. Colado Durán del Laboratorio experimental en reproducción de organismos acuáticos, Dr. Ernesto Goytortúa Bores del Laboratorio de Nutrición Acuícola, Eulalia Meza Chávez de Laboratorio de Histología e Histoquímica, Dr. Raúl Martínez Rincón del programa de Cátedras SEASE, Delfino J. Barajas Frías del Laboratorio de Cultivo de Moluscos y a Patricia Hinojosa Baltazar del Laboratorio de Fisiología Comparada.

Compañeros de posgrado, Lilian, Paty, Andressa, Joan, Isabel y Esteban, servicio social: Enrique, Guadalupe y Elisa y al grupo de verano científico: Avicenia, Daney, Uriel, Mariano y Rodrigo.

Contenido.

Resumen	i
Summary	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Contenido	v
Lista de figuras	vii
Lista de tablas	ix
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Jurel de Castilla (<i>Seriola lalandi</i> , Valenciennes, 1833).....	3
2.1.1 Taxonomía.....	4
2.1.2 Características morfológicas.....	4
2.1.3 Reproducción.....	5
2.1.4 Acuicultura.....	5
2.1.5 Control de enfermedades en condiciones de cultivo.....	6
2.2 <i>Neobenedenia</i> sp.....	8
2.2.1 Características morfológicas.....	8
2.2.2 Impacto en acuicultura.....	10
2.2.3 Tratamientos antiparasitario.....	11
2.3 Sistema inmunológico en peces.....	11
2.4 Herbolaria y sus usos en acuicultura.....	13
3. JUSTIFICACIÓN	15
4. HIPÓTESIS	16
5. OBJETIVOS	17
5.1 Objetivo general.....	17
5.2 Objetivos particulares.....	17
6. MATERIAL Y MÉTODOS	18
6.1 Mantenimiento de peces.....	18
6.2 Obtención y mantenimiento del lote de parásitos.....	19
6.3 Obtención de extractos naturales.....	21
6.4 Evaluación <i>in vitro</i> del efecto anti-parasitario de extractos de origen natural contra el ectoparásito <i>Neobenedenia</i> sp.....	22
6.4.1 Diseño experimental extractos vs adultos de <i>Neobenedenia</i> sp.....	22
6.4.2 Diseño experimental extractos vs huevos de <i>Neobenedenia</i> sp.....	24
6.4.3. Diseño experimental extractos vs. oncomiracidios de <i>Neobenedenia</i> ...	25
6.5. Toxicidad del extracto de jengibre en esquemas de administración crónica <i>in vivo</i> a juveniles de <i>S. lalandi</i>	26

6.6. Respuesta inmunológica y parámetros hematológicos de juveniles de <i>S. lalandi</i> infectados con <i>Neobenedenia</i> sp.....	26
6.7. Respuesta inmunológica de juveniles de <i>S. lalandi</i> infectados con <i>Neobenedenia</i> sp., alimentados con la dieta adicionada con extracto de jengibre.....	27
6.8. Procesamiento de muestras.....	28
6.9. Análisis estadísticos.....	33
7. RESULTADOS.....	34
7.1 Efecto anti-parasitario de los extractos de ajo, jengibre, cebolla, albahaca, papaya y chaparro amargo, contra el ectoparásito monogéneo <i>Neobenedenia</i> sp. en sus tres etapas de desarrollo, adulto, huevo y larva en ensayos in vitro.....	34
7.2 Caracterización de células sanguíneas de <i>S. lalandi</i>	41
7.3 Efecto de la incorporación del extracto de jengibre en la dieta de juveniles de <i>S. lalandi</i>	43
7.4. Respuesta inmunológica y parámetros hematológicos de juveniles de <i>S. lalandi</i> infectados con <i>Neobenedenia</i> sp.....	46
7.5. Respuesta inmunológica en juveniles de <i>S. lalandi</i> infectados con <i>Neobenedenia</i> sp, alimentados con una dieta adicionada con extracto de jengibre.....	51
8. DISCUSIÓN.....	57
8.1 Efecto anti-parasitario de los extractos de ajo, jengibre, cebolla, albahaca, papaya y chaparro amargo, contra el ectoparásito monogéneo <i>Neobenedenia</i> sp. en sus tres etapas de desarrollo, adulto, huevo y larva en ensayos in vitro.....	57
8.2. Respuesta inmunológica y hematológica en juveniles de <i>S. lalandi</i> infestados con <i>Neobenedenia</i> sp.....	61
8.3. Uso y efecto de la incorporación del extracto de jengibre en la dieta de juveniles de <i>S. lalandi</i> sanos y la respuesta inmune de los peces ante la infestación con el ectoparásito <i>Neobenedenia</i> sp.....	63
9. CONCLUSIÓN.....	65
10. LITERATURA CITADA.....	66

Lista de figuras

Figura 1. Mapa de distribución del género <i>Seriola</i> . Los puntos amarillos son áreas donde se han pescado y los puntos rojos representan las granjas donde cultivan el género (Seriola lalandi @ BOLD (1); Global Biodiversity Information Facility (80975) http://www.discover).....	3
Figura 2. Jurel de castilla (<i>Seriola lalandi</i>).....	4
Figura 3. Diseños de jaulas flotantes. A) Jaula circular con sistema de hundimiento, B)Jaula cuadrada, C) Jaula rectangular, D)Seastation, E) Aquapod y F)Aquapod flotante. Fuente: A, B y C) https://www.egersundnet.no/products/fish-farming-nets , D y E) www.innovasea.com F) www.kampachifarm.com	6
Figura 4. Morfología de <i>Neobenedenia</i> sp., tinción de tricomia de Gomori. Escala de la barra = 500µm. aa, órgano de fijación anterior; ah, hamuli; as, esclerita accesoria; e, huevo; g, germarium; h, haptor; m, valva marginal; ic, cámara de fertilización interna; oo, ootype; p, faringe; pe, pene; ph, hamuli posterior; t, testículos; te, tendón; u, utero; vd, bazo deferente; vf, folículo vitelino; vr, reservorio vitelino. (Whittington, 2012).....	9
Figura 5. Ciclo de vida de <i>Neobenedenia</i> sp. Los adultos miden entre 2 a 7 mm (Whittington, 2012).....	9
Figura 6. Localización de los órganos linfoides en peces (http://albeitar.portalveterinaria.com/imprimir-noticia.asp?noti=3346).....	12
Figura 7. Método de colecta e incubación de huevos de <i>Neobenedenia</i> sp. A) Colectores en manguera de aireación, B) Colector en caja Petri, C) Colector con huevos de visto bajo estereoscopio. D) Huevos de <i>Neobenedenia</i> sp.....	20
Figura 8. Etapas de desarrollo embrionario de <i>Neobenedenia</i> (Hutson <i>et al.</i> , 2012). A) Etapa I: no embrionado, B) Etapa II: embrionado, C) Etapa III: en desarrollo, D) Etapa IV: eclosionado. Escala = 50µm.....	21
Figura 9. Ejemplo del diseño experimental de la evaluación <i>in vitro</i> extractos vs adultos de <i>Neobenedenia</i> sp.....	23
Figura 10. Bioensayo adultos de <i>Neobenedenia</i> vs. extractos <i>in vitro</i>	23
Figura 11. Ejemplo del diseño experimental para evaluación <i>in vitro</i> extractos vs huevos de <i>Neobenedenia</i> sp.....	24

Figura 12. Ejemplo del ensayo <i>in vitro</i> larvas vs extractos.....	25
Figura 13. Diagrama de alimentación, infección y muestreo.....	27
Figura 14. Huevos de <i>Neobenedenia</i> sp. A) Huevos de 8 días del tratamiento control, marcado con la flecha se puede observar la apertura del opérculo por donde salió la larva. B) Huevos después de 8 días en inmersión en Jengibre 1:10, todos se observan cerrados.....	37
Figura 15. Tasa de eclosión (%) de huevos de <i>Neobenedenia</i> sp. inmersos en los diferentes extractos naturales, etanol y control en agua de mar. (a) dilución 1:100, (b) dilución 1:50 y (c) dilución 1:10.....	38
Figura 16. Células sanguíneas de <i>S. lalandi</i> teñidas con Giemsa (100x).....	42
Figura 17. Expresión relativa en A) timo y B) riñón cefálico de TNF/EF1- α y en C) timo y D) riñón cefálico de IL1- β /EF1- α en peces sin infección alimentados con la dieta adicionada con jengibre y peces con dieta control.....	46
Figura 18. Corte histológico de tejido de piel de <i>S. lalandi</i> . A) La flecha señala a un individuo de <i>Neobenedenia</i> sp, Op. Opistohaptor, E. epidermis del pez. B) Corte histológico de un juvenil de <i>S. lalandi</i> sin infección, las flechas indican: células de mucosas llenas (teñidas de azul) y células de mucosas vacías. C) Corte de histológico de un juvenil con infección donde se observa un mayor número de células de mucosa llenas.....	47
Figura 19. Índice de producción de mucinas en juveniles de <i>S. lalandi</i> sin infección y juveniles infectados con <i>Neobenedenia</i> sp.....	48
Figura 20. Expresión relativa. A) timo y B) riñón cefálico de TNF/ EF1 α , en C) timo y B) riñón cefálico de IL1 β /EF1 α de peces infectados con <i>Neobenedenia</i> sp y peces sin infección.....	51
Figura 21. Intensidad de infección con <i>Neobenedenia</i> sp en juveniles de <i>S. lalandi</i> registrada durante el bioensayo.....	52
Figura 22. Índice de producción de mucinas en juveniles de <i>S. lalandi</i> infectados con <i>Neobenedenia</i> sp. y alimentados con las dietas suplementadas con jengibre.....	53
Figura 23. Expresión relativa. A) timo y B) riñón cefálico de TNF/ EF1 α . C) timo y D) riñón cefálico de IL1 β /EF1 α de <i>S. lalandi</i> infectados con <i>Neobenedenia</i> sp. y alimentados con dietas adicionadas con jengibre.....	56

Lista de tablas

Tabla I. Enfermedades reportadas para Jurel de Castilla en condiciones de cultivo y sus respectivos tratamientos (Sheppard, 2004). NA, indica que no hay tratamiento.....	7
Tabla II. Programa de alimentación diaria (Avilés y Castelló, 2004).....	19
Tabla III. Listado de extractos naturales que se utilizaron para evaluar su efecto anti-parasitario contra <i>Neobenedenia</i> sp en ensayos <i>in vitro</i>	22
Tabla IV. Supervivencia de adultos de <i>Neobenedenia</i> sp, producción de huevos y tiempo de sujeción, durante 24-h de inmersión en los extractos naturales, control de etanol y control con agua de mar (35 g L ⁻¹).....	36
Tabla V. Supervivencia de larvas de <i>Neobenedenia</i> sp., durante 8 h de inmersión en los tratamientos con extractos de plantas, etanol y agua de mar (35 g L ⁻¹).....	40
Tabla VI. Parámetros de crecimiento de juveniles de <i>S. lalandi</i> , después de alimentar con la dieta adicionada con jengibre (dosis 1g/kg pez).....	44
Tabla VII. Valores de hematocrito y hemoglobina obtenidos en cada uno de los tiempos de muestreo, durante la alimentación con dieta adicionada con jengibre (dosis 1g / kg pez).....	45
Tabla VIII. Prevalencia e intensidad de infección en juveniles de <i>S. lalandi</i> infectados con <i>Neobenedenia</i> sp.....	47
Tabla IX. Parámetros de crecimiento de juveniles de <i>S. lalandi</i> infectados con parásitos de <i>Neobenedenia</i> sp, comparado a juveniles sin infección.....	49
Tabla X. Valores de hematocrito, hemoglobina, fórmula sanguínea y formula leucocitaria obtenidos en cada uno de los tiempos de muestreo para peces sin infección e infectados.....	50
Tabla XI. Parámetros de crecimiento de juveniles de <i>S. lalandi</i> infectados con parásitos de <i>Neobenedenia</i> sp y alimentados con dietas adicionadas con jengibre.....	53
Tabla XII. Valores de hematocrito, hemoglobina, formula sanguínea y formula leucocitaria obtenida en cada una de las dosis de jengibre y dieta control.....	55

1. INTRODUCCIÓN

El cultivo de jureles es la empresa de acuicultura marina más exitosa a nivel mundial (Sicuro y Luzzana, 2016). Comenzó en Japón en los años 50 y en 1960 emprendieron el cultivo en jaulas flotantes en el mar (Whittington *et al.*, 2001). Sin embargo, la intensificación y comercialización de productos acuícolas ha facilitado la ocurrencia de epidemias limitando el cultivo de algunas especies (Bondad-Reantaso *et al.*, 2005). Son muchas las especies de patógenos que ha afectado el cultivo de *Seriola* spp y el ectoparásito del género *Neobenedenia*, es uno de los capsálidos que ha provocado mortalidades masivas y amenazan el éxito de los cultivos (Hirazawa *et al.*, 2001; Hutson, 2007; Hutson *et al.*, 2007; Ohno *et al.*, 2008; Sharp *et al.*, 2003). Solo en Japón se reporta que el costo operativo para el manejo de enfermedades parasitarias con monogeneos constituye el 20% del costo total de la producción (Tubbs y Tingle, 2006; Whittington, 2012).

El control efectivo de las enfermedades parasitarias en sistemas acuícolas es muy complejo, se requiere de un diagnóstico oportuno, medidas de prevención y tratamientos efectivos, para lo cual es indispensable conocer el ciclo de vida del parásito. Actualmente para el manejo de enfermedades parasitarias en peces marinos, se reporta el uso del anti-parasitario Praziquantel vía oral y los baños con agua dulce, formalina y peróxido de hidrógeno (Hirazawa *et al.*, 2016b). Sin embargo, estos tratamientos afectan a los parásitos en estadio adulto, pero tienen poco o ningún efecto sobre los huevos y embriones en desarrollo (Brazenor y Hutson, 2015; Ernst *et al.*, 2005). Además, los baños son tratamientos que requieren gran esfuerzo laboral, son estresantes para los peces y se desconocen las consecuencias en el ambiente. Hasta la fecha no existe un método o tratamiento que garantice el control efectivo de las enfermedades parasitarias en sistemas acuícolas (Hirazawa *et al.*, 2016b).

De aquí la imperiosa necesidad de encontrar estrategias que permitan mejorar las condiciones de salud de los peces, así como, prevenir y combatir las infestaciones

parasitarias en los cultivos. La utilización de productos naturales para el tratamiento y control de enfermedades en la acuicultura es una línea de investigación que emerge por la necesidad de eliminar o reducir el uso de antibióticos y productos químicos en la producción de alimentos para consumo humano.

2. ANTECEDENTES

2.1 Jurel de Castilla (*Seriola lalandi*, Valenciennes, 1833).

El género *Seriola* pertenece a la Familia Carangidae. Son peces pelágicos de amplia distribución desde mares templados hasta subtropicales y profundidades de 20 a 70 metros (Fig. 1). Los peces agrupados en este género pueden alcanzar tallas máximas de 190 cm de longitud total y 80 kg de peso, son carnívoros depredadores y se alimentan principalmente de macarela, anchoveta, sardina y calamar (Aviles y Castelló, 2004).

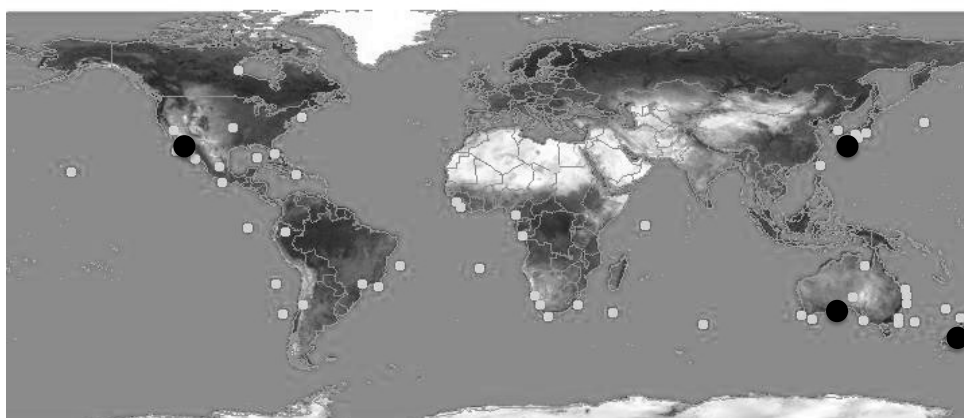


Figura 1. Mapa de distribución *Seriola lalandi* (Valenciennes, 1833). Los puntos blancos son áreas donde se han pescado y los puntos negros representan las granjas donde se cultivan (Fuente: *Seriola lalandi* @ BOLD (1); Global Biodiversity Information Facility (80975) <http://www.discove>).

2.1.1 Taxonomía:

Reino: *Animalia*

Filo: *Chordata*

Clase: *Actinopterygii*

Orden: *Perciformes*

Familia: *Carangidae*

Género: *Seriola*

Especie: *S. lalandi*

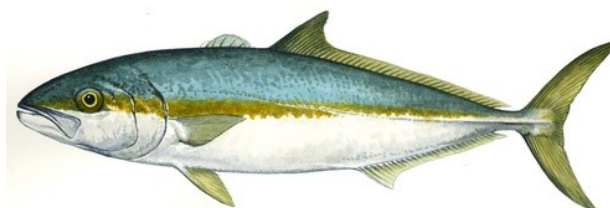


Figura 2. Jurel de castilla (*S. lalandi*).

2.1.2 Características morfológicas.

Los peces de la Familia Carangidae se caracterizan por presentar dos aletas dorsales, la primera aleta tiene seis espinas unidas por una membrana y siete radios, la segunda aleta dorsal tiene de 33 a 36 radios. La aleta anal, posee de dos a tres espinas y de 20 a 22 radios. Las aletas pectorales son más cortas que las pélvicas y la aleta caudal es furcada. El pedúnculo caudal delgado y presenta escamas en la línea lateral formando una quilla sobre el pedúnculo caudal en los adultos. *S. lalandi* (Fig. 2) se identifica por presentar las esquinas de la parte posterior del maxilar redondeadas. El arco branquial puede presentar de ocho a nueve branquiespinas en la parte superior y de 18 a 21 en la parte inferior. Once vértebras precaudales y 14 caudales. En los adultos el dorso presenta color azulado, lados y vientre plateados, una estrecha franja amarilla que se extiende

desde el hocico a través del ojo y a lo largo de la línea medio-lateral del cuerpo (Avilés y Castelló, 2004; Castelló, 2013).

2.1.3. Reproducción.

Su reproducción es asincrónica con desoves múltiples de aproximadamente 50,000 huevos por día (Avilés y Castelló, 2004). Según estudios con especímenes silvestres, la talla de maduración es de 925 y 1275 mm (longitud furcal) para machos y hembras respectivamente (Poortenaar *et al.*, 2001). El desove se da en un rango de temperatura óptima entre 17 y 25 °C, inducido por la luz. Los huevos miden de 1.33 a 1.5 mm de diámetro, son transparentes, redondos, pelágicos y con una sola gota de aceite de 0.30 a 0.33 mm de diámetro (Moran *et al.*, 2007).

2.1.4 Acuicultura.

De las especies de *Seriola*, el jurel de Castilla (*S. lalandi*) tiene el segundo lugar en volumen de producción, esto se debe a su rápido crecimiento, fácil domesticación, aceptación a condiciones de confinamiento y alimento seco, además, su carne es de alta calidad y de alto valor comercial (Castelló, 2013). El cultivo del *Seriola* spp cuenta con más de 60 años de antigüedad, y actualmente, los principales países productores son; Japón, China, Australia y Nueva Zelanda (Sicuro y Luzzana, 2016).

La reproducción y crianza de juveniles se lleva a cabo en sistemas controlados y la engorda de los juveniles en jaulas flotantes (Hutson *et al.*, 2007). El sistema de cultivo en jaulas flotantes (Fig. 3) es una tecnología que ha permitido reducir los costos de producción con la misma capacidad de producción que una granja en tierra, sin embargo, en este tipo de sistemas no se puede controlar la calidad de agua ni la presencia de agentes patógenos en la fauna que se encuentra fuera de las jaulas, por lo que genera un ambiente propicio para el establecimiento y transmisión de patógenos (Nowak, 2007).

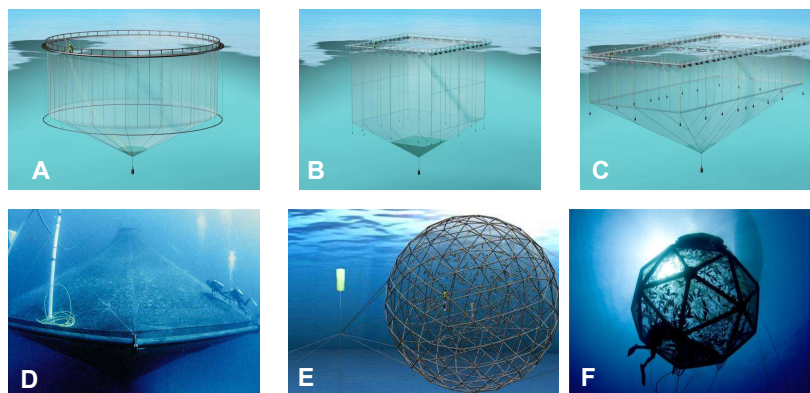


Figura 3. Diseños de jaulas flotantes. A) Jaula cilíndrica con sistema de hundimiento, B) Jaula cúbica, C) Jaula rectangular, D) Sea station, E) Aquapod y F) Aquapod sumergible. Fuente: A, B y C) <https://www.egersundnet.no/products/fish-farming-nets>, D y E) www.innovasea.com F) www.kampachifarm.com.

2.1.5 Control de enfermedades en condiciones de cultivo

A medida que la producción acuícola se intensifica también aumentan la ocurrencia de enfermedades virales, bacterianas y parasitarias (Bondad-Reantaso *et al.*, 2005). A nivel de producción acuícola es común el uso de antibióticos para evitar pérdidas económicas o la propagación de enfermedades (Tabla I). Los antibióticos son administrados vía oral en el alimento, en inmersión o inyecciones como tratamiento o como media profiláctica (Rico *et al.*, 2013). El desarrollo de vacunas ha demostrado ser muy efectivo para el tratamiento contra vibriosis y furunculosis, no obstante, para la mayoría de las enfermedades la producción de vacunas efectivas es todavía muy difícil (Ringo *et al.*, 2014).

Para combatir enfermedades parasitarias los tratamientos más utilizados son inmersiones en agua dulce o químicos (formol, peróxido de hidrógeno), así como, el uso de antiparasitarios como Praziquantel, sin embargo, su efectividad es temporal y no erradica la infección (Whittington, 2012; Yamamoto y Fukushima, 2014).

Tabla I. Enfermedades reportadas para jurel de Castilla en condiciones de cultivo y sus respectivos tratamientos (Sheppard, 2004). NA, indica que no hay tratamiento.

Origen	Nombre de la enfermedad	Tratamiento
Bacteriano	<i>Lactococcus</i> (antes <i>Streptococcus</i>) <i>Lactococcus garvieae</i>	Vacunas. Antibióticos vía oral y quimioterapia. Tratamientos por al menos 10 días.
	Photobacterium <i>Photobacterium damsela piscicida</i>	Antibioticos orales.
	Nocardia <i>Nocardia seriolae</i>	NA
	Mycobacterium <i>Mycobacterium marinum</i>	NA.
	Vibrio en ojos <i>Listonella anguillarum</i>	Vacunas, antibioticos y quimioterapia.
	Listonella dermatitis <i>Listonella / Vibrio</i>	Vacunas. Antibióticos orales (10 días mínimo).
	Piel, aletas y boca <i>Tenacibaculum</i>	Antibióticos orales.
	Epitheliocystis <i>Chlamydia</i>	NA
	Enrojecimiento de cerebro Meningitis	NA
	Myxobolus en cerebro <i>Myxobolus buri</i>	NA
Parasitario	Tremátodos en sangre <i>Paradeontacylix sanguinicoloides</i>	NA
	Parásitos en piel <i>Benedenia seriolae</i> <i>Neobenedenia</i>	Inmersión en agua dulce y quimioterapia en baños.
	Parásitos en branquias <i>Zeuxapta seriolae</i> <i>Heteraxine heterocerca</i>	Quimioterapia en inmersión y tratamientos orales.
Viral	YAV ("Yellowtail Ascites Virus") Aquabirnavirus	NA
	RSIV Iridovirus	NA

En la mayoría de los casos no hay tratamiento, por lo que el uso de buenas prácticas de manejo, y de higiene, así como, registro diario de salud de los peces y monitoreo de condiciones ambientales, son la única manera para evitar epidemias y controlar las enfermedades en los sistemas de cultivo (Castelló, 2013).

2.2. *Neobenedenia* sp.

Neobenedenia sp. pertenece a la Clase Monogenea, Familia Capsalidae, es un ectoparásito que infecta las branquias, piel y aletas de peces marinos y dulceacuícolas. Actualmente las especies descritas para el género *Neobenedenia* se encuentran bajo revisión ya que se ha demostrado que las características morfológicas no son evidencia suficiente para diferenciarlas (Whittington, 2012), por lo que, se está recurriendo a técnicas moleculares para tratar de hacer una descripción más fidedigna de las especies. Por esta razón en la tesis nos referiremos al parásito como *Neobenedenia* sp.

2.2.1 Características morfológicas.

El cuerpo es aplanado dorso-ventralmente y se conforma por cabeza y tronco. En el extremo anterior se encuentra el prohaptor, el cual presenta glándulas adhesivas u órganos cefálicos (Fig. 4). En el extremo posterior se encuentra el opistohaptor, el cual consiste de una ventosa con ganchos que permiten al parásito fijarse al hospedero. En conjunto el prohaptor y el opistohaptor permiten al monogéneo reptar y fijarse permanentemente a su hospedero (Klaus Rohde, 1978). La superficie del cuerpo de los adultos está formada por una neodermis no ciliada. El sistema digestivo se conforma por una faringe (órgano succionador) y ciegos intestinales. Un adulto mide entre 2 y 7 mm con un promedio de 2.9 mm (Whittington, 2012).

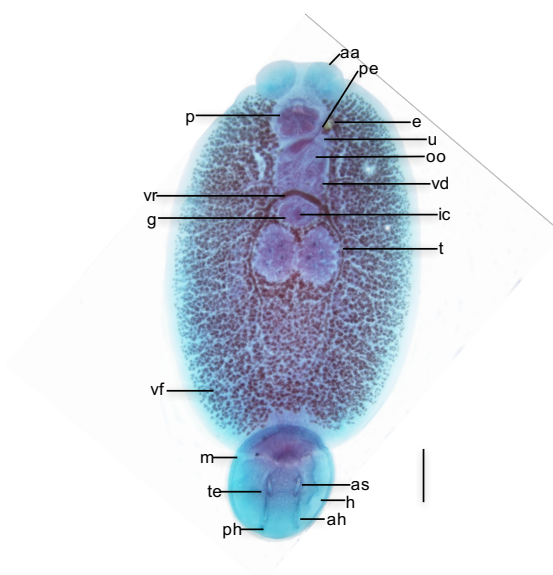


Figura 4. Morfología del estadio adulto de *Neobenedenia* sp. Tinción de tricromía de Gomori. Escala de la barra = 500 μ m. aa, órgano de fijación anterior; ah, hamuli; as, esclerita accesoria; e, huevo; g, germarium; h, haptor; m, valva marginal; ic, cámara de fertilización interna; oo, ootype; p, faringe; pe, pene; ph, hamuli posterior; t, testículos; te, tendón; u, útero; vd, bazo deferente; vf, folículo vitelino; vr, reservorio vitelino (Whittington, 2012).

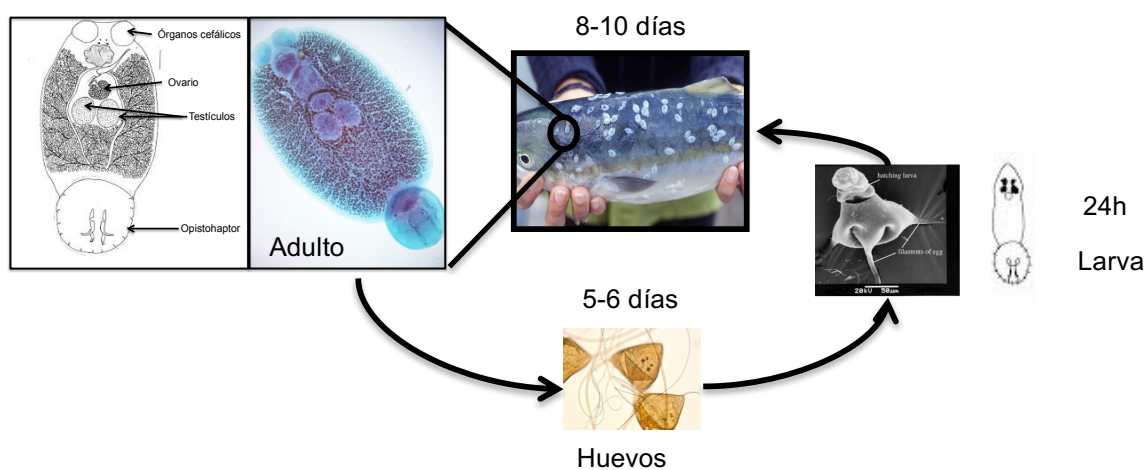


Figura 5. Ciclo de vida de *Neobenedenia* sp. Los adultos miden de 2 a 7 mm (Whittington, 2012).

El género *Neobenedenia*, tiene ciclo de vida directo (Fig. 5), son hermafroditas complejos y poseen varios mecanismos de reproducción, incluyendo: oviparidad, autofecundación e inseminación cruzada (Ogawa *et al.*, 2014). El adulto produce aproximadamente 8 ± 2 huevos/parásito/hora (Hoai y Hutson, 2014). El huevo es de forma tetraédrica con un filamento largo y dos cortos en forma de ganchos, el huevo eclosionan en un periodo de 5 a 6 días liberando una larva llamada oncomiracidio, libre nadadora, ciliada, ocelada, de fototactismo positivo (Ishida *et al.*, 2007), capaz de re-infectar a su hospedero primario. En un lapso de 8 a 10 días después de fijado en su hospedero el parásito comenzará a producir huevos (Whittington, 2012), este periodo varía dependiendo de la temperatura del agua, a mayor temperatura (20-30 °C), el tiempo de desarrollo disminuye (Hirazawa *et al.*, 2010).

2.2.2 Impacto en acuicultura.

Neobenedenia sp afecta a más de 100 especies y cerca de 30 familias de peces (Whittington, 2012). A nivel comercial las especies afectadas son: en el sur-este de Asia el Mero de manchas naranjas *Epinephelus coioides*, *Lutjanus johnnii*, el Pargo de manglar *Lutjanus argentimaculatus* y *Pinjalo pinjalo* (Seng, 1997); en Japón al Pez limón *S. dumerili*, al Medregal o Pez fuerte *S. rivoliana*, el Medregal de Japón *S. quinqueradiata*, Lenguado del Pacífico noroccidental *Paralichthys olivaceus* y *Verasper variegatus* (Hirayama *et al.*, 2009; Hirazawa *et al.*, 2016b; Ogawa *et al.*, 1995; Ohno *et al.*, 2009; Sicuro y Luzzana, 2016); en Indonesia y Australia afecta al Barramundi *Lates calcarifer* (Hutson *et al.*, 2012; Seng, 1997) y en México al Jurel de Castilla *S. lalandi* (Aviles y Castelló, 2004).

Dado que se alimenta del mucus y células epiteliales del pez hospedero, altos niveles de infección pueden ocasionar hemorragias, inflamación e hiperproducción de mucus, incluso muerte (Hirazawa *et al.*, 2016a). También se reporta que el nivel de infección afecta el crecimiento, el factor de conversión alimenticia y el grosor de la epidermis (Hirayama *et al.*, 2009). A su vez, peces altamente

infectados dejan de comer, cambian de coloración en su cuerpo, se tallan contra cualquier superficie llegando a producirse úlceras, infecciones secundarias bacterianas o virales, que en conjunto causan la muerte del hospedero (Thoney y Hargis, 1991).

2.2.3 Tratamientos antiparasitarios.

El control efectivo de las enfermedades parasitarias en sistemas acuícolas es complejo, se requiere de un diagnóstico oportuno, medidas de prevención y tratamientos efectivos (Ogawa, 2015; Seng, 1997).

En la acuicultura, el anti-helmíntico Praziquantel ya sea vía oral o por medio de inmersión ha sido utilizado para tratar epidemias con parásitos internos y externos (Thoney y Hargis, 1991). Se ha demostrado su efectividad como tratamiento antiparasitario en *S. lalandi* (Sharp *et al.*, 2004; Tubbs y Tingle, 2006), *S. quinqueradiata*, *S. dumerili* (Hirazawa *et al.*, 2013) y *Scomber japonicus* (Yamamoto *et al.*, 2011).

Recientemente el tratamiento con 75 ppm de peróxido de hidrógeno ha demostrado ser efectivo para el tratamiento de ectoparásitos en *S. dumerili*, *S. quinqueradiata* (Hirazawa *et al.*, 2017, 2016b) y *S. lalandi* (Mansell *et al.*, 2005).

Además se han evaluadas otras estrategias como son: el tratamiento con agua dulce (Fajer-Ávila *et al.*, 2008); el uso de sombras sobre las jaulas de cultivo (Yamamoto *et al.*, 2011); la inmersión en buffer de calcio y magnesio (Ohashi *et al.*, 2007); la inmersión en 400 ppm de formalina (Sharp *et al.*, 2004), así como el uso de peces limpiadores (Grutter *et al.*, 2002; Souza *et al.*, 2012).

2.3. Sistema inmunológico en peces.

El sistema inmune en peces se puede dividir en dos, según el tipo de respuesta: en sistema inmune innato, que consiste en los mecanismos que posee el organismo para eliminar o bloquear de manera inespecífica la entrada de

patógenos y el sistema inmune adaptativo que es inducible y requiere la presencia de células que reaccionan de manera específica con el antígeno inductor (Tort *et al.*, 2003).

El sistema inmune innato en peces provee la primera línea de defensa. Las escamas, piel y las membranas mucosas que recubren las branquias y el tracto gastrointestinal constituyen esta primera línea de defensa contra patógenos en peces (Magnadóttir, 2006). La producción de moco que recubre la piel y escamas es el mecanismo de defensa más importante, ya que contiene lisozimas, proteasas, factores del complemento, proteína reactiva C, lectinas, interferones, eicosanoides, transferrina, péptidos y diversos carbohidratos que le confieren propiedades antimicrobianas y anti-parasitarias (Alvarez-Pellitero, 2008).

El sistema inmune adaptativo protege al organismo contra infecciones recurrentes a través de la producción de células de memoria y receptores específicos como las células T e inmunoglobulinas que permiten una respuesta rápida y eficiente para la eliminación de patógenos específicos. La respuesta inmune en peces depende tanto de la respuesta celular como de la humoral y poseen órganos (Fig. 6) dedicados a la respuesta inmune como son riñón cefálico, bazo, timo y tracto gastrointestinal (Kiron, 2012).

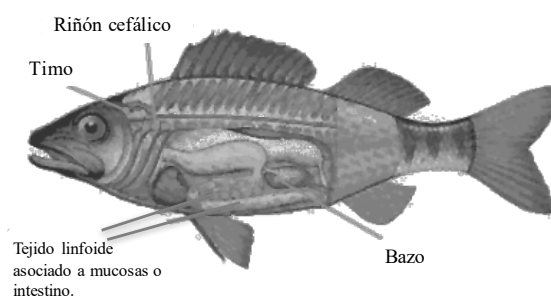


Figura 6. Localización de los órganos linfoides en peces (Tomado de: <http://albeitar.portalveterinaria.com/imprimir-noticia.asp?noti=3346=>).

A nivel celular, los leucocitos son las células involucradas en el sistema inmune de peces y se encuentran en sangre circulante o en tejidos. Los leucocitos se clasifican, siguiendo criterios morfológicos en: linfocitos, granulocitos (no siempre están descritos en peces) y monocitos / macrófagos. Los macrófagos constituyen la principal célula fagocítica en los peces (Whyte, 2007).

La infestación con *Neobenedenia* sp., provoca daño en la epidermis y afecta su grosor (Hirayama *et al.*, 2009; Truhillo *et al.*, 2014), incrementa el número de células de mucosas, la secreción de mucus en piel (Hirazawa *et al.*, 2011) y se reporta que provoca el incremento en los niveles de anticuerpos en el mucus y suero, así como, el incremento en el número de células eosinófilas en el tejido (Kishimori, 2010; Kishimori *et al.*, 2015).

2.4. Herbolaria y sus usos en acuicultura.

En la acuicultura, con la finalidad de reemplazar el uso de antibióticos, se ha retomado los conocimientos de herbolaria tradicional para el control y tratamiento contra enfermedades. Las plantas son ricas en metabolitos secundarios capaces de combatir enfermedades bacterianas, virales y parasitarias en peces. Además, ofrecen una alternativa segura para el medio ambiente y para el ser humano (Stratev *et al.*, 2017).

Más de 250 especies de plantas de 75 familias y 32 órdenes que pueden ser suministradas vía oral, en inmersión o inyección intraperitoneal (Bulfon *et al.*, 2015) han sido evaluadas para su uso como promotores de crecimiento, como métodos profilácticos, tratamientos o moduladores del sistema inmune (Awad y Awaad, 2017; Reverter *et al.*, 2017). El efecto letal de la mayoría de las plantas es atribuido a metabolitos secundarios como son saponinas, alcaloides, taninos, compuestos fenólicos, ligninas, glucósidos y compuestos polipeptídicos (Van Hai,

2015). En la evolución de las plantas, los metabolitos secundarios han sido seleccionados como mecanismos de defensa química o para actuar como compuestos de señalización en interacciones planta-animal, planta-microbios, plantas-plantas. Los metabolitos secundarios interfieren en tres áreas: en las proteínas como agonista (estimulando receptores) o como antagonistas (bloqueando receptores); en el ADN y RNA, incluyendo enzimas relacionadas y proteínas regulatorias; y en biomembranas (Wink, 2008). La mayoría de los estudios donde se ha evaluado la eficiencia de la herbolaria tradicional se ha enfocado en enfermedades bacterianas en peces dulceacuícolas (Citarasu, 2010; Ramudu y Dash, 2013; Reverter *et al.*, 2014; Vaseeharan y Thaya, 2014), muy pocos han examinado el efecto anti-helmíntico de las plantas en infecciones parasitarias. Tratamientos con ajo han demostrado ser eficientes en la prevención de infecciones con *Gyrodactylus* spp. en juveniles de *Oreochromis niloticus* (Abd El-Galil y Aboelhadid, 2012), así mismo, disminuye significativamente la tasa de eclosión, longevidad de oncomiracidios y tasa de infección de *Neobenedenia* sp. en *L. calcarifer* (Militz *et al.*, 2013a, 2013b). La inmersión en extractos de ajo y jengibre redujo la infección con *G. turnbulli* en el guppy *Poecilia reticulata* (Fridman *et al.*, 2014; Levy *et al.*, 2015).

El uso de productos naturales para el tratamiento de enfermedades en las especies de importancia acuícola muestra un gran potencial, sin embargo, existe poca información sobre el tratamiento de enfermedades parasitarias en peces marinos, por lo que se requiere de mayor investigación.

3. JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades parasitarias son un problema creciente y de alto costo para la acuicultura de peces marinos. El cultivo del Jurel de Castilla representa la empresa de cultivo de peces más exitosa en el mundo, sin embargo, se encuentra amenazada por el ectoparásito *Neobenedenia* sp. Los tratamientos actualmente utilizados son de alto costo para las empresas, muy estresantes para los peces y se desconoce si ocasionan efectos nocivos para el consumidor, además, ninguno garantiza el controlar este parásito.

De aquí la necesidad de buscar tratamientos alternativos de bajo costo y de origen natural que puedan ser suministrados vía oral en la dieta, de esta manera reducir el nivel de estrés causado a los peces al ser tratados, favorecer la respuesta inmunológica y que no representen un riesgo al ser consumidos por el ser humano.

4. HIPÓTESIS

Considerando las propiedades anti-parasitarias e inmunoestimulantes de los extractos de origen natural, se espera que la supervivencia *in vitro* de *Neobenedenia* sp. sea afectada y a su vez la adición de extractos de origen natural en la dieta del Jurel de Castilla *S. lalandi* infectados con *Neobenedenia* sp, favorezca la respuesta inmune y control de la infección, reduciendo la intensidad y prevalencia de *Neobenedenia* sp.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general.

Evaluar la eficacia de 6 extractos de origen natural con actividad anti-parasitaria, para ser utilizados en el tratamiento contra el ectoparásito *Neobenedenia* sp. en cultivos de *S. lalandi*.

5.2 Objetivos particulares.

1. Evaluar el efecto anti-parasitario de 6 extractos de origen natural (Ajo, Jengibre, Cebolla, Albahaca, Papaya y Chaparro Amargo) contra el ectoparásito monogéneo *Neobenedenia* sp. en sus tres etapas de desarrollo, adulto, huevo y larva en ensayos *in vitro*.
2. Establecer la toxicidad del extracto de mayor actividad anti-parasitaria en un esquema de administración crónica, *in vivo* en juveniles de *S. lalandi*.
3. Determinar *in vivo* el estado de salud en términos de respuesta inmunológica y de parámetros hematológicos de juveniles de *S. lalandi* infectados con el monogéneo *Neobenedenia* sp.
4. Evaluar *in vivo* la respuesta inmunológica de juveniles de *S. lalandi* infectados con *Neobenedenia* sp., al ser alimentados con la dieta adicionada con el extracto de mayor actividad anti-parasitaria.

6. MATERIAL Y MÉTODOS.

El desarrollo de este trabajo se llevó a cabo dentro del marco del proyecto SEP-CONACYT “Genómica funcional de peces marinos” (073C).

6.1 *Mantenimiento de los peces.*

Los peces se recibieron en las instalaciones del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), para esto se prepararon 3 áreas:

- Área de cuarentena: con un sistema de dos tanques circulares de fibra de vidrio con capacidad de 3000 L con aireación y flujo abierto.
- Área para mantenimiento de lote de parásitos: sistema de cuatro tanques circulares de color blanco de 600 L de capacidad cada uno. Cada uno de los tanques con entrada de agua, aire y drenaje independiente. En el área se contaba con control de temperatura ambiental y fotoperiodo.
- Área de bioensayos: se instaló y diseñó un sistema de flujo abierto, de 15 tanques (1000 L cada uno), cada tanque con entrada de agua, aire y drenaje independiente, control de temperatura del agua y fotoperiodo natural.

En todas las áreas se llevó el monitoreo y control de los parámetros fisicoquímicos (temperatura, oxígeno y salinidad), así como, de enfermedades parasitarias (ver apartado 6.2).

La empresa Baja Seas proporcionó los juveniles de *S. lalandi* (100-200 g), estos fueron transportados de las jaulas de cultivo en Bahía Magdalena, Baja California Sur, México a las instalaciones del CIBNOR en La Paz, Baja California Sur.

- Alimentación.

Los peces fueron alimentados dos veces al día con dieta peletizada comercial (marca EWOS y Skretting). La ración diaria de alimentación se determinó según el peso de los juveniles, como lo establecen Avilés y Castelló (2004) (Tabla II).

Tabla II. Programa de alimentación diaria (Avilés y Castelló, 2004).

Peso promedio del pez (g)	Tasa promedio de alimentación diaria (%)	Frecuencia (veces / día)	Tamaño de partícula (mm)
50 - 200	1,5	2	4 - 4.5
200 - 500	1.4	2	6 - 7
500 - 2000	1.3 - 0.5	2	6 - 7

- Monitoreo de parámetros.

Con un equipo de medición multi-parámetro de la marca YSI modelo 85, diariamente se registró el oxígeno, temperatura y salinidad, controlando que los parámetros se mantuvieran dentro del rango óptimo de $5 \text{ mg/L} \pm 0.5$, $25 \text{ °C} \pm 2$ y $35 \text{ g L}^{-1} \pm 2$ respectivamente.

6.2 Obtención y mantenimiento del lote de parásitos.

Del lote de juveniles de *S. lalandi* traídos de las jaulas en Bahía Magdalena B.C.S., se identificaron parásitos de *Neobenedenia* sp., a partir de esta infección se obtuvieron huevos y se prosiguió a realizar la infección controlada de juveniles de jurel de castilla.

Veinte juveniles de jurel se utilizaron para el mantenimiento del parásito. Para garantizar la presencia de una sola especie de parásito, los peces fueron

sometidos a un protocolo de desinfección con inmersiones en agua dulce durante 3 min.

Los huevos de *Neobenedenia* sp. se colectaron del agua de los tanques que contenían peces infectados, para esto, se colocó en la manguera de aireación colectores de cordón de algodón de 30cm de largo (Fig. 7A). Estos fueron incubados por un lapso de 6 ± 1 días en caja Petri con agua a 35 g L^{-1} (previamente tratada y filtrada), bajo condiciones controladas de temperatura ($25 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$) y fotoperiodo periodo natural, realizando recambio del 100% del agua cada 24 h (Fig. 7B). Diariamente se examinaba bajo estereoscopio (Leica EZ4D) el grado de desarrollo embrionario de los huevos (Fig. 8). Transcurridos 7 días de incubación, bajo estereoscopio se realizaba la colecta de larvas de *Neobenedenia* sp. utilizando una pipeta de cristal, se contabiliza el número de larvas y se concentraban en un volumen conocido de agua de mar filtrada (35 g L^{-1}). Para la infección inicial se utilizaron 300 larvas por pez. Para garantizar la infección se suspendía el suministro de agua a los tanques y se reducía la aireación durante 1 hora (Hirayama *et al.*, 2009).

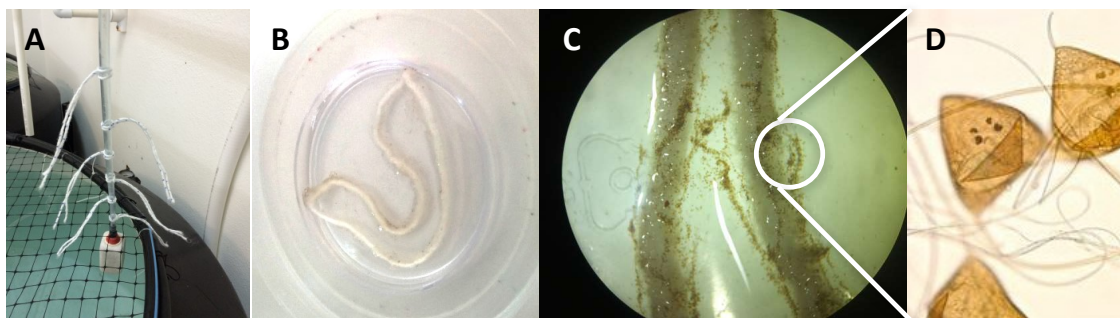


Figura 7. Método de colecta e incubación de huevos de *Neobenedenia* sp. A) Colectores en manguera de aireación, B) Colector en caja Petri, C) Colector con huevos visto bajo estereoscopio, D) Huevos de *Neobenedenia* sp.

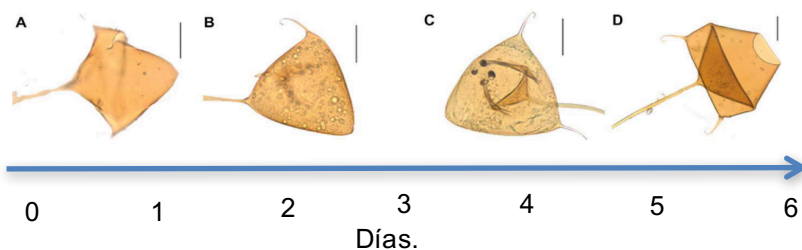


Figura 8. Etapas de desarrollo embrionario de *Neobenedenia* (Hutson *et al.*, 2012). A) Etapa I: no embrionado, B) Etapa II: embrionado, C) Etapa III: en desarrollo, D) Etapa IV: eclosionado. Escala =50 μ m.

Para el suministro constante de parásitos se mantuvo el cultivo de peces parasitados, durante este tiempo el nivel de infección se controló a través de la implementación de protocolos de desinfección y reinfección. El número de huevos en los colectores se utilizó como el indicativo del nivel de infección (baja, < 100 huevos / colector; media, 100 – 499 huevos / colector; y alta > 500 huevos / colector).

6.3 Obtención de extractos naturales.

Los extractos naturales se adquirieron en la empresa Extractos Sigma S.A. de C.V., empresa mexicana que produce extractos naturales estandarizados en flavonoides y polifenoles (taninos, flavonoides, ésteres, entre otros). Las técnicas utilizadas para la estandarización son espectrofotometría, cromatografía de capa fina, HPLC, electroforesis capilar y color platino-cobalto. Los extractos son de grado comestible, para su elaboración se utiliza 20% de materia prima seca de cada planta o fruta por litro de extracto y para todos se utilizó extracción hidroalcohólica (etanol 70%). Los extractos de las plantas se seleccionaron con base a información de medicina naturista y herbolaria tradicional, así como de publicaciones arbitradas (Tabla III), por sus características antiparasitarias e inmuno-estimulantes.

Tabla III. Listado de extractos naturales que se utilizaron para evaluar su efecto anti-parasitario contra *Neobenedenia* sp. en ensayos *in vitro*.

Nombre	Nombre científico	Principal compuesto activo	Referencia
Ajo	<i>Allium sativum</i>	Alicina	(Benkeblia, 2004)
Albahaca	<i>Ocimum basilicum</i>	Geranial/feraniol Linalool	(De Almeida <i>et al.</i> , 2007; Shirazi <i>et al.</i> , 2014)
Cebolla	<i>Allium cepa</i>	Alicina	(Benkeblia, 2004)
Chaparro amargo	<i>Castella tortuosa</i>	Chaparrina (Terpenos)	(Calzado Flores, 1995)
Jengibre	<i>Zingiber officinale</i>	Gingerol	(Ali <i>et al.</i> , 2008)
Papaya	<i>Carica papaya</i>	Papaina	(Citarasu, 2010)

6.4. Evaluación *in vitro* del efecto anti-parasitario extractos de origen natural contra el ectoparásito monogéneo *Neobenedenia* sp.

Los extractos se prepararon en agua de mar esterilizada en tres diluciones 1:10, 1:50 y 1:100. Se utilizaron dos controles uno fue agua de mar 35 g L⁻¹ previamente filtrada y esterilizada, también se evaluó como control el contenido de etanol (70 %) de los extractos en sus tres diluciones 1:10 (7 % etanol), 1:50 (1.4 % etanol) y 1:100 (0.07 % etanol). Se evaluó la toxicidad en los tres estadios de vida; adulto, huevo y oncomiracidio por inmersión continua a temperatura ambiente (25 ± 1 °C), fotoperiodo natural (12:12) y luz indirecta por un periodo de 24 h.

6.4.1 Diseño experimental extractos vs adultos de *Neobenedenia* sp.

Cada extracto de planta, etanol (1:10, 1:50, 1:100) y control agua de mar (35 g L⁻¹) se realizó por sextuplicado, cada réplica con cinco adultos, en total 30 adultos por tratamiento (Fig. 9). Se utilizaron placas de cultivo de tejido de 6 pocillos de fondo plano (15.5 mL volumen total) con tapa de baja evaporación de la marca Becton Dickinson Labware (Fig. 10C)

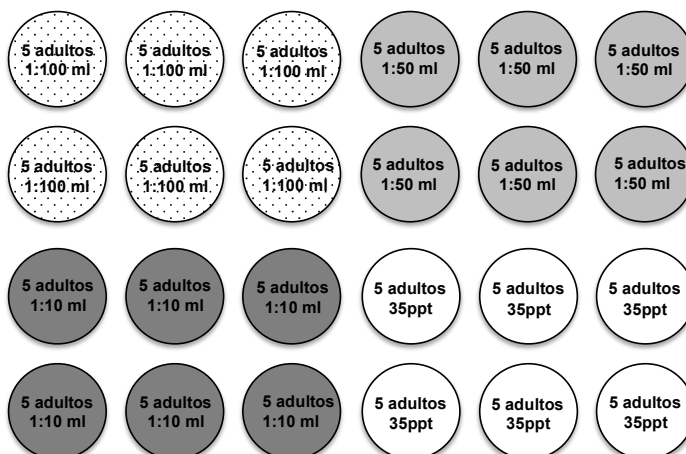


Figura 9. Ejemplo del diseño experimental de la evaluación *in vitro* extractos vs adultos de *Neobenedenia* sp.

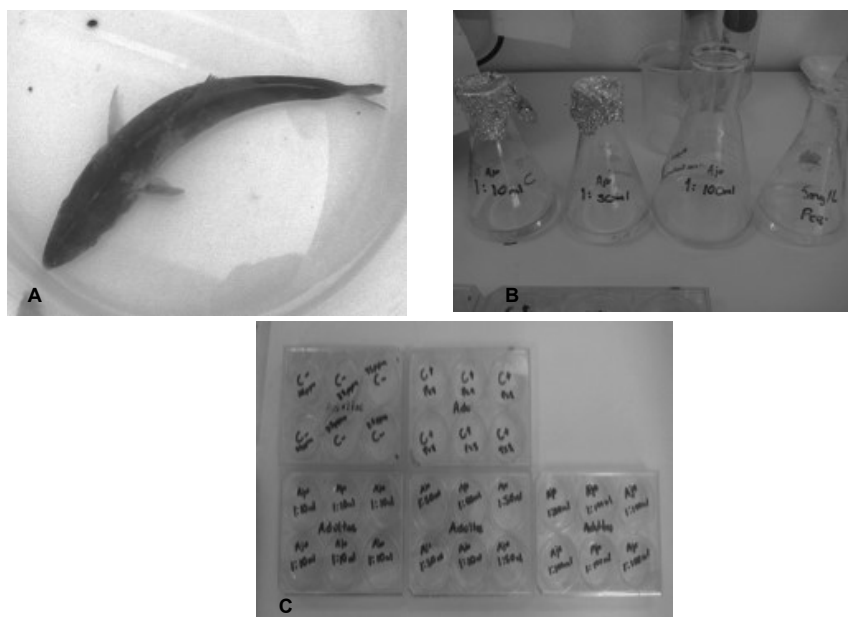


Figura 10. Bioensayo adultos de *Neobenedenia* sp. vs extractos *in vitro*. A) Juvenil de *S. lalandi* altamente infectado, con lesiones visibles en el cuerpo (manchas blancas) y aletas. B) Preparación de tratamientos. C) Placas de incubación.

Para la colecta de parásitos, los jureles fueron anestesiados con Eugenol (dosis 3 mL/ 100 L). Con una aguja de disección con punta de lanceta y espátula, se retiraron uno por uno los adultos de *Neobenedenia sp.* y se colocaron en las placas de incubación con agua a 35 ups (Fig. 10).

Se realizaron observaciones a la hora 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 24 después de inmersión. Se contabilizó el número de huevos producidos en la hora 0 y hora 24. En cada observación se anotó la posición del parásito: suelto o fijo a la placa y su coloración transparente u opaco. La muerte fue definida como el momento en que los individuos dejaron de responder a estímulos como luz y tacto. El efecto de los tratamientos se evaluó en términos de supervivencia y producción de huevos.

6.4.2 Diseño experimental extractos vs huevos de *Neobenedenia sp.*

Para evaluar el efecto sobre los huevos de *Neobenedenia* se utilizaron placas de cultivo de tejido de 6 pocillos, cada extracto, etanol (1:10, 1:50, 1:100) y control con nueve réplicas, cada una con al menos diez huevos (total 90 observaciones por tratamiento) (Fig. 11).

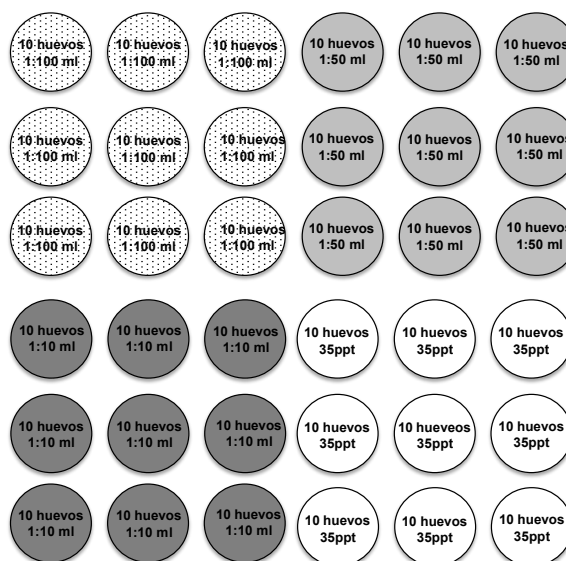


Figura 11. Ejemplo del diseño experimental para evaluación *in vitro* extractos vs huevos de *Neobenedenia sp.*

Se realizaron observaciones cada 24 h durante 8 días. Se registraron los estadios de desarrollo, siguiendo la clasificación de Hutson y colaboradores (2012). El efecto de los tratamientos se evaluó en términos de tasa de eclosión (%) y tiempo de desarrollo embrionario.

$$Tasa\ de\ eclosi3n\ (\%) = \frac{Numero\ de\ huevo\ eclosionados \times 100}{Total\ de\ huevos} \quad (1)$$

6.4.3. Dise3o experimental extractos vs oncomiracidios de *Neobenedenia* sp.

Para este ensayo se utiliz3 una microplaca de 96 pozos (Fig. 12B), cada pozo se consider3 como una r3plica y en cada uno se coloc3 una larva. Para cada tratamiento (extracto, etanol; 1:10, 1:50, 1:100 y control 35 g L⁻¹) se utilizaron 36 r3plicas (Fig.12A).

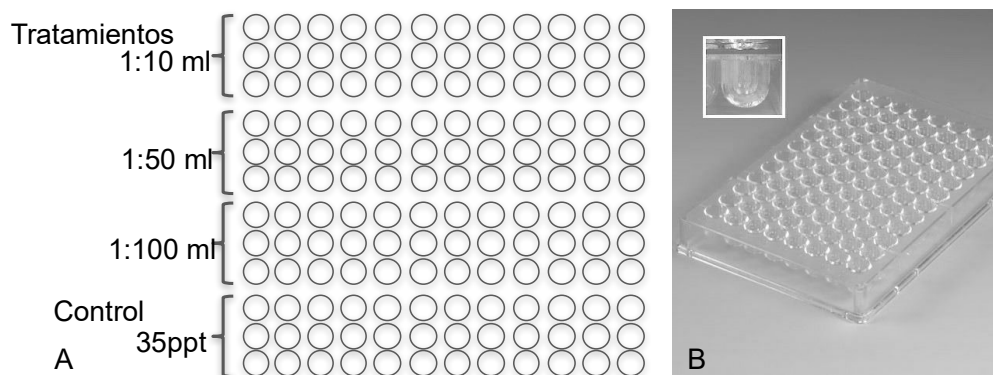


Figura 12. Ejemplo del ensayo *in vitro* larvas vs extractos. A) Dise3o experimental: un oncomiracidio por pozo, 36 r3plicas, por tratamiento. B) Placa de incubaci3n de 96 pozos (Microplaca).

Se realizaron observaciones con la siguiente frecuencia: 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 7 h y 8 h después de la inmersión en los tratamientos. El efecto de los tratamientos se evaluó en términos de supervivencia.

6.5. Toxicidad del extracto de jengibre en esquema de administración crónica in vivo a juveniles de S. lalandi.

Para evaluar si el extracto de jengibre es tóxico al ser suministrado a través del alimento a los juveniles de *S. lalandi* se realizó el siguiente bioensayo. Se evaluó la dieta comercial con extracto de jengibre (dosis 1 g/kg pez) y se comparó con la dieta comercial sin extracto. Para el ensayo se utilizaron juveniles de 300 g (sin infección), se realizó por triplicado y cada réplica con 9 peces. Se alimentaron dos veces al día (1.4 % de la biomasa diario). La duración del bioensayo fue de 45 días. Se realizaron muestreos a los 15, 30 y 45 días. En cada muestreo se sacrificaron 3 peces por réplica (9 peces por tratamiento), cada uno se pesó y midió (longitud total), se tomó muestra de sangre, de intestino para histología, para biología molecular se tomaron muestras de riñón cefálico y timo. En el apartado 6.8 se describe la metodología para cada una de las muestras.

6.6. Respuesta inmunológica y parámetros hematológicos de juveniles de S. lalandi infectados con Neobenedenia sp.

Para este objetivo se hicieron 2 grupos experimentales: un grupo de peces sin infección y el segundo grupo infectados con *Neobenedenia* sp. Ambos se alimentaron con pelet comercial, el 1.4 % de su biomasa al día, dividida en dos raciones. Cada tratamiento por triplicado, con 9 juveniles (300 g de peso) por réplica. La evaluación duró 45 días. Se realizaron muestreos a los 15, 30 y 45 días. En cada muestreo se sacrificaron 3 peces por réplica (9 peces por tratamiento) y se registró peso, talla, el grado de infección, se tomaron muestra de sangre, de piel para histología y muestras de riñón cefálico y timo para biología

molecular. En el apartado 6.8 se describe la metodología para cada una de las muestras.

6.7. *Respuesta inmunológica de juveniles de S. lalandi* infectados con *Neobenedenia* sp., alimentados con la dieta adicionada con extracto de jengibre.

Se evaluaron 2 dosis de jengibre:

1. Dieta 1, dosis de jengibre 1g / kg pez.
2. Dieta 2, dosis de jengibre 0.5g / kg pez
3. Dieta control sin jengibre

Cada tratamiento por triplicado y cada réplica con 9 juveniles de *S. lalandi* (300 g). Se estableció un periodo de aclimatación a la dieta de jengibre de 15 días previo a la infección. El bioensayo tuvo una duración de 45 días, con tres muestreos, el primero 24 horas después de la infección, a los 15 y 30 días del experimento, en cada muestreo se sacrificarán 3 peces por réplica (Fig. 13). Al igual que en el objetivo anterior en cada muestreo se realizaron biometrías, toma de sangre, de muestras de piel para histología, de riñón cefálico y timo para biología molecular, por último se cuantificó la intensidad y la prevalencia de la infección. En el apartado 6.8 se describe la metodología para cada una de las muestras.

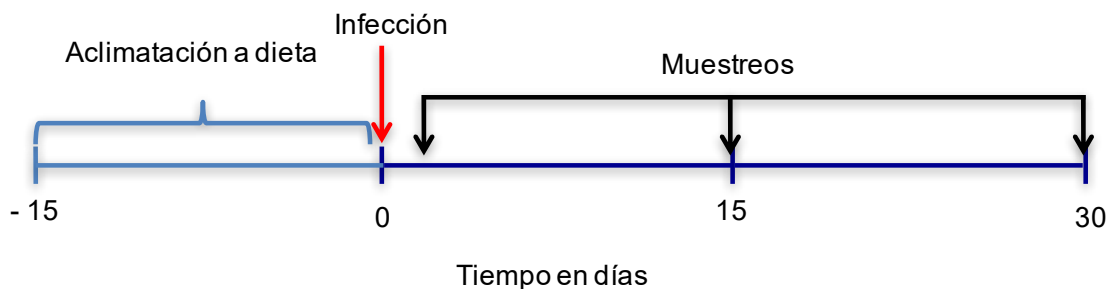


Figura 13. Diagrama de alimentación, infección y muestreo.

6.8 Procesamiento de muestras.

Crecimiento.

El crecimiento de los juveniles se evaluó en:

- Ganancia en peso:

$$GP = \text{peso final (g)} - \text{peso inicial (g)} \quad (2)$$

- Ganancia en longitud:

$$GL = \text{longitud final (mm)} - \text{longitud inicial (mm)} \quad (3)$$

- Tasa de crecimiento específico:

$$TCE = \left(\frac{\text{In peso final (g)} - \text{In peso inicial (g)}}{\text{días}} \right) \times 100 \quad (4)$$

In = logaritmo natural.

- Factor de condición:

$$FC = 100 \times \left(\frac{\text{peso final}}{\text{longitud total final}^3} \right) \quad (5)$$

Parámetros hematológicos.

Se extrajo 2 ml de sangre de la vena caudal utilizando jeringas plásticas de 21G previamente heparinizadas. Y se realizaron las evaluaciones siguientes:

- Determinación de Hematocrito (Hct).

Se llenaron tres tubos de microhematocrito por pez, se sellaron de un extremo y se dejaron sedimentar en posición vertical por 60 min. Después se midió el

plasma y los eritrocitos sedimentados, la lectura se reportó en porcentaje (Del Rio-Zaragoza *et al.*, 2010).

- Conteo Celular Sanguíneo.

Se realizaron frotis de sangre por triplicado de cada uno de los peces para todos los tratamientos. Para esto se colocó una gota de sangre en un extremo del portaobjetos y con un segundo portaobjetos en posición de ángulo agudo, se deslizó la muestra de sangre hacia el extremo opuesto, obteniendo de esta forma, una película delgada de sangre. Los frotis se secaron al aire, fijaron en alcohol absoluto y finalmente se tiñeron con la técnica de tinción de Giemsa, siguiendo las indicaciones del fabricante. Las láminas se observaron en un microscopio compuesto (Olimpus BX41) acoplado a una cámara digital (Nikon DS-Ri1), en objetivo de inmersión (100 X). Se llevó a cabo la identificación por tipo celular, eritrocitos, trombocitos y leucocitos. De leucocitos se lograron identificar, linfocitos, monocitos, neutrófilos, eosinófilos y basófilos (Fijan, 2002; Shigdar *et al.*, 2007). Se obtuvo el diámetro máximo de una muestra de 30 células de cada tipo para su descripción (Hrubec *et al.*, 2000).

Para determinar si la composición sanguínea era afectada por el tiempo y/o el tratamiento, de manera aleatoria se seleccionaron los frotis sanguíneos de tres juveniles de *S. lalandi* de cada uno de los tiempos de muestreo (0, 15 y 30 días) de cada tratamiento, de estas muestras, se contabilizó el total de eritrocitos, leucocitos y trombocitos en 30 imágenes, en promedio se contaron 4846 células por pez, los resultados se presentan en porcentajes. Así mismo, se realizó el conteo diferencial de 200 células blancas (Hrubec *et al.*, 2000), pero en este caso se analizaron los frotis de todos los peces (135 en total).

- Concentración de hemoglobina (Hb).

Se obtuvo la concentración total de hemoglobina de todos los peces por medio del método de cianometahemoglobina (Blaxhall y Daisley, 1973).

Análisis histológicos e histoquímicos.

Los análisis histológicos se llevaron a cabo en el Laboratorio de Histología e Histoquímica de CIBNOR. Las muestras de tejidos (1 cm³) se fijaron en solución de Davidson. Se deshidrataron en alcoholes de concentración ascendente (70, 80, 90, 96 y 100 %), se aclararon con alcohol etílico absoluto y xileno 100 % (1:1) y después por xileno al 100 %. La infiltración de las muestras en parafina punto de fusión de 54 - 56 °C (Paraplast X-Tr Mc Cormick Scientific, San Diego, CA) se realizó con una mezcla de 1:1 de parafina: xileno, para después infiltrarlas en tres recipientes con parafina líquida a 60 °C. La inclusión de las muestras se llevó a cabo en un centro de inclusión (Histoembedder Leica EG1150H y EG1150C®). Los moldes se dejaron enfriar en una placa fría (-5 °C).

Se realizaron cortes de 4µm de grosor con un micrótopo de rotación (Leica RM2155). Se utilizaron dos técnicas de tinción: Hematoxilina-Eosina (Humason, 1979) y Azul Alciano-PAS. Una vez teñidas se montaron con resina sintética y cubreobjetos de vidrio. Las láminas se observaron en un microscopio compuesto (Olimpus BX41), acoplado a una cámara digital (Nikon DS-Ri1).

La tinción de Azul Alciano-Schiff se utilizó para evaluar el contenido de las células de mucosas en piel, este método tiñe de azul los mucopolisacáridos ácidos, de magenta los mucopolisacáridos neutros y azul oscuro la sustancia cartilaginosa.

Para evaluar la respuesta inmunológica, en piel, se cuantificó la producción de mucinas. En total se revisaron 540 imágenes digitales (10 por pez) a 40 x de aumento. Se empleó el software Image-Pro Plus® (v.6.0) y se calculó el área de cobertura de mucinas en piel con la siguiente fórmula (Rosero, 2016).

$$MI = \frac{\text{área de cobertura de mucinas } (\mu\text{m}^2)}{\text{área de la imagen } (\mu\text{m}^2)} \times 100 \quad (6)$$

Infección.

El grado de infestación se evaluó siguiendo los parámetros propuestos por Bush y colaboradores 1997:

- Intensidad: Número de individuos de una especie de parásito infectando un pez hospedero.
- Prevalencia de la infección: Número de peces hospederos infectados con uno o más individuos de una especie de parásito, dividido entre el número de hospederos revisados.

Extracción de ácido ribonucleico (ARN) y cuantificación relativa de los genes IL-1 β y TNF- α

De las muestras de riñón cefálico y timo se llevó a cabo la cuantificación relativa de las citoquinas interleucina-1 β (IL-1 β) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). Ambas citoquinas han sido caracterizadas ampliamente en peces y se ha demostrado que al igual que en mamíferos actúan como moduladores del sistema inmune (Plouffe *et al.*, 2005).

Los análisis se llevaron a cabo en el Laboratorio de Patogénesis Microbiana de CIBNOR. Las muestras de bazo y timo (0.1 g) se fijaron en 1ml de solución de RNAlater siguiendo el protocolo del fabricante.

Las extracciones de ARN total se llevaron a cabo con las instrucciones del fabricante con el reactivo TRIzol. La calidad y la pureza del ARN total se evaluó utilizando métodos espectrofométricos en un Nanodrop 1000 (Thermofisher). La calidad e integridad del ARN total se evaluó mediante electroforesis en geles agarosa TAE-Cloro, para verificar por inspección visual las bandas del ARN ribosomal (ARNr) 18s y 28s (Aranda *et al.*, 2012).

Una vez verificada la calidad del ARN total, se tomó 1 µg de este y se trató con ADNasa I, grado amplificación (Sigma Aldrich), se agregó el buffer y agua hasta 10 µL, se dejó 15 min a TA y posteriormente se le añadió 1 µL de solución de paro (EDTA 50 mM) y se incubó a 70 °C por 15 min. Para la síntesis de ADN complementario (ADNc) se utilizó la enzima Impromp II (Promega, Madison, WI), siguiendo las instrucciones del fabricante y utilizando oligod(T) para la captura de ARNm, el ADNc se almacenó a - 80 °C.

Los oligos fueron probados con una PCR punto final, se utilizó la enzima GoTaq Flexi (Promega, Madison, WI) con los siguientes componentes de reacción: buffer 1X, MgCl₂ 2.5 mM, dNTPs 0.2 mM, oligonucleótidos 0.5 µM de cada sentido, 1.25 u de ADN polimerasa GoTaq Flexi, a la reacción se le agregaron 2 µL de ADNc (1:50 ~ 3.5 ng finales) en un volumen final de 25 µL. El perfil de temperaturas utilizada fue el siguiente: 95 °C 5 min, 35 ciclos de 95 °C 20 s, 60 °C 20 s y 72 °C 20 s, una extensión final de 72 °C por 5 min. Los productos de PCR fueron cargados en un gel de agarosa al 2%, en el buffer de carga se incluyó el agente intercalante RedGel 1X (Biotium), se añadieron 3 µL de 1 kb plus (Invitrogen, 10787018) como marcador de peso molecular. El gel se observó a través de un transiluminador de luz UV, para visualizar las bandas y dímeros existentes.

Una vez identificados los genes de interés, se llevó a cabo la cuantificación relativa de transcritos mediante PCR en tiempo real (qPCR). Para la estandarización de la eficiencia de los oligos, se realizó un agrupamiento de todas las muestras de ADNc, posteriormente se cuantificó la cantidad de muestra y después se realizaron diluciones seriadas (1:5, 1:50, 1:500, 1:5,000 y 1:50,000), para realizar curvas estándar. La mezcla de reacción para el qPCR consistió en: buffer sin color de GoTaq Flexi 1X, 2.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTPs, 1X de EvaGreen (Biotium), 1X de CES (2.7 M de betaína, 6.7 mM DTT, 55 µg/mL de BSA, 6.7% de DMSO), 1.25 u de ADN polimerasa GoTaq Flexi, 0.5 µM de cada oligo; en un volumen final de 15 µL. El perfil de temperaturas fue 95 °C por 5 min,

40 de ciclos de 95 °C 20 s, 60 °C 20 s, 72 °C, extensión final de 72 °C, curva de disociación de 55 °C a 90 °C 1 °C/lectura. Las qPCR se llevaron a cabo en el equipo RotorGene 6000 (Corbette Research). La normalización de la fluorescencia se llevó a cabo utilizando tubos dinámicos y corrección de pendiente, las curvas se estimaron a una línea umbral de 0.034, el cual representa el punto de fluorescencia basal, para la obtención del C_q . Las curvas se evaluaron con 4 puntos de dilución de ADNc (1:50, 1:500, 1:5,000 y 1:50,000)

Se corrieron los genes blancos seleccionados (IL 1 β y TNF- α) utilizando las condiciones anteriormente mencionadas. Los datos de C_q se analizaron mediante el software RotorGene 6000 v1.7, estos datos se exportaron a una hoja de cálculo donde se realizó el cálculo de la expresión relativa $2^{-\Delta\Delta C_q}$ (Livak y Schmittgen, 2001).

6.9. Análisis estadísticos.

Los parámetros evaluados se expresaron como media aritmética con su error estándar. Se utilizó el análisis de varianza ANOVA y finalmente se analizaron con una prueba de comparación múltiple de Tukey ($p < 0.05$) para identificar diferencias significativas entre grupos. Los análisis se realizaron en la plataforma R v. 3.1.3 (R Core Team, 2015).

En el caso específico de los resultados obtenidos en la evaluación *in vitro* de los extractos naturales vs. *Neobenedenia* sp., se realizó la transformación log₁₀ de los datos para satisfacer los requerimientos de normalidad y homogeneidad de variancia.

7. RESULTADOS

7.1 Efecto anti-parasitario de los extractos de ajo, jengibre, cebolla, albahaca, papaya y chaparro amargo, contra el ectoparásito monogéneo Neobenedenia sp. en sus tres etapas de desarrollo, adulto, huevo y larva en ensayos in vitro.

Supervivencia, producción de huevos y tiempo de sujeción de adultos.

La supervivencia de los adultos no es afectada por ninguna de las diluciones del extracto de ajo. En cambio, la inmersión en jengibre y albahaca reduce la supervivencia del parásito. El extracto de jengibre en todas las diluciones reduce significativamente la supervivencia comparado con el control en agua de mar. El tratamiento 1:100 y 1:50 de albahaca afecta significativamente la supervivencia del parásito (Tukey, $P = 0.002$ y $P = 0.0001$, respectivamente). Los tratamientos con albahaca, en la dilución de 1:100 los parásitos viven 12.80 ± 1.98 h y en el tratamiento de 1:50 sobreviven 10.10 ± 1.59 h comparado con el control en agua de mar donde los parásitos viven el doble de tiempo, 23.36 ± 0.64 h (Tabla IV). En los tratamientos con los extractos de chaparro amargo, cebolla y papaya ninguno afecta la supervivencia de los adultos, los parásitos se mantienen transparentes y adheridos a la superficie de la placa de cultivo. En el tratamiento con etanol, la dilución 1:10 es la única que afecta significativamente ($P = 0.0005$), ya que reduce el tiempo de supervivencia a 18.66 h comparado al control en agua de mar (24 h).

La inmersión en los tratamientos con ajo, no afecta la producción de huevos comparado con el control en agua de mar (Tabla IV). No obstante, la producción promedio de huevos se reduce significativamente en las tres diluciones de jengibre (dilución 1:100 $P = 0.00008$, dilución 1:50 $P = 0.0$ y dilución 1:10 $P = 0.0$), de albahaca (dilución 1:100 $P = 0.00002$, dilución 1:50 $P = 0.000003$ y dilución 1:10 $P = 0.0$) y chaparro amargo (dilución 1:100 $P = 0.00005$, dilución 1:50 $P = 0.000004$ y dilución 1:10 $P = 0.0$). En estos tratamientos se reduce más del 70% la

producción de huevos comparados con el control en agua de mar (Tabla IV). Con los extractos de cebolla y papaya, solo el tratamiento más concentrado (1:10) disminuye significativamente ($P = 0.0$ y $P = 0.0$, respectivamente) la producción de huevos. La inmersión de los adultos en las diluciones 1:50 y 1:10 de etanol, redujo significativamente la producción de huevos, a 3.2 ± 1.33 y 0.43 ± 0.23 respectivamente, comparado a 39.56 ± 4.71 promedio de huevos producidos en el control de agua de mar (Tabla IV).

Los parásitos inmersos en los tratamientos (1:10, 1:50 y 1:100) de jengibre son los primeros en soltarse de las placas de incubación. El extracto de jengibre es el de mayor toxicidad en adultos, la coloración del cuerpo de los parásitos cambia de transparente a opaco y el opistohaptor se contrae. En la dilución 1:10 de jengibre, transcurridas 1.56 ± 0.24 h, todos los parásitos se sueltan de la placa de incubación, en comparación con el control donde los parásitos se mantienen adheridos durante 10.80 ± 1.51 h (Tabla IV). El tratamiento 1:100 y 1:50 de albahaca disminuye significativamente ($P = 0.003$ y $P = 0.00005$, respectivamente) el tiempo de sujeción de los parásitos comparado con el control (Tabla IV). Con los extractos de ajo y cebolla solamente la dilución de 1:10 disminuye significativamente ($P = 0.00007$ y $P = 0.002$, respectivamente) el tiempo de sujeción de los parásitos. En cambio, con los extractos de chaparro amargo y papaya el tiempo de sujeción no es afectada (Tabla IV). Los tratamientos 1:50 y 1:10 de etanol reducen el tiempo de sujeción significativamente ($P = 0.0001$ y $P = 0.0$, respectivamente) comparado con el control en agua de mar.

Tabla IV. Supervivencia de adultos de *Neobenedenia* sp., producción de huevos y tiempo de sujeción, durante 24 - h de inmersión en los extractos naturales, control de etanol y control con agua de mar (35 g L⁻¹).

Tratamientos	Temperatura	N	Supervivencia promedio (h)	Producción promedio de huevos por parásito / día.	Tiempo promedio de sujeción (h)
Control 35 g L ⁻¹		6	14.93 ± 3.24	6.97 ± 3.12	14.93 ± 3.24
Ajo - 100	24 ± 1	6	12.26 ± 2.28	17.86 ± 3.70	11.73 ± 2.09
Ajo - 50		6	9.06 ± 1.06	13.26 ± 3.93	8.30 ± 0.60
Ajo - 10		6	7.6 ± 0.22	0.16 ± 0.09	3.83 ± 0.52*
Control 35 g L ⁻¹		6	10.56 ± 1.56	13.5 ± 1.63	10.80 ± 1.51
Jengibre - 100	25 ± 1	6	7.26 ± 0.24*	3.16 ± 1.03*	5.93 ± 0.57*
Jengibre - 50		6	7.43 ± 0.38*	0.36 ± 0.20*	2.53 ± 0.27*
Jengibre - 10		6	2 ± 0.00*	0.06 ± 0.06*	1.56 ± 0.24*
Control 35 g L ⁻¹		5	23.36 ± 0.64	76.98 ± 22.82	23.36 ± 0.64
Albahaca - 100	24 ± 1	6	12.80 ± 1.98*	9.7 ± 1.13*	12.76 ± 1.99*
Albahaca - 50		6	10.10 ± 1.59*	7.36 ± 1.10*	8.83 ± 0.78*
Albahaca - 10		6	22.53 ± 0.92	0.23 ± 0.08*	16.63 ± 1.99
Control 35 g L ⁻¹		4	17.60 ± 1.84	46.12 ± 8.40	17.20 ± 1.64
C. amargo - 100	25 ± 1	6	22.93 ± 1.06	13.66 ± 3.47*	22.23 ± 1.15
C. amargo - 50		6	20.80 ± 1.43	9.06 ± 0.69*	20.80 ± 1.43
C. amargo - 10		6	17 ± 1.02	0 ± 0*	14.93 ± 1.73
Control 35 g L ⁻¹		6	12.80 ± 2.57	48.23 ± 10.73	12.26 ± 2.56
Cebolla - 100	26 ± 1	6	10.13 ± 1.06	60.8 ± 7.89	10.13 ± 1.06
Cebolla - 50		6	8.53 ± 0.53	30.7 ± 7.80	8.53 ± 0.53
Cebolla - 10		6	8 ± 0	0.23 ± 0.09*	5.76 ± 0.42*
Control 35 g L ⁻¹		6	12.80 ± 2.57	48.23 ± 10.73	12.26 ± 2.56
Papaya - 100	26 ± 1	6	11.20 ± 1.16	30.76 ± 1.73	11.20 ± 1.16
Papaya - 50		6	12.26 ± 1.58	30.2 ± 1.97	12.26 ± 1.58
Papaya - 10		6	7.9 ± 0.10	0 ± 0*	7 ± 0.27
Control 35 g L ⁻¹		6	24 ± 0	39.56 ± 4.71	23.46 ± 0.53
Etanol - 100	22 ± 1	6	24 ± 0	40.03 ± 6.95	16.46 ± 1.37
Etanol - 50		6	22.93 ± 0.67	3.2 ± 1.33*	6.5 ± 2.17*
Etanol - 10		6	18.66 ± 1.34*	0.43 ± 0.23*	1.36 ± 0.20*

* Diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$)

Valores expresados como medias ± error estándar

Desarrollo embrionario y tasa de eclosión.

Los huevos de *Neobenedenia* sp. no se desarrollan en la dilución 1:10 de ninguno de los extractos o etanol; los huevos se conservan de coloración café clara durante los 8 días de inmersión, con 0 % de tasa de eclosión (Figs. 14 y Fig. 15c). La tasa de eclosión se reduce significativamente en el tratamiento de albahaca 1:100 (86.6 %) y en el tratamiento con etanol 1:50 (71.11 %) comparado con las demás diluciones de extractos naturales, etanol y control en agua de mar, donde hay 100 % de tasa de eclosión (Fig. 15a y b). La tasa de eclosión no es afectada por ninguno de los extractos naturales en la dilución 1:50, en todos estos tratamientos se obtiene el 100 % de eclosión (Fig. 15b). En las diluciones 1:100 y 1:50 de todos los extractos y control con agua de mar, los huevos comienzan a eclosionar el día 5 y terminan al día 8. En los tratamientos 1:100 y 1:50 de etanol el inicio de la eclosión se atrasa hasta el día 7 y termina al día 8. El desarrollo embrionario es igual en todos los tratamientos. Durante los primeros 3 días después de colectados, los huevos comienzan a cambiar de color café claro a oscuro con apariencia granular, indicando división celular, al día 4 los embriones presentan manchas oculares, al día 5 comienza la eclosión y termina al día 8.



Figura 14. Huevos de *Neobenedenia* sp. A) Huevos de 8 días del tratamiento control, marcado con la flecha se puede observar la apertura del opérculo por donde salió la larva. B) Huevos después de 8 días en inmersión en Jengibre 1:10, todos se observan cerrados.

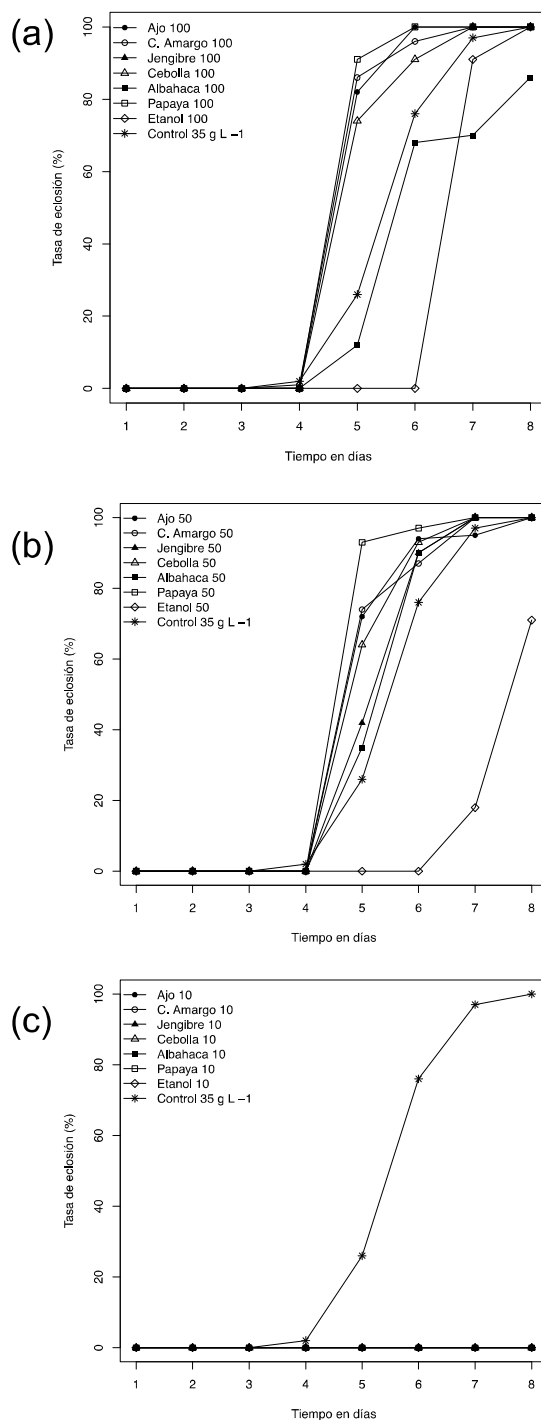


Figura 15. Tasa de eclosión (%) de huevos de *Neobenedenia* sp. inmersos en los diferentes extractos naturales, etanol y control en agua de mar. (a) Dilución 1:100, (b) dilución 1:50 y (c) dilución 1:10.

Supervivencia de larvas de *Neobenedenia* sp.

Con el extracto de ajo, solamente la dilución 1:10 redujo significativamente la supervivencia de las larvas ($P = 0.0005$). En cambio, todas las diluciones de los extractos de jengibre y albahaca afectan la supervivencia significativamente de las larvas. El extracto de jengibre mató a todas las larvas en menos de 4 h, comparada con el control en agua de mar donde el tiempo de vida es de 7.47 ± 0.29 h (Tabla V). Se reduce significativamente la supervivencia en las diluciones 1:50 y 1:10 de chaparro amargo. La supervivencia de las larvas, no es afectada por los tratamientos de cebolla y papaya al comparar los resultados obtenidos en el control agua de mar (Tabla V). Se observa una reducción significativa en la supervivencia de las larvas al ser inmersas en etanol 1:50 ($P = 0.0013$) y 1:10 ($P = 0$).

Tabla V. Supervivencia de larvas de *Neobenedenia* sp., durante 8 h de inmersión en los tratamientos con extractos de plantas, etanol y agua de mar (35 g L⁻¹). * Diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$)

Tratamientos	Temperatura	N	Supervivencia promedio (h)
Control 35 g L ⁻¹		36	7.02 ± 0.28
Ajo - 100	24 ± 1	36	6.16 ± 0.39
Ajo - 50		36	6.66 ± 0.35
Ajo - 10		36	4.88 ± 0.43*
Control 35 g L ⁻¹		36	7.47 ± 0.29
Jengibre - 100	24 ± 1	36	3.36 ± 0.22*
Jengibre - 50		36	1.91 ± 0.29*
Jengibre - 10		36	0*
Control 35 g L ⁻¹		36	7.91 ± 0.06
Albahaca - 100	24 ± 1	36	5.5 ± 0.41*
Albahaca - 50		36	3.61 ± 0.43*
Albahaca - 10		36	0*
Control 35 g L ⁻¹		36	6.38 ± 0.39
C. amargo - 100	25 ± 1	36	4.88 ± 0.40
C. amargo - 50		36	4.3 ± 0.38*
C. amargo - 10		36	0.05 ± 0.03*
Control 35 g L ⁻¹		36	7.88 ± 0.11
Cebolla - 100	26 ± 2	36	7.94 ± 0.05
Cebolla - 50		36	7.55 ± 0.21
Cebolla - 10		36	7.16 ± 0.26
Control 35 g L ⁻¹		36	7.22 ± 0.28
Papaya - 100	25 ± 1	36	7.27 ± 0.29
Papaya - 50		36	7.11 ± 0.28
Papaya - 10		36	7.47 ± 0.27
Control 35 g L ⁻¹		36	7.27 ± 0.22
Etanol 100	22 ± 1	36	7.27 ± 0.25
Etanol 50		36	5.88 ± 0.43*
Etanol 10		36	0.05 ± 0.30*

* Diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$)

Valores expresados como medias ± error estándar

7.2. Caracterización de células sanguíneas de *S. lalandi*.

En la figura 16 se muestran los diferentes tipos de células sanguíneas identificadas.

Eritrocitos.

Células que se caracterizan por su núcleo central bien definido, citoplasma abundante de coloración azul-grisácea, según su estado de maduración pueden ser de forma esférica (inmaduros) u ovalada (maduros). Los eritrocitos de *S. lalandi* miden $9.93 \pm 0.44 \mu\text{m}$ de largo y $6.58 \pm 0.39 \mu\text{m}$ de ancho y su núcleo mide $4.26 \pm 0.20 \mu\text{m}$ de largo y $2.71 \pm 0.16 \mu\text{m}$ de ancho (Fig.16-1). Los eritrocitos representan el $96.98 \pm 0.75 \%$ de la fórmula sanguínea de *S. lalandi*.

Leucocitos.

Los glóbulos blancos en conjunto representan $1.88 \pm 0.61 \%$ de la fórmula sanguínea de *S. lalandi*. Se identificaron 5 tipos de leucocitos:

- Linfocitos. De los leucocitos, son las células más pequeñas, en promedio miden $5.10 \pm 0.36 \mu\text{m}$ de diámetro. Tienen forma esférica, con un núcleo esférico no central y densamente teñidas basófilo; citoplasma ligeramente basófilo en ocasiones no es visible y puede presentar proyecciones (Fig. 16-2).
- Neutrofilos. Células esféricas con citoplasma granuloso ligeramente basófilo con gránulos morados, núcleo acéntrico multi-lobulado (Fig. 16-3). En promedio, miden $8.19 \pm 0.67 \mu\text{m}$ de diámetro.
- Basófilos. Células esféricas, se distinguen por su citoplasma basófilo con gránulos azul oscuro, presentan un núcleo que ocupa la mayor parte de la célula. Diámetro promedio $6.95 \pm 0.86 \mu\text{m}$ (Fig. 16-4).

- Monocito. Célula esférica, se distingue por su gran tamaño $8.55 \pm 0.53 \mu\text{m}$, presenta un núcleo grande no central pudiendo variar de forma desde esférico hasta de forma de riñón y de citoplasma basófilo (Fig. 16-6).
- Eosinófilos. Célula esférica con núcleo acéntrico con gránulos de color morado a rojo oscuro, citoplasma color rosa intenso. Diámetro promedio $6.35 \pm 0.40 \mu\text{m}$ (Fig. 16-7).

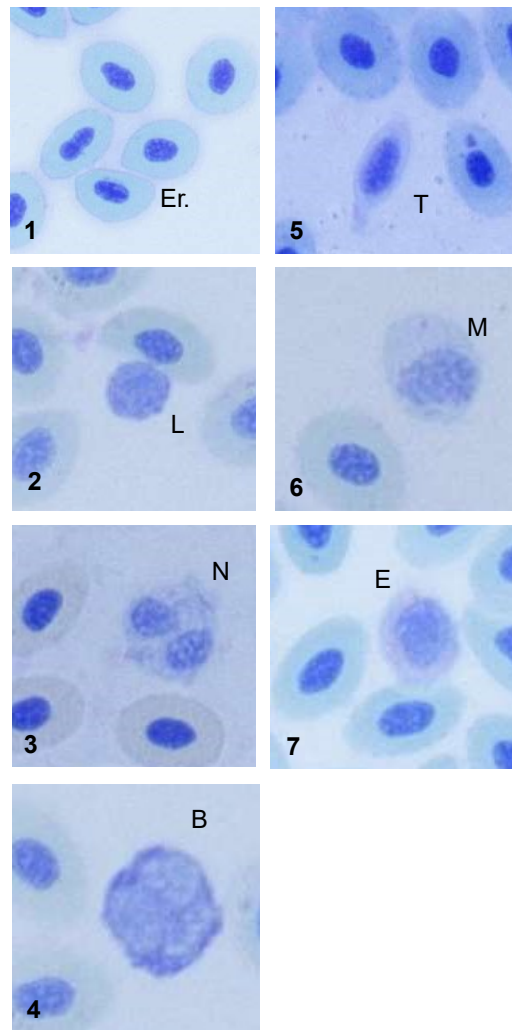


Figura 16. Células sanguíneas de *S. lalandi* teñidas con Giemsa (100x). 1) Er. eritrocito, 2) L. linfocito, 3) N. neutrófilo, 4) B. basófilo, 5) T. trombocito, 6) M. monocito, 7) E. eosinófilo.

Trombocitos.

En *S. lalandi* representan el 1.13 ± 0.25 % de la fórmula sanguínea. Se identifican por su forma elongada, núcleo central elongado color azul oscuro y citoplasma basófilo pálido (Fig. 16-7). Diámetro máximo 8.36 ± 0.65 μm .

7.3 Efecto de la incorporación del extracto de jengibre en la dieta de juveniles de S. lalandi.

La incorporación del extracto de jengibre en la dosis de 1g/kg pez, en el alimento peletizado, no tiene efectos negativos al ser suministrado a juveniles de *S. lalandi*. La dieta con jengibre no afecta el crecimiento de los juveniles (Tabla VI). Los peces al final del bioensayo (45 días) ganaron en peso 373.5 ± 36.5 g, llegando a un peso final mayor a los 800 g y un incremento en talla de 73.2 ± 4.8 mm. De igual manera los valores de hematocrito (Hct) no presentan diferencias estadísticas entre tratamientos ni en el transcurso del experimento.

El valor de hemoglobina incrementa a la par del crecimiento de los peces, entre los tratamientos no hay diferencias significativas, sin embargo, los peces con la dieta adicionada con extracto de jengibre, el valor de hemoglobina al final del experimento es significativamente mayor ($P = 0.001$) que el valor inicial (Tabla VII). En la composición de la fórmula sanguínea y la composición leucocitaria no hay diferencias estadísticas entre tratamientos ni entre los muestreos (Tabla VII).

La expresión relativa de IL 1- β en timo y riñón cefálico se comporta diferente entre los peces con dieta control y los peces alimentados con la dieta adicionada con jengibre, sin embargo, no hay diferencias significativas entre ellos. En cambio, la expresión relativa del factor de necrosis tumoral (TNF) en riñón cefálico es significativamente mayor al día quince, comparado a la expresión en los peces alimentados con la dieta control (Fig. 17).

Tabla VI. Parámetros de crecimiento de juveniles de *S. lalandi*, después de alimentar con la dieta adicionada con jengibre (dosis 1g/kg pez).

Tratamientos	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Longitud inicial (mm)	Longitud final (mm)	Ganancia en Peso (g)	Ganancia en longitud (mm)	TEC (%/día)	FC
D. Control	454.3 ± 10.4	827.8 ± 37.4	347.3 ± 2.7	420.5 ± 5.9	373.5 ± 36.5	73.2 ± 4.8	1.3 ± 0.1	1.1 ± 0.1
D. Jengibre	438.8 ± 8.7	830.4 ± 38.4	345.3 ± 4.3	414.2 ± 7.1	391.5 ± 33.9	72.6 ± 4.1	1.4 ± 0.1	1.3 ± 0.1

Tabla VII. Valores de hematocrito y hemoglobina obtenidos en cada uno de los tiempos de muestreo, durante la alimentación con dieta adicionada con jengibre (dosis 1g / kg pez).

Parametros	Tratamiento	Días de muestreo			
		15	30	45	
Hct (%)	D. Control	34.9 ± 3.71	36.44 ± 3.33	45.88 ± 3.67	
	D. Jengibre	38.2 ± 4.92	47.01 ± 7.04	53.21 ± 8.70	
Hb (g/dL)	D. Control	4.67 ± 0.82	6.21 ± 0.45	8.98 ± 0.97	
	D. Jengibre	4.55 ± 1.02	8.57 ± 1.29	11.8 ± 2.78*	
Formula sanguínea	Eritrocitos (%)	D. Control	95.70 ± 1.11	97.18 ± 0.99	97.22 ± 0.23
		D. Jengibre	98.07 ± 0.70	96.46 ± 0.61	97.37 ± 0.57
	Trombocitos (%)	D. Control	1.60 ± 0.31	0.77 ± 0.29	1.13 ± 0.12
		D. Jengibre	0.77 ± 0.30	1.63 ± 0.24	1.13 ± 0.11
	Leucocitos (%)	D. Control	2.69 ± 0.83	2.05 ± 0.70	1.64 ± 0.24
		D. Jengibre	1.15 ± 0.43	1.89 ± 0.41	1.50 ± 0.49
Formula leucocitaria	Linfocitos (%)	D. Control	79 ± 2.45	85.22 ± 1.29	87.50 ± 2.83
		D. Jengibre	81.62 ± 3.28	75.80 ± 9.67	87.55 ± 1.16
	Monocitos (%)	D. Control	5.11 ± 1.39	4 ± 0.57	4 ± 1.26
		D. Jengibre	5.5 ± 1.38	14.6 ± 6.55	6.33 ± 0.97
	Neutrófilos (%)	D. Control	3.66 ± 0.98	2.22 ± 0.27	1.83 ± 0.60
		D. Jengibre	3.75 ± 1.61	1.80 ± 0.48	1.55 ± 0.44
	Eosinófilos (%)	D. Control	3.00 ± 0.70	1.33 ± 0.33	1.50 ± 0.61
		D. Jengibre	1.75 ± 0.36	1.20 ± 0.37	0.77 ± 0.36
	Basófilos (%)	D. Control	10.11 ± 2.46	8.55 ± 0.85	6.16 ± 1.07
		D. Jengibre	8.62 ± 1.94	7.60 ± 3.09	5.11 ± 0.56

* Diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$)

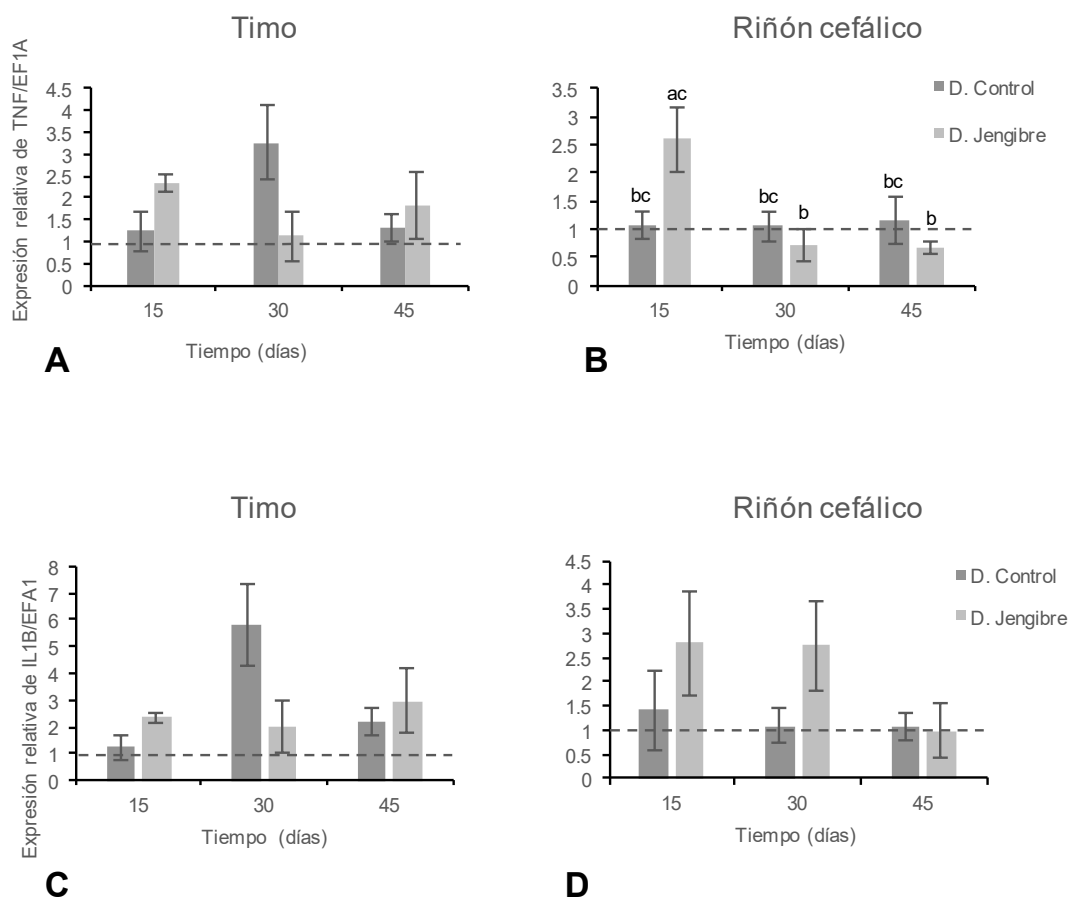


Figura 17. Expresión relativa en peces sin infección alimentados con la dieta adicionada con jengibre y peces con dieta control. A) tímo y B) riñón cefálico de TNF/EF1- α y en C) tímo y D) riñón cefálico de IL1- β /EF1- α .

7.4. Respuesta inmunológica y parámetros hematológicos de juveniles de *S. lalandi* infectados con *Neobenedenia* sp.

Establecimos la infección en condiciones controladas de laboratorio. Al día nueve post-infección colectamos los primeros huevos de *Neobenedenia* sp. Y al día 15 post-infección validamos el 100 % de prevalencia de la infección. Al finalizar el bioensayo la intensidad media fue de 64.44 ± 12.83 parásitos por pez (Tabla VIII).

Tabla VIII. Prevalencia e intensidad de infección en juveniles de *S. lalandi* infectados con *Neobenedenia* sp.

	Días de muestreo post infección.	
	15	30
Prevalencia (%)	100	100
Intensidad media (parásitos/pez)	9 ± 2.53	64.44 ± 12.83

La infección con *Neobenedenia* sp. (Fig. 18 A) en los juveniles de *S. lalandi* aumenta el índice de producción de mucinas (Fig. 18 B y C), aun que, no hay diferencias estadísticamente significativas al compararlo con los peces sin infección (Fig. 19).

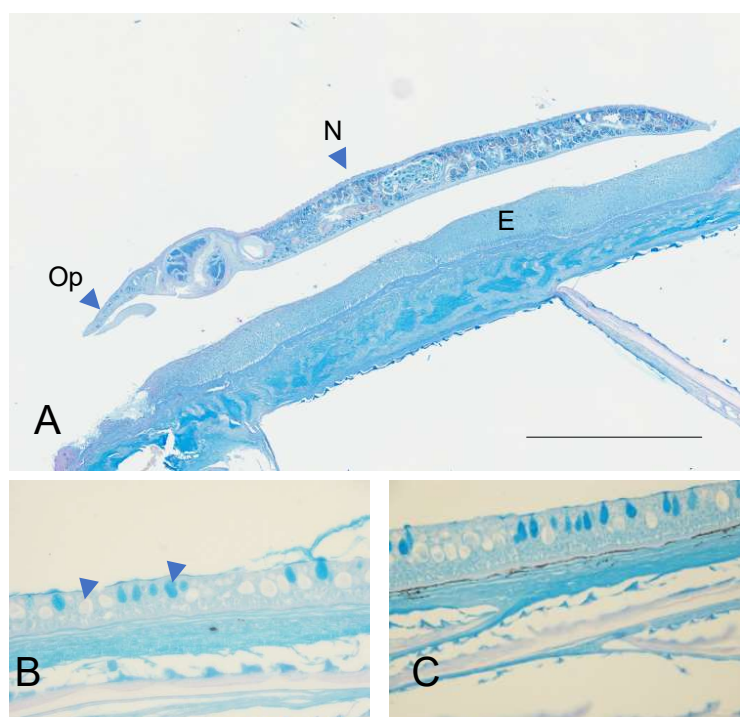


Figura 18. Corte histológico de tejido de piel de *S. lalandi*. A) La flecha señala a un individuo de *Neobenedenia* sp, Op. Opistohaptor, E. epidermis del pez. B) Corte histológico de un juvenil de *S. lalandi* sin infección, las flechas indican: células de mucosas llenas (teñidas de azul) y células de mucosas vacías. C) Corte de histológico de un juvenil con infección donde se observa un mayor número de células de mucosa llenas.

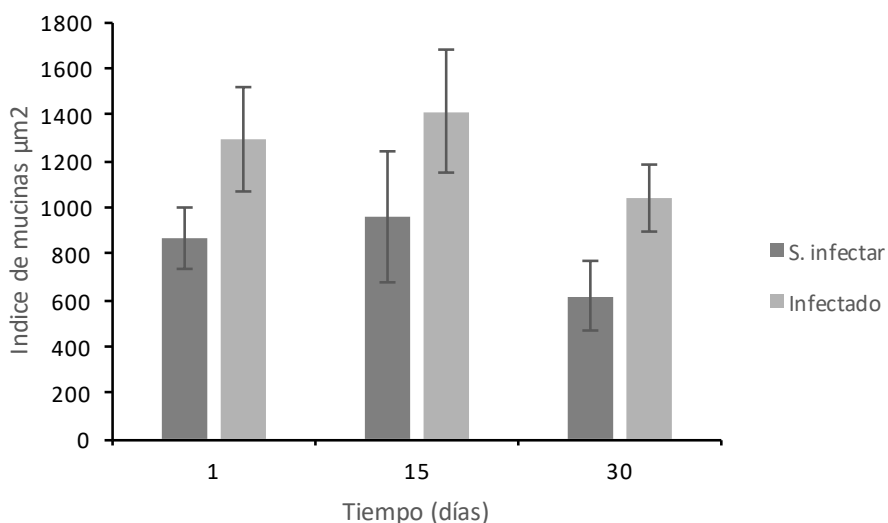


Figura 19. Índice de producción de mucinas en juveniles de *S. lalandi* sin infección y juveniles infectados con *Neobenedenia* sp.

El peso final promedio de los juveniles de *S. lalandi*, es significativamente ($P = 0.034$) menor en los peces infectados. Los peces sin infección al final del experimento ganaron 129 g más que los peces infectados. Todos los parámetros de crecimiento son mayores en los peces sin infección, aunque no son estadísticamente significativos, comparados con los resultados obtenidos con los peces infectados (Tabla IX).

En los parámetros de hematocrito, hemoglobina y composición de fórmula sanguínea no hay cambios o diferencias significativas entre peces sanos e infectados. Sin embargo, la composición de la fórmula leucocitaria al día 15 post-infección, en los peces infectados, cambia significativamente comparada a la de los peces sanos, el porcentaje de linfocitos es menor y se incrementa el porcentaje de monocitos y células eosinófilas. Al día 30 post-infección los valores de linfocitos, monocitos y células eosinófilas siguen la misma tendencia, pero dejan de ser estadísticamente diferentes, y aumenta significativamente el porcentaje de células neutrófilas (Tabla X).

Tabla IX. Parámetros de crecimiento de juveniles de *S. lalandi* infectados con parásitos de *Neobenedenia* sp, comparado a juveniles sin infección. * Diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$)

Tratamientos	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Longitud inicial (mm)	Longitud final (mm)	Ganancia en Peso (g)	Ganancia en longitud (mm)	TEC (%/dia)	FC
Sin infección	454.3 ± 10.4	827.8 ± 37.4*	347.3 ± 2.7	420.5 ± 5.9	373.5 ± 36.5	73.2 ± 4.8	1.3 ± 0.1	1.1 ± 0.03
Infectados	442.3 ± 10.5	698.3 ± 37.9	344.8 ± 2.8	403.3 ± 6.2	256 ± 42.2	58.4 ± 7.1	0.9 ± 0.1	0.9 ± 0.1

* Diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$)

Tabla X. Valores de hematocrito, hemoglobina, fórmula sanguínea y fórmula leucocitaria obtenidos en cada uno de los tiempos de muestreo para peces sin infección e infectados.

Parámetros	Tratamiento	Días de muestreo			
		1	15	30	
Hct (%)	Control	34.9 ± 3.71	36.44 ± 3.33	45.88 ± 3.67	
	Infectado	37.04 ± 3.75	43.85 ± 2.84	47.5 ± 5.09	
Hb (g/dL)	Control	4.67 ± 0.82	6.21 ± 0.45	8.98 ± 0.97	
	Infectado	3.73 ± 0.36	8.55 ± 0.61	12.33 ± 1.69	
Formula sanguínea	E (%)	Control	95.70 ± 1.11	97.17 ± 0.99	97.22 ± 0.23
		Infectado	97.62 ± 0.35	96.67 ± 1.06	97.58 ± 0.62
	T (%)	Control	1.60 ± 0.31	0.77 ± 0.29	1.13 ± 0.12
		Infectado	1.25 ± 0.39	1.07 ± 0.23	0.95 ± 0.33
	L (%)	Control	2.69 ± 0.83	2.05 ± 0.70	1.64 ± 0.24
		Infectado	1.11 ± 0.24	2.24 ± 0.84	1.45 ± 0.29
Formula leucocitaria.	Linfo. (%)	Control	79 ± 2.45	85.22 ± 1.29	87.50 ± 2.83
		Infectado	74.25 ± 5.39	56.75 ± 4.28*	67.14 ± 4.82
	Mono. (%)	Control	5.11 ± 1.39	4 ± 0.57	4 ± 1.26
		Infectado	13.12 ± 3.38	19.12 ± 5.34*	12.14 ± 1.53
	Neutró. (%)	Control	3.66 ± 0.98	2.22 ± 0.27	1.83 ± 0.60
		Infectado	4.62 ± 1.93	5.87 ± 0.78	11.42 ± 3.59*
	Eos. (%)	Control	3 ± 0.70	1.33 ± 0.33	1.5 ± 0.61
		Infectado	0.62 ± 0.26	4.25 ± 0.88*	1.85 ± 0.70
	Basó. (%)	Control	10.11 ± 2.46	8.55 ± 0.85	6.166 ± 1.07
		Infectado	8.62 ± 1.47	15.25 ± 2.41	9 ± 1.44

* Diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$)

Valores expresados como medias ± error estándar

Al día uno post-infección se observa una mayor expresión relativa de los genes TNF y IL1- β tanto en timo como en riñón cefálico, siendo estadísticamente significativo el incremento de TNF en riñón cefálico (Fig. 20B).

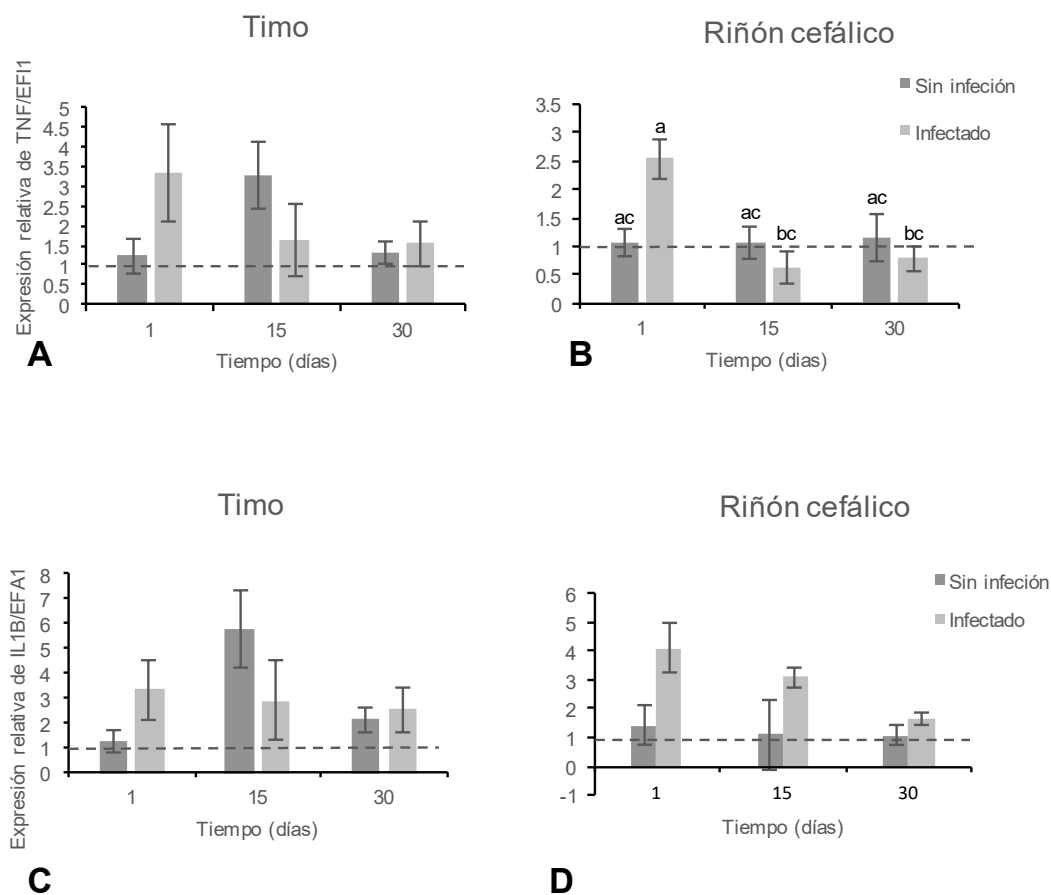


Figura 20. Expresión relativa en peces infectados con *Neobenedenia* sp. y peces sin infección. A) timo y B) riñón cefálico de TNF/ EF1 α , en C) timo y D) riñón cefálico de IL-1 β / EF1 α .

7.5 Respuesta inmunológica de juveniles de *S. lalandi* infectados con *Neobenedenia* sp., alimentados con la dieta adicionada con extracto de jengibre.

La prevalencia de la infección con *Neobenedenia* sp. durante el experimento y en todos los tratamientos fue del 100 %. Los peces alimentados con la dosis de

jengibre de 1 g/kg, son los peces que registran la infección más alta, con un promedio 123.12 ± 54.10 parásitos por pez (Fig. 21). Sin embargo, en todos los parámetros de crecimiento evaluados, los valores más altos se obtuvieron en los juveniles de *S. lalandi* alimentados con las dietas adicionadas con jengibre, aunque al compararse con la dieta control no hay diferencias estadísticas (Tabla XI).

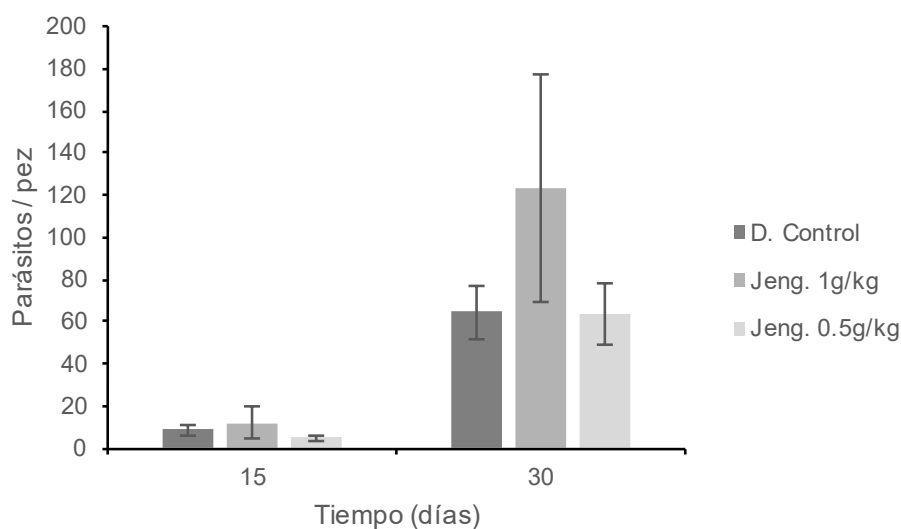


Figura 21. Intensidad de infección con *Neobenedenia* sp en juveniles de *S. lalandi* registrada durante el bioensayo.

El índice de producción de mucinas en los peces alimentados con la dieta control, registra los valores más altos y se mantienen constantes durante los primeros 15 días post- infección. En cambio, en los tratamientos con jengibre, la producción de mucinas se incrementa conforme la infestación avanza en el tiempo y el número de parásitos por pez. No hay diferencia estadística en los valores promedio entre tratamientos (Fig. 22).

Tabla XI. Parámetros de crecimiento de juveniles de *S. lalandi* infectados con parásitos de *Neobenedenia* sp. y alimentados con dietas adicionadas con jengibre.

Tratamientos	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Longitud inicial (mm)	Longitud final (mm)	Ganancia en Peso (g)	Ganancia en longitud (mm)	TEC (%/dia)	FC
D. Control	442.3 ± 10.5	698.3 ± 37.9	344.8 ± 2.8	403.3 ± 5.9	256 ± 42.2	58.4 ± 7.1	0.9 ± 0.1	0.9 ± 0.1
Jeng. 1 g/kg	466.3 ± 6	736.6 ± 47.3	347.5 ± 2.5	407.5 ± 7.7	274.6 ± 47.1	59.1 ± 9.1	0.9 ± 0.1	1.1 ± 0.02
Jeng. 0.5/kg	422.12 ± 17.7	830.4 ± 38.4	345.3 ± 2.5	407.7 ± 5.4	312.8 ± 29.1	62.4 ± 5.2	1.2 ± 0.1	1.1 ± 0.01

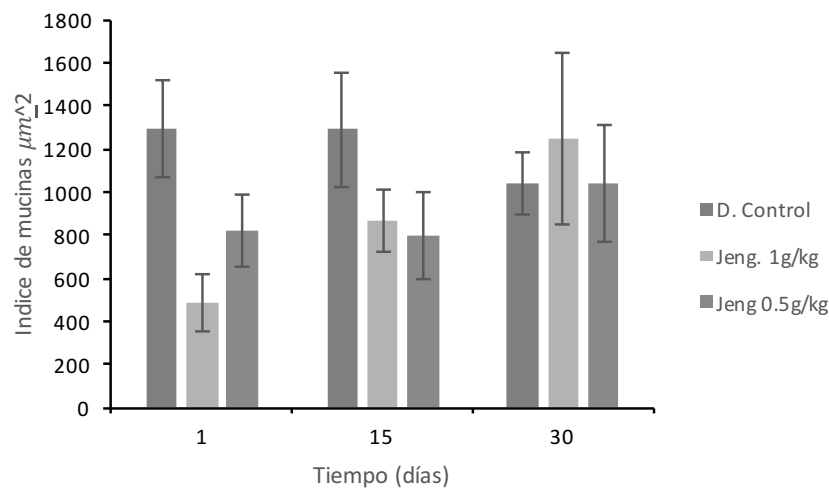


Figura 22. Índice de producción de mucinas en juveniles de *S. lalandi* infectados con *Neobenedenia* sp. y alimentados con las dietas suplementadas con jengibre.

Los valores de hematocrito, hemoglobina y la composición de la fórmula sanguínea fueron similares en todos los tratamientos, la incorporación de jengibre en ninguna de las dosis probadas, tuvo un efecto medible en estos parámetros. En la composición de la formula leucocitaria, los peces alimentados con la dosis de 1g de jengibre, al día 15 post- infección se registra un incremento significativo en el porcentaje de linfocitos, disminución en el porcentaje de eosinófilos y al día 30 post-infección también se da una disminución en el porcentaje de neutrófilos. Con la dosis de 0.5g de jengibre se disminuye significativamente el porcentaje de eosinofilos (Tabla XII).

En la expresión relativa en timo de los genes IL1 β y TNF no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ni entre tiempos de muestreo. En riñón cefálico la mayor expresión de TNF en todos los tratamientos se da a las 24h post-infección, en cambio la expresión relativa de IL1 β en el la dosis de jengibre 0.5g /kg es estadísticamente mayor al día 15 post-infección (Fig. 23)

Tabla XII. Valores de hematocrito, hemoglobina, formula sanguínea y formula leucocitaria obtenida en cada una de las dosis de jengibre y dieta control.

Parametros	Tratamiento	Días de muestreo (post-infección)			
		1	15	30	
Hct (%)	D. Control	37.04 ± 7.55	43.85 ± 2.84	47.50 ± 5.09	
	Jeng. 1 g/kg	40.72 ± 3.67	49.53 ± 2.75	55.32 ± 4.34	
	Jeng. 0.5g/kg	34.14 ± 4.85	50.14 ± 1.77	47.33 ± 1.77	
Hb (g/dL)	D. Control	3.73 ± 0.36	8.55 ± 0.61	12.33 ± 1.69	
	Jeng. 1 g/kg	3.89 ± 0.44	8.81 ± 0.71	10.39 ± 1.94	
	Jeng. 0.5g/kg	4.14 ± 0.53	9.33 ± 0.58	10.21 ± 0.88	
Formula sanguínea	E. (%)	D. Control	97.63 ± 0.35	96.67 ± 1.06	97.58 ± 0.62
		Jeng. 1 g/kg	97.81 ± 0.15	96.51 ± 0.65	96.05 ± 1.11
		Jeng. 0.5g/kg	97.64 ± 0.10	95.90 ± 1.27	96.86 ± 0.41
	T. (%)	D. Control	1.25 ± 0.39	1.07 ± 0.23	0.96 ± 0.33
		Jeng. 1 g/kg	0.96 ± 0.05	1.02 ± 0.27	1.21 ± 0.25
		Jeng. 0.5g/kg	0.82 ± 0.6	1.23 ± 0.28	1.39 ± 0.08
	L. (%)	D. Control	1.11 ± 0.24	2.24 ± 0.84	1.45 ± 0.29
		Jeng. 1 g/kg	1.21 ± 0.2	2.46 ± 0.54	2.73 ± 0.92
		Jeng. 0.5g/kg	1.52 ± 0.09	2.86 ± 1.35	1.75 ± 0.33
Formula leucocitaria	Linfo. (%)	D. Control	74.25 ± 5.39	56.75 ± 4.28	67.14 ± 4.82
		Jeng. 1 g/kg	81.85 ± 3.55	71.42 ± 7.31	69.5 ± 5.44
		Jeng. 0.5g/kg	81.37 ± 4.63	78.77 ± 2.95*	73.44 ± 4.29
	Mono. (%)	D. Control	13.12 ± 3.38	19.12 ± 5.34	12.14 ± 1.53
		Jeng. 1 g/kg	8.28 ± 2.72	13.42 ± 4.49	16.33 ± 3.45
		Jeng. 0.5g/kg	8.12 ± 4.03	10.33 ± 2	14.77 ± 2.55
	Neutró. (%)	D. Control	4.62 ± 1.93	5.87 ± 0.78	11.42 ± 3.59
		Jeng. 1 g/kg	1.85 ± 1.1	5.14 ± 1.89	3.5 ± 0.76 *
		Jeng. 0.5g/kg	1.62 ± 0.59	2.66 ± 0.55	5.55 ± 1.14
	Eos. (%)	D. Control	0.62 ± 0.26	4.25 ± 0.88	1.85 ± 0.70
		Jeng. 1 g/kg	1.57 ± 0.61	1 ± 0.21*	1.16 ± 0.47
		Jeng. 0.5g/kg	1.75 ± 0.45	1.44 ± 0.47*	1.22 ± 0.22
Basó. (%)	D. Control	8.62 ± 1.47	15.25 ± 2.41	9 ± 1.44	
	Jeng. 1 g/kg	7.71 ± 0.99	10.14 ± 2.28	10.83 ± 2.40	
	Jeng. 0.5g/kg	8.12 ± 1.4	8 ± 1.02	6.33 ± 0.86	

* Diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$)

Valores expresados como medias ± error estándar

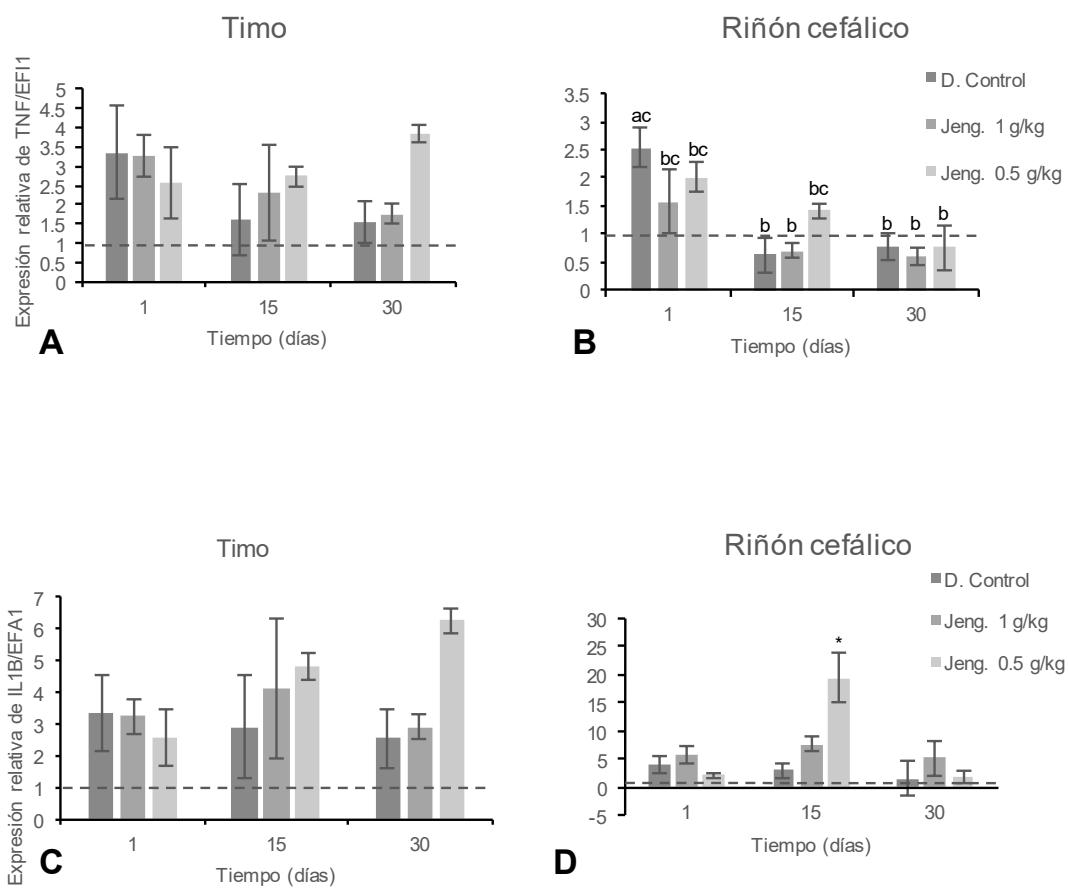


Figura 23. Expresión relativa en juveniles de *S. lalandi* infectados con *Neobenedenia* sp. y alimentados con dietas adicionadas con jengibre. A) tímo y B) riñón cefálico de TNF / EF1 α , en C) tímo y D) riñón cefálico de IL-1 β / EF1 α .

8. DISCUSIÓN

8.1 Efecto anti-parasitario de los extractos de ajo, jengibre, cebolla, albahaca, papaya y chaparro amargo, contra el ectoparásito monogéneo Neobenedenia sp. en sus tres etapas de desarrollo, adulto, huevo y larva en ensayos in vitro.

El jengibre (*Z. officinale*) es una planta medicinal que se ha utilizado ampliamente para el tratamiento de enfermedades infecciosas y parasitarias (El-Bahy y Bazh, 2015). Sus principales compuestos activos son: gingerol, shogaol y curcumina (Lin *et al.*, 2014). Los resultados de este estudio demuestran que la inmersión en jengibre reduce la supervivencia de los adultos y larvas de *Neobenedenia sp.* Los adultos rápidamente se contraen y se sueltan de la superficie de las placas de cultivo, sugiriendo el daño en las estructuras de sujeción, tales como los órganos de fijación delantera, haptor posterior y elementos musculares. En consecuencia, se afectó la capacidad reproductiva del parásito, reduciendo significativamente la producción de huevos. Las propiedades anti-helmínticas del jengibre han sido demostradas en ensayos *in vitro* e *in vivo* en estudios con el monogéneo *G. turnbulli* infectando al guppy *P. reticulata* (Levy *et al.*, 2015), con parásitos terrestres como *Shistosoma mansoni* (Mostafa *et al.*, 2011; Sanderson *et al.*, 2002), *Raillietina cestocillus* (El-Bahy y Bazh, 2015), en nematodos intestinales de ovejas (Iqbal *et al.*, 2006), entre otros. Se ha demostrado que los compuestos activos [10] - shogaol, [6] - gingerol, [10] - gingerol, [6] - shogaol, gingerona A, [6] - dehidrogingerdiona, [4] - shogaol, 5 - hidroxí - [6] - gingerol, hexahidrocurcumina, 3R, 5S - [6] - gingeradiol y 3S, 5S - [6] - gingeradiol, aislados del jengibre reducen el movimiento y la supervivencia de las larvas del nematodo *Angiostrongylus cantonensis* y del cestodo *Hymenolepis nana* (Lin *et al.*, 2014, 2010).

En la medicina popular, las hojas de albahaca son utilizadas como carminativos, estomacales, antiespasmódicos, estimulantes, diuréticos, antisépticos, anestésicos, analgésicos y antihelmínticos (Shirazi *et al.*, 2014). En la acuicultura,

se ha evaluado el tratamiento con albahaca para tratar infecciones bacterianas con *Aeromonas hydrophila* en *Oreochromis mossambicus* (Bulfon *et al.*, 2015). La albahaca, se reporta que en el larvicultivo del camarón (*Penaeus*), como promotor de crecimiento, inmuno-estimulante y antibacterial (Citarasu, 2010). Los principales compuestos activos son los derivados de fenil, como el eugenol, metileugenol, chavicol, estrago, metilcinato y linalool (Filip *et al.*, 2016). El efecto anti-parasitario de esta planta ha sido relacionado con su contenido de linalool. De Almeida y colaboradores (2007) reportan que el contenido de linalool en la albahaca (*O. basilicum*) inhibe la actividad proteolítica de las peptidasas y sugieren que, a través de este mecanismo se inhiben procesos enzimáticos, produciendo daños y muerte a los parásitos. En los resultados de este estudio, las diluciones 1:100 y 1:50 redujeron significativamente la supervivencia, producción de huevos y tiempo de sujeción de los adultos, así como, se redujo la supervivencia de las larvas. Sin embargo, en la dilución 1:10 los parásitos se mantuvieron vivos (respondiendo a estímulos de tacto y luz) durante el tiempo de inmersión, pero no produjeron huevos. Se desconoce si esto es resultado de un daño citotóxico generalizado, o si los compuestos activos presentes en la albahaca, inhiben los procesos reproductivos del parásito. Sutili *et al.*, (2016) evaluaron el aceite esencial de albahaca (*O. americanum*) contra el monogéneo *Gyrodactylus* sp. Ellos reportan que la dosis de 50 mg l⁻¹ reduce la supervivencia *in vitro* e *in vivo* de parásitos infectando al bagre *Rhamdia quelen*.

El extracto de Chaparro amargo (*C. tortuosa*) se utiliza para el tratamiento de infecciones bacterianas, parasitarias y amebiasis (Robles-Zepeda *et al.*, 2011). En el presente estudio, el extracto de chaparro amargo redujo la producción de huevos (Tabla IV) y redujo la supervivencia de larvas de *Neobenedenia* sp. (Tabla V). El efecto tóxico de esta planta es atribuido a metabolitos secundarios. El chaparrin se ha identificado como el compuesto antiparasitario del chaparro amargo (Aguilar *et al.*, 2008; Reyes-López *et al.*, 2005).

La inmersión continua en las diluciones de 1:100 y 1:50 de los extractos de ajo, cebolla o papaya, no tuvieron ningún efecto en ninguna de las etapas del ciclo de vida de *Neobenedenia* sp (Tablas IV y V, Fig. 15). Sin embargo, al igual que en todos los extractos utilizados, la dilución 1:10 fueron las más efectivas comparadas con el control en agua de mar. Los extractos de ajo y cebolla se reportan como repelentes de insectos y vermífugos (Guarrera, 1999) y son recomendados como remedios antihelmínticos para animales y humanos (Melhorn *et al.*, 2013). Se reporta que el incluir estas plantas en la dieta del camarón, ayuda a prevenir infecciones bacterianas (Citarasu, 2010). Tratamientos con ajo han demostrado prevenir infecciones parasitarias en juveniles de tilapia, *O. niloticus*, en el barramundi, *L. calcarifer* y en el guppy, *P. reticulata* (Abd El-Galil y Aboelhadid, 2012; Fridman *et al.*, 2014; Levy *et al.*, 2015; Militz *et al.*, 2013a, 2013b). El componente principal de ambas plantas es el agua y los compuestos más importantes son los organosulfuros, como aliina y alicina, además la cebolla contiene flavonoides (Benkeblia, 2004). La actividad antiparasitaria de estos vegetales es atribuida al contenido de alicina; sin embargo, es un compuesto inestable y el método de procesamiento afecta la estructura química de las preparaciones de ajo, afectando directamente la actividad anti-parasitaria de los extractos de esta planta (Corzo-Martínez *et al.*, 2007; Lee y Gao, 2012). Las propiedades anti-parasitarias de la papaya se han reportado para el tratamiento contra cestodos y nematodo infestando ratones (Abou Shady *et al.*, 2014), para tratar infestaciones de *Ichthyophthirius multifiliis* infectando a la carpa dorada *Carassius auratus* (Ekanem *et al.*, 2004) y para tratar parásitos intestinales en humanos (Alanís *et al.*, 2005). Las propiedades medicinales de la papaya están bien documentadas, cada parte de la planta contiene diferentes compuestos y enzimas de interés (Vij y Prashar, 2015). La actividad anti-parasitaria es atribuida al compuesto benzil isotiocianato y se obtiene de la semilla de la papaya (Kermanshai *et al.*, 2001). Sin embargo, los extracto hidro-alcohólicos de ajo, cebolla y papaya evaluados durante esta investigación, no mostraron propiedades

antiparasitarias contra *Neobenedenia* sp., muy probablemente debido a la inestabilidad y baja concentración de los compuestos activos.

Los huevos de monogéneos son reportados como altamente resistentes ante factores externos, esto se debe al cascaron proteínico que protege al embrión de agentes químicos y físicos (Whittington, 2012). Sin embargo, en las dilución 1:10 de todos los extractos de plantas y etanol, no hubo desarrollo embrionario durante los 8 días de inmersión continua y no hubo eclosión. Efectos similares se ha reportado con desecación, inmersión en agua a 50 °C, con 25 % de etanol (Ernst *et al.*, 2005), 120 mg L⁻¹ de hipoclorito de sodio (Fajer-Ávila *et al.*, 2007), hiposalinidad (Chen *et al.*, 2010) y con extractos hidrosoluble del alga rojo *Asparagopsis taxiformis* (Hutson *et al.*, 2012).

El proceso de extracción con etanol es uno de los más comúnmente utilizados en la medicina tradicional china (Van Hai, 2015). En el presente estudio, etanol (70 %) en 3 diluciones con agua de mar (1:100, 1:50 y 1:10), afectó diferentes parámetros en los tres estadíos de vida de *Neobenedenia* sp. Levy *et al.* (2015) compararon la eficiencia de un extracto etanolito y un extracto acuoso ambos de jengibre y un control con etanol 75 %, contra el monogéneo *G. turnbulli* y también reportan que la exposición al etanol al 75 % afecta la supervivencia del parásito *in vitro*; sin embargo, cuando comparan la eficiencia entre el extracto etanólico y el extracto acuoso de jengibre, el extracto etanólico es el de mayor eficiencia. Los autores sugieren que la extracción con etanol permite una mayor obtención de compuestos lipofílicos que afectan al parásito. El extracto con etanol de la hierba china *Arisaema erubescens* demostró ser dos veces más tóxico que el extracto crudo, contra el parásito de plantas *Meloidogyne incognita* (Du *et al.*, 2011). En general cuando se comparan los métodos de extracción, los solventes alcohólicos son más eficientes para extraer metabolitos secundarios (Bulfon *et al.*, 2015).

La dilución 1:10 de jengibre y albahaca fueron los tratamientos que más impactaron los parámetros biológicos de *Neobenedenia* sp. Este trabajo

demuestra que el efecto sinérgico del etanol y los compuestos activos de los extractos de jengibre, albahaca y chaparro amargo, son tóxicos contra *Neobenedenia* sp. en todas sus etapas del ciclo de vida. Jengibre y albahaca redujeron la supervivencia *in vitro* de los adultos, el tiempo de sujeción, la producción de huevos y la supervivencia de las larvas. El extracto de chaparro amargo redujo la producción de huevos y la supervivencia de las larvas.

8.2. Respuesta inmunológica y hematológica en juveniles de *S. lalandi* infestados con *Neobenedenia* sp.

Neobenedenia es uno de los parásitos monogéneos que causan los eventos epizooticos más importantes en la acuicultura, causando altas mortalidades en *Seriola* spp., entre otras especies (Thoney y Hargis, 1991). *Neobenedenia*, es un ectoparásito que se alimenta del mucus y células epiteliales de su hospedero y se reporta que infestaciones de este parásito ocasionan en su hospedero, hemorragias, inflamación e hiper-producción de mucus (Whittington, 2012).

En el sistema inmune de los peces la primera línea de defensa contra patógenos es el tegumento y el mucus. El mucus funciona como barrera física de protección para la piel y además se encuentra provista de mecanismos antibacteriales (Tort *et al.*, 2003). En esta investigación la infestación con *Neobenedenia* sp. (64.44 ± 12.83 parásitos promedio/pez) incremento la producción de mucus en los peces infectados ($1211.65 \pm 133.96 \mu\text{m}^2$) comparado a los valores de referencia obtenidos de los peces sanos ($803 \pm 114.10 \mu\text{m}^2$). A los 30 días post infección, los parámetros de crecimiento son afectados y en consecuencia, la ganancia en peso de los juveniles de *S. lalandi* es significativamente ($P < 0.05$) menor en los peces infectados. Igual a los resultados que encontramos en *S. lalandi*, la infección con este mismo monogéneo en *S. dumerili*, también afecta el crecimiento, además, se reportan que a mayor grado de infestación el grosor de la epidermis disminuye y a partir de infecciones mayores a 1 parásito por cm^2 de superficie de piel los parámetros hematológicos se reducen significativamente y se presentaron

mortalidades en los peces infectados (Hirayama *et al.*, 2009; Hirazawa *et al.*, 2016a). De igual manera en el barramundi, *Lates calcarifer*, *Neobenedenia* sp. provoca cambios morfológicos en la epidermis del pez; inflamación, pérdida de epidermis y disminución significativa en el número de células de mucosa (Trujillo-González *et al.*, 2015).

Está bien establecido en peces, que en la respuesta inmune del hospedero en al infestaciones parasitarias (nemátodos, digeneos y cestodos) las células macrofagas, neutrófilos, eosinófilos y linfocitos todos están involucrados. Las infestaciones con helmintos pueden alterar significativamente el número de leucocitos tanto en la circulación como en órganos linfoides, como lo son bazo y riñón (Secombes y Chappell, 1996). De tal manera, que al comparar la composición de la fórmula leucocitaria entre peces sanos y peces infectados se observa que en el día 15 post-infección el porcentaje de linfocitos disminuye e incrementa el porcentaje de monocitos, eosinófilos y neutrófilos de manera significativa ($P < 0.05$). Estos mismos resultados se reportan en *Lutjanus guttatus* infectados con el monogéneo *Dactylogirus* sp., a manera que la infestación crece, el porcentaje de linfocitos disminuye y se incrementa el porcentaje de neutrofilos y eosinófilos (Del Rio-Zaragoza *et al.*, 2010). El incremento de monocitos, eosinófilos y neutrófilos, así como, la disminución de linfocitos es una respuesta característica de un proceso de inflamación y en el caso específico de los eosinófilos su incremento es una respuesta típica a infecciones parasitarias (Suzuki y Iida, 1992).

Por último, evaluamos la expresión relativa de las citoquinas IL-1 β y TNF- α en timo y riñón cefálico, demostrando que para ambas citoquinas a las 24 h post-infección se incrementa expresión relativa en riñón cefálico, confirmando lo antes publicado por Reyes-Becerril *et al.* (2017), donde se sugiere que estas mismas citoquinas pro-inflamatorias juegan un papel importante en los mecanismos de defensa contra *Neobenedenia* sp. en *S. lalandi*.

8.3 Uso y efecto de la incorporación del extracto de jengibre en la dieta de juveniles de *S. lalandi* sanos y la respuesta inmune de los peces ante la infestación con el ectoparásito *Neobenedenia* sp.

Los tratamientos con plantas medicinales en la acuicultura es un tema que tiene tiempo desarrollándose, mas de 250 especies de plantas de 75 familia y 32 órdenes han sido evaluadas en tratamiento orales, en inmersión ó inyección intraperitoneal (Bulfon *et al.*, 2015), se ha evaluado su uso como promotores de crecimiento, tratamientos profilácticos, como tratamientos de control y como moduladores del sistema inmune (Awad y Awaad, 2017; Reverter *et al.*, 2014). En el presente trabajo se demuestra que la incorporación del extracto de jengibre en la dieta de juveniles de *S. lalandi* sin infección, no tiene ningún efecto negativo en los parámetros de crecimiento, hematológicos y expresión relativa de genes. Al retar a los peces con *Neobenedenia* sp. y alimentarlos con las dietas adicionadas con jengibre, aunque los resultados no son estadísticamente significativos, el mejor crecimiento se obtuvo en los peces alimentados con 0.5 g de jengibre / kg pez. En los tratamientos con jengibre, la producción de mucus se incrementa conforme la infección avanza, en cambio, en el tratamiento control la producción de mucus es alta los primeros 15 días, pero al día 30 disminuye, sugiriendo que la capacidad de respuesta del sistema inmune ante la infección, en los peces alimentados con jengibre, es mejor que en el grupo control. Así mismo, en la expresión relativa de ambas citoquinas (IL-1 β y TNF- α), a partir del día 15 post infección en los peces alimentados con la dieta con jengibre, la expresión relativa es mayor en ambos órganos comparado a los valores obtenidos en los peces infectados y alimentados con la dieta control. Las acciones farmacológicas demostradas en jengibre, incluyen propiedades inmuno-regulatorias, antitumorales, antiinflamatorias, etc. (Ali *et al.*, 2008; Chrubasik *et al.*, 2005). La incorporación de jengibre se ha evaluado en juveniles de *Huso huso* (Gholipour-Kanani *et al.*, 2014), así como en tratamientos de inmersión en aceite de jengibre en la lubina *Dicentrarchus labrax* (Yilmaz y Ergün, 2012), en ambos casos se

demuestra que no es tóxico para los peces y que mejora significativamente los parámetros de crecimiento y hematológicos. En la trucha *Oncorhynchus mykiss* la incorporación de jengibre en la dieta, además de mejorar los parámetros de crecimiento, redujo a 0 % de mortalidad al retar a los peces con *Aeromonas hydrophila* (Nya y Austin, 2009). De igual manera en *Lates calcarifer* al retar con *Vibrio harveyi* se demostró que la adición de jengibre en la dieta, incremento la supervivencia, la ganancia en peso, la tasa de conversión, así como se incrementó el número de eritrocitos y leucocitos. (Talpur *et al.*, 2013). En conjunto se sugiere que la incorporación del jengibre en la dieta de peces fortalece la respuesta inmunológica y reduce la susceptibilidad a infecciones bacterianas y parasitológicas.

9. CONCLUSIONES.

- Se demuestra el potencial de los extractos de plantas para el tratamiento de infestaciones con *Neobenedenia* sp. De los seis extractos de plantas evaluados, el extracto de jengibre y albahaca demostraron ser los más efectivos.
- La ingesta del extracto de jengibre en las dosis utilizadas, no repercute en los parámetros evaluados en *S. lalandi* y se determina que bajo estas condiciones no es tóxico para esta especie.
- La infestación con *Neobenedenia* sp, a partir del día 1 post-infección desencadena la respuesta inmunológica de los juveniles de jurel, aumentando la producción de mucus y expresión relativa de IL-1 β y TNF- α en timo y riñón cefálico.
- En la composición de la fórmula leucocitaria, se establecieron rangos de referencia para la infestación con *Neobenedenia* sp en *S. lalandi*.
- La incorporación de jengibre en la dieta de *S. lalandi* ayuda en la respuesta inmune ante infestaciones con *Neobenedenia* sp, sin embargo, se requiere mayor investigación para encontrar la dosis más adecuada.

10. LITERATURA CITADA

Abd El-Galil, M.A.A., S.M. Aboelhadid. 2012. Trials for the control of trichodinosis and gyrodactylosis in hatchery reared *Oreochromis niloticus* fries by using garlic. *Vet. Parasitol.* 185:57–63. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.10.035>

Abou Shady, O.M., M.M.A. Basyoni, O.A. Mahdy, N.Z. Bocktor. 2014. The effect of praziquantel and *Carica papaya* seeds on *Hymenolepis nana* infection in mice using scanning electron microscope. *Parasitol. Res.* 113: 2827–2836. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-3943-4>

Aguilar, H.H.G., P.M. de Gives, D.O.S. Sánchez, M.E.L. Arellano, E.L. Hernández, U.L. Aroche, G. Valladares-Cisneros. 2008. In vitro nematocidal activity of plant extracts of mexican flora against *Haemonchus contortus* fourth larval stage. *Anim. Biodivers. Emerg. Dis.* 1149:158–160. <https://doi.org/10.1196/annals.1428.075>

Alanís, A.D., F. Calzada, J.A. Cervantes, J. Torres, G.M. Ceballos. 2005. Antibacterial properties of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. *J. Ethnopharmacol.* 100: 153–157. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.02.022>

Ali, B.H., G. Blunden, M.O. Tanira, A. Nemmar. 2008. Some phytochemical, pharmacological and toxicological properties of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe): A review of recent research. *Food Chem. Toxicol.* 46:409–420. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.085>

Alvarez-Pellitero, P. 2008. Fish immunity and parasite infections: from innate immunity to immunoprophylactic prospects. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 126:171–198.

Aranda, P.S., D.M. Lajoie, C.L. Jorcyk. 2012. Bleach gel: A simple agarose gel for analyzing RNA quality. *Electrophoresis* 33:366–369. <https://doi.org/10.1002/elps.201100335>

Avilés-Quevedo, M.A., F. Castelló-Orvay. 2004. Manual para el Cultivo de Jurel. Mexico. Instituto Nacional de la Pesca. México.

Awad, E., A. Awaad. 2017. Role of medicinal plants on growth performance and immune status in fish. *Fish Shellfish Immunol.* 67:40–54. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.05.034>

Benkeblia, N. 2004. Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). *LWT - Food Sci. Technol.* 37:263–268. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2003.09.001>

Blaxhall, P.C., K.W. Daisley. 1973. Routine haematological methods for use with fish blood. *J. Fish Biol.* 5:771–781. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1973.tb04510.x>

Bondad-Reantaso, M.G., R.P. Subasinghe, J.R. Arthur, K. Ogawa, S. Chinabut, R. Adlard, Z. Tan, M. Shariff. 2005. Disease and health management in Asian aquaculture. *Vet. Parasitol.* 132:249–72. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.07.005>

Brazenor, A.K., K.S. Hutson. 2015. Effects of temperature and salinity on the life cycle of *Neobenedenia* sp . (Monogenea: Capsalidae) infecting farmed barramundi (*Lates calcarifer*). *Parasitol. Res.* <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4375-5>

Bulfon, C., D. Volpatti, M. Galeotti. 2015. Current research on the use of plant-derived products in farmed fish. *Aquac. Res.* 46:513–551. <https://doi.org/10.1111/are.12238>

Bush, A.O., K.D. Lafferty, J.M. Lotz, A.W. Shostak. 1997. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis *et al.* revisited. *J. Parasitol.* 83:575–583. <https://doi.org/10.2307/3284227>

Calzado Flores, C. 1995. Actividad citotóxica de la chaparrina in vitro sobre entamoeba histolytica y fibroblastos diploides humanos. Tesis (Maestría en Ciencias con especialidad en química de productos naturales). Monterrey N.L. México. Universidad Autónoma de Nuevo León. 52p. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

Castelló, F. 2013. Piscicultura Marina en Latinoamérica. Publicaciones i Edicions de la Universitat de Barcelona, Barcelona. 312p.

Chen, H., H. Chen, C. Wang, S. Chen, H. Shih. 2010. Veterinary Parasitology Effects of various treatments on egg hatching of *Dendromonocotyle pipinna* (Monogenea: Monocotylidae) infecting the blotched fantail ray , *Taeniurops meyeri* , in Taiwan. *Vet. Parasitol.* 171:229–237. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.03.036>

Chrubasik, S., M.H. Pittler, B.D. Roufogalis. 2005. *Zingiberis rhizoma*: A comprehensive review on the ginger effect and efficacy profiles. *Phytomedicine* 12:684–701. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2004.07.009>

Citarasu, T. 2010. Herbal biomedicines: a new opportunity for aquaculture industry. *Aquac. Int.* 18:403–414. <https://doi.org/10.1007/s10499-009-9253-7>

Corzo-Martínez, M., N. Corzo, M. Villamiel 2007. Biological properties of onions and garlic. Trends Food Sci. Technol. 18:609–625. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2007.07.011>

De Almeida, I., D.S. Alviano, D.P. Vieira, P.B. Alves, A.F. Blank, A.H.C.S. Lopes, C.S. Alviano, M.D.S.S. Rosa. 2007. Antigiardial activity of *Ocimum basilicum* essential oil. Parasitol. Res. 101:443–452. <https://doi.org/10.1007/s00436-007-0502-2>

Del Rio-Zaragoza, O.B., E.J. Fajer-Avila, P. Almazán-Rueda. 2010. Haematological and gill responses to an experimental infection of dactylogyrid monogeneans on the spotted rose snapper *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869). Aquac. Res. 41:1592–1601. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02471.x>

Dinh, H.T., K.S. Hutson. 2014. Reproductive strategies of the insidious fish ectoparasite, *Neobenedenia* sp. (Capsalidae: Monogenea). PLoS One 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108801>

Du, S.S., H.M. Zhang, C.Q. Bai, C.F. Wang, Q.Z. Liu, Z.L. Liu, Y.Y. Wang, Z.W. Deng. 2011. Nematocidal flavone-C-glycosides against the root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) from *Arisaema erubescens* tubers. Molecules 16:5079–5086. <https://doi.org/10.3390/molecules16065079>

Ekanem, A.P., A. Obiekezie, W. Kloas, K. Knopf. 2004. Effects of crude extracts of *Mucuna pruriens* (Fabaceae) and *Carica papaya* (Caricaceae) against the protozoan fish parasite *Ichthyophthirius multifiliis*. Parasitol. Res. 92:361–366. <https://doi.org/10.1007/s00436-003-1038-8>

El-Bahy, N.M., E.K.A. Bazh. 2015. Anthelmintic activity of ginger, curcumin, and praziquantel against *Raillietina cesticillus* (in vitro and in vivo). Parasitol. Res. 114:2427–2434. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4416-0>

Ernst, I., I.D. Whittington, S. Corneillie, C. Talbot. 2005. Effects of temperature, salinity, desiccation and chemical treatments on egg embryonation and hatching success of *Benedenia seriolae* (Monogenea : Capsalidae), a parasite of farmed *Seriola* spp . J. Fish Dis. 28:157–164.

Fajer-Ávila, E.J., I. Martínez-Rodríguez, M.I. Abdo de la Parra, L. Álvarez-Lajonchere, M. Betancourt-Lozano. 2008. Effectiveness of freshwater treatment against *Lepeophtheirus simplex* (Copepoda: Caligidae) and *Neobenedenia* sp. (Monogenea: Capsalidae), skin parasites of bullseye puffer fish, *Sphoeroides annulatus* reared in tanks. Aquaculture 284:277–280. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.07.027>

Fajer-Ávila, E.J., S.P. Velásquez-Medina, M. Betancourt-Lozano. 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. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.12.035>

Fijan, N. 2002. Morphogenesis of blood cell lineages in channel catfish. *J. Fish Biol.* 60:999–1014. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2002.tb02424.x>

Filip, S., S. Vidović, J. Vladić, B. Pavlić, D. Adamović, Z. Zeković. 2016. Chemical composition and antioxidant properties of *Ocimum basilicum* L. extracts obtained by supercritical carbon dioxide extraction: Drug exhausting method. *J. Supercrit. Fluids* 109:20–25. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2015.11.006>

Fridman, S., T. Sinai, D. Zilberg. 2014. Efficacy of garlic based treatments against monogenean parasites infecting the guppy (*Poecilia reticulata* (Peters)). *Vet. Parasitol.* 203:51–58. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.02.002>

Gholipour Kanani, H., Z. Nobahar, S. Kakoolaki, H. Jafarian. 2014. Effect of ginger- and garlic-supplemented diet on growth performance, some hematological parameters and immune responses in juvenile *Huso huso*. *Fish Physiol. Biochem.* 40:481–490. <https://doi.org/10.1007/s10695-013-9859-6>

Grutter, A.S., M.R. Deveney, I.D. Whittington, R.J.G. Lester. 2002. The effect of the cleaner fish *Labroides dimidiatus* on the capsalid monogenean *Benedenia lolo* parasite of the labrid fish *Hemigymnus melapterus*. *J. Fish Biol.* 61:1098–1108. <https://doi.org/10.1006/jfbi.2002.2121>

Guarrera, P.M. 1999. Traditional antihelmintic, antiparasitic and repellent uses of plants in Central Italy. *J. Ethnopharmacol.* 68:183–192. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(99\)00089-6](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(99)00089-6)

Hirayama, T., F. Kawano, N. Hirazawa. 2009. Effect of *Neobenedenia girellae* (Monogenea) infection on host amberjack *Seriola dumerili* (Carangidae). *Aquaculture* 288:159–165. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.11.038>

Hirazawa, N., K. Akiyama, N. Umeda. 2013. Differences in sensitivity to the anthelmintic praziquantel by the skin-parasitic monogeneans *Benedenia seriolae* and *Neobenedenia girellae*. *Aquaculture* 404–405:59–64. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.04.021>

Hirazawa, N., H. Hagiwara, R. Takano, M. Noguchi, M. Narita. 2011. Assessment of acquired protection levels against the parasite *Neobenedenia girellae* (Monogenea) between body surface sites including fins of amberjack *Seriola dumerili* (Carangidae) and the skin in response to the parasite infection. *Aquaculture* 310:252–258. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.10.029>

- Hirazawa, N., H. Hagiwara, S. Tsubone, R. Takano. 2017. Investigation of the toxicological and histopathological effects of hydrogen peroxide bath treatments at different concentrations on *Seriola* species and the effectiveness of these treatments on *Neobenedenia girellae* (Monogenea) infestations. *Aquaculture* 479:217–224. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.05.019>
- Hirazawa, N., R. Ishizuka, H. Hagiwara. 2016a. The effects of *Neobenedenia girellae* (Monogenea) infection on host amberjack *Seriola dumerili* (Carangidae): Hematological and histopathological analyses. *Aquaculture* 461:32–39. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.04.007>
- Hirazawa, N., S. Oshima, K. Hata. 2001. In vitro assessment of the antiparasitic effect of caprylic acid against several fish parasites. *Aquaculture* 200:251–258.
- Hirazawa, N., R. Takano, H. Hagiwara, M. Noguchi, M. Narita. 2010. The influence of different water temperatures on *Neobenedenia girellae* (Monogenea) infection, parasite growth, egg production and emerging second generation on amberjack *Seriola dumerili* (Carangidae) and the histopathological effect of this parasite on fish. *Aquaculture* 299:2–7. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.11.025>
- Hirazawa, N., S. Tsubone, R. Takano. 2016b. Anthelmintic effects of 75ppm hydrogen peroxide treatment on the monogeneans *Benedenia seriolae*, *Neobenedenia girellae*, and *Zeuxapta japonica* infecting the skin and gills of greater amberjack *Seriola dumerili*. *Aquaculture* 450:244–249. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.07.028>
- Hrubec, T.C., J.L. Cardinale, S.A. Smith. 2000. Hematology and plasma chemistry reference intervals for cultured tilapia (*Oreochromis hybrid*). *Vet. Clin. Pathol.* 29:7–12. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2000.tb00389.x>
- Hutson, K.S. 2007. Parasite interactions between wild and farmed yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) in southern Australia. Tesis (Doctor of Philosophy). South Australia. The University of Adelaide. 194p.
- Hutson, K.S., I. Ernst, I.D. Whittington. 2007. Risk assessment for metazoan parasites of yellowtail kingfish *Seriola lalandi* (Perciformes: Carangidae) in South Australian sea-cage aquaculture. *Aquaculture* 271:85–99. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.03.020>
- Hutson, K.S., L. Mata, N.A. Paul, R. de Nys. 2012. Seaweed extracts as a natural control against the monogenean ectoparasite, *Neobenedenia* sp., infecting farmed barramundi (*Lates calcarifer*). *Int. J. Parasitol.* 42:1135–41. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.09.007>

- Iqbal, Z., M. Lateef, M.S. Akhtar, M.N. Ghayur, A.H. Gilani. 2006. In vivo anthelmintic activity of ginger against gastrointestinal nematodes of sheep. *J. Ethnopharmacol.* 106:285–287. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.12.031>
- Ishida, M., F. Kawano, N. Umeda, N. Hirazawa. 2007. Response of *Neobenedenia girellae* (Monogenea) oncomiracidia to brightness and black-and-white contrast. *Parasitology* 134:1823–1830. <https://doi.org/10.1017/S0031182007003149>
- Kermanshai, R., B.E. McCarry, J. Rosenfeld, P.S. Summers, E.A. Weretilnyk, G.J. Sorger. 2001. Benzyl isothiocyanate is the chief or sole anthelmintic in papaya seed extracts. *Phytochemistry* 57:427–435. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(01\)00077-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00077-2)
- Kiron, V.. 2012. Fish immune system and its nutritional modulation for preventive health care. *Anim. Feed Sci. Technol.* 173:111–133. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.12.015>
- Kishimori, J.M. 2010. The teleost mucosal immune response at the host-parasite interface of tilapia, *Oreochromis mossambicus*, against *Neobenedenia melleni*. Tesis (Doctor of philosophy). Estados Unidos de America. University of Hawaii. 190p.
- Kishimori, J.M., A. Takemura, J.C. Leong. 2015. *Neobenedenia melleni* -specific antibodies are associated with protection after continuous exposure in Mozambique Tilapia. *J. of Immunology Research.* 2015:1-5
- Klaus Rohde. 1978. Monogenean gill parasites of the kingfish *Seriola grandis* *Castlenau* (Carangidae) from the great barrier reef. *Publ. Seto Mar. Biol.* 10-15
- Lee, J., Y. Gao. 2012. Review of the application of garlic, *Allium sativum*, in aquaculture. *J. World Aquac. Soc.* 43:447–458. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2012.00581.x>
- Levy, G., D. Zilberg, G. Paladini, S. Fridman. 2015. Efficacy of ginger-based treatments against infection with *Gyrodactylus turnbulli* in the guppy (*Poecilia reticulata* (Peters)). *Vet. Parasitol.* 209:235–241. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.03.002>
- Lin, R.J., C.Y. Chen, L.Y. Chung, C.M. Yen. 2010. Larvicidal activities of ginger (*Zingiber officinale*) against *Angiostrongylus cantonensis*. *Acta Trop.* 115:69–76. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.12.007>
- Lin, R.J., C.Y. Chen, C.M. Lu, Y.H. Ma, L.Y. Chung, J.J. Wang, J.D. Lee, C.M. Yen. 2014. Anthelmintic constituents from ginger (*Zingiber officinale*) against *Hymenolepis nana*. *Acta Trop.* 140:50–60. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.07.009>

Livak, K.J., T.D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402–8. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>

Magnadóttir, B. 2006. Innate immunity of fish (overview). *Fish Shellfish Immunol.* 20:137–51. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2004.09.006>

Mansell, B., M.D. Powell, I. Ernst, B.F. Nowak. 2005. Effects of the gill monogenean *Zeuxapta seriolae* (Meserve, 1938) and treatment with hydrogen peroxide on pathophysiology of kingfish, *Seriola lalandi* Valenciennes, 1833. *J. Fish Dis.* 28:253–62. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2005.00625.x>

Melhorn, H., Z. Wu, B. Ye. 2013. Treatment of human parasitosis in traditional Chinese medicine. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-39824-7>

Militz, T.A., P.C. Southgate, A.G. Carton, K.S. Hutson. 2013a. Dietary supplementation of garlic (*Allium sativum*) to prevent monogenean infection in aquaculture. *Aquaculture* 408–409:95–99. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.05.027>

Militz, T.A., P.C. Southgate, A.G. Carton, K.S. Hutson. 2013b. Efficacy of garlic (*Allium sativum*) extract applied as a therapeutic immersion treatment for *Neobenedenia* sp. management in aquaculture. *J. Fish Dis.* 37:451–461. <https://doi.org/10.1111/jfd.12129>

Moran, D., C.K. Smith, B. Gara, C.W. Poortenaar. 2007. Reproductive behaviour and early development in yellowtail kingfish (*Seriola lalandi* Valenciennes 1833). *Aquaculture* 262:95–104. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.10.005>

Mostafa, O.M.S., R.A. Eid, M.A. Adly. 2011. Antischistosomal activity of ginger (*Zingiber officinale*) against *Schistosoma mansoni* harbored in C57 mice. *Parasitol. Res.* 109:395–403. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2267-x>

Nowak, B.F. 2007. Parasitic diseases in marine cage culture--an example of experimental evolution of parasites? *Int. J. Parasitol.* 37:581–8. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.01.003>

Nya, E.J., B. Austin. 2009. Use of dietary ginger, *Zingiber officinale* Roscoe, as an immunostimulant to control *Aeromonas hydrophila* infections in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J. Fish Dis.* 32:971–977. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2009.01101.x>

Ogawa, K. 2015. Diseases of cultured marine fishes caused by Platyhelminthes (Monogenea, Digenea, Cestoda). *Parasitology* 142:178–195. <https://doi.org/10.1017/S0031182014000808>

Ogawa, K., M.G. Bondad-Reantaso, M. Fukudome, H. Wakabayashi. 1995. *Neobenedenia girellae* (Hargis, 1955) Yamaguti, 1963 (Monogenea: Capsalidae) from cultured marine fishes of Japan. *J. Parasitol.* 81:223–227.

Ogawa, K., S. Shirakashi, H. Ishitani. 2014. Insemination of the monogenean *Neobenedenia girellae* (Capsalidae, Benedeniinae). *Parasitol. Int.* 63:473–478. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2013.10.009>

Ohashi, H., N. Umeda, N. Hirazawa, Y. Ozaki, C. Miura, T. Miura. 2007. Antiparasitic effect of calcium and magnesium ion-free buffer treatments against a common monogenean *Neobenedenia girellae*. *Parasitology* 134:229–236. <https://doi.org/10.1017/S0031182006001430>

Ohno, Y., F. Kawano, N. Hirazawa. 2009. The effect of oral antibiotic treatment and freshwater bath treatment on susceptibility to *Neobenedenia girellae* (Monogenea) infection of amberjack (*Seriola dumerili*) and yellowtail (*S. quinqueradiata*) hosts. *Aquaculture* 292:248–251. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.04.012>

Ohno, Y., F. Kawano, N. Hirazawa. 2008. Susceptibility by amberjack (*Seriola dumerili*), yellowtail (*S. quinqueradiata*) and Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) to *Neobenedenia girellae* (Monogenea) infection and their acquired protection. *Aquaculture* 274:30–35. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.11.013>

Plouffe, D.A., P.C. Hanington, J.G. Walsh, E.C. Wilson, M. Belosevic. 2005. Comparison of select innate immune mechanisms of fish and mammals. *Xenotransplantation* 12:266–277. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3089.2005.00227.x>

Poortenaar, C.W., S.H. Hooker, N. Sharp. 2001. Assessment of yellowtail kingfish (*Seriola lalandi lalandi*) reproductive physiology, as a basis for aquaculture development. *Aquaculture* 201:271–286. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00549-X](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00549-X)

Ramudu, K.R., G. Dash. 2013. A review on herbal drugs against harmful pathogens in aquaculture. *Am. J. Drug Discov. Dev.* <https://doi.org/10.3923/ajdd.2013.209.219>

Reverter, M., N. Bontemps, D. Lecchini, B. Banaigs, P. Sasal. 2014. Use of plant extracts in fish aquaculture as an alternative to chemotherapy: current status and future perspectives. *Aquaculture* 433:50–61. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.05.048>

Reverter, M., N. Tapissier-Bontemps, P. Sasal, D. Saulnier. 2017. Use of Medicinal Plants in Aquaculture, Use of Medicinal Plants in Aquaculture, in Diagnosis and Control of Diseases of Fish and Shellfish. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, UK.

Reyes-Becerril, M., E. Alamillo, A.G. Trasviña-Moreno, I. Hirono, H. Kondo, W. Jirapongpaioj, F. Ascencio-Valle, C. Angulo. 2017. In vivo and in vitro studies using larval and adult antigens from *Neobenedenia melleni* on immune response in yellowtail (*Seriola lalandi*). J. Fish Dis. 40:1497–1509. <https://doi.org/10.1111/jfd.12620>

Reyes-López, M., S. Villa-Treviño, M. Arriaga-Alba, L. Alemán-Lazarini, M. Rodríguez-Mendiola, C. Arias-Castro, S. Fattel-Fazenda, M. De La Garza. 2005. The amoebicidal aqueous extract from *Castela texana* possesses antigenotoxic and antimutagenic properties. Toxicol. Vitro. 19:91–97. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2004.06.005>

Rico, A., T.M. Phu, K. Satapornvanit, J. Min, A.M. Shahabuddin, P.J.G. Henriksson, F.J. Murray, D.C. Little, A. Dalsgaard, P.J. Van den Brink. 2013. Use of veterinary medicines, feed additives and probiotics in four major internationally traded aquaculture species farmed in Asia. Aquaculture 412–413:231–243. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.07.028>

Ringø, E., R.E. Olsen, I. Jensen, J. Romero, H.L. Lauzon. 2014. Application of vaccines and dietary supplements in aquaculture: possibilities and challenges. Rev. Fish Biol. Fish. 1005–1032. <https://doi.org/10.1007/s11160-014-9361-y>

Robles-Zepeda, R.E., C.A. Velázquez-Contreras, A. Garibay-Escobar, J.C. Gálvez-Ruiz, E. Ruiz-Bustos. 2011. Antimicrobial activity of northwestern mexican plants against *Helicobacter pylori*. J. Med. Food 14:1280–1283. <https://doi.org/10.1089/jmf.2010.0263>

Rosero, G.A. del P.. 2016. Evaluación de medicamentos homeopáticos en el cultivo de juveniles de pargo lunarejo *Lutjanus guttatus*. Tesis (Maestro en Ciencias en Manejo de Recursos Marinos) La Paz, B.C.S. México. Instituto Politecnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas. 100p.

Sanderson, L., A. Bartlett, P.J. Whitfield. 2002. In vitro and in vivo studies on the bioactivity of a ginger (*Zingiber officinale*) extract towards adult schistosomes and their egg production. J. Helminthol. 76:241–247. <https://doi.org/10.1079/JOH2002116>

Secombes, C.J., L.H. Chappell. 1996. Fish immune responses to experimental and natural infection with helminth parasites. Annu. Rev. Fish Dis. 6:167–177.

Seng, L.T. 1997. Control of parasites in cultured marine finfishes in Southeast Asia-an Overview. *Int. J. Parasitol.* 27:1177–1184.

Sharp, N., B. Diggles, C. Poortenaar, T. Willis. 2004. Efficacy of AQUI-S, formalin and praziquantel against the monogeneans, *Benedenia seriolae* and *Zeuxapta seriolae*, infecting yellowtail kingfish *Seriola lalandi lalandi* in New Zealand. *Aquaculture* 236:67–83. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.02.005>

Sharp, N.J., C.W. Poortenaar, B.K. Diggles, T.J. Willis. 2003. Metazoan parasites of yellowtail kingfish, *Seriola lalandi lalandi*, in New Zealand: Prevalence, intensity, and site preference. *New Zeal. J. Mar. Freshw. Res.* 37:273–282. <https://doi.org/10.1080/00288330.2003.9517165>

Shigdar, S., D. Cook, P. Jones, A. Harford, A.C. Ward. 2007. Blood cells of murray cod *Maccullochella peelii peelii* (Mitchell). *J. Fish Biol.* 70:973–980. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2007.01351.x>

Shirazi, M.T., H. Gholami, G. Kavooosi, V. Rowshan, A. Tafsiry. 2014. Chemical composition, antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of *Tagetes minuta* and *Ocimum basilicum* essential oils. *Food Sci. Nutr.* 2:146–55. <https://doi.org/10.1002/fsn3.85>

Sicuro, B., U. Luzzana. 2016. The state of *Seriola* spp. other than yellowtail (*S. quinqueradiata*) farming in the world. *Rev. Fish. Sci. Aquac.* 24:314–325. <https://doi.org/10.1080/23308249.2016.1187583>

Souza, R. a R., W.F. da Anunciação, S.M. Lins, E.G. Sanches, M.L. Martins, M.Y. Tsuzuki. 2012. Can barber goby *Elacatinus figaro* control *Neobenedenia melleni* infections on dusky grouper *Epinephelus marginatus*? *Aquac. Res.* n/a-n/a. <https://doi.org/10.1111/are.12002>

Stratev, D., G. Zhelyazkov, X. Siwe Noundou, R.W.M. Krause. 2017. Beneficial effects of medicinal plants in fish diseases. *Aquac. Int.* 1–20. <https://doi.org/10.1007/s10499-017-0219-x>

Sutili, F.J., A.L. Murari, L.L. Silva, L.T. Gressler, B.M. Heinzmann, A.C. de Vargas, D. Schmidt, B. Baldisserotto. 2016. The use of *Ocimum americanum* essential oil against the pathogens *Aeromonas hydrophila* and *Gyrodactylus* sp. in silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Lett. Appl. Microbiol.* 63:82–88. <https://doi.org/10.1111/lam.12602>

Suzuki, Y., T. Iida. 1992. Fish granulocytes in the process of inflammation. *Annu. Rev. Fish Dis.* 2:149–160. [https://doi.org/10.1016/0959-8030\(92\)90061-2](https://doi.org/10.1016/0959-8030(92)90061-2)

- Talpur, A.D., M. Ikhwanuddin, A.-M. Ambok Bolong. 2013. Nutritional effects of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) on immune response of Asian sea bass, *Lates calcarifer* (Bloch) and disease resistance against *Vibrio harveyi*. *Aquaculture* 400:46–52. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.02.043>
- Thoney, D.A., W.J. Hargis. 1991. Monogenea (platyhelminthes) as hazards for fish in confinement. *Annu. Rev. Fish Dis.* 1:133–153. [https://doi.org/10.1016/0959-8030\(91\)90027-H](https://doi.org/10.1016/0959-8030(91)90027-H)
- Tort, L., J.C. Balasch, S. Mackenzie. 2003. Fish immune system. A crossroads between innate and adaptive responses. *Immunologia* 22:277–286. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(04\)00084-6](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(04)00084-6)
- Trujillo-González, A., L.K. Johnson, C.C. Constantinoiu, K.S. Hutson. 2015. Histopathology associated with haptor attachment of the ectoparasitic monogenean *Neobenedenia* sp. (Capsalidae) to barramundi, *Lates calcarifer* (Bloch). *J. Fish Dis.* 38:1063–1067. <https://doi.org/10.1111/jfd.12320>
- Tubbs, L.A., M.D. Tingle. 2006. Bioavailability and pharmacokinetics of a praziquantel bolus in kingfish *Seriola lalandi*. *Dis. Aquat. Organ.* 69:233–8. <https://doi.org/10.3354/dao069233>
- Tubbs, L.A., M.D. Tingle. 2006. Effect of dose escalation on multiple dose pharmacokinetics of orally administered praziquantel in kingfish *Seriola lalandi*. *Aquaculture* 261:1168–1174. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.09.013>
- Van Hai, N. 2015. The use of medicinal plants as immunostimulants in aquaculture: A review. *Aquaculture* 446:88–96. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.03.014>
- Vaseeharan, B., R. Thaya. 2014. Medicinal plant derivatives as immunostimulants: an alternative to chemotherapeutics and antibiotics in aquaculture. *Aquac. Int.* 22:1079–1091. <https://doi.org/10.1007/s10499-013-9729-3>
- Vij, T., Y. Prashar. 2015. A review on medicinal properties of *Carica papaya* Linn. *Asian Pacific J. Trop. Dis.* 5:1–6. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(14\)60617-4](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(14)60617-4)
- Whittington, I.D. 2012. *Benedenia seriolae* and *Neobenedenia* Species, in: Woo, P.T.K., Buchmann, K. (Eds.), *Fish Parasites: Pathobiology and Protection*. CABI, Wallingford, Oxfordshire, UK., pp. 225–244.
- Whittington, I.D., S. Corneillie, C. Talbot, J.A.T. Morgan, R.D. Adlard. 2001. Short communication Infections of *Seriola quinqueradiata* Temminck & Schlegel and *S. dumerili* (Risso) in Japan by *Benedenia seriolae* (Monogenea) confirmed by morphology and 28S ribosomal DNA analysis. *Journal of Fish Diseases*. 24:421–425.

Whyte, S.K. 2007. The innate immune response of finfish--a review of current knowledge. *Fish Shellfish Immunol.* 23:1127–51. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2007.06.005>

Wink, M. 2008. Evolutionary advantage and molecular modes of action of multi-component mixtures used in phytomedicine. *Curr. Drug Metab.* 9:996–1009. <https://doi.org/10.2174/138920008786927794>

Yamamoto, S., A. Fukushima. 2014. Shading of net cage is an effective control measure against skin fluke *Neobenedenia girellae* infection in chub mackerel *Scomber japonicus*. *Fish. Sci.* 80:1021–1026. <https://doi.org/10.1007/s12562-014-0781-3>

Yamamoto, S., S. Shirakashi, S. Morimoto, K. Ishimaru, O. Murata. 2011. Efficacy of oral praziquantel treatment against the skin fluke infection of cultured chub mackerel, *Scomber japonicus*. *Aquaculture* 319:53–57. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.06.045>

Yilmaz, S., S. Ergün. 2012. Effects of garlic and ginger oils on hematological and biochemical variables of sea bass *Dicentrarchus labrax*. *J. Aquat. Anim. Health* 24:219–224. <https://doi.org/10.1080/08997659.2012.711266>

Referencia de internet.

Seriola lalandi @ BOLD (1); Global Biodiversity Information Facility (80975) <http://www.discover>.

Egersund Net. Part of AKVA group. <https://www.egersundnet.no/products/fish-farming-nets>,

InnovaSea. www.innovasea.com

Kampachi Farms LLC. www.kampachifarm.com.

El sistema inmune de los teleósteos (I), (2014) <http://albeitar.portalveterinaria.com/imprimir-noticia.asp?noti=3346>=).