



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL EXTRACTO METANÓLICO DEL TEPOZÁN
(*Buddleja cordata*) SOBRE TRICODÍNIDOS DE TILAPIA (*Oreochromis* sp.)

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

PRESENTA

OFELIA CITLALLI MONTAÑEZ GARCÍA

TUTOR PRINCIPAL:

DR. ROGELIO AGUILAR AGUILAR

FACULTAD DE CIENCIAS-UNAM

COMITÉ TUTOR:

DRA. EVANGELINA ROMERO CALLEJAS

FMVZ-UNAM

DRA. PATRICIA MORA MEDINA

FES CUAUTITLAN-UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX. FEBRERO 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

- ✚ Al Posgrado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal, Universidad Autónoma de México.
- ✚ Al CONACYT por la beca otorgada durante mis estudios de posgrado.
- ✚ A las Dras. Patricia Mora Medina y Evangelina Romero Callejas, por ser parte de mi comité tutor, gracias por sus consejos y comentarios, por todo el apoyo y por confiar en mí. Fue un gran gusto trabajar bajo su dirección, sin su apoyo esto no hubiera sido posible.
- ✚ Al Dr. Ricardo Reyes Chilpa, la Dra. Silvia Laura Guzmán Gutiérrez y la M.C. Griselda Hernández Pasteur por sus enseñanzas en el área de la fitoquímica y el extracto metanólico de *B. cordata* proporcionado.
- ✚ Agradezco al profesor David Tafolla Venegas por permitirme trabajar en su laboratorio de parasitología en la UMSNH, por recibirme siempre con las puertas abiertas; sus enseñanzas, paciencia y consejos fueron de gran importancia para mi trabajo de tesis.
- ✚ Al M. C. José Luis Pablos Hach y la Dra. Silvia Laura Guzmán Gutiérrez, por su apoyo en la parte estadística de este proyecto.
- ✚ Al M.C. Ignacio Andrés Morales Salas por su apoyo técnico en el traslado de las tilapias y el material prestado para este propósito. Además de alentarme a seguir a pesar de las dificultades.
- ✚ A los miembros de mi jurado, la Dra. Yazmín Alcalá Canto, Dra. Silvia Laura Guzmán Gutiérrez, Dra. Patricia Mora Medina y Dr. Jorge Francisco Monroy López por sus aportaciones tan importantes al momento de la revisión de mi escrito de tesis, ayudaron a mejorar sustancialmente mi trabajo.
- ✚ Al Dr. Omar Domínguez Domínguez por el material prestado para la realización de los bioensayos, y por ser siempre un apoyo académico. Gracias Omar.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

- ✚ A los Tafolla-parasitólogos, Dave, Marcos, Dianita y Ale por permitirme ser parte de su equipo y hacerme sentir como en casa en mi estancia en Morelia.
- ✚ A Omar Lagunas por todos los consejos y largas pláticas en los momentos más complicados del proceso, por ser tan linda persona y tenerme paciencia.
- ✚ A los Pindaros-Lab, Massiel, Arturo, Jaz, Pedro y Fer por su amistad y los ratos de esparcimiento entre horas de trabajo, que sin ellas me habría vuelto loca.

DEDICATORIA

A mi mamá, por ser un pilar en mi vida y mi ejemplo a seguir, por apoyarme en todo este camino llamado vida, siempre te estaré agradecida, porque de ti aprendí a no quedarme nunca quieta y salir siempre de mi zona de confort.

A mi tía Juanita, porque creíste en mí, por ser mi amiga, confidente y animarme a seguir; por cuidar de mí y consentirme tanto.

A mis hermanas Grace e Itzel por tantas risas y también sus abrazos en los momentos de llanto, porque con ustedes mi vida tiene un plus, y siempre aprendo a su lado.

A mi papá por las charlas, los consejos y estar pendiente de mí.

A mi mamá Reyes, porque tu gusto por la medicina tradicional despertó en mí la curiosidad por la aplicación de la fitoterapia en los peces, porque siempre me recuerdas que mis raíces están aquí; que la tierra siempre puede ofrecer solución a los problemas como la enfermedad o el hambre, y que si hubiera más plantas todo sería mejor.

A mi baby (Fer), por alentarme a hacer una maestría, por ser el culpable de mis desvelos y grandes aprendizajes, gracias por enseñarme a confiar en mí, a vencer mis miedos, y superar mis adversidades, has visto en mí cosas que yo no veía, me has ayudado a ver el mundo con otros ojos, siempre me haces sacar mi mejor versión. Eres una gran persona y siempre estarás en mi corazón. Te amo.

Al resto de mi familia.

RESUMEN	i
ABSTRACT.....	ii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MARCO TEORICO.....	4
2.1. Protozoarios ectoparásitos: Tricodínidos.....	4
2.2. Tricodínidos. Principales características morfológicas.....	5
2.3. Ciclo de vida de los tricodínidos.....	9
2.4. Tricodiniasis.....	10
2.5. Hospedero. <i>Oreochromis</i> sp. Características biológicas y taxonómicas	13
2.6. Ambiente.....	16
2.7. Prevención, control y tratamiento de la tricodiniasis	19
2.8. Medicina tradicional mexicana	23
2.9. Características generales del tepozán (<i>Buddleja cordata</i>) y su distribución.	26
2.10. Composición química y estudios fitoquímicos del tepozán (<i>Buddleja cordata</i>)	29
2.11. Obtención de extractos herbales	30
2.12. Toxicidad en peces	31
III. HIPOTESIS	34
IV. OBJETIVOS.....	34
4.1. General.....	34
4.2. Particulares.....	34
V. MATERIALES Y METODOS.....	35
5.1. Descripción del sitio de colecta.....	35
5.2. Colecta y transporte de los organismos.....	36
5.3. Técnicas de tinción	39
5.4. Bioensayos.....	41
5.4.1. Estandarización del tiempo de sobrevivencia in vitro de las tricodinas y método del lavado de branquias	41
5.4.2. Pruebas de toxicidad	43
5.4.2.1. Toxicidad del DMSO	43
5.4.2.2. Toxicidad del extracto del tepozán	45

5.4.3.	Evaluación del efecto in vivo del extracto metanólico del tepozán (<i>Buddleja cordata</i>) a diferentes concentraciones sobre tricodínidos presentes en tilapia (<i>Oreochromis sp.</i>).	46
VI.	RESULTADOS	50
6.1.	Técnicas de tinción	50
6.2.	Bioensayos.....	50
6.2.1.	Tiempo de sobrevivencia in vitro de las tricodinas	50
6.2.2.	Toxicidad del DMSO	51
6.2.3.	Toxicidad del extracto metanólico del tepozán	52
6.2.4.	Evaluación del efecto in vivo del extracto metanólico del tepozán (<i>Buddleja cordata</i>) a diferentes concentraciones sobre tricodínidos presentes en tilapia (<i>Oreochromis sp.</i>).	55
VII.	DISCUSIÓN.....	59
VIII.	CONCLUSIONES	65
IX.	REFERENCIAS.....	66

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Parámetros fisicoquímicos del agua. Rangos óptimos para el cultivo de tilapia.	16
Cuadro 2. Fármacos aprobados para su utilización en peces de consumo humano en Estados Unidos de Norteamérica, Europa y México.	20
Cuadro 3. Medidas de los parámetros fisicoquímicos del agua de los estanques de colecta.	35
Cuadro 4. Número de tilapias utilizadas en cada bioensayo	36
Cuadro 5. Variables conductuales medidas en otros trabajos y su modelo biológico.	42
Cuadro 6. Preparación de las concentraciones del EMeOH del tepozán	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema general de una tricodina.	5
Figura 2. Microfotografías de <i>T. urinicola urinicola</i> , <i>T. claviformis</i> y <i>T. jadranica</i> .	6
Figura 3. Microfotografías con impregnación de nitrato de plata.	7
Figura 4. Tinción con hematoxilina de Harris.	7
Figura 5. Ciclo de vida de los tricodínidos.	9
Figura 6. <i>Trichodina</i> spp. nadando sobre aleta y branquias de pez.	10
Figura 7. Morfología general externa de la tilapia (<i>Oreochromis</i> sp.).	13
Figura 8. Morfología general interna de la tilapia (<i>Oreochromis</i> sp.).	14
Figura 9. Comportamiento reproductivo de la tilapia.	15
Figura 10. Estructura química de la bruceina A y B.	23
Figura 11. Estructura química del osthol y el isopimpinellin.	24
Figura 12. Arbusto de <i>B. cordata</i>	25
Figura 13. Morfología de <i>Buddleja cordata</i> H.B.K ssp.	27
Figura 14. Mapa de distribución de <i>Buddleja cordata</i> .	27
Figura 15. Estructura química del verbascósido.	29
Figura 16. Método general de obtención de extractos herbales.	30
Figura 17. Localización del sitio de colecta.	34
Figura 18. Técnica de Klein “en seco”.	39
Figura 19. Técnica de hematoxilina de Harris.	39
Figura 20. Esquema de la técnica de cuantificación de tricodinas y estandarización del tiempo de sobrevivencia.	41
Figura 21. Procedimiento de la prueba de toxicidad del DMSO.	43
Figura 22. Procedimiento de la prueba de toxicidad del extracto metanólico del tepozán.	44
Figura 23. Preparación de alícuotas para los bioensayos de eficacia del extracto metanólico del tepozán.	45
Figura 24. Técnica utilizada para la prueba de eficacia del extracto metanólico del tepozán.	47
Figura 25. Tricodínidos teñidos mediante la técnica de Klein “en seco” y hematoxilina de Harris.	49
Figura 26. Número de tricodinas vivas y muertas, con y sin branquias <i>in vitro</i> .	50

Figura 27. Gráficas de las variables conductuales observadas en la prueba de toxicidad del DMSO. 51

Figura 28. Número de peces por variable conductual para la prueba de toxicidad del extracto metanólico del tepozán. 52

Figura 29. Análisis PROBIT realizado a las 48 horas de exposición al extracto metanólico del tepozán. 53

Figura 30. Número de tricodínidos vivos por tratamiento en la prueba del extracto metanólico del tepozán. 54

Figura 31. Porcentaje de los promedios de tricodinas vivas para cada tratamiento. 55

Figura 32. Porcentaje de los promedios de tricodinas vivas para cada tratamiento por tiempo 56

Figura 33. Microfotografías de tricodinas presentes en los tratamientos. 57

Figura 34. Microfotografías de tricodinas muestreadas en los tratamientos. 57

RESUMEN

Los tricodínidos (Trichodinidae) son uno de los grupos más grandes y más ampliamente distribuidos de ectoparásitos ciliados en ambientes de agua dulce, marinos y eurihalinos; siendo los sistemas de cultivo de peces los más afectados por su presencia. En México, en las granjas de tilapia, los géneros de la familia Trichodinidae, producen daños como irritación en piel, aletas y branquias, lo cual genera exceso de mucosidad en las branquias y dificultando la respiración, y facilitando infecciones por hongos o bacterias. La enfermedad que causan estos parásitos es conocida como tricodiniasis, y genera altos niveles de mortalidad. Ante dicho panorama, se ha planteado el uso de alternativas naturales, tales como los extractos de plantas medicinales, que en la acuicultura han tenido un efecto positivo, debido a los componentes fitoquímicos activos.

El presente trabajo tuvo como objetivo general la exploración de un nuevo tratamiento con el extracto crudo metanólico de *Buddleja cordata* (tepozán) contra tricodínidos presentes en tilapia de cultivo. Se realizaron colectas en la granja ecológica “El pescadito”, ubicada en Huandacareo, Michoacán, para obtener tilapias parasitadas con tricodínidos y así llevar a cabo las pruebas de eficacia *in vivo* del extracto metanólico del tepozán (*B. cordata*), a concentraciones de 300, 500, 750 y 1000 mg/L, con dos controles, uno de DMSO y otro de sólo agua, aplicándolos en baños de inmersión con duración de 3, 6 y 9 horas.

Como resultado obtuvimos que las concentraciones de 750 y 1000 mg/L mostraron un efecto importante sobre las tricodinas, disminuyendo el número de vivas a las 3 horas de exposición. Por otra parte, en los bioensayos de toxicidad el extracto presenta un efecto tóxico sobre las tilapias a las 48 h en las concentraciones de 500, 750 y 1000 mg/L, siendo esta última la de mayor toxicidad, por lo que no se podrían considerar inocuas estas concentraciones en tiempos prolongados de exposición.

De este modo concluimos que la concentración de 750 mg/L presenta potencial para tratar la tricodiniasis en tilapia, y se podría considerar como tratamiento seguro debido a que a las 3 horas de exposición presenta una reducción considerable sobre el número de tricodínidos vivos ($P < 0.05$), y su efecto tóxico se presenta hasta las 48 horas post exposición.

Palabras clave: Trichodiniasis, tilapia, tepozán, *Buddleja cordata*.

ABSTRACT

Trichodinids (Trichodinidae) are one of the most and widely distributed groups of ciliated ectoparasites in freshwater, marine and euryhaline environments; fish farming systems being the most affected by their presence. In Mexico, in tilapia farms, genera of the family Trichodinidae, produces damages such as irritation in skin, fins and gills, which generates excessive mucus production in the gills making breathing difficult, and allowing infections by fungi or bacteria. The disease caused by these parasites is known as trichodiniasis, which generates high levels of mortality. Given this perspective, the use of natural alternatives has been proposed, such as medicinal plants extracts, which in aquaculture have had a positive effect, due to their active phytochemical components.

The aim off the work was to explore a new treatment using the raw methanolic extract of *Buddleja cordata* (tepozán) against trichodinids present in tilapia aquaculture. Collections were carried out in the ecological farm "El pescadito", located in Huandacareo, Michoacán, to obtain tilapia parasitized with trichodinids and thus carry out in vivo efficacy tests of the methanol extract of tepozán (*B. cordata*). We were performed at 300, 500, 750 and 1000 mg/L concentrations test, with two controls, one of DMSO and another one just with water. For exposure the parasite with the different treatment I did an immersion baths with a duration of 3, 6 and 9 hours.

Our results suggest that the 750 and 1000 mg / L concentrations have an important effect on the trichodines, decreasing the number of individuals alive after 3 hours of exposure. On the other hand, in toxicity bioassays, the extract has a toxic effect on tilapia at 48 h at concentrations of 500, 750 and 1000 mg/L, the latter being the most toxic, so these concentrations could not be considered harmless at prolonged times of exposure.

In this respect, we conclude that the 750 mg/L concentration has the potential to treat trichodiniasis in tilapia, and could be considered as a safe treatment because after 3 hours of exposure it presents a considerable reduction in the number of alive trichodinides ($P < 0.05$), and its toxic effect occurs up to 48 hours post exposure.

Key words: Trichodiniasis, tilapia, tepozán, *Buddleja cordata*.

I. INTRODUCCIÓN

La acuicultura es uno de los sectores de producción alimentaria con mayor crecimiento en los últimos años, lo que ha permitido que en la actualidad aporte casi la mitad del abasto de pescado para consumo humano a nivel mundial (FAO, 2016; FAO, 2018). México es el décimo sexto productor mundial en pesca y acuicultura, con una producción de alrededor de 1, 681,258 toneladas, de la cual el cultivo la tilapia ocupa el segundo lugar. Tan sólo en Michoacán se cuenta con nueve mil 230 unidades de producción acuícola donde sobresalen las unidades de producción de tilapia, camarón y trucha (SAGARPA, 2013; 2018).

La acuicultura en México (y en cualquier parte del mundo) es vulnerable a las enfermedades y las condiciones ambientales, y en años recientes se han dado brotes causados por patógenos en peces de cultivo que han disminuido parcial o completamente la producción acuícola (Jiménez-Bahena *et. al.*, 2010; Rubio-Godoy, 2013). Por lo tanto, uno de los factores que limitan el desarrollo del sector acuícola es la mortalidad de los peces en los sistemas de cultivo, asociada a diversas enfermedades y la ineficacia de los métodos utilizados para controlarlas, por ejemplo, el mal uso de antibióticos, de los cuales hay un desconocimiento de su vida media tanto en los peces como en el medio ambiente, así como su influencia en el desarrollo de cepas resistentes, debido al uso indiscriminado de estos medicamentos (Martínez-Millán y Fontanillas Pérez, 2016).

Un aspecto importante que por lo regular se pasa por alto es que tanto los antibióticos como las cepas resistentes a los mismos podrían modificar la biota del suelo, representando así, un riesgo potencial para los recursos naturales, la vida silvestre y los seres humanos; además de que hay sustancias químicas que se bioacumulan o tardan mucho tiempo en ser metabolizadas y eliminadas por los peces. Para lograr un efectivo tratamiento preventivo y correctivo de las enfermedades en la acuicultura, es necesario realizar una rigurosa investigación científica básica para sustentar el uso de terapias alternativas que actúen fortaleciendo el sistema inmune e incrementen la resistencia del huésped ante la enfermedad sin comprometer al medio o la inocuidad del producto final (González-Mantilla, 2010; Bulfon *et. al.*, 2013; Froehlich *et. al.*, 2017).

En forma natural, como parte del ecosistema, la mayoría de los peces, tanto en estado silvestre como en cautividad (acuafilia), se encuentran infestados por parásitos cuyas lesiones pasan inadvertidas en la mayoría de los casos. Sin embargo, en las poblaciones de peces de cultivo los parásitos causan a menudo serios brotes de enfermedad, debido a las altas densidades mantenidas en los estanques, lo que favorece la rápida diseminación de los parásitos o agentes infecciosos (Woo, 1999; Martins y Romero, 1996).

Las enfermedades causadas por protozoarios afectan a una gran diversidad de peces, tanto dulceacuícolas como marinos, muchos de ellos de importancia comercial. Estos parásitos pueden llegar a ocasionar daños considerables, y en infecciones severas reducen la calidad del producto o provocan altas mortalidades en los sistemas de cultivo anulando su rentabilidad (Paperna, 1996). Los protozoarios están representados por varias familias y géneros, con especificidad hospedadora y prevalencias elevadas en condiciones ambientales adversas, por lo que representan un peligro potencial para las granjas acuícolas. Este es el caso de las especies de los géneros *Trichodina*, *Paratrachodina*, *Trichodinella* y *Tripartiella* (familia Tricodinidae), que en altas densidades causan daños en la superficie corporal del hospedero (irritación en las zonas de adherencia, formación de ampulas o agujeros en la superficie corporal). A la enfermedad causada por tricodínidos se le conoce como tricodiniasis, y existen algunos tratamientos para combatirla (formalina, praziquantel, entre otros), pero en ocasiones los parásitos no son eliminados del todo, crean resistencia, o las sustancias empleadas son muy agresivas tanto para los peces como para el personal que aplica el tratamiento y muchas veces no se toma en cuenta el impacto ambiental que tendrán sus residuos al ser eliminados al medio (Jiménez-Guzmán *et al.*, 1988; Rodríguez-Gutiérrez *et al.*, 2001; Fajer-Avila *et al.*, 2003; Colorni y Diamant, 2005; Benítez-Villa, 2010; Rubio-Godoy *et al.*, 2013; Balbuena-Rivarola *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2017).

Ante dicho panorama, se ha planteado el uso de alternativas naturales. Los extractos de plantas medicinales en la acuicultura han tenido un efecto positivo, debido a su potencial como aditivos alimenticios, inmuno-estimulantes, promotores del crecimiento, efecto anti-estrés, estimulantes de la maduración sexual y anti-patógenos; esto debido a los componentes fitoquímicos activos como alcaloides, terpenoides, taninos, saponinas, glucósidos, flavonoides, compuestos fenólicos, esteroides, aceites esenciales, entre otros (Silveira-

Coffiny, 2006; Reverter *et. al.* 2017). Después de algunos años de investigación sobre el efecto de las plantas medicinales en padecimientos causados por parásitos en peces, se ha llegado a considerar que su implementación podría reducir los costos del tratamiento y ser más amigable con el medio ambiente en comparación con los medicamentos sintéticos, lo anterior debido a que las plantas poseen moléculas biodegradables (Silveira-Coffiny, 2006). En nuestro país existe una gran diversidad de plantas con efectos anti-parasitarios importantes, tal es el caso del tepozán (*Buddleja cordata*), el cual genera metabolitos secundarios, que son componentes de defensa contra agentes externos; cuya actividad se ha estudiado recientemente como tratamiento para combatir protozoarios ectoparásitos de tilapia (Ávila-Álvarez, 1992; Díaz-Reyes, 1993; Ocampo y Jiménez, 1993; Xu *et. al.*, 1999; Díaz-Sánchez *et. al.*, 2000; Bulfon *et. al.*, 2013, Xu *et. al.*, 2015).

II. MARCO TEORICO

Es estrecha la relación que existe entre el hospedero, el agente patógeno y el ambiente, marcando un delicado equilibrio que, si es quebrantado, sobreviene la enfermedad (Martins y Romero, 1996). En este caso, los agentes como los ectoparásitos suelen vivir en las superficies externas de sus hospederos, (por ejemplo los peces). Existe una amplia variedad con alta especificidad de hospedero e incluso llegan a parasitar zonas muy específicas del organismo.

2.1. Protozoarios ectoparásitos: Tricodínidos

Géneros

Trichodina (Ehrenberg, 1838)

Vauchomia (Müller, 1938)

Trichodinella (Raabe, 1950; Šrámek-Hušek, 1953)

Semitrichodina (Kazubski, 1958)

Dipartinella (Stein, 1961)

Familia Trichodinidae

Tripartinella (Lom, 1959)

Paratrichodina (Lom, 1963)

Trichodoxa (Sirgel, 1983)

Hemitrichodina (Basson y van As, 1989)

Pallitrichodina (Van As y Basson, 1993)

Heterobladetrichodina (Hu, 2011)

(Islas-Ortega, 2017)

La familia Trichodinidae incluye 11 géneros, de los cuales los más conocidos son *Trichodina*, *Paratrichodina*, *Trichodinella* y *Tripartinella*, estos 11 géneros a su vez engloban una gran cantidad de especies, muchas de las cuales que se encuentran comúnmente asociadas a la piel, aletas, branquias, vejiga y sistema urinario de peces de agua salada, salobre y dulce, además de crustáceos, moluscos y anfibios (Xu *et. al.*, 2002; Asmat, 2004; Asmat y Sultana, 2005; Özer, 2000, Zhang *et. al.*, 2017).

Estos protozoarios generalmente suelen estar presentes en los estanques nadando libremente y posándose de vez en cuando sobre cuerpo y branquias de los peces, constituyen un “acompañante casi natural, pero molesto” (Mojica-Sastoque *et. al.*, 2010); sólo en condiciones favorables para ellos, proliferan para tornarse patógenos, causar daños severos, incluso mortalidad en poblaciones de peces tanto juveniles como adultos, esto ocurre más

frecuentemente en cultivos acuícolas, por las condiciones de hacinamiento, mala calidad del agua, entre otros factores (Van As y Basson, 1987; Martins y Romero, 1996).

2.2. Tricodínidos. Principales características morfológicas

Los tricodínidos son ciliados microscópicos en forma circular (vista superior) o de copa (vista horizontal), pueden medir de 20 a 100 μ de diámetro, tienen en su interior estructuras con forma de aspas (dentículos), que giran constantemente; están cubiertos por una membrana delgada, llamada periciclo, la cual presenta ciliatura adoral en forma de espiral con tres cinturones ciliares, que corren en el sentido contrario a las agujas del reloj alrededor del extremo anterior de la célula, el primer cinturón está asociado al margen de la membrana y se compone de cilios cortos y sencillos; el segundo es un círculo de pectinelas locomotoras largas y fuertes; el tercero presenta cilios táctiles marginales insertados sobre el borde del velum.

Su disco adhesivo quitinoide está compuesto por membranas estriadas y dentículos en forma de gancho con un arreglo radial, cada uno con un aspa aplanada dirigida hacia afuera (cuchilla), un cono central y un rayo o espina interna, el macronúcleo tiene forma de herradura, el micronúcleo redondo y situado cerca del macronúcleo (Figura 1) (Van As y Basson, 1984; Van As y Basson, 1986; Van As y Basson, 1987; Van As y Basson, 1989; Olmo y Fernandez Galiano, 1997; Franco-Rojas, 2007; Islas-Ortega, 2017).

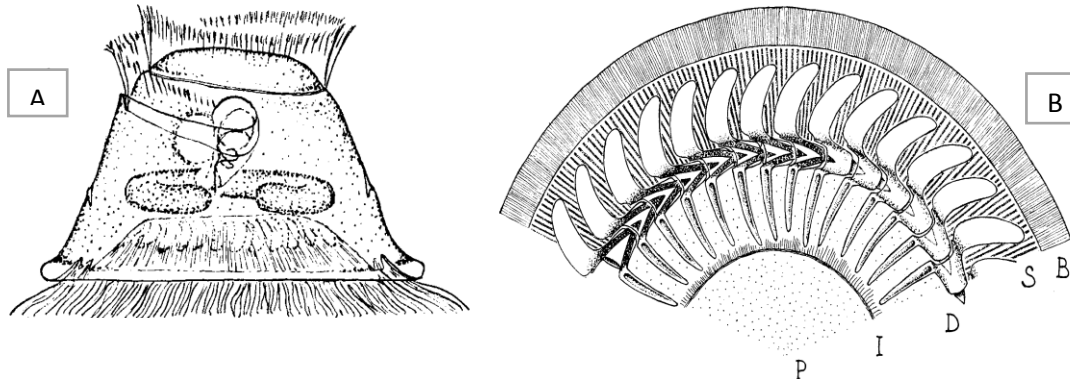


Figura 1. Esquema general de una tricodina, vista lateral A). Detalle del disco adhesivo B); BM: Borde de membrana finamente estriada; S: Membrana estriada que consiste en numerosos alfileres radiales (8-10 entre cada denticulo); D: anillo denticulado. Una parte de los denticulos están representados como diseccionados y en la otra parte se aprecia la superficie de los denticulos. I: anillo ciliar interno desde el cual las fibrillas se elevan hacia la cinetobasis del circulo ciliar externo. P: la parte central del disco adhesivo (Tomado y modificado de Lom, 1958).

La mayoría de los trabajos científicos sobre estos ciliados están enfocados principalmente a su taxonomía, la cual inició con el trabajo de Ehrenberg (1838). En la identificación de las tricodinas un factor importante a considerar es el crecimiento de los elementos esqueléticos para determinar la madurez de los especímenes en forma individual, principalmente el disco adhesivo, que está conformado por denticulos y membranas estriadas normalmente oscurecidas por el periciclo; los denticulos se conectan a la membrana estriada por medio de microfibrillas, la forma de los denticulos se conforma de cuchilla, parte central y rayo, las cuchillas pueden ser rectas o curvas y muestran diferentes formas de tamaño, mientras que los rayos pueden ser de diferentes longitudes en forma de barra, de espina, de aguja o de remo (Lom, 1958; Kazubski, 1967; Lom y Dyková, 1992; Basson *et. al.*, 1993; Van As y Basson, 1984; Van As y Basson, 1986; Van As y Basson, 1987; Van As y Basson, 1989; Islas-Ortega, 2017).

Con la impregnación argéntica del carbonato de plata de Fernandez-Galiano (1994) únicamente se pueden distinguir los “pins” (alfileres) radiales y en forma de V los denticulos. Con la metodología de Lom (1958), las imágenes permiten tomar las medidas del disco adhesivo, diámetro del anillo denticular y número de “pins” radiales entre cada dos denticulos (Figura 2). La espiral adoral se encuentra formada por una haplocinetia en el exterior con una fila de cilios dispuestos en zig-zag, y una policinetia formada por tres filas de cinetosomas; la espiral adoral entra en la cavidad bucal; en el movimiento del ciliado está implicado la

banda troncal o borde locomotor, compuesto por una corona ciliada con 9-11 cilios en disposición diagonal y por el anillo basal (Figura 2) (Olmo y Fernández-Galiano, 1997; Xu *et. al.*, 1999).

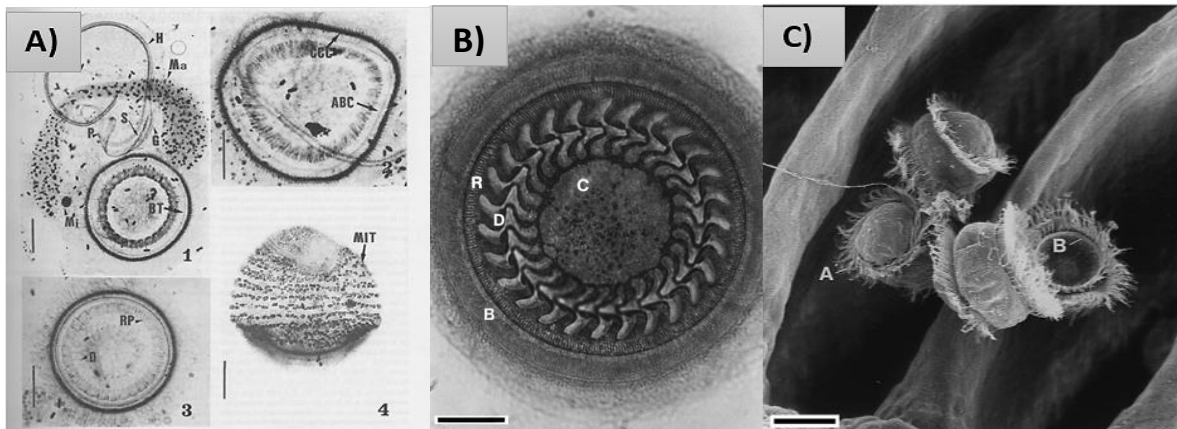


Figura 2. Microfotografías de *Trichodina urinicola urinicola* (A), impregnadas con el método del carbonato de plata (Fernández-Galiano, 1994); A1: Infraciliación somática y oral. BT- Banda troncal; G- Cinética germinal; H- Haplocinetia; Ma- Macronúcleo; Mi- Micronúcleo; P- Penáculos; PO- Policinetia; S- Estructura impregnable. A2: Infraciliación del borde locomotor. CCC- Corona circular de cilios. A3: Disco adhesivo. D- Dentículos; RP- <pins> radiales. A4: Mitocondrias dispuestas en filas paralelas. MIT- Mitocondrias. Escala = 20 μ m. B) Microfotografías de *Trichodina claviformis*, procesadas por el método de plata en “seco” de Klein; D- D- Anillo denticulado; C- Centro del disco adhesivo; B- Borde de membrana; R- <pins> radiales. C) Fotografías en microscopía electrónica de *T. jadratica*, A- cavidad bucal; B- corona ciliar (figura A modificada de Olmo y Fernández-Galiano, 1997; B y C modificado de Palm y Dobberstein, 1999).

Dentro la familia Trichodinidae los distintos géneros se distinguen por la extensión de la espiral ciliada y por la forma de los dentículos. *Trichodina* presenta una espiral ciliada que da más de una pero menos de dos vueltas completas y los dentículos tiene una hoja externa extendida, un cono central y un radio interno o púa, contiene macro y micronúcleo y la corona de cilios permite su movimiento (Sierra *et. al.*, 2006). El género más abundante de la familia es *Trichodina* y comprende más de 300 especies (Dobberstein y Palm, 2000; Asmat y Sultana, 2005), sin embargo hasta el momento sólo se han descrito alrededor de 170 especies para peces, la mayoría mediante el empleo de la impregnación argéntica de Klein (Figura 3); esta técnica resalta estructuras como la espiral ciliar adoral (diámetro), así como la forma y número de los dentículos del disco adhesivo, que en los últimos años ha tomado gran

importancia para la identificación de las especies de tricodínidos (Lom y Dyková, 1992; Gaze y Wootten, 1998).



Figura 3. Microfotografías con impregnación de nitrato de plata, donde se muestra la variación de los dentículos de *Trichodina reticulata*. Tomado y modificado de Islas-Ortega, 2017.

Sin embargo, hay autores que consideran ambiguos estos criterios debido al alto grado de variabilidad y deformación entre individuos de la misma y/o diferente especie, lo cual puede deberse o no a la etapa de crecimiento al finalizar la reproducción asexual (fisión binaria), lo que resulta en que uno (célula hija) o ambos ejemplares (célula madre e hija) presentan diferencias marcadas en las características del disco adhesivo, el número de sus constituyentes, las estructuras ciliares y nucleares (Paperna, 1983).

La técnica de impregnación con hematoxilina de Harris también es utilizada en la identificación de tricodínidos, principalmente para resaltar el macronúcleo en forma de herradura (Figura 4) (Rodríguez-Santiago, 2002; Islas-Ortega, 2013).

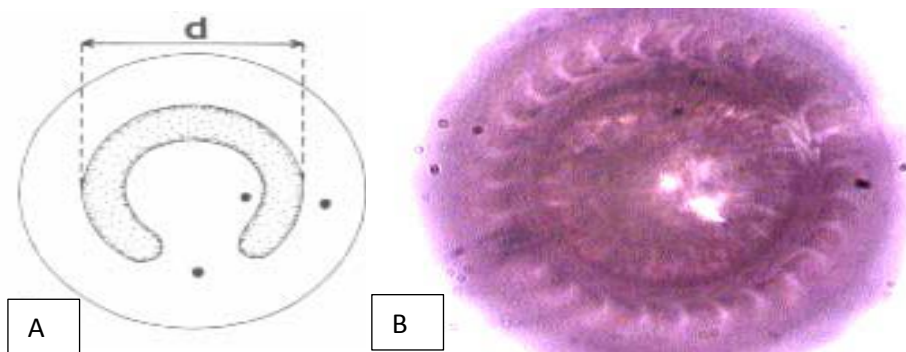


Figura 4. Tinción con hematoxilina de Harris. A) Macronúcleo representante del género *Trichodina*, en forma de herradura de caballo d: diámetro del macronúcleo (tomado de Lom y Dyková, 1992). B) Macronúcleo de *Trichodina centrostrigata* (tomado de Rodríguez-Santiago, 2002).

La tilapia (*Oreochromis* spp.), es cultivada en muchos lugares a nivel mundial y es de los peces en los que se encuentra con regularidad tricodinas, pues este pez presenta gran resistencia a condiciones ambientales adversas, como la mala calidad del agua (materia orgánica en suspensión, altas concentraciones de nitratos, nitritos, nitrógeno amoniacal, fósforo etc.) en la que suelen encontrarse estos ectoparásitos ciliados (Zhang, *et. al.*, 2017). Tal es el caso de *Trichodina acuta*, *T. nigra*, *T. pediculus*, *T. mutabilis* y *T. heterodentata*, registradas para la especie *Oreochromis mossambicus* en las Filipinas (Duncan, 1977) posteriormente encontradas en África del Sur e Israel (Basson *et. al.*, 1983), así como en Taiwán (Van As y Basson, 1989) en este mismo hospedero.

Recientemente existen reportes de *Trichodina centrostrigata*, *Trichodina heterodentata*, *T. magna*, *T. nigra* y *T. pediculus* parasitando tilapia nilótica, *Oreochromis* sp. y *T. zilli* en diferentes sitios de México (Sinaloa, Chihuahua, Durango, Coahuila, Sonora, Oaxaca, Veracruz, Tamaulipas, Michoacán, Estado de México, Ciudad de México) (Rodríguez-Santiago, 2002; Martins y Ghiraldelli, 2008; Madsen *et. al.*, 2000; Islas-Ortega, 2013; Lagunas-Calvo, 2014; Aguilar-Aguilar e Islas-Ortega, 2015).

2.3.Ciclo de vida de los tricodínidos

Los tricodínidos se reproducen por fisión binaria transversal, dando lugar a dos células hijas más o menos de igual tamaño, por lo tanto los individuos que se encuentran en esta fase de reproducción presentan por lo general todas las estructuras esqueléticas y morfológicas, o a veces sólo la mitad, y estas se van desarrollando a medida que el individuo crece; en ocasiones incluso las cuchillas muestran diferentes formas y tamaños en el anillo denticular de un mismo tricodínido (Kasubski, 1968; Xu *et. al.*, 1999; Xu *et. al.*, 2002; Franco-Rojas, 2007; Hu, 2011) (Figura 5).

El parásito joven forma un anillo de adherencia con el número de ganchos característico de la especie, la conjugación es poco común en estos protozoarios (Smith, 2009). En unas cuantas horas puede reproducirse rápidamente y a lo largo de unos cuantos días alcanzar un 100% de prevalencia, con numerosos parásitos por hospedero (Martins *et. al.*, 2015).

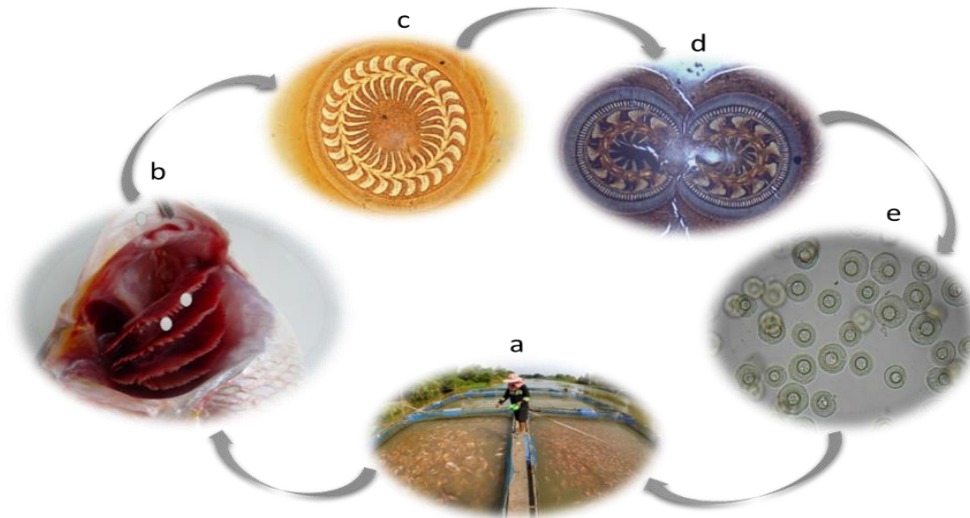


Figura 5. Ciclo de vida de los tricodínidos. a) Condiciones de hacinamiento, factores ambientales adversos, calidad de agua deficiente, alimentación inadecuada, con peces inmunodeprimidos; b) las tricodinas se adhieren a piel, branquias y aletas, causando severos daños debido a la fricción causada por la acción del disco adhesivo con dentículos giratorios; c) inicia la fase de reproducción, preparándose el material genético, lo cual se lleva a cabo en individuos adultos que presentan todas las estructuras esqueléticas y morfológicas; d) fisión binaria transversal; e) crecimiento exponencial del número de tricodínidos (Modificado de Martins *et. al.*, 2015).

De manera general los tricodínidos pueden vivir fuera de su hospedador libremente en el agua de 1 a 1.5 días, alimentándose de partículas en suspensión en los cuerpos de agua eutrofizados (Jiménez-Guzmán *et. al.*, 1988). Sin embargo, en condiciones de hacinamiento de los hospederos y con sistema inmunitario deprimido, es cuando generalmente se propaga su infestación. En peces saludables nunca hay gran cantidad de tricodínidos; estos parásitos se posan sobre la piel, aletas y agallas del pez ocasionalmente, no obstante, en peces estresados o debilitados por factores ambientales o en alevines, la cantidad de tricodínidos puede aumentar notablemente y empezar a fijarse a los peces, de este modo los protozoarios fijados siguen girando y erosionan la piel de los hospederos, convirtiéndose así en parásitos que se alimentan del tejido de los peces (Rubio-Godoy, 2013; Zhang *et. al.*, 2017).

2.4. Tricodiniasis

Las especies de tricodinas patógenas son causantes de la enfermedad conocida como tricodiniasis (Post, 1983), estos ciliados se encuentran por lo regular en la columna de agua nadando libremente, y aunque no es un parásito estricto, cuando las condiciones ambientales son favorables para su reproducción, llegan a encontrarse varias centenas de tricodinas

adheridas a la piel, branquias y aletas de los peces, perforándolas y generando daños como dermatitis pruriginosa, que da pie a infecciones secundarias por hongos y bacterias (Martins *et. al.*, 2011; Valladão *et. al.*, 2013; Valladão *et. al.*, 2014).

El número de tricodínidos por pez puede variar de manera significativa, desde un parásito a miles de ellos, y su tasa de reproducción es igualmente variable, aunque no se ha determinado el tiempo exacto de la misma (Figura 6). La transmisión de estos protozoarios puede ser por contacto directo con el agua contaminada o a través de utensilios contaminados empleados en la piscicultura (Martins *et. al.*, 2015).

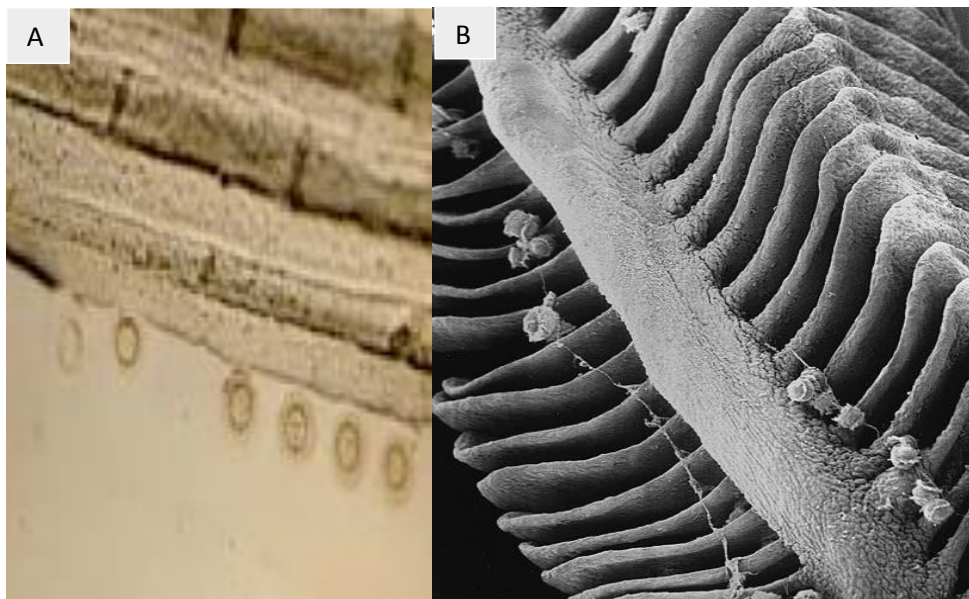


Figura 6. A) *Trichodina* spp., nadando sobre aleta de un pez (Tomada de Rubio-Godoy, 2013). B) *Trichodina* spp., sobre branquias de pez (Tomada de Palm, 1999).

Los tricodínidos llegan a parasitar diversas especies de peces (bagre, carpa, trucha, entre otras), entre ellos la tilapia, y los efectos negativos son variables dependiendo de la edad y el estado fisiológico del hospedero. Los peces, al estar infestados con estos protozoarios, presentan cierta signología, como nadar con movimientos bruscos y repentinos, producción anormal de moco color blanquecino, obscurecimiento en las zonas de mayor daño, “deshilachamiento” de aletas, letargia, anorexia, pérdida de escamas, y cuando están involucradas las branquias pueden causar asfixia en los peces (Woo, 1999; Rodríguez Gutiérrez *et. al.*, 2001).

A medida que el parásito se adhiere al área branquial, invade las células epiteliales. Cuando el tiempo de adhesión es reducido, las alteraciones patológicas son discretas o poco evidentes; sin embargo, cuando el pez está fuertemente infestado, esto es arriba de cien tricodínidos, estos parásitos reducen la superficie respiratoria e impiden el intercambio gaseoso en las branquias, en este caso los peces experimentan dificultad respiratoria y se les puede ver cerca de la superficie del agua “boqueando” (Martins *et. al.*, 2015). Además, estos protozoarios pueden llegar a causar irritación grave en las branquias, puesto que “muerden” la superficie de las células epiteliales de los peces. La enfermedad puede ocurrir en forma aguda principalmente en larvas y alevines, provocándoles úlceras, edemas subepiteliales, desplazamiento de las laminillas secundarias en los filamentos de las branquias, causando hiperplasia e infiltración inflamatoria mononuclear (Valladío *et. al.*, 2014). Por otro lado, en infestaciones crónicas los tricodínidos pueden inducir un aumento de células mucosas del epitelio y filamentos de las branquias, hiperplasia discreta con fusión parcial o total de las laminillas secundarias, y posteriormente necrosis (Valladío *et. al.*, 2013). Si continúan las microlesiones causadas por la presencia de estos parásitos son colonizadas por bacterias, que a su vez son responsables de infecciones oportunistas, que aceleran la progresión de la enfermedad, causando la muerte si no hay tratamiento.

Los signos clínicos no son específicos y los peces enfermos pueden presentar además obscurecimiento de la piel, áreas blanquecinas en las branquias, hipoxia movimientos súbitos con saltos hacia la superficie de los estanques, debido a la irritación de las heridas o la falta de oxígeno, también pueden tener un nado errático o aletargado debido a las condiciones de hipoxia (Balbuena-Rivarola *et. al.*, 2011; Valladío *et. al.*, 2013; Valladío *et. al.*, 2014; Martins *et. al.*, 2015). En el caso de adhesión en la superficie del pez, se observa desplazamiento de escamas posiblemente debido a infecciones secundarias (Martins *et. al.*, 2015).

Los factores ambientales, como los parámetros fisicoquímicos de agua, altas concentraciones de materia orgánica, cambios bruscos de temperatura, malnutrición o altas tasas de alimentación (aumento de las concentraciones de amoníaco) y la carencia de medidas sanitarias, dan como resultado peces debilitados, con lo cual se acelera la propagación del parásito; por lo que la importancia de las tricodinas no sólo radica en las pérdidas económicas

que ocasiona, sino también en el impacto que puede llegar a generar en las poblaciones de peces silvestres y por la amenaza sanitaria que directamente representan algunos gérmenes bacterianos que propagan los peces enfermos en el estanque a través de las lesiones ulcerativas cutáneas o excreciones provocadas por los tricodínidos (El-Sayed, 2006; Rodríguez-Santiago, 2002).

Al igual que otras enfermedades, la tricodiniasis representa un grave y persistente problema para la actividad acuícola, debido a que las especies afectadas son las más consumidas y de buen precio en el mercado, esto a su vez disminuye el rendimiento de la producción de granjas y centros piscícolas (Snieszko y Axelrod, 1971; Abdel-Meguid, 2001; Tavares-Días *et. al.* 2001). Se ha encontrado que al realizar el examen microscópico en piel y agallas, una población de 10 a 15 parásitos por campo (en 80X), se considera como un caso severo de infestación (Jiménez-Guzmán *et. al.*, 1988).

2.5. Hospedero. *Oreochromis* sp. Características biológicas y taxonómicas

Oreochromis sp., más conocido como tilapia es un pez de agua dulce originario de África y fue introducido a México en la década de los años 70 (1979), en total 5 especies de origen africano fueron traídas al continente americano. El éxito del cultivo de esta especie se debe principalmente a su gran resistencia física a condiciones adversas del medio, su crecimiento acelerado, elevado potencial reproductor, y la adaptación a condiciones de cautiverio. Estas características ayudaron a que los sistemas de cultivo incrementaran las densidades de siembra, pero esto llevó a condiciones adversas de hacinamiento, donde su tolerancia al estrés y resistencia a enfermedades se ha visto comprometida (García-Ortega y Calvario Martínez, 2008; FAO, 2016).

La tilapia se caracteriza por la forma del cuerpo que suele ser comprimida lateralmente con forma ovalada y profunda, aunque puede variar según el medio ambiente en que se encuentre. Presenta línea lateral interrumpida con 30-34 escamas cicloidales. La aleta caudal trunca tiene 7-12 franjas verticales distintivas (Figura 7). Es una especie omnívora filtradora, que se alimenta de fitoplancton, perifiton, plantas acuáticas, pequeños invertebrados, fauna béntica, desechos y capas bacterianas asociadas al detritus, en condiciones de cultivo acepta muy bien el alimento comercial. Con boca terminal, los dientes se encuentran en series de 3 a 7 en los

maxilares (con dientes faríngeos), su número depende de la talla del pez; el primer arco branquial tiene de 20 a 26 lamelas en la parte inferior (FAO, 2017).

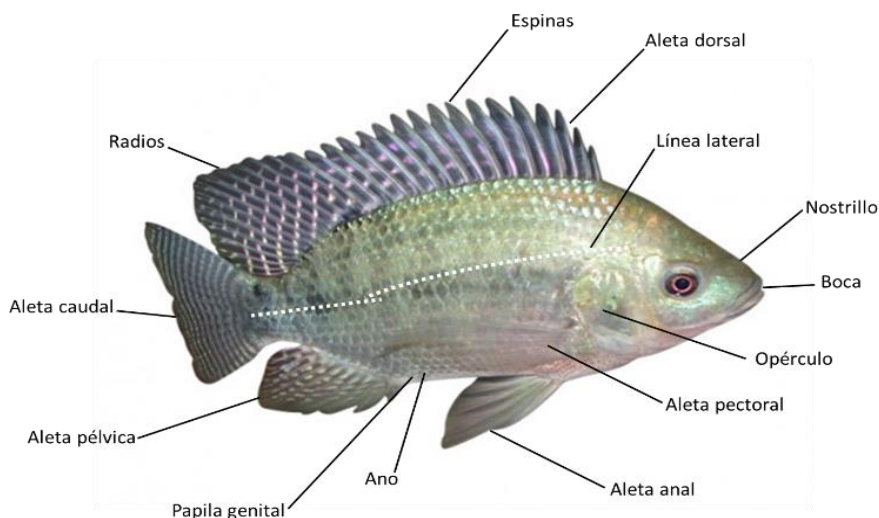


Figura 7. Morfología general externa de la tilapia (*Oreochromis* sp.). Imagen tomada y modificada de <http://agricultura101.com/2016/02/como-criar-tilapia-para-negocio/>

El sistema circulatorio está impulsado por el corazón es el encargado de bombear la sangre a todo el cuerpo, generalmente es bilocular y de forma redonda, compuesto por tejido muscular y localizado casi en la base de la garganta. La vejiga natatoria que es un órgano respiratorio aéreo, que se llena de aire por medio de la bomba bucal de presión y ayuda al pez a flotar (Figura 8). El sistema digestivo se inicia en la boca, que presenta en su interior dientes mandibulares, y continua con el esófago y el estómago (Ruiz *et. al.*, 1992; García-Ortega y Calvario Martínez, 2008).

En cuanto al intestino, es siete veces más largo que la longitud total del cuerpo, característica que predomina en las especies herbívoras, con forma de tubo que se adelgaza después del píloro diferenciándose en dos partes; una anterior, corta, que corresponde al duodeno y una posterior más larga, aunque de menor diámetro. Dos glándulas importantes asociadas al tracto digestivo son el hígado, que es un órgano grande, de estructura alargada y el páncreas, en forma de pequeños fragmentos redondos y difíciles de observar por estar incluidos en la grasa que rodea los ciegos pilóricos. La respiración es branquial, y las branquias están constituidas por laminillas delgadas alojadas en la cavidad opercular (Figura 8), (Ruiz *et. al.*, 1992).

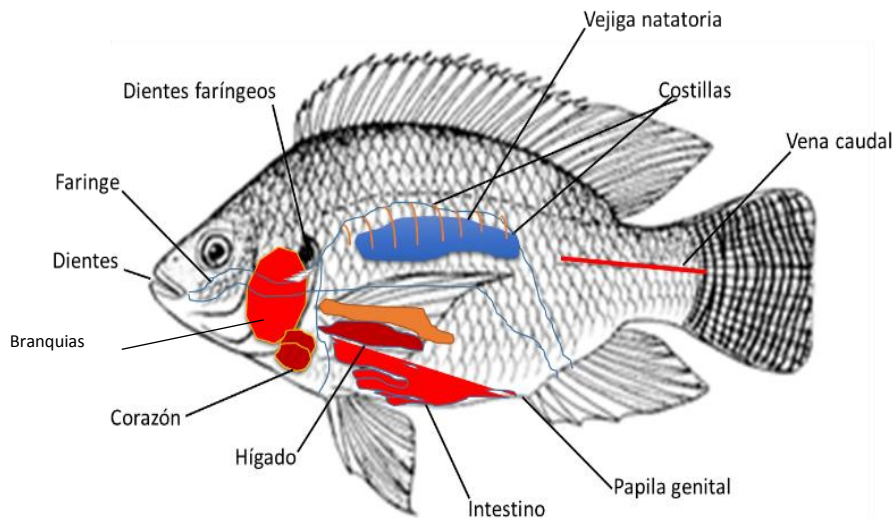


Figura 8. Morfología general interna de la tilapia (*Oreochromis* sp.). Imagen tomada y modificada de <http://fishethobase.net/en/ethology/6/nile-tilapia>.

Las especies del género *Oreochromis* por lo regular se alimentan durante toda su vida de plancton (plantas y animales microscópicos que flotan en el agua). Además, llega a consumir huevos, larvas, gusanos y ciertos peces pequeños (alevines), por lo cual es denominada como omnívora. Debido a estos hábitos alimenticios se le llega a encontrar principalmente en la superficie y parte media de la columna de agua, por lo regular en la época reproductiva es cuando los machos principalmente se sitúan en el fondo del estanque para cuidar el nido.

En estanques, la madurez sexual se da a los 5 ó 6 meses de edad. Existe un marcado dimorfismo y dicromatismo sexual entre hembras y machos. El desove inicia cuando la temperatura alcanza un rango óptimo (24-32 °C), en esta temporada el macho permanece en su territorio, cuidando el nido, y puede fertilizar los huevos de varias hembras, las cuales incuban en la boca, en el caso de las hembras, durante el período de incubación se alimentan muy poco o no comen (Figura 9). Los huevos carecen de una capa adhesiva (a diferencia de otras especies de cíclidos), el número de huevecillos es proporcional al peso de la hembra. Si no se presenta una temporada de frío por la que se suprima un desove, la hembra puede desovar continuamente (García-Ortega y Calvario Martínez, 2008).

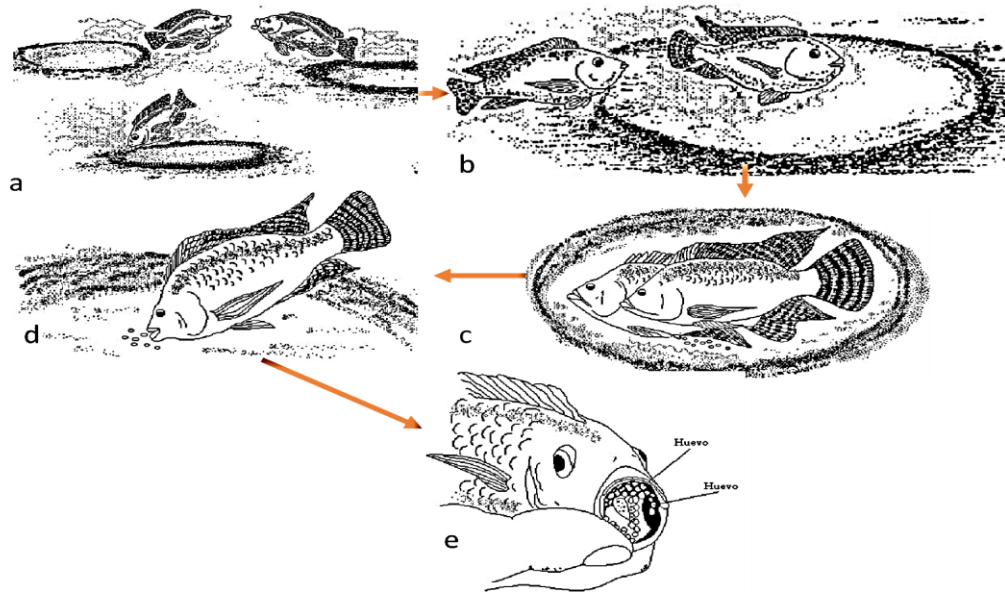


Figura 9. Comportamiento reproductivo de la tilapia (*Oreochromis* spp.); a) el macho delimita y defiende territorio, limpiando un área circular de 20 a 30 cm; b) la hembra es atraída al nido, donde es cortejada por el macho; c) la hembra deposita los huevos que son fertilizados por el macho; d) la hembra recoge los huevos fertilizados con la boca; e) los huevos son incubados en la boca de la hembra. (Tomado y modificado de Saavedra Martínez, 2006).

En sistemas semi-intensivos una densidad de siembra de 1 - 2 alevines/ m² es adecuada. En cuanto a sistemas intensivos (estanques circulares) se proponen 20 peces por m³ con un peso promedio de 15 g., para alcanzar un peso de 400 g en un periodo de 6 meses aproximadamente; para lo cual es muy importante asegurar la talla inicial y el sexo (machos de preferencia), para no tener juntos hembras y machos, y de este modo evitar las tallas menores y la consecuente sobrepoblación del estanque por desoves indeseados (García-Ortega y Calvario Martínez, 2008).

2.6. Ambiente

Del ambiente en el que se encuentren las tilapias va a depender en gran medida la salud de éstas. Aunado a ello, las características del estanque tienen efecto sobre las condiciones higiénicas del agua, por ejemplo si es rústico, el agua en su interior tendrá contacto directo con los cambios del suelo del estanque, por ejemplo si es fangoso o arcilloso, sus componentes, coloración, acidez, alcalinidad, contenido de sales, metales pesados (As, Cr,

Hg, Pb), uso de fertilizantes, herbicidas, pesticidas, uso de detergentes, crianza de ganado o mascotas cerca de los estanques, si se encuentran en un lugar techado o al aire libre, origen y ubicación de las tomas de agua, la cantidad de alimento suministrado a los peces de cada estanque, la limpieza del excedente de alimento y las excretas tendrán efectos negativos en los peces (Meyer, 1999; Granados *et. al.*, 2002; Castro-Rivera, 2004; Nicovita, 2008).

Entre los parámetros fisicoquímicos que se miden en el cultivo de tilapia están la temperatura, oxígeno, pH, sólidos y residuos, color, olor, amoníaco, nitritos, nitratos, dureza, alcalinidad, fósforo, dióxido de carbono, plomo, cobre, turbidez y transparencia del agua. Como se muestra en el cuadro 1, se resumen los intervalos óptimos para tilapia de algunas de las variables fisicoquímicas (Pérez-Castellanos, 1995; Castro-Rivera, 2004; García-Ortega y Calvario-Martínez, 2008).

Cuadro 1

Parámetros fisicoquímicos del agua. Rangos óptimos para el cultivo de tilapia

<i>Parámetro</i>	Requerimientos
<i>Temperatura</i>	Máxima: 34-36°C Óptima: 28-32°C Mínima: 14°
<i>Oxígeno</i>	Óptimo: 5 ppm
<i>pH</i>	Mínimo: 2 ppm Óptimo: 6.5-7.5
<i>Dióxido de carbono</i>	50-100 ppm
<i>Dureza</i>	100-170 ppm
<i>Transparencia</i>	45 cm
<i>H-NH₃ (amonio)</i>	0.3 ppm
<i>Nitritos N-NO₂</i>	>0.1 ³ >0.1 ⁵ (mg/L)
<i>Nitratos N-NO₃</i>	>10 ³ (mg/L)

Fuente: García Ortega y Calvario Martínez (2008).

El cambio drástico de alguno de estos parámetros de calidad del agua o que pasen los rangos tolerables por las tilapias podría afectar la capacidad de las mismas para resistir agentes patógenos (Nicovita, 2007; Nicovita, 2008).

Los peces son poiquilotermos, variando su temperatura de acuerdo a la temperatura del medio en que viven, adaptándose a las variaciones moderadas de temperatura, dichos niveles de adaptación varían de 34 a 36°C, para la tilapia (Balbuena-Rivarola *et. al.*, 2011). En cuanto a la temperatura aún no queda claro si los tricodínidos aumentan o reducen en número conforme sube o baja la temperatura, se menciona que estos parásitos incrementan su número conforme la temperatura aumenta (Martins *et. al.*, 2015), encontrándose que de igual forma en algunas especies de tricodínidos decrecen en cantidad durante el invierno, cuando la temperatura es baja (Yemmen *et. al.*, 2011). Sin embargo en 2017 Zhang *et. al.*, en su estudio sobre la correlación entre abundancia del género *Trichodina* y los parámetros de la calidad del agua de piscifactorías, encontraron que no hay correlación entre la abundancia de tricodinas y la temperatura (24-30.5°C).

Por otro lado, factores como la evaporación, solubilidad de los gases, incidencia de los rayos solares, concentración de materia orgánica, tipo y cantidad de alimento afectan directa o indirectamente la temperatura de un cuerpo de agua; y como consecuencia el incremento de la flora bacteriana nociva, lo cual a su vez hace que aumenten los niveles de amoníaco en forma tóxica (Nicovita, 2007; Nicovita, 2008; García-Ortega y Calvario-Martínez, 2008).

En el caso del oxígeno, cuando hay una disminución durante tiempos prolongados los peces son propensos a enfermedades debido a una ineficiencia en la tasa de conversión de alimento y con ello una baja en las defensas del sistema inmune (Wicki, 1997; El-Sayed, 2006; Nandlal and Pickering, 2004; Williams, 2000; Nicovita, 2007).

En cuanto al dióxido de carbono, las concentraciones elevadas disminuyen el oxígeno disuelto y puede acidificar el medio; en este caso para dar una idea del grado de acidez en los estanques, se mide el pH, el cual es un coeficiente que indica el grado de acidez o alcalinidad del agua. Cuando el pH, en los estanques es ácido (pH <6.5), se corre el riesgo de que branquias, piel y cornea se irriten, puede haber alteraciones de la osmoregulación y acidificación de la sangre, así como un efecto a largo plazo en la fisiología y bajo crecimiento

de los peces (Nicovita, 2007; García-Ortega y Calvario-Martínez, 2008; Balbuena-Rivarola *et. al.*, 2011).

La alcalinidad y la dureza, se refiere a la concentración de compuestos minerales, en particular sales de magnesio y calcio. La dureza se mide por la concentración de dichas sales, por lo tanto, un agua más dura tiene una mayor concentración de sales. En cuanto a los nitritos, éstos dependen del proceso de oxidación, y es necesario mantener la concentración por debajo de 0.1 ppm, haciendo recambios fuertes, limitando la alimentación y evitando concentraciones altas de amonio en el agua (Nandlal and Pickering, 2004; Nicovita, 2007; García-Ortega y Calvario-Martínez, 2008)

La cantidad de materia orgánica debe ser constantemente monitoreada, eliminando los desechos y despojos de animales muertos, hojas insectos o cualquier agente externo al ambiente acuático de los estanques (García-Ortega y Calvario-Martínez, 2008).

Además de los parámetros ambientales y fisicoquímicos del agua en los estanques, se debe poner atención en ciertos elementos microbiológicos en el agua para asegurar un mejor entorno para los peces, tales como protozoos, cianobacterias, diatomeas, virus, coliformes fecales y totales. Debido a esto se ha sugerido que los tricodínidos pudieran ser indicadores de eutrofización de aguas salobres debido a que su proliferación en granjas de cultivo de peces, se relaciona con altas densidades de siembra, alto contenido de materia orgánica y aumento o disminución en la temperatura del agua (Basson y Van As, 2006; Martins *et al.*, 2010; Martins *et. al.*, 2015, Zhang *et. al.*, 2017).

2.7. Prevención, control y tratamiento de la tricodiniasis

La sanidad acuícola es el estudio de las enfermedades que afectan a los organismos acuáticos cultivados para ornato y consumo humano (incluye a los organismos de vida silvestre), así como al conjunto de prácticas encaminadas a la prevención, diagnóstico y control de las mismas (Rey y Verján, 2002; García-Ortega y Calvario-Martínez, 2008; Balbuena-Rivarola, 2011).

Dado que la acuicultura es de las industrias alimentarias de más rápido crecimiento en el planeta, es particularmente apremiante que la práctica acuícola se lleve a cabo de manera efectiva y con un enfoque sustentable y encaminado a la conservación, y cuidado de los recursos naturales en tanto que se beneficia a la población (FAO, 2016; Froehlich *et. al.*, 2017).

La Organización Mundial para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) son dos organizaciones internacionales que tienen asignaciones específicas en materia de inocuidad en la producción de alimentos, incluyendo los productos acuícolas y pesqueros. De igual manera, promover las prácticas sanitarias y de higiene, así como el uso mínimo de agentes terapéuticos, fármacos, hormonas, antibióticos y otros químicos que se utilizan para controlar enfermedades en acuicultura (OMS, 2002; FAO, 2003; Balbuena-Rivarola *et. al.*, 2011; FAO, 2018).

Además, compete a la FAO y la OMS regular el uso de químicos en la acuicultura que sean peligrosos para la salud humana y el medio ambiente, asegurando de esta manera el bienestar tanto de los organismos acuáticos como la de los consumidores. Por lo cual es necesario generar conciencia y promover entre los productores acuícolas la importancia de tener el mayor cuidado en la eliminación de los desechos y despojos de animales muertos, excesos de fármacos y otros químicos considerados peligrosos para su utilización en la acuicultura (OMS, 2002; FAO, 2003).

Son varios los factores de los que depende el éxito en la terapia farmacológica aplicada en peces. Diagnóstico del agente causal de enfermedad, esto es, la selección y administración de una terapia son consecuencia de la aplicación sistemática, ordenada y completa del protocolo diagnóstico; anamnesis, análisis de muestras de agua, examen clínico de ejemplares, toma de muestras y necropsia de ser necesario (García-Ortega y Calvario Martínez, 2008; Limonta y Silveira-Coffigny, 2009; González-Mantilla, 2010; Shinn y Bron, 2012; INIA, 2012).

Cada país tiene una regulación particular sobre el uso de fármacos en peces (Cuadro 2), siendo Estados Unidos uno de los más restrictivos en los principios aprobados como fármacos en peces de consumo por parte de la Food & Drug Administration Agency (FDA). De tal

manera que son la Agencia Europea del Medicamento (EMA) y su equivalente español Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios (AEMPS), las que ordenan la actividad de registro y control de estos medicamentos. La FDA establece que es ilegal utilizar un fármaco no autorizado, a menos que esté calificado como una "nuevo fármaco para investigación animal" (por sus siglas en inglés INAD), una vez completados los requisitos, se obtiene la denominada "aprobación para un nuevo fármaco de uso animal (por sus siglas en inglés NADA), (Rubio-Limota y Silveira Coffgny, 2009).

Cuadro 2

Fármacos aprobados para su utilización en el tratamiento de enfermedades en peces de consumo humano, en Estados Unidos de Norteamérica, Europa y México.

<i>País</i>	<i>Fármacos aprobados para su utilización en peces de consumo humano</i>
<i>EUA</i>	-Oxitetraciclina, sulfamerazina, formalina, sulfadimetoxina/ormetoprim, sulfamerazina, metasulfato de tricaina, flufenicol, FDA, (2001); Benbrook, (2002)
<i>Unión Europea</i>	-Todas las sulfonamidas, oxitetraciclina, flumequina, tiamfenicol, deltametrin, florfenicol, emamectin benzoato, benzocaína, bronopol, sarafloxacin, ácido oxolínico, clortetraciclina, enrofloxacin, amoxicilina, trimetoprim, ampicilina, bencilpenicilina, cloxacilina, dicloxacilina, penetamato, sarafloxacin, clortetraciclina, bronopol, somatosalm, azametifos, teflubenzuron, tricaina mesilato, toscloramida Na, peróxido de hidrogeno, diflubenzuron, tiopental iv, flumequina, ácido oxolínico. (Apromar (2015); Apromar (2016); Martínez-Millán y Fontanillas Pérez (2016).

México Tetraciclina, clortetraciclina, oxitetraciclina y sus 4-epimeros correspondientes, solas o en combinación, sulfonamidas, quinolonas, bencimidazoles, levamisol, ivermectinas, piretroides, carazolol, azaperone y metabolito azaperol, flunixin, fenilbutazona y metabolito oxifenbutazona, olaquinox (MQCA), aldrin, BHC y sus metabolitos, DDT y metabolitos, heptacloro, heptacloro epóxido, endosulfan y metabolitos, metoxicloro, mirex, diclorvos, diazinon, clorpirifos y metabolitos, metyl clorpirifos, ronnel y metabolitos, clorfenvinfos, malation, etion, trition, di-syston, fention y metabolitos, fenitroton, paration y sus metabolitos, triclorfon, aflatoxina totales (b1,b2,g1 y g2), metrifonato, preparado de extracto de clavo, enrofloxacin,

SENASICA (2016, 2017)

En el Manual de Procedimiento de la Comisión del Codex Alimentarius (CCA), se establecen los límites máximos para residuos de medicamentos veterinarios (LMRMV), que se definen como «la concentración máxima de residuos resultante del uso de un medicamento veterinario (expresada en mg/kg o en mg/kg del peso del producto fresco) que la CCA recomienda como legalmente permisible o reconoce como aceptable dentro de un alimento o en la superficie del mismo».

Se requiere de buenas prácticas en el uso de medicamentos veterinarios (BPMV), para que se tenga el debido cuidado en todas las etapas de la producción de un alimento, desde su producción, transformación y distribución (FAO, 2015), por tal motivo se ha hecho un esfuerzo por establecer procedimientos de fitoterapia en donde se siga un protocolo de obtención del agente químico activo y su aplicación segura, para cumplir con los requisitos de un medicamento veterinario según el CODEX alimentario (Silveira-Coffigny, 2006).

En México hasta el momento se utiliza como referencia a las autoridades sanitarias en Norteamérica (FDA) y Europa (Consejo de la Unión Europea, 1996), empero el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), por medio de la Dirección de Sanidad Acuícola y Pesquera publicó en 2016 un documento con los productos

registrados para el uso en la acuicultura, en el cual incluyen tanto medicamentos veterinarios como productos de uso biológico aprobados por la Dirección General de Salud Animal. Por tanto, es el SENASICA el organismo encargado de los procesos de registro y autorización de productos químicos y alimenticios, de uso y consumo animal.

En tema de regulación, México cuenta con la NOM-064-ZOO-2000, donde se establecen los lineamientos para la clasificación y prescripción de productos farmacéuticos veterinarios por el nivel de riesgo de sus ingredientes activos.

No obstante, el uso indiscriminado de estos medicamentos, la mala prevención y falta de diagnóstico oportuno han dado como resultado una resistencia a los medicamentos por parte de los parásitos, por lo que es de suma importancia hacer el diagnóstico de la enfermedad en tiempo y forma, además de mantener una profilaxis integral (Prieto, 2004).

Actualmente, se utilizan pocos fármacos para tratar las infestaciones por tricodínidos (formaldehído, teflubenzuron) (Balta *et. al.*, 2008; Venancio-Ikefuti *et. al.*, 2015), sin embargo, muchos de estos resultan tóxicos para los peces y presentan riesgos para organismos no objetivo (biota acuática o terrestre aledaña a los estanques) (Kołodziejaska *et. al.*, 2013).

2.8. Medicina tradicional mexicana

Una alternativa a la problemática de las enfermedades parasitarias en peces, es el uso de extractos de plantas con efecto parasitocida. Las plantas se han empleado para el tratamiento de las enfermedades del hombre y de los animales desde la época prehispánica; por ejemplo, para el tratamiento de las enfermedades dérmicas en peces de ornato se tiene reportado el uso de helecho macho quemado (Auró-Jiménez, 1993; Bassols y Gurni, 1996). La medicina tradicional es la suma total de conocimientos, técnicas y procedimientos basados en las teorías, creencias y experiencias indígenas de diferentes culturas, sean explicables o no, utilizados para el mantenimiento de la salud, así como la prevención, diagnóstico y tratamiento de enfermedades físicas y mentales (OMS, 2002).

Prieto *et. al.*, (2005), hacen una compilación de los trabajos científicos sobre la utilización de extractos de plantas en el área del Caribe y México de 1988 a 2004, en la que registraron el efecto terapéutico y profiláctico de por lo menos 40 productos vegetales en especies acuáticas, la mayor parte de las plantas son comunes a los países tropicales y subtropicales. Ellos mencionan que en la sanidad animal las plantas medicinales pueden jugar un papel relevante, si la biomedicina se aboca al desarrollo del potencial terapéutico de la flora.

Existen plantas con muy diversos usos. En cuanto a la actividad antiparasitaria, se ha observado que el modo de acción de las saponinas es similar a la de los antihelmínticos convencionales como el prazicuantel, que tiene efecto sobre la permeabilidad de la membrana celular de los parásitos, y provoca la desintegración del tegumento de los monogéneos (Schmahl and Taraschewski, 1987; Wang *et. al.*, 2010). Buchmann *et. al.*, 2003, encuentran que el extracto de ajo tiene un efecto sobre el ciliado *Ichthyophthirius multifiliis*, parásito de peces, responsable de la enfermedad conocida como la mancha blanca. El arbusto java brucea (*Brucea javanica*), contiene quassinoides, (triterpenos degradados) como la bruceina A y D (Figura 10), que han mostrado actividad contra varios protozoarios parásitos (antiinflamatorios y antipaludicos), su efecto es sobre las proteínas de los ciliados (O'Neill *et. al.*, 1987; Wright *et. al.*, 1988; Guo *et. al.*, 2005; Nakao *et. al.*, 2009). Wang *et. al.*, 2008, probaron dos compuestos identificados como osthol e isopimpinellin (Figura 11), aislados de *Fructus cnidii*, los cuales resultaron eficaces para el tratamiento de peces dorados infestados por *Dactylogyrus intermedius*.

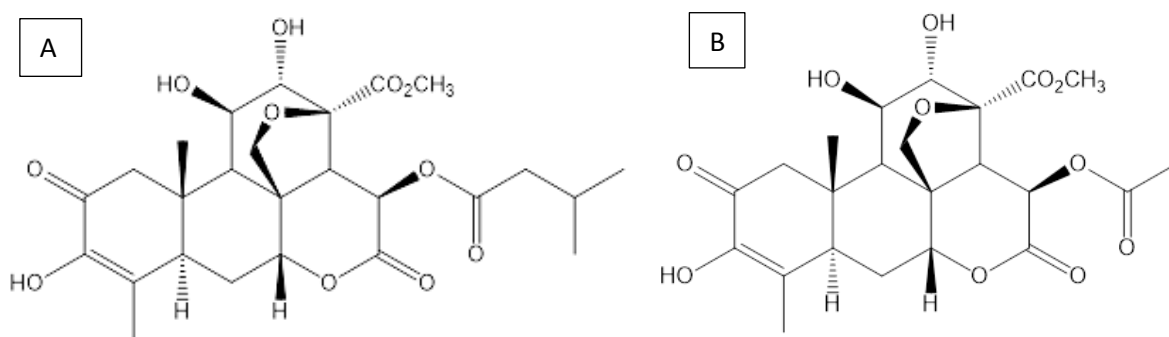


Figura 10. Estructura química de la Bruceina A (A) y Bruceina B (B).

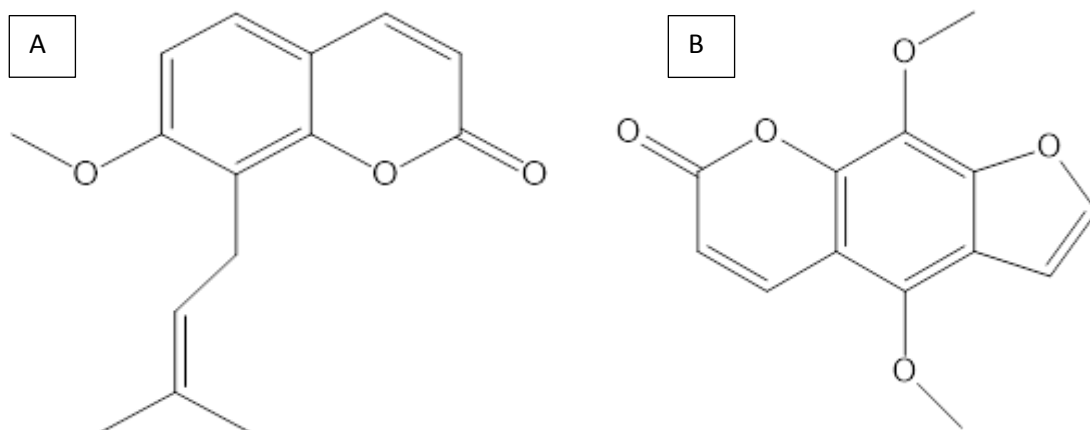


Figura 11. Estructura química del osthol (A) y el isopimpinellin (B).

Chasquibol *et. al.* (2003) clasifican varios fitoquímicos que tienen actividad contra parásitos de peces, algunos de ellos son: los alcaloides, glucósidos, esteroides, ácidos orgánicos, taninos, saponinas; algunos de estos con acción conocida para su utilización en peces (Silveira-Coffigny, 2006).

Antes de la aplicación de algún extracto de planta de reconocido efecto antiparasitario es necesario desarrollar ensayos para comprobar la efectividad y toxicidad de estos compuestos sobre organismos acuáticos, por lo que pueden ser empleadas diferentes metodologías ya sea *in vitro* o *in vivo* (Silveira-Coffigny, 2006).

En otra compilación sobre medicina herbolaria aplicada en acuicultura, realizada por Reverter *et al.* (2017), ellos identifican en los trabajos revisados más de 250 especies de plantas, 75 familias y 32 órdenes que han sido utilizadas o reportadas con potencial para su uso en acuicultura, de las cuales el 17% presentan actividad antiparasitaria; concluyendo entonces que las plantas medicinales presentan un potencial prometedor para su uso en la acuicultura como sustituto de la quimioterapia en el tratamiento de las enfermedades, sin embargo aún hay poco conocimiento sobre el modo de acción de la mayoría de las plantas bioactivas, así como la forma más eficaz de administración segura, por lo que se requiere de mayor esfuerzo de investigación para dilucidar los productos vegetales y sus modos de acción a niveles más específicos.

2.9. Características generales del tepozán (*Buddleja cordata*) y su distribución.

El género *Buddleja* fue considerado taxonómicamente parte de la familia Loganiaceae, sin embargo, posteriormente se asignó dentro de la familia Buddlejaceae, debido a las investigaciones relacionadas a su química (Houghton y Yong Hong, 2003). Este género es nativo de los trópicos y subtropicos de América, África y Asia, con alrededor de 100 especies de las cuales 50 son originarias de América austral (Ávila-Acevedo, 2002; Mendoza-Hernández, 2003). En México existen 16 de las 125 especies de *Buddleja*, las cuales se distribuyen en todo el territorio nacional y son conocidas por el nombre común de “tepozán” (Figura 12).



Figura 12. Arbusto de *B. cordata*. Foto: OCMG. Tomada dentro de C.U. UNAM.

Son árboles o arbustos, su altura varía de 1 hasta 15 m de altura, con ramas jóvenes cilíndricas o cuadrangulares a subcuadrangulares, sus hojas con abundante pubescencia flocosa por lo general opuesto-cruzadas, estípulas la mayoría de las veces reducidas a una línea; corola amarillenta, por lo regular con un toque amarillento a anaranjado en la garganta; inflorescencia terminal o axilar, flores agregadas en cimas dispuestas a su vez en cabezuelas, las cuales a su vez se agrupan a manera de panículas, racimos o verticilos; flores tetrámeras,

en raras ocasiones pentámeras, actinomorfas o ligeramente zigomorfas, perfectas o funcionalmente dioicas; cáliz sinsépalo, en ocasiones profundamente partido, corola sinpétala, generalmente actinomorfa, tubular, hipocraterimorfa o campanulada; estambres 4, insertos en el tubo corolino, dehiscentes longitudinalmente; ovario súpero, en muy raras ocasiones semiínfero, usualmente con tejido nectarífero en su base, bilocular o rara vez tetralocular, óvulos anátropos, con un estilo, estigma por lo regular ligeramente bilobado, fruto comúnmente en forma de cápsula septicida, en ocasiones carnosos o indehiscentes, raramente loculicida, semillas diminutas, a menudo aladas, endospermo carnosos (Figura 13) (Ávila *et. al.*, 1999; Ávila-Acevedo, 2002; Ocampo-Acosta, 2003).

Una de estas especies es *Buddleja cordata*, a la que podemos encontrar frecuentemente formando parte de gran variedad de hábitats tales como bosque de *Abies*, bosque de pino-encino, bosque de encino, bosque mesófilo de montaña, bosque tropical caducifolio, matorrales xerófilos, pastizales y sobre todo en lugares con vegetación secundaria en áreas urbanas localizadas a una altitud entre 1400 y 3200 msnm, en climas cálido, semicálido y templado (Martínez-Luna, 1999; Ocampo-Acosta, 2003; Mendoza-Hernández, 2003) (Figura 14).

Buddleja cordata presenta una amplia distribución tanto en Guanajuato, como en Querétaro y en el norte de Michoacán, en altitudes de 1400 a 3200 msnm (Ocampo-Acosta, 2003).

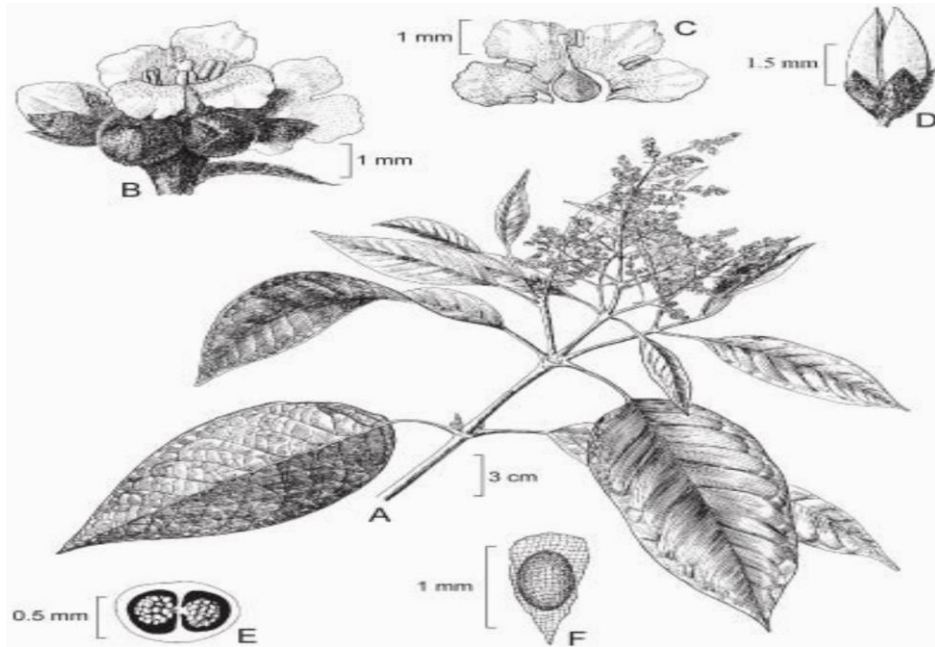


Figura 13. Morfología de *Buddleja cordata* H.B.K ssp. A. rama con inflorescencia; B. aspecto de un grupo de botones y dos flores; C. flor disecada; D. cápsula madura; E. corte de ovario; F. semilla (Tomado de Ocampo-Acosta, 2003).

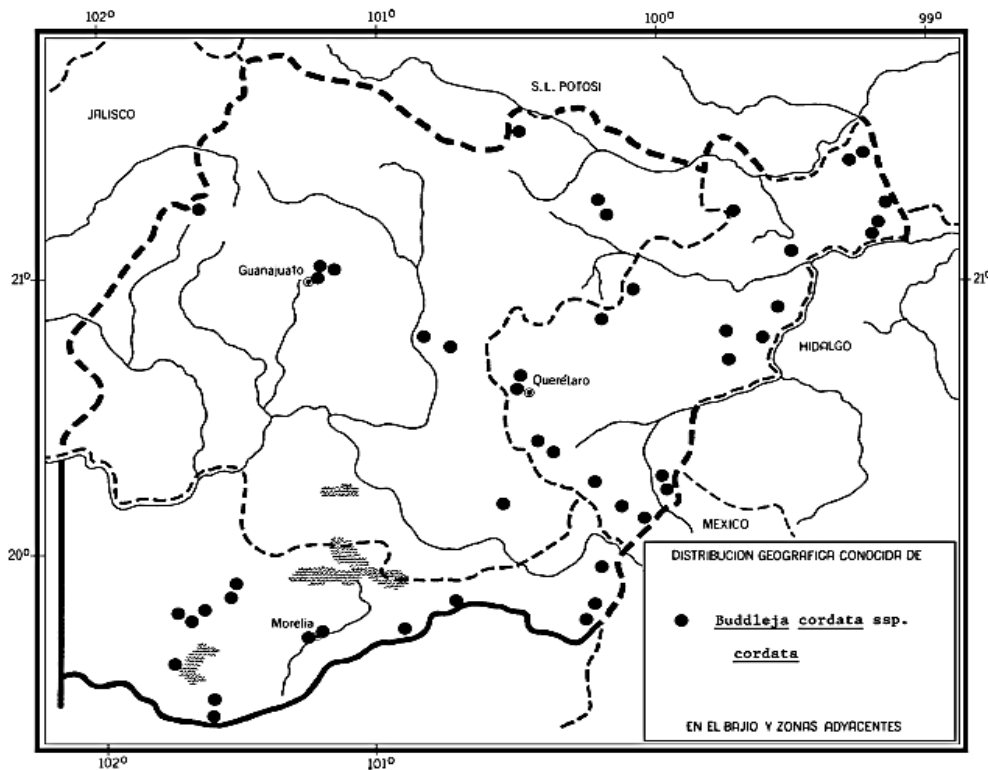


Figura 14. Mapa de distribución geográfica de *Buddleja cordata*. (tomado de Ocampo-Acosta, 2003).

2.10. Composición química y estudios fitoquímicos del tepozán (*Buddleja cordata*)

Las especies del género *Buddleja* engloban aquellos árboles o arbustos conocidos como “tepozán”; estas han sido estudiadas para conocer los compuestos activos y probar su eficacia contra ectoparásitos de peces. Tal es el caso del estudio realizado por Díaz-Sánchez *et al.* (2000), donde probaron la eficacia antiparasitaria de la especie *Buddleja cordata* contra *Costia necatrix* un ectoparásito encontrado en las tilapias analizadas. Las pruebas fueron realizadas con extracto acuoso (hexano) y metanólico, de los cuales este último fue el que presentó eficacia contra *C. necatrix* a una concentración de 100 mg/L, logrando una mortalidad del 100% de los parásitos, este efecto lo atribuyen a un glucósido fenilpropanoide llamado verbascósido, presente en *B. cordata*.

Las especies del género *Buddleja* son conocidas mundialmente por su uso medicinal en el tratamiento de la disentería, como agentes cicatrizantes, antiinflamatorios, diuréticos, antisépticos, analgésico-sedativos, hepatoprotectores, antiulcerogástricos y abortivos (López-Quintero, 2017). A pesar de los amplios usos que se le da y que está ampliamente distribuido en México, el tepozán carece de estudios químicos y farmacológicos para probar y respaldar los usos que se le da en la medicina tradicional mexicana. Entre los compuestos químicos que sean encontrados en *Buddleja* están el verbascosido, aucubina y metil catalpol (Houghton, 1984; Ávila-Acevedo, 2002).

El verbascósido pertenece a la familia de los fenilpropanoides y se caracteriza estructuralmente por estar formado de un ácido cafeico y un tirosol, ambos unidos por una ramnosa y una glucosa (Figura 15), este compuesto se ha encontrado en más de 200 especies de plantas pertenecientes a 23 familias, entre las que se encuentra la familia Buddlejaceae (Houghton, 1984; Ávila *et. al.*, 1999; Ávila-Acevedo, 2002; Ocampo-Acosta, 2003; Mendoza-Hernández, 2003; de Oliveira *et. al.*, 2014).

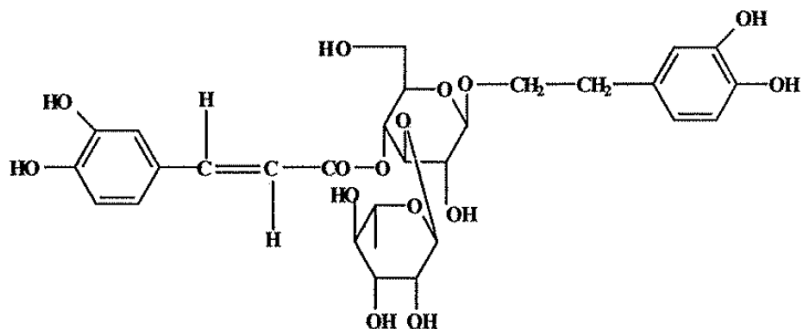


Figura 15. Estructura química del verbascósido. (Tomado de Ávila-Acevedo, 2002).

2.11. Obtención de extractos herbales

Para la obtención de extractos orgánicos de plantas medicinales por lo general se utiliza el mismo procedimiento con algunas variaciones según el tipo de disolvente o el material disponible en el laboratorio (Domínguez, 1973; Rojas De Astudillo *et. al.*, 2015). A continuación, se describen de manera general los pasos para la extracción de los componentes fitoquímicos de las plantas.

- 1) Se hace la colecta del material vegetal, ya sea hojas, raíz o tallo, y se seca con ayuda de un horno de secado o se deja secar al aire libre por algunos días, cuidando que esté sobre una superficie absorbente, lugar ventilado y sin contacto directo con el sol (Domínguez, 1973; Ávila-Acevedo, 2002; Ocampo-Acosta, 2003; Mendoza-Hernández, 2003).
- 2) Una vez que está seca nuestra planta, se muele para tener una mayor superficie de contacto con el disolvente que se agregue (metanol, etanol, acetato de etilo, hexano, dicloro metano etc.), siempre procurando que el material vegetal quede cubierto.
- 3) Posteriormente se deja macerando la mezcla durante algunos días, posteriormente se realizan destilaciones, mediante un rotavapor (durante varios días), hasta extraer el máximo contenido de fitoquímicos posible, lo cual se dejará secar en un frasco de vidrio hasta que el disolvente se elimine por completo (Domínguez, 1973; Ávila-Acevedo, 2002; Ocampo-Acosta, 2003; Mendoza-Hernández, 2003; de Oliveira *et. al.*, 2014) (Figura 16).

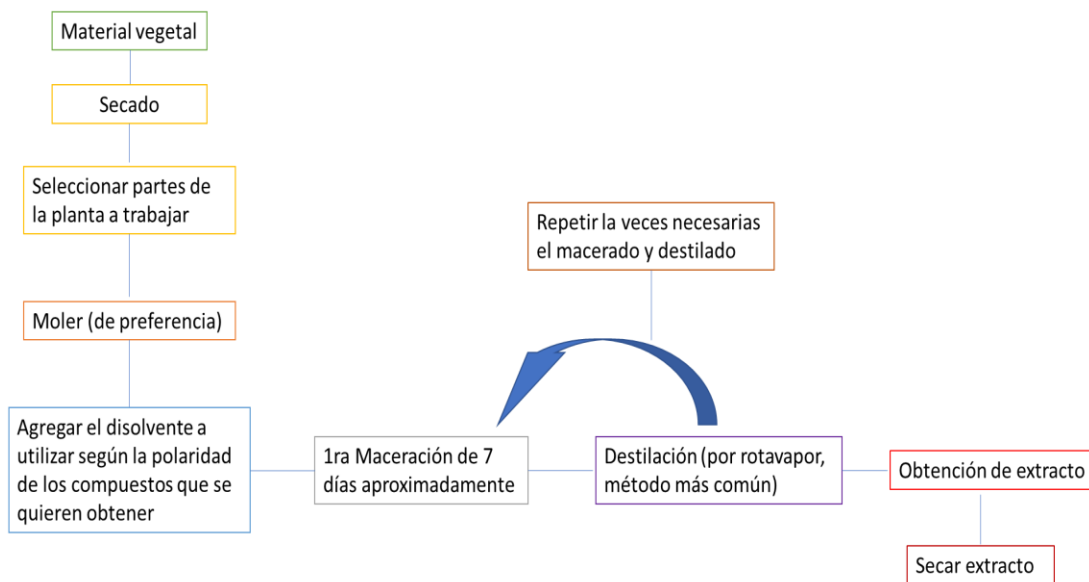


Figura 16. Método general de obtención de extractos herbales (Domínguez, 1973)

2.12. Toxicidad en peces

Dentro del proceso de selección de concentraciones efectivas para el tratamiento de parasitosis en organismos acuáticos se debe tomar en cuenta la toxicidad de las sustancias a utilizar y sus efectos en las especies a tratar. Los peces en particular son vulnerables debido a que pueden asimilar sustancias nocivas disueltas en el agua a través de la dieta, branquias y piel (González-Zuarth y Álvarez, 2015).

El comportamiento de los peces es un parámetro importante a tomar en cuenta para poder discernir el grado de afectación que los químicos utilizados pueden tener sobre los organismos. Por lo que incluir la conducta como biomarcador de toxicidad generada por cualquier agente químico puede llegar a ser de gran ayuda en los estudios de toxicidad, para reforzar la información de las concentraciones letales, tomando en cuenta ciertas reacciones que nos indiquen las concentraciones y tiempos máximos tolerados por los peces (García-Batalla *et. al.*, 2012; De los Santos, 2013; González-Zuarth y Álvarez, 2015).

La conducta puede ser alterada fácilmente por numerosos estresores ambientales debido a su labilidad; la ejecución de conductas por parte de los organismos es mediada por una secuencia de procesos fisiológicos que son desencadenados por estímulos internos

(bioquímicos, fisiológicos y genéticos) y medioambientales (De los Santos, 2013; González-Zuarth y Álvarez, 2015).

En los sistemas acuáticos las señales químicas son tan relevantes o más que las señales visuales en la comunicación a grandes distancias o en condiciones de mala visibilidad; una comunicación química eficiente incide en la sobrevivencia de manera importante; de este modo la respuesta conductual de los organismos ante la presencia de factores químicos puede ser útil para detectar concentraciones máximas tolerables por los peces (González-Zuarth y Álvarez, 2015). Dado que el comportamiento no es un proceso aleatorio, sino una secuencia de actividades estructuradas y predecibles que son diseñadas para garantizar la aptitud y supervivencia (éxito) de los individuos, las alteraciones conductuales son una herramienta valiosa para discernir y evaluar los efectos de las exposiciones sustancias nocivas para los organismos acuáticos (De los Santos, 2013).

Para hacer una valoración del comportamiento se pueden tomar en cuenta una gran variedad de actividades como el escape, equilibrio, excavación, alimentación, locomoción, memoria, cortejo, respiración, protección de crías, toma de riesgos, respuesta al miedo entre otros. Por lo tanto, la alteración del comportamiento “normal” de alguno de los criterios anteriores puede ser indicativo de algún factor nocivo para los organismos que están expuestos al mismo (Hellou 2011).

Existen muchas formas de determinar la toxicidad, y aunque los efectos bioquímicos, fisiológicos, reproductivos y de comportamiento son de gran utilidad el indicador comúnmente más utilizado es la muerte del organismo de prueba. La mayoría de las pruebas de toxicidad suministran una estimación de la dosis (o concentración en el alimento, aire o agua) que produce una respuesta toxica a un 50% de los organismos utilizados en la prueba. Por ejemplo, la dosis letal media es la dosis o concentración que mata al 50% de la población (CL_{50}). En estas pruebas la estadística juega un papel importante no sólo para su cálculo, sino para la planificación y ejecución de las pruebas de toxicidad y para el análisis e interpretación de los resultados obtenidos en ellas. El análisis de relaciones entre dos o más variables implica, en la mayoría de los casos, la utilización de técnicas estadísticas de regresión (Díaz-Báez *et al.*, 2004).

Cuando la aplicación de tratamientos se realiza en forma de baño, generalmente se aplican en:

1) Baños cortos, que van de 5 a 30 minutos, en donde se adiciona una solución patrón al estanque por periodos cortos y se distribuye de manera homogénea, las concentraciones por lo regular son “elevadas”, pero no en exposiciones prolongadas, debido a que si permanecen los peces expuestos a determinadas sustancias durante mucho tiempo podría haber efectos adversos en el desarrollo, crecimiento y reproducción de los organismos y a largo plazo podrían afectar severamente la salud de los peces y llevar incluso a la muerte de los mismos (Wright *et. al.*, 1988; Granados, 2004; Prieto *et. al.*, 2005; Nakao *et. al.*, 2009; Romero, 2009);

2) Baños largos, que van de 30 minutos hasta 1 hora (incluso más). En la aplicación de los tratamientos antiparasitarios no es recomendable que la aplicación de sustancias tóxicas o medicamentos con alto potencial de eficacia, sea por largos periodos de tiempo (Silveira-Coffigny, 2006).

III. HIPOTESIS

El extracto metanólico del tepozán (*Buddleja cordata*), presentará efecto antiparasitario *in vivo* contra tricodínidos de tilapia (*Oreochromis* sp), y será inocuo para los peces.

IV. OBJETIVOS

4.1. General

Evaluar el efecto antiparasitario *in vivo* del extracto metanólico del tepozán (*Buddleja cordata*) contra protozoarios de la familia Trichodinidae presentes en tilapia (*Oreochromis* sp.).

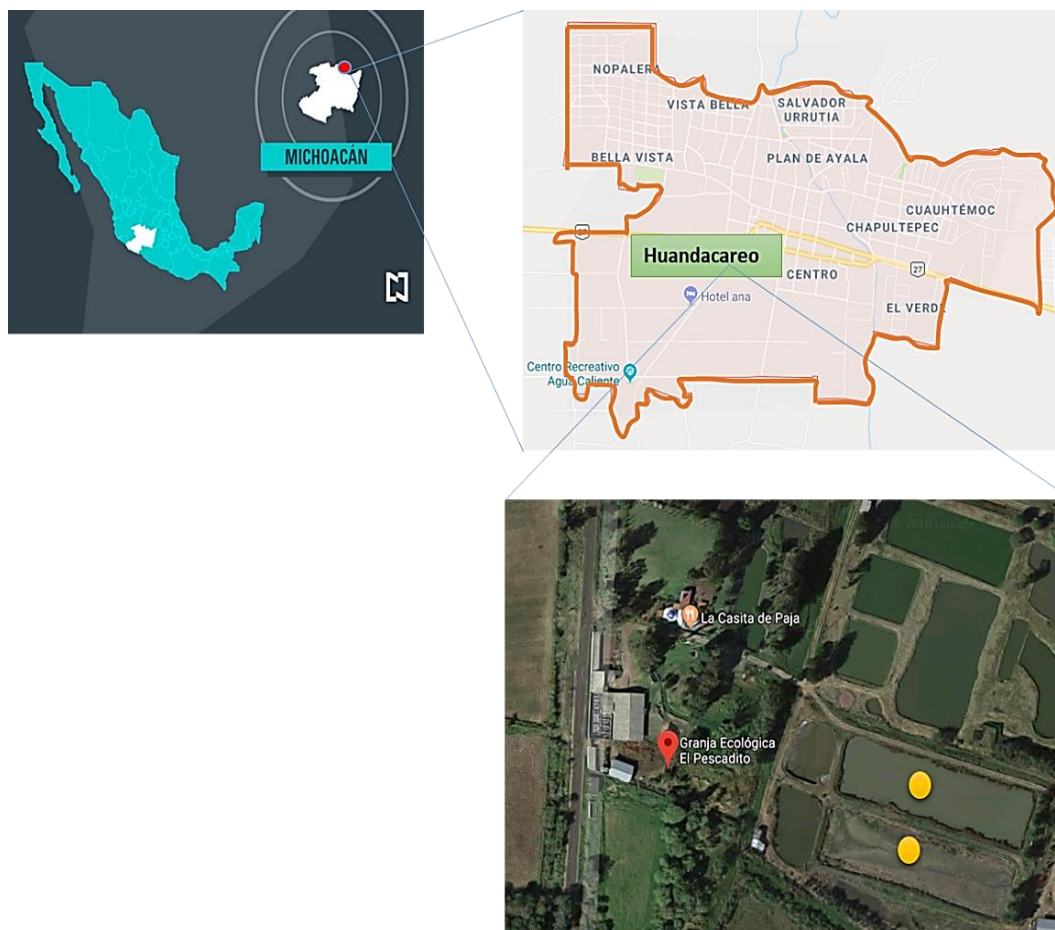
4.2.Particulares

- Realizar el diagnóstico específico de los tricodínidos con ayuda de las técnicas de tinción con hematoxilina y nitrato de plata.
- Estandarizar el tiempo de sobrevivencia *in vitro* de las tricodinas.
- Realizar pruebas de toxicidad del dimetil sulfóxido (DMSO) y el extracto metanólico del tepozán.
- Analizar el efecto antiparasitario *in vivo* del extracto metanólico del tepozán (*Buddleja cordata*) contra tricodinas presentes en tilapia (*Oreochromis* sp.).
- Determinar la concentración con efecto antiparasitario contra tricodínidos que es inocuo para los peces.

V. MATERIALES Y METODOS

5.1. Descripción del sitio de colecta

Las colectas se llevaron a cabo en la granja ecológica “El pescadito” ubicada en Huandacareo, Michoacán, con coordenadas de 19°56'56.00” N, 101°18'58.27” O, a 1837 msnm (Figura 17). Cuenta con cinco estanques rústicos con fondo lodoso y expuestos a la intemperie, sin ningún tipo de protección, tienen diferentes medidas y profundidad, los organismos fueron obtenidos de los estanques más grandes, los cuales presentan 49.6 m de ancho por 121.8 m de largo y de 1.10 metros de profundidad. La temperatura generalmente varió de 5°C a 30°C, la temporada calurosa dura 3 meses (abril-junio) mientras que el período más frío es de 4 meses (noviembre-febrero); por último la temporada de lluvias dura 10 meses (mayo-febrero), los vientos varían de 7.1-8.6 k/h (Weatherspark, 2018).



17. Figura. Localización del sitio de colecta. Granja ecológica “El pescadito”, Huandacareo, Michoacán.

Los peces no tienen un patrón de distribución en los estanques, encontrándose de todos tamaños y edades, por lo que se realizó una selección del tamaño una vez obtenida la muestra, considerando 10cm como el tamaño adecuado para este trabajo.

Cuadro 3

Medidas de los parámetros fisicoquímicos del agua de los estanques de colecta.

Parámetros fisicoquímicos	Estanque 1	Estanque 2
<i>Temperatura</i>	13-16°C	13-15°C
<i>*Nitritos</i>	<0.3 mg/L	<0.3 mg/L
<i>Nitratos</i>	5 mg/L	5 mg/L
<i>Amonio</i>	0.5 mg/L	0.5 mg/L
<i>pH</i>	8.0	8.5
<i>Fosfato</i>	0.1 mg/L	0.2 mg/L
<i>Profundidad</i>	1.10 m	1.10cm

*Concentración de nitritos con lo que se podría considerar el agua de los estanques como eutrofizada, según Zhang *et. al.*, 2017 (rango de 0.171-1.946 mg/L).

5.2. Colecta y transporte de los organismos

Los artes de pesca utilizados para la colecta de organismos fueron la atarraya y el chinchorro, en el primer lance se pudieron obtener alrededor de 100 organismos, esto es un indicativo de que los estanques tienen una carga de peces elevada, con 5 o 6 peces por m³, e incluso más, debido a que se observaron alevines y larvas en los lances; por lo que se podrían considerar como condiciones de hacinamiento, puesto que no hay control de calidad del agua, de la cantidad de peces por estanque, ni de las edades y tamaños, así como un adecuado control de enfermedades. Por lo que era de esperarse que los peces presentaran prevalencias de 80% hasta 100% en la mayoría de los muestreos.

La colecta de las tilapias se realizó en dos etapas, en la primera se colectaron alrededor de 38 peces de los cuales 30 se utilizaron para determinar la presencia de tricodínios en la granja ecológica “El pescadito”, esto en el mes de septiembre de 2017. La segunda etapa se llevó a cabo en el mes de abril de 2018, de los peces colectados en esta etapa, 311 se utilizaron para las pruebas de toxicidad y de eficacia del extracto metanólico del tepozán, colectando un poco más de 341 tilapias en ambas salidas.

Cuadro 4

Número de tilapias utilizadas en cada bioensayo

<i>Prueba</i>	<i>No. de organismos utilizados</i>
<i>Técnicas de diagnóstico específico</i>	30
<i>Estandarización del tiempo de sobrevivencia de las tricodinas</i>	6
<i>Toxicidad</i>	196
<i>Eficacia</i>	109
<i>Total</i>	341

El transporte de los peces vivos se realizó según lo recomendado por la OIE (2016), en el manual para el bienestar de los peces de cultivo durante el transporte. Con temperatura del agua fría en el caso de las tilapias de 15°C a 20°C, en el caso del pH recomendado es de 7-7.5, sin embargo, el agua con que se transportaron los organismos provenía de los estanques de origen por lo que el pH fue de 7 a 8.

Antes y durante el transporte, se mantuvo en ayuno a los peces, se utilizaron bolsas transparentes gruesas de 70 de largo por 50 de ancho, reforzadas con bolsas negras gruesas de 60 por 90 cm, colocando aproximadamente de 15 a 20 peces por bolsa, se agregó oxígeno con bomba de aire y se hicieron dos amarres a cada bolsa, para mantener el oxígeno en la bolsa el mayor tiempo posible.

Posteriormente las bolsas se colocaron en contenedores de plástico de 90 por 120 cm, se mantuvieron bajo sombra, colocando paños húmedos para evitar el efecto de la evaporación, dentro de la cabina de la camioneta Hilux 2013 en la que se transportaron. La velocidad promedio del vehículo de transporte fue de 90 k/h, por carretera de asfalto, con curvas moderadas. Los contenedores se mantuvieron en movimiento, sin que este fuera brusco, para favorecer la agitación regular y aumentar en lo posible la concentración de oxígeno disuelto.

A la llegada de los peces al lugar de descarga, el personal capacitado (dos personas por contenedor), llevó a cabo las operaciones de descarga con el material apropiado para este propósito, y se procedió a colocar el agua que se tomó de los estanques en acuarios de 50 (50 cm largo, 30 cm de ancho y 34 cm de alto), y 20 litros (50 cm largo, 20 cm de ancho y 20 cm de alto) previamente preparados con bombas y aireadores. Posteriormente se colocó ahí a los peces, aclimatándolos gradualmente en el agua de los acuarios dejando las bolsas en las que se transportó a las tilapias durante unos cinco minutos y abriendo las mismas para que poco a poco se mezclaran sus contenidos y los peces se adaptarán más fácilmente.

En los acuarios se mantuvieron las condiciones originales mediante, bombas, mangueras de aireación, aireadores grandes y agua del medio transportada en galones de 20 litros, los cuales se mantuvieron también con aireación constante. (FAO, 2017; OIE, 2017).

Una vez instalados los acuarios con los peces aclimatados se procedió a registrar en la bitácora el número de organismos adquiridos, intervalos de peso y talla, además de monitorear diariamente peces muertos y sobrevivientes, así como las variables fisicoquímicas de los acuarios, para llevar un control de los organismos y sus condiciones en cautiverio.

El material que se requirió para esta parte fue: atarraya, chinchorro, bombas de aire de pilas, manguera, aireadores, tres cubetas de 20 litros, 8 garrafones, ligas gruesas, bolsas transparentes de 50 cm de ancho por 70 cm de largo, bolsas negras de 60 cm por 90 cm, charola de metal, termómetro digital, ictiómetro, balanza, contenedores de plástico de 1.20 m de largo por 80 cm de ancho y un kit Sera® aqua-test.

Los peces seleccionados para este estudio debían ser juveniles de 25 a 27 g, y sus tallas de 10 a 12 cm, con presencia de lesiones cutáneas visibles de leves a moderadas, estas lesiones podían ser “deshilachamiento” de aletas, irritación debajo de las aletas pectorales o pequeñas ámpulas a lo largo del cuerpo (criterios de inclusión).

No se agregaron a la muestra, hembras con huevos o larvas en la boca o peces muy lastimados (criterios de exclusión).

5.3. Técnicas de tinción

Se requirió de 30 tilapias para determinar la presencia de los géneros de la Familia Trichodinidae, en la granja ecológica “El pescadito”, mediante técnicas de tinción (técnica de Klein “en seco” y hematoxilina de Harris), las cuales resaltan características morfológicas únicas de los tricodínidos; esta parte del proyecto se llevó a cabo en el laboratorio de Zoología Acuática de la Facultad de Ciencias de la UNAM.

Para llevar a cabo la identificación de los protozoarios y confirmar la presencia de especies del género *Trichodina*, se llevó a cabo la **técnica de Klein “en seco”**, descrita por Lom (1958) y modificada por Islas-Ortega (2017), la cual consiste en la de impregnación con nitrato de plata de los ciliados para resaltar características diagnósticas.

Se sacrificó cada uno de los peces por medio de punción medular (Rubio-Limota y Silveira Coffgny, 2009), se extrajeron las branquias y se realizó el enjuague de las mismas en agua del medio, en seguida se colocó una gota del enjuague sobre portaobjetos.

Las preparaciones con nitrato de plata se realizaron de la siguiente manera, una vez puesta la muestra en el portaobjetos se dejó secar a temperatura ambiente, posteriormente se agregó nitrato de plata al 5% (5 g. de nitrato de plata en 100 ml de agua destilada) por 5 minutos, se enjuagó una sola vez con agua destilada y se expusieron a luz UV por 5 minutos, después de esto las preparaciones con mejor calidad en la visibilidad de las tricodinas se montaron con bálsamo de Canadá.



Figura 18. Técnica de Klein “en seco”.

Para obtener las preparaciones con la **técnica de hematoxilina de Harris** se siguió el siguiente protocolo: los frotis que se dejaron secando se rehidrataron con agua destilada, se añadió hematoxilina de Harris durante 20 minutos, tiempo después del cual se enjuagó el portaobjetos con agua destilada dos veces y con agua corriente dos veces más, para en seguida revisar al microscopio óptico (marca AmScope, B690B) y obtener las microfotografías a 40x y 100x, posteriormente se deshidrató con alcohol al 70, 96 y 100%, en esta última concentración se pasaron dos veces las preparaciones, se sumergieron en xilol durante cinco minutos y se montaron con bálsamo de Canadá (Figura 19) (Lom, 1958; Van As y Basson, 1989; Islas-Ortega, 2013).



Figura 19. Técnica de hematoxilina de Harris.

Tanto en la técnica de Klein “en seco” como en la de hematoxilina de Harris se recurrió a la literatura para verificar que los ejemplares observados al microscopio fueran efectivamente tricodínidos (Lom, 1958; Kazubski, 1967; Van As y Basson, 1984; Van As y Basson, 1986; Van As y Basson, 1987; Van As y Basson, 1989; Lom y Dyková, 1992; Basson *et. al.*, 1993; Fernández-Galiano, 1994; Gaze y Wootten, 1998; Olmo y Fernández-Galiano; Palm y Dobberstein, 1999; Xu *et. al.*, 1999; Rodríguez-Santiago, 2002, Islas-Ortega, 2013).

5.4. Bioensayos

Los bioensayos de sobrevivencia, toxicidad y eficacia se llevaron a cabo en el Laboratorio de Parasitología, de la Facultad de Biología de la UMSNH.

El procedimiento experimental fue aprobado por el Subcomité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales Experimentales (SICUAE), de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), con el número de protocolo MC-2018/1-11 que es consistente con los principios éticos de la experimentación animal adoptados por el Posgrado en Ciencias de la Salud y la Producción Animal.

5.4.1. Estandarización del tiempo de sobrevivencia *in vitro* de las tricodinas y método del lavado de branquias

Antes de realizar los análisis *in vivo* de la acción antiparasitaria de los extractos fitoquímicos, se realizaron pruebas para determinar el tiempo de supervivencia de las tricodinas fuera de su hospedero en condiciones de laboratorio, de esta manera obtuvimos un estándar del tiempo de sobrevivencia sin extracto. Así se tuvo mayor seguridad de que al momento de aplicar los extractos y extraer branquias los parásitos morirían por efecto del extracto y no sólo por su permanencia *in vitro*. Para esta prueba se utilizaron 3 peces, a los cuales se les aplicó el protocolo que a continuación se describe (Figura 20), modificado de Venâncio *et. al.*, 2015:

- a) Se sacrificó un pez a la vez mediante punción medular (Rubio-Limota y Silveira Coffgny, 2009), enseguida se extrajeron las branquias y se colocaron en viales de vidrio con capacidad de 5 mL, en los cuales se colocaron por separado las branquias

derecha e izquierda. Las branquias del lado izquierdo se enjuagaron con agua del medio (3.5 mL) procurando despegar la mayor cantidad de tricodinas posible y se desecharon; y las branquias del lado derecho se dejaron en el agua del medio (3.5 mL).

- b) Se colectaron los 3.5 mL de agua del enjuague con y sin branquias y se colocaron en portaobjetos (7) alícuotas de 0.5 mL cada 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 14 horas, para hacer el conteo de células vivas y muertas.
- c) La cuantificación de los parásitos se hizo en *zig-zag*, con la ayuda de dos microscopios ópticos marca AmScope, B690B e Iroscope, enfocando con el objetivo de 10x. Al final se sacaron promedios del total de tricodinas encontradas en los siete portaobjetos. Este experimento se hizo por duplicado con un total de 6 peces.

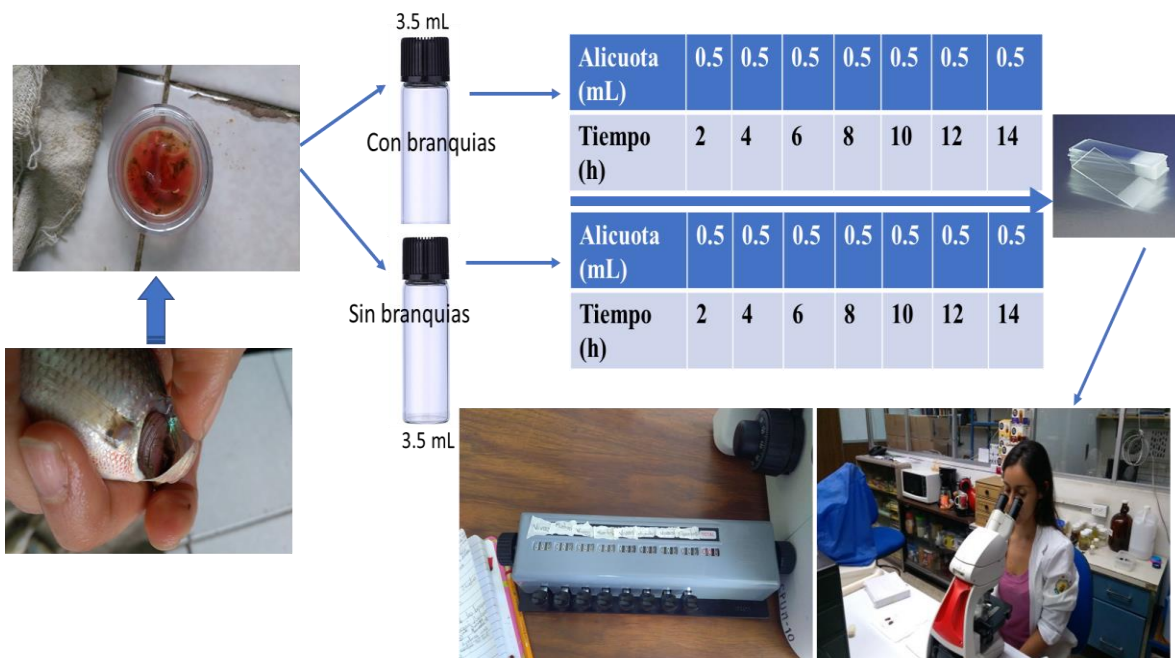


Figura 20. Esquema de la técnica de cuantificación de tricodinas y estandarización del tiempo de sobrevivencia.

Se consideraba muerto un tricodínido cuando no presentaba el movimiento giratorio del disco adhesivo, ni desplazamiento en el líquido o las branquias de la muestra.

Se utilizó el programa Excel para sacar promedios de tiempo de sobrevivencia con desviación estándar y realizar las gráficas, y así poder observar la sobrevivencia *in vitro* de los

tricodinidos a través del tiempo, esto nos ayudó a elegir el mejor método de preservación en el medio de cultivo (con o sin branquias).

5.4.2. Pruebas de toxicidad

5.4.2.1. Toxicidad del DMSO

Ya que se utilizó el DMSO (dimetil sulfóxido) al 0.5% para diluir los extractos crudos, se corroboró que este vehículo no tuviera toxicidad en los peces, para lo cual se realizaron pruebas a diferentes concentraciones, y de este modo conocer la tolerancia de las tilapias a este compuesto químico.

Con el objetivo de determinar la respuesta conductual de los peces al DMSO se mantuvieron en observación hasta llegadas las 48 horas, tiempo en el cual se registraron las siguientes variables conductuales: F (fondo), M (medio), S (superficie), estas variables se observaron cinco minutos antes y después de la alimentación (De los Santos, 2013; Rueda-Jasso *et. al.*, 2014). En cuanto a NALET (nado aletargado), MBS (movimientos bruscos) son parámetros establecidos para nuestro estudio, debido a que se consideró que la tilapia tiene reacciones a estresores que se podrían medir mejor tomando en cuenta estos criterios, además de que las condiciones experimentales en las que se mantuvo a los peces de nuestras pruebas son diferentes (sustancias químicas como el DMSO, agua eutrofizada y con parásitos). Los experimentos se realizaron en sistemas cerrados en un área aislada, con agua del medio y temperatura controlada.

Cuadro 5

VARIABLES CONDUCTUALES MEDIDAS EN OTROS TRABAJOS Y SU MODELO BIOLÓGICO.

<i>Autor/año</i>	<i>Variables conductuales</i>	<i>Especie de pez</i>	<i>Sustancia química</i>
De los Santos, 2013	F (fondo), M (medio), S (superficie)	<i>Skiffia multipunctata</i> y <i>Goodea atripinnis</i>	Nitritos y fosfatos
Rueda-Jasso <i>et. al.</i> , 2014	F (fondo), M (medio), S (superficie)	<i>Skiffia multipunctata</i>	Fosfato de sodio dibásico

García-Batalla <i>et. al.</i> , 2012	Tiempo de reacción (ms), desplazamiento (cm) y velocidad	<i>Poeciliopsis gracilis</i>	Zinc
Zuarth González y Macías García, 2006	Disminución del tamaño de aletas dorsal y ventral, área de color y tasa de cortejo.	<i>Girardinichthys multiradiatus</i>	Metil paration (insecticida)

Se prepararon las concentraciones a probar con DMSO Sigma Aldrich, pureza 99%.

Se seleccionaron cinco peceras con capacidad para 2 L, agregándoles agua (1 L) de los estanques donde se realizaron las colectas de organismos, y se mantuvieron con aireación constante. Antes de agregar el DMSO, se midieron los parámetros fisicoquímicos como nitritos, nitratos, amonio, pH y temperatura.

1. Se seleccionaron cinco tilapias al azar, con un rango de peso de entre 25 y 27 g, colocando una por pecera. Posteriormente el DMSO fue agregado en concentraciones de 0, 0.5, 1, 1.5 y 2 mL/L; el tiempo de exposición al DMSO fue de 48 horas, monitoreando cada tres horas a los peces, hasta las 48 horas (Figura 21). Esta prueba se realizó por cuadruplicado con una **n** de 20 peces.

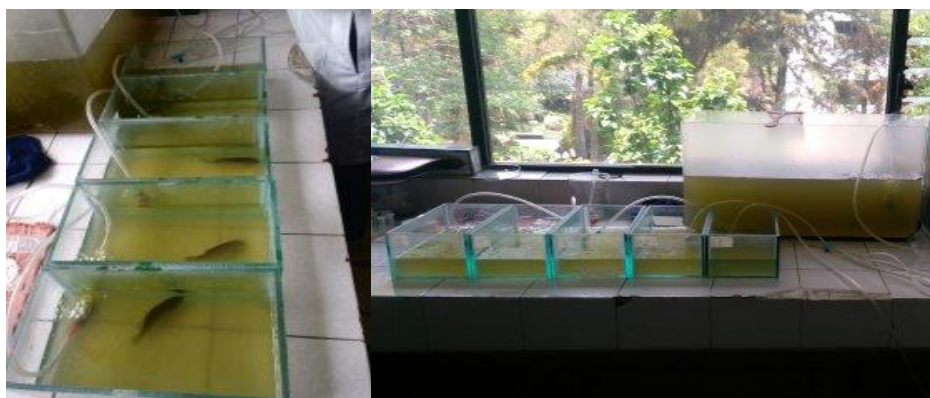


Figura 21. Procedimiento de la prueba de toxicidad del DMSO. Cinco tilapias, una por pecera, concentraciones sucesivas de 0,0.5, 1, 1.5, 2 mL/L, con una exposición de 48 horas.

2. Se realizó una segunda prueba, en la cual se agregó mayor concentración de DMSO 0, 2, 6, y 10 mL; se colocaron 2 litros de agua por pecera, monitoreando los parámetros fisicoquímicos del agua antes y después del experimento. Se colocaron 2 peces por pecera, con un total de 8 peces y 4 peceras, se monitoreo la signología y conducta de los peces cada 12 horas, hasta llegadas las 48 horas. La actividad en el fondo, parte media y superficie de la pecera se observó al momento de la alimentación.

La segunda prueba se realizó por cuadruplicado, con un total de 32 peces. Durante ambas pruebas se agregó alimento a todas las peceras dos veces al día, retirando el excedente de comida después de que la última tilapia se alimentaba. A la hora de la alimentación se observó la conducta de las tilapias antes de proporcionar el alimento y después, viendo su posición en la columna de agua (fondo, medio superficie) y observando también si presentaban movimientos bruscos o nado aletargado.

En este caso no fue posible utilizar algún estadístico o gráfico, puesto que sólo un pez murió en las pruebas y su muerte se debió a su condición deteriorada de salud.

5.4.2.2. Toxicidad del extracto del tepozán

Posteriormente se llevaron a cabo las pruebas de toxicidad de los extractos, para esto se tomaron 12 peces al azar, colocando 2 peces por pecera, en 6 peceras, las cuales ya estaban acondicionadas con agua del medio y aireación; se agregó la concentración de 300 mg/L a cuatro de los acuarios, y los dos restantes se dejaron como control de DMSO (0.5%) y sólo agua (Figura 22).

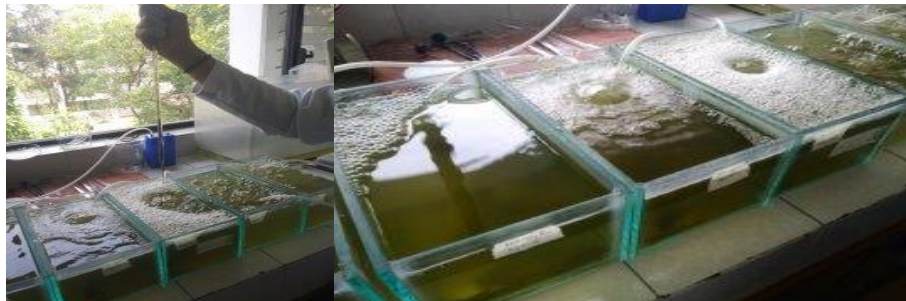


Figura 22. Procedimiento de la prueba de toxicidad del extracto metanólico del tepozán. Seis peceras, dos peces por c/u, concentraciones de extracto metanólico de tepozán de 300, 500, 750 y 1,000 mg/L, control DMSO (0.5%) y sólo agua, exposición de 48 horas.

El baño de inmersión tuvo una duración de 48 horas, revisando la signología y conducta de los organismos cada 12 horas. Se realizó por triplicado esta prueba. El procedimiento anterior se realizó también para las concentraciones de 500, 750 y 1000 mg/L.

Se adiciono alimento dos veces al día a todas las peceras, retirando el excedente de comida después de que la última tilapia se alimentaba. A la hora de la alimentación se observó la conducta de las tilapias antes de proporcionar el alimento y después, viendo su posición en la columna de agua (fondo, medio, superficie) y observando también si presentaban movimientos bruscos o nado aletargado.

Con los datos obtenidos en estas pruebas se realizaron gráficas de las variables conductuales con el programa Excel y con SPSS se llevó a cabo un análisis PROBIT, el cual es empleado en estudios de toxicidad (Díaz-Báez, 2004; Samaniego-Aguilar, 2015).

5.4.3. Evaluación del efecto *in vivo* del extracto metanólico del tepozán (*Buddleja cordata*) a diferentes concentraciones sobre tricotínidos presentes en tilapia (*Oreochromis sp.*).

El extracto metanólico de *B. cordata* fue proporcionado por el Dr. Ricardo Reyes Chilpa y la M.C. Griselda Hernández Pasteur del Instituto de Química de la UNAM. Se prepararon las alícuotas para las concentraciones, esto midiendo los gramos de extracto y agregando 1 mL de DMSO aproximadamente. Haciendo estas alícuotas por repetición de cada bioensayo (Figura 23).



Figura 23. Preparación de alícuotas para los bioensayos de eficacia del extracto metanólico del tepozán.

Las concentraciones para este experimento se eligieron con base en un estudio previo realizado por Díaz-Sánchez *et. al.*, (2000), en el cual utilizaron extracto metanólico a las concentraciones de 25, 50 y 100 mg/L para ver su efecto sobre *Costia necatrix*, con dos testigos, uno con DMSO (0.5%) y otro sólo con agua del medio. Sin embargo, en las pruebas preliminares de este estudio no hubo efecto contra las tricodinas a esas concentraciones (25, 50, 75 y 100 mg/L), por lo que se aumentaron a 300, 500, 750 y 1000 mg/L.

Cuadro 6

Preparación de las concentraciones del EMeOH del tepozán

Concentración mg/L	miligramos	mL
25	100.4*	1.30
50	180*	1.20
75	250.8*	1.11
100	350*	1.16
300	950*	1.05
500	1600*	1.06
750	2260*	1.00
1000	3100*	1.03

*Se agregaron algunos mg más por las pérdidas que pudiera haber en los procedimientos

Antes de cada prueba (toxicidad de DMSO, tepozán y eficacia), se hizo un lavado de la branquia derecha de cada pez, con una pipeta de plástico, utilizando 1 mL de agua del medio; esto con el fin de comprobar que se encontraban parasitados, colocando el mililitro del enjuague de las branquias en portaobjetos, agregando 0.5 mL a cada uno, para realizar el conteo al microscopio óptico en el objetivo de 10x.

Se prepararon 6 peceras con la concentración de 300 mg/L, un control de DMSO (0.5%) y un control sólo con agua, agregando 3 peces por pecera. Cada grupo de tratamiento se mantuvo con aireación constante y se midieron las variables fisicoquímicas antes y después del experimento. De las peceras utilizadas 4 se dejaron para aplicar las concentraciones por lo que se tomaron como repeticiones, con un control de sólo agua y agua con DMSO (0.5%) por concentración, este último control se agregó para corroborar que el vehículo utilizado para resuspender y aplicar el extracto no tuviera acción antiparasitaria por sí solo (Figura 24).

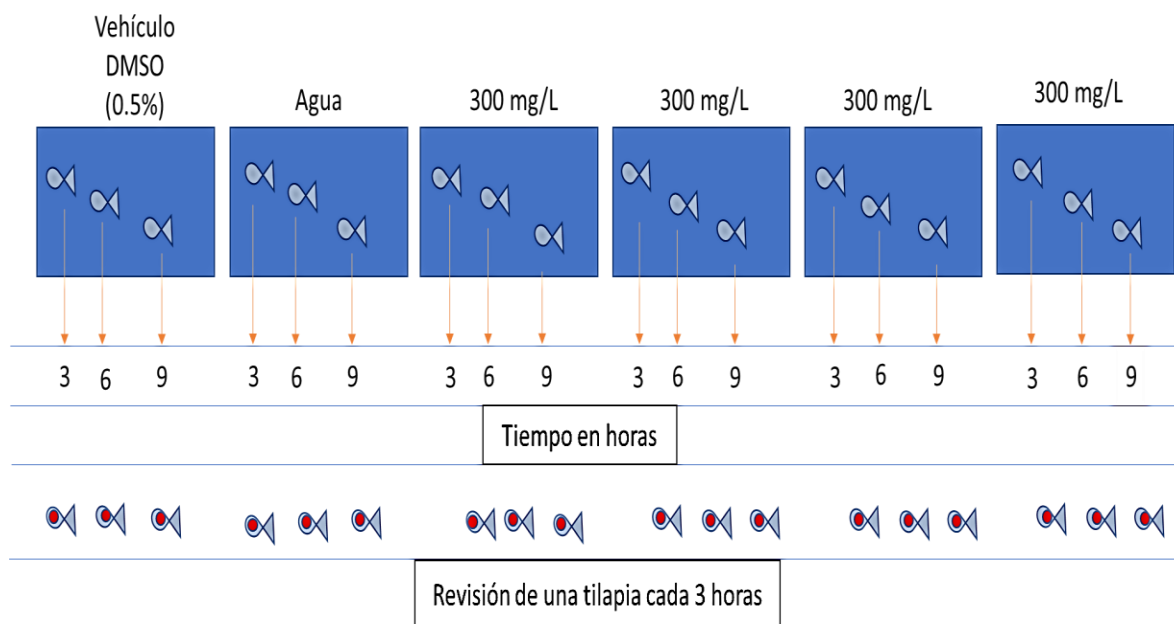


Figura 24. Técnica utilizada para la prueba de eficacia del extracto metanólico del tepozán, donde se colocaron 3 peces por pecera, con la concentración de extracto de tepozán en cuatro y dos peceras para los controles, sacando un pez por pecera cada tres horas para revisión de branquias.

Pasadas las primeras tres horas en el baño de inmersión con las concentraciones progresivas de EMeOH de tepozán se procedió a extraer las branquias de un pez por tratamiento, aplicando previamente eutanasia por medio de punción medular, enjuagando en 3.5 mL y tomando inmediatamente una alícuota de 0.5 mL del lavado de las branquias, hasta terminar con los 3.5 mL del enjuague, con el fin de hacer la determinación de la efectividad por medio del conteo de tricodinas vivas y el total, comparándolo con el control sólo con agua y DMSO, esto para cada uno de los tratamientos cada tres horas y hasta las 9 horas.

Se definió que un parásito se encontraba vivo cuando se observaba movimiento giratorio del disco adhesivo, desplazamiento en el agua de la muestra, adhesión a branquias o restos de ellas; en lo que respecta a parásitos muertos se consideraba sin vida aquellos que no tenían desplazamiento en la columna de agua, ni movimiento giratorio del disco adhesivo, tomando en cuenta estos criterios se realizó la cuantificación total del número de tricodinas vivas y muertas que se pudieron obtener del enjuague de las branquias de todas las tilapias para obtener la caracterización de la infestación. Este procedimiento y número de peces se utilizó de igual manera para los bioensayos de las concentraciones de 500, 750 y 1000 mg/L.

El criterio utilizado para determinar la eficacia *in vivo* del extracto metanólico del tepozán, estuvo basado en el número de parásitos muertos, para lo cual se interpretó como muerte la ausencia de movimiento (ciliar y del disco de adhesión) en estos protozoarios.

Se realizó una prueba no paramétrica de Ji-cuadrada, con el programa SPSS, para conocer la distribución de nuestros datos en las concentraciones de la prueba preliminar y así saber si había diferencia entre los tratamientos, y se realizó un gráfico con los promedios de tricodinas vivas por tratamientos para representar los resultados. El análisis de varianza de una sola vía, y sus respectivos gráficos, se llevó a cabo para conocer el efecto de las concentraciones evaluadas en los diferentes tiempos de exposición (3, 6 y 9 horas) con el programa Prisma. Y con el programa Excel se sacaron promedios de los porcentajes de tricodinas vivas por tiempo (3, 6 y 9 horas), con DS y EEM. Aunado a esto se realizaron gráficos para las variables conductuales con los promedios de peces por variable conductual a los diferentes tiempos de lectura.

VI. RESULTADOS

6.1. Técnicas de tinción

Las técnicas de tinción permitieron identificar las estructuras características pertenecientes a la familia Trichodinidae, como el disco adhesivo, el macronúcleo en forma de herradura, el micronúcleo circular y la ciliatura (Figura 25). Al parecer la mayoría de los tricodínidos observados pertenecía al género *Trichodina*.

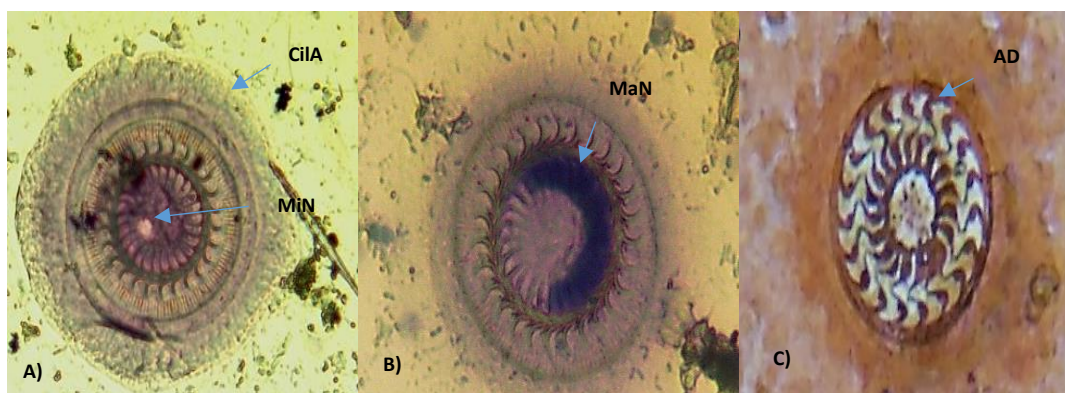


Figura 25. Tricodínidos teñidos mediante la técnica de Klein “en seco” y hematoxilina de Harris. A), B) tricodinas teñidas con la técnica de hematoxilina de Harris; CilA: ciliatura del disco adhesivo, MiN: micronúcleo, MaN: macronúcleo. C) tricodina teñida por técnica de Klein “en seco”, AD: anillo denticulado.

6.2. Bioensayos

6.2.1. Tiempo de sobrevivencia *in vitro* de las tricodinas

La prueba de sobrevivencia *in vitro* de los tricodínidos mostró que a pesar de la disminución de células vivas al transcurrir el tiempo post-mortem del huésped, se pudieron mantener vivas en proporciones importantes hasta pasadas las 8 horas en los viales. Lo que nos confirmó que hay un margen de tiempo que nos permitirá hacer cuantificaciones después de los tratamientos, sin que la mortandad natural de las tricodinas afecte el resultado, al no disminuir el número de tricodinas en un periodo de tiempo corto, por lo tanto, se puede inferir que se obtendrá una buena comparación en el número de parásitos antes y después del tratamiento *in vivo*.

En la gráfica del tiempo de sobrevivencia de las tricodinas (figura 26) observamos que la variación más significativa la encontramos en el número de tricodínidos vivos al dejar las

branquias en el agua del medio, debido a esto se decidió conservar las branquias en los enjuagues subsecuentes para la cuantificación.

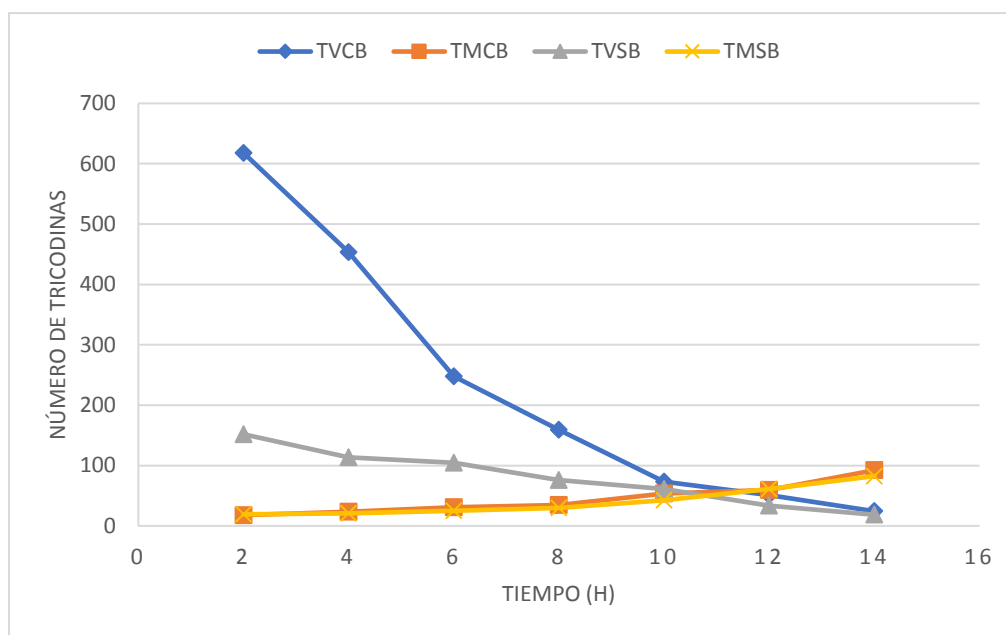


Figura 26. Número de tricodinas vivas y muertas, con y sin branquias *in vitro*. TVCB: tricodinas vivas con branquias, TMCB: tricodinas muertas con branquias, TVSB: tricodinas vivas sin branquias, TMSB: tricodinas muertas sin branquias.

6.2.2. Toxicidad del DMSO

En las dos pruebas que se realizaron para saber si el DMSO presentaba toxicidad en las tilapias, se pudo corroborar que ninguna concentración tuvo un efecto tóxico sobre los peces, puesto que no causo mortalidad, con excepción de un individuo en la primera prueba, pero esto no se tomó como algo significativo puesto que en las demás concentraciones hasta las 48 horas ningún otro pez murió. Las concentraciones empleadas en la primera prueba fueron 0, 0.5, 1, 1.5 y 2 mL/L.

En los registros conductuales realizados durante las pruebas de toxicidad del DMSO, se pudo obtener información útil para comprender mejor la reacción de los peces al vehículo utilizado para la dilución de los extractos y su adición en el agua de las peceras de los tratamientos. Esto nos ayudó a corroborar que no hubo un efecto tóxico en los organismos expuestos al DMSO, dado que al perecer los signos conductuales mostrados por estos individuos fueron

normales, datos que se muestran en la figura 27. Los registros de las variables conductuales de la segunda prueba de toxicidad del DMSO (0, 2, 6, y 10 mL/L) mostraron un comportamiento normal en los peces, sin nado aletargado ni movimientos bruscos o saltos que denotaran signos de estrés.

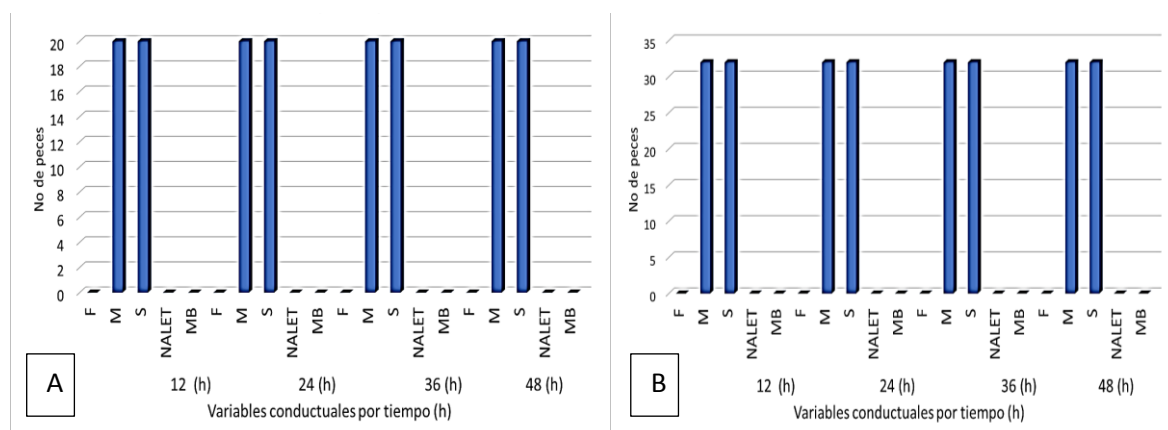


Figura 27. Graficas de las variables conductuales observadas en la prueba de toxicidad del DMSO. A) Número de peces por variable conductual para la primera prueba de toxicidad del DMSO. B) Número de peces por variable conductual para la segunda prueba de toxicidad del DMSO. Tenemos las áreas de las peceras en las que se encontraban las tilapias en cada tiempo de observación, F: fondo, M: medio y S: superior; así como las variables conductuales observadas directamente en los peces por tiempo en el que se realizaron las observaciones NALET: nado aletargado, MB: movimientos bruscos.

La posición en la columna de agua se observó al momento de la alimentación, donde se tomó como un comportamiento normal que los peces se desplazaran hacia la parte media y superficie para recibir el alimento, y si por el contrario el pez no se movía del fondo para alimentarse se podía considerar que había algún factor que estaba alterando su conducta alimentaria. En este caso a excepción del pez que murió todos los demás individuos mostraron un comportamiento normal al momento de la alimentación, moviéndose sin dificultad en la columna de agua para tomar el alimento.

6.2.3. Toxicidad del extracto metanólico del tepozán

Las concentraciones de 500, 750 y 1000 mg/L mostraron toxicidad en los peces a las 48 horas con 7, 14 y 24 peces muertos respectivamente. La concentración de 300 mg/L no tuvo ningún muerto en este periodo de tiempo.

En la prueba de toxicidad del extracto metanólico de la concentración de 500 mg/L el análisis de las variables conductuales (figura 28), nos muestra un cambio en el comportamiento de los peces a las 36 horas con nado aletargado y movimientos bruscos, así como una mayor permanencia en el fondo de las peceras, lo cual se mantuvo hasta las 48 horas, tiempo en el cual ocurrieron 7 decesos. Los signos de estrés en los peces en la concentración de 750 mg/L se observaron a partir de las 36 horas. Finalmente, en la concentración de 1000 mg/L se observaron signos de estrés a partir de las 24 horas, presentando saltos fuera de las peceras después de este tiempo hasta las 48 horas, muriendo todos los peces de los tratamientos (24 tilapias) excepto los de los controles. Con respecto a la presencia en la columna de agua, se observó que se situaban más en el fondo con la concentración de 1000 mg/L y en la de 300 mg/L la mayor parte del tiempo estaban activos en la parte media y la superficie.

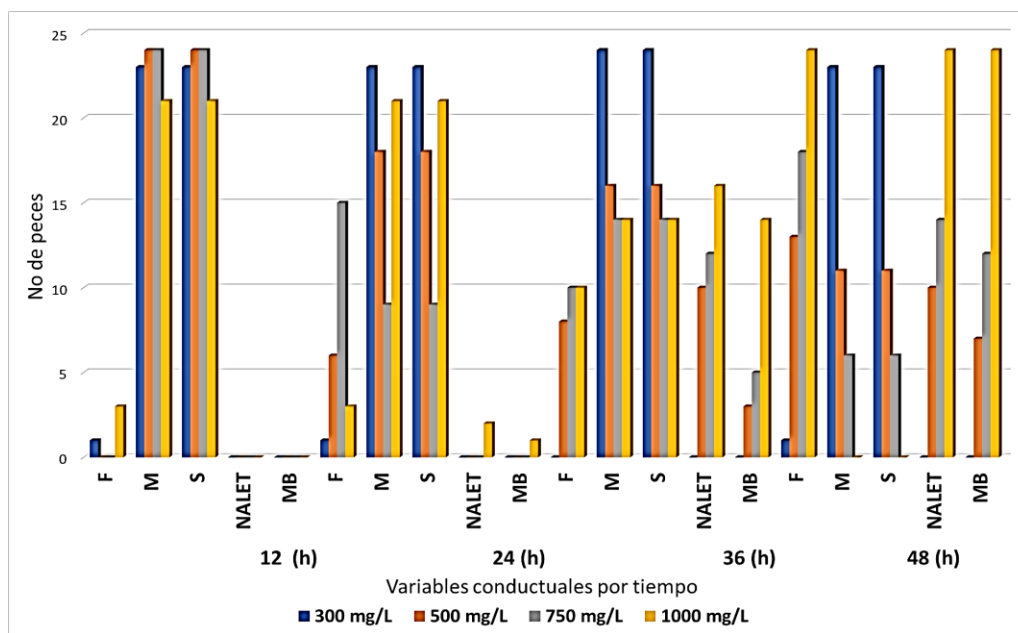


Figura 28. Número de peces por variable conductual para la prueba de toxicidad del extracto metanólico del tepozán (concentraciones 300 mg/L, 500 mg/L, 750 mg/L y 1000 mg/L). En cuanto a las variables conductuales; tenemos las áreas de las peceras en las que se encontraban las tilapias en cada tiempo de observación, F: fondo, M: medio y S: superior; así como las variables conductuales observadas directamente en los peces por tiempo en el que se realizaron las observaciones, NALET: nado aletargado, MBS: movimientos bruscos.

A partir de las 36 horas disminuyó el número de peces alimentándose en las concentraciones de 500 y 750 mg/L, y para la concentración de 1000 mg/L desde las 24 horas dejaron de recibir alimento.

El análisis Probit se pudo realizar solamente para las 48 horas en todos los tratamientos (300, 500, 750 y 1000 mg/L), esto debido a que este fue el tiempo en el que se presentaron mortalidades. No hubo muertos a las 12, 24 o 36 horas en ninguno de los tratamientos, solamente se pudo recoger información a partir de las variables conductuales y como ya se mencionó anteriormente, varios organismos dejaron de alimentarse a las 36 horas en las concentraciones de 500 y 750 mg/L, mostrando nado aletargado, y desde las 24 horas en la concentración de 1000 mg/L.

Como se puede apreciar en la figura 29, este análisis (Probit) nos arroja que la concentración letal media para los organismos es de 676.44 mg/L (límite inferior 673.306 y límite superior 688.889) de extracto metanólico de *B. cordata*.

Nota: En cuanto a las concentraciones menores de las pruebas preliminares no se realizaron pruebas de toxicidad debido a que estas no tuvieron diferencias significativas en la respuesta antiparasitaria, además de que no se contaba con suficiente extracto para las pruebas de toxicidad de esas concentraciones (ver apartado 6.2.4).

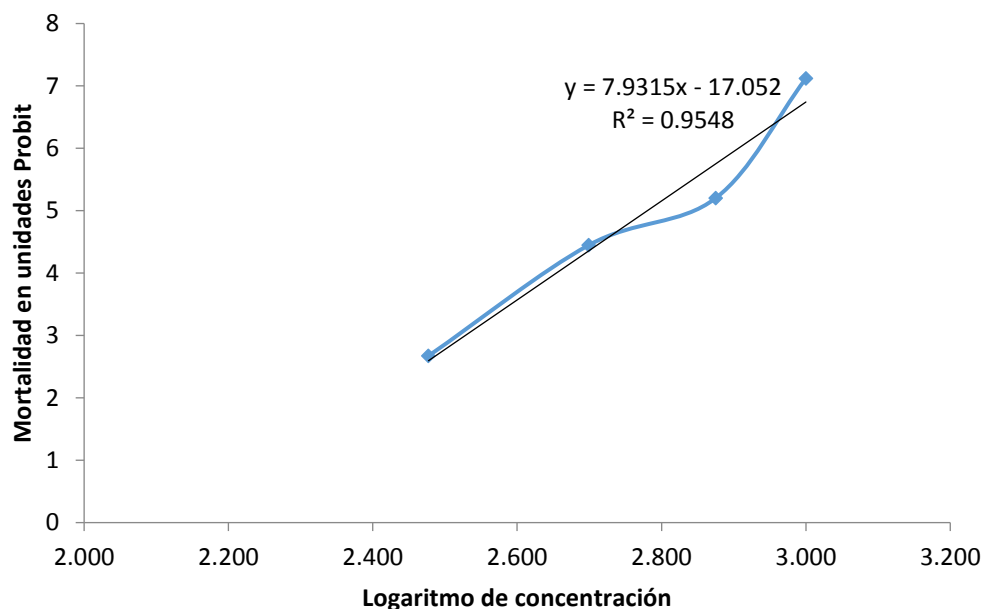


Figura 29. Análisis PROBIT realizado a las 48 horas; donde se aprecia que la mortalidad de peces aumenta conforme se les expone a concentraciones mayores. La mortalidad esta expresada en unidades Probit. Concentración letal media (CLM): 676.44 mg/L, con un intervalo de confianza del 95%.

6.2.4. Evaluación del efecto *in vivo* del extracto metanólico del tepozán (*Buddleja cordata*) a diferentes concentraciones sobre tricodínidos presentes en tilapia (*Oreochromis sp.*).

Para las interpretaciones de los gráficos del efecto del extracto metanólico del tepozán cabe aclarar que debido al ciclo de vida de las tricodinas (ver antecedentes) se tiene tricodinas muertas de manera natural incluso en los controles, esto debido a la manipulación al momento de pasar los organismos al medio *in vitro* o por muerte natural, por lo que podría parecer que en los grupos con concentración de 0 mg/L y DMSO al 0.5% también hay efectos antiparasitarios, no obstante, no es así.

A pesar de que se evaluaron las concentraciones del extracto metanólico del tepozán en un rango más o menos amplio (25-100 mg/L) en las pruebas preliminares no se observó un efecto antiparasitario contra los tricodínidos que fuera significativo a las 3, 6 y 9 horas, debido a que se contabilizaban cantidades similares de parásitos vivos en las concentraciones de extracto metanólico de tepozán que en los controles (Figura 30).

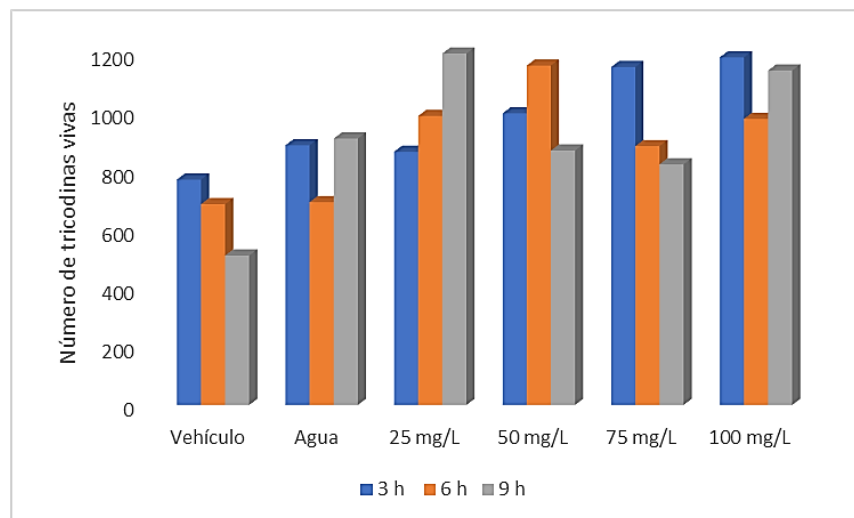


Figura 30. Número de tricodínidos vivos por tratamiento en la prueba del extracto metanólico del tepozán.

Tal como se puede apreciar en la figura 30, los promedios de tricodínidos vivos en las diferentes concentraciones no tuvieron diferencias estadísticamente significativas ($\alpha=0.5$) según la prueba de Ji-cuadrada. Por tal motivo se decidió aumentar las concentraciones a 300, 500, 750 y 1000 mg/L.

Por lo que respecta al porcentaje de tricodínidos vivos a lo largo de las horas de exposición, se puede ver en el gráfico de la figura 31 que no cambia de manera significativa el porcentaje de tricodínidos muertos al pasar del tiempo como se esperaba, que a mayor tiempo de exposición el porcentaje de tricodínidos disminuiría, sin embargo, este grafico nos ayuda a ver que no existe una relación tiempo-dependiente en cuanto al número de tricodínidos vivos en los tratamientos.

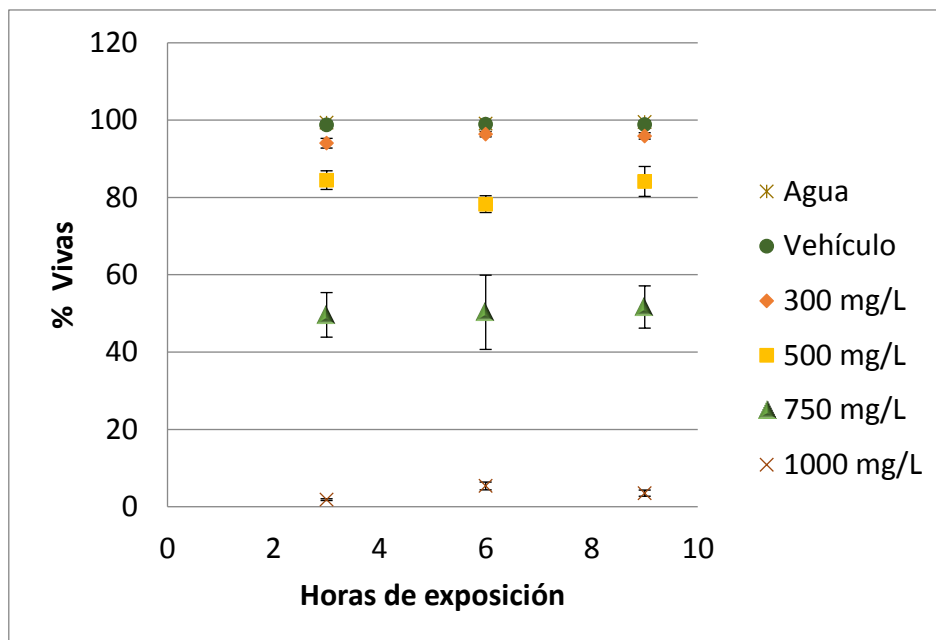


Figura 31. Porcentaje de los promedios de tricodinas vivas para cada tratamiento a las 3, 6 y 9 horas.

El contraste del promedio de tricodínidos vivos de los diferentes grupos tratados con el extracto metanólico del tepozán (*B. cordata*), contra los de los grupos testigos, a lo largo de las horas de tratamiento (3, 6 y 9 horas) se encontró que no hubo diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) entre los controles y la concentración de 300 mg/L, las diferencias en los porcentajes de tricodinas vivas comienzan a verse en la concentración de 500 mg/L, sin embargo el mayor efecto antiparasitario se deja ver con las concentraciones de 750 y 1000 mg/L del EMeOH de *B. cordata*, donde se observa una disminución importante, lo que significa que si hay una relación entre la concentración y la disminución de tricodínidos vivos (figura 32).

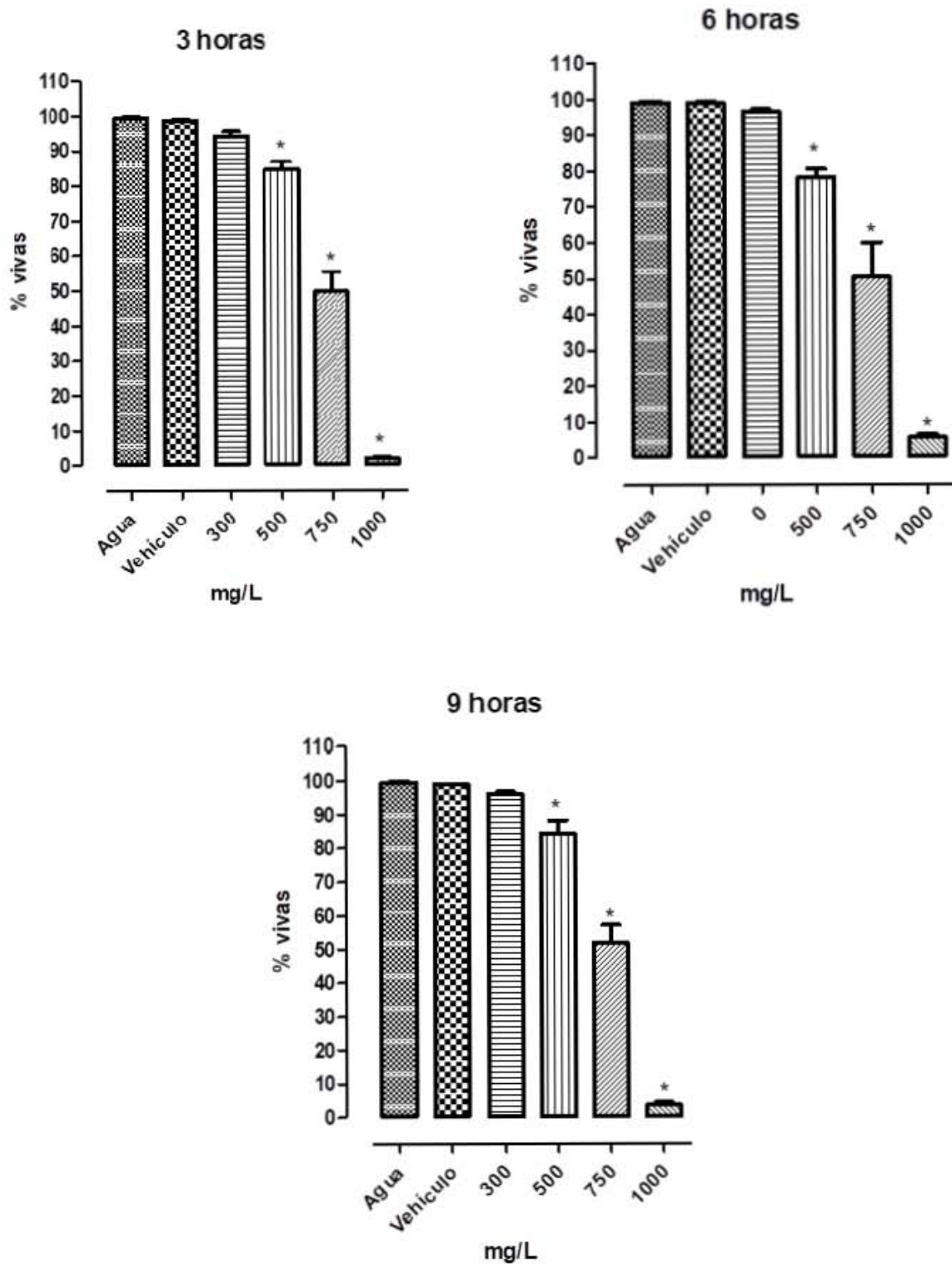


Figura 32. Porcentaje de los promedios de tricodinas vivas para cada tratamiento, por tiempo de lectura (3, 6 y 9 horas). (*) valores estadísticamente significativos ($P < 0.05$)

En las microfotografías 33A y 33B, se puede apreciar que tanto el control de agua (0 mg/L) como la concentración de 300 mg/L conservaban en buen estado todas las estructuras morfológicas de los tricodínidos (disco adhesivo, ciliatura, periciclo, micro y macronúcleo). Mientras que en la concentración de 500 mg/L (Figura 33C), ya se puede visualizar en los ejemplares analizados unas ligeras modificaciones en el periciclo, lo cual alteraba su modo de desplazamiento al observar *in vitro*, el disco parecía ladearse al momento de girar y los cilios no presentaban el mismo movimiento que un tricodínido “sano”. Lo mismo ocurría en las concentraciones de 750 mg/L (Figura 33A), y 1000 mg/L (figura 34B), donde el periciclo presenta un tipo de “ulceras”, e incluso perforaciones, y el disco adhesivo a pesar de que seguía girando lo hacía con ligeras intermitencias, hasta que la célula dejaba de presentar movimiento.

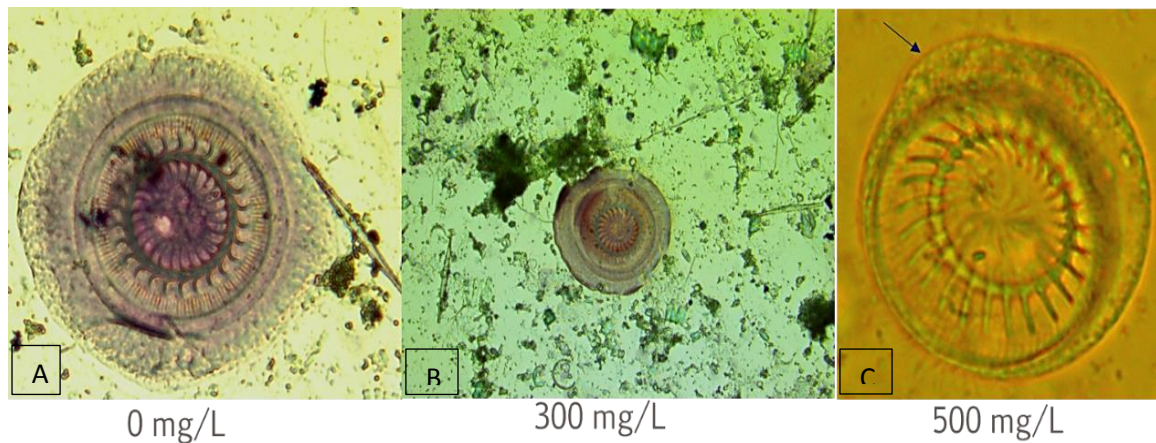


Figura 33. Microfotografías de tricodinas presentes en los tratamientos; tanto en control de 0 mg/L (A), como en las concentraciones de 300 mg/L (B) y 500 mg/L (C), tomadas a las 9 horas de exposición a los tratamientos. En la microfotografía C, puede apreciarse una deformación en el periciclo.



Figura 34. Microfotografías de tricodinas muestreadas en los tratamientos, a concentraciones de 750 mg/L (A) y 1000 mg/L (B), a las 9 horas de exposición. Los daños estructurales son más notorios para este tiempo a estas concentraciones, pues en la mayoría de los frotis se observaban tricodínidos con este efecto, incluso en el disco adhesivo. Las flechas en las imágenes

VII. DISCUSIÓN

Se corroboró la presencia de tricodinas en las tilapias colectadas en la granja ecológica “El Pescadito”; esto mediante las técnicas de tinción como la impregnación argéntica de Klein “en seco”, que resalta estructuras como la espiral ciliar adoral, así como la forma y número de dentículos del disco adhesivo, el cual fue bástate notorio en nuestros ejemplares; así mismo con la técnica de hematoxilina de Harris, que es utilizada para resaltar el anillo ciliar, así como el macro y micronúcleo, permite apreciar en los tricodínidos de nuestras tinciones estas estructuras. Los tricodínidos incluyen diversos géneros de la familia Tricodinidae, por lo que las técnicas de tinción ayudaron a determinar que en nuestros peces se encontraban protozoarios de este grupo (Rodríguez-Santiago, 2002; Jiménez-Bahena *et. al.*, 2010; Mojica-Sastoque *et. al.*, 2010; Rubio-Godoy, 2013; Islas-Ortega y Aguilar-Aguilar, 2014). Por lo tanto, se pudo confirmar la presencia de los tricodínidos para nuestro sitio de colecta; algo que diversos autores ya han reportado para tilapias de sistemas de cultivo dulceacuícola (Duncan, 1977; Basson *et. al.*, 1983; Van As y Basson, 1989; Mojica-Sastoque *et. al.*, 2010; Balbuena-Rivarola *et. al.*, 2011).

Las pruebas de sobrevivencia realizadas antes de los bioensayos (toxicidad y efecto del extracto metanólico del tepozán), dieron pauta para conocer de mejor manera el comportamiento *in vitro* de los tricodínidos y así tener un conocimiento más preciso de su tiempo de sobrevivencia en condiciones de laboratorio y conocer el margen de tiempo para la cuantificación de los parásitos de interés después de sacrificados los peces.

Antes de las pruebas preliminares del tiempo de sobrevivencia de los tricodínidos se tenía la hipótesis de que estos protozoarios no permanecían más de 3 horas fuera de su hospedero *in vitro*, sin embargo, con los datos obtenidos en este experimento se pudo comprobar que las tricodinas pueden mantenerse vivas en agua del medio con branquias durante un lapso de 8 a 10 horas, empero a partir de las 12 horas el número de estos parásitos comienza a disminuir significativamente.

Jiménez-Guzmán *et. al.*, 1988, mencionan que las tricodinas pueden sobrevivir de 1 a 1.5 días en vida libre alimentándose de partículas en suspensión en los cuerpos de agua, no

obstante, hasta el momento no se sabe de trabajos donde reporten el tiempo de sobrevivencia de las tricodinas *in vitro*, por lo que nuestros resultados en este sentido aún no se pueden contrastar con trabajos previos.

En cuanto a las pruebas de toxicidad realizadas con el DMSO, se pudo confirmar que fue una buena elección como vehículo para aplicar el extracto crudo metanólico del tepozán, puesto que ayudo a su integración al agua del medio donde se encontraban las tilapias sin ningún efecto toxico según nuestros resultados. El DMSO es conocido desde 1953 por sus propiedades como un “súper disolvente” y por su capacidad de penetrar fácilmente los tejidos animales y vegetales. Debido a sus propiedades antiinflamatorias y analgésicas se ha empleado en medicina y veterinaria (Álvarez-Caro y Larqué-Saavedra, 2004; López-Núñez *et. al.*, 2013).

La aplicación de estudios conductuales como parte de las pruebas de toxicidad acuática, son considerados ya indicadores efectivos (García-Batalla *et. al.*, 2012). Durante los bioensayos de toxicidad se registraron variables de comportamiento en los peces tales como NALET: nado aletargado, MB: movimientos bruscos, así como la permanencia de estos en el fondo (F), parte media (M) y la superficie (S) de las peceras, esto con el fin de tener una documentación del efecto tóxico de las concentraciones del DMSO y el extracto metanólico de *B. cordata*. El comportamiento reúne la manifestación acumulada de procesos bioquímicos, fisiológicos y genéticos, que son esenciales para la vida, los cuales se expresan mediante una secuencia de acciones que operan a través del sistema nervioso (central y periférico). Esto permite que un organismo se adapte y responda a los estímulos que recibe del medio con la finalidad de sobrevivir en un ambiente cambiante (Kane *et. al.*, 2005). Dado que el comportamiento no es un proceso aleatorio, sino una secuencia de actividades estructuradas y predecibles que son diseñadas para garantizar la aptitud y supervivencia (éxito) de los individuos, las alteraciones conductuales son una herramienta valiosa para discernir y evaluar los efectos de las exposiciones a contaminantes ambientales (Scott y Sloman 2004, Kane *et. al.*, 2005, Hellou 2011; De los Santos, 2013). El estudio conductual de la prueba de toxicidad del DMSO nos dio un buen soporte para asegurar que nuestro vehículo no tuvo efecto tóxico sobre las tilapias, lo cual nos dio luz verde para su utilización

en la resuspensión y aplicación del extracto metanólico para el análisis de su efecto contra los tricodínidos.

Por otro lado, el análisis conductual durante la prueba de toxicidad del extracto metanólico de *B. cordata* nos ayudó a comprender el efecto que produce sobre los peces en las concentraciones aplicadas (300, 500, 750 y 1000 mg/L) en el transcurso de 48 horas. La concentración de 300 mg/L, mostró ser una concentración segura para las tilapias pues no hubo muertos en estos grupos de tratamiento y tampoco presentaron alteraciones conductuales manteniéndose activos en la parte media y la superficie, durante la alimentación. Sin embargo, en las concentraciones de 500, 750 y 1000 mg/L los peces comenzaron a mostrar cambios conductuales que denotaban estrés a partir de las 36 y 48 horas de exposición al extracto, donde las tilapias tenían nado aletargado, movimientos bruscos a manera de convulsiones y saltos repentinos en los acuarios; al respecto García-Batalla *et. al.* (2012), mencionan que en presencia de compuestos tóxicos puede haber modificaciones sobre las respuestas motrices y el desempeño muscular, en mayor medida que las respuestas sensoriales.

En la prueba de toxicidad del extracto metanólico del tepozán nuestros resultados de las variables conductuales de permanencia en fondo (F), parte media (M) y superficie (S) de la columna del agua son comparables con los obtenidos por Rueda-Jasso *et. al.*, 2014, puesto que ellos mencionan que los peces (*Skiffia multipunctata*) permanecieron activos en la parte media y superficie a la hora de la alimentación cuando no tenían un efecto tóxico aparente, algo similar a lo que ocurrió con las tilapias utilizadas en nuestros bioensayos, que presentaban mayor actividad en superficie y parte media al momento de darles el alimento, esto en la concentración de 300 mg/L desde las 12 a las 48 horas, y en las de 500 y 750 mg/L de las 12 a las 36 horas de exposición al extracto metanólico del tepozán, por lo que se puede decir que hubo una dependencia entre la concentración y el efecto de las conductas evaluadas.

No obstante, De los Santos (2013), toma la permanencia de los peces (*Skiffia multipunctata* y *Goodea atripinnis*), en parte media y el fondo de los acuarios como signos de ausencia de estrés, sin embargo, en este trabajo se observó que los peces se mantenían en la parte media y la superficie en concentraciones bajas del extracto, y se alimentaban mejor, en comparación con las concentraciones elevadas, donde se mostraron estáticos y su permanencia fue mayor

en el fondo que en la parte media y la superficie, y sólo al momento de tener movimientos bruscos o saltos subían de manera súbita a la superficie.

Por su parte, el análisis Probit realizado nos arrojó una concentración letal media de 678.37. Además, se pudo observar que las concentraciones más elevadas (500, 750 y 1000 mg/L) comenzaron a presentar peces muertos (7, 14 y 24 respectivamente) a partir de las 48 horas de exposición al extracto metanólico del tepozán. No obstante, se requeriría de mayor investigación para conocer el efecto a nivel celular que tiene el extracto metanólico del tepozán y así saber si es temporal y los peces se podrían recuperar rápidamente después del tratamiento o tiene efectos negativos permanentes.

Este efecto tóxico, piscicida de los sesquiterpenos (Buddleinas) con estructura cariofiléticas fue reportado por Houghton (1986), empero este autor lo reporta para los extractos hechos con raíces de *Buddleja davidii* y *Buddleja japonica*, y en el presente estudio se trabajó con el extracto metanólico hecho con las hojas de *Buddleja cordata*.

Autores como Ávila-Álvarez (1992); Díaz-Reyes (1993) también trabajaron con el extracto de *B. cordata* sólo que en su caso ellos probaron el extracto acuoso, y no reportan toxicidad de los extractos en peces, sin embargo, las concentraciones utilizadas en esos trabajos fueron de 49 mg/L, 9.86 mg/L, con una aplicación por día durante tres días, sin especificar la duración de los baños aplicados. En el caso de Díaz-Sánchez *et. al.* (2000), analizaron tanto el extracto acuoso como el metanólico de *B. cordata*, con una concentración máxima de 100 mg/L, con dos aplicaciones con 24 horas de diferencia (tiempo del baño sin especificar); sin embargo, las concentraciones probadas en estos tres estudios son mucho menores a las que se probaron en nuestros bioensayos, además de que estos tres autores no realizaron pruebas de toxicidad como tal, y tanto sus concentraciones como sus tiempos de aplicación no fueron tan elevados y prolongados como los del presente trabajo de investigación.

En este estudio se demostró que el extracto crudo metanólico del tepozán (*Buddleja cordata*) presenta potencial para el tratamiento *in vivo* de la tricodiniasis en tilapia a partir de las 3 y hasta las 9 horas de exposición para las concentraciones de 750 y 1000 mg/L, debido que a estas concentraciones se vio una reducción en el promedio de tricodínidos vivos, efecto que fue más notorio en la concentración de 1000 mg/L; por lo que, si lo que se busca es reducir de manera rápida el promedio de tricodínidos vivos en los peces, puede llegar a ser una

opción, debido a que a partir de las 3 horas esta concentración mostro una drástica disminución en la cantidad de tricodínidos vivos, y este tiempo está muy distante del total de horas de las pruebas de toxicidad (48 h).

Por otro lado, el efecto contra los tricodínidos también se presenta en la concentración de 750 mg/L a partir de las 3 horas de que las tilapias entraron en contacto con el extracto; y su toxicidad fue menor que la de 1000 mg/L, por lo que se podría considerar que es la mejor alternativa en cuanto a eficacia antiparasitaria y menor toxicidad se refiere; los baños cortos con el extracto podrían ayudar en un tratamiento de primera instancia.

Varios son los trabajos que reportan al glucósido fenilpropanoide llamado verbascósido como el principal compuesto activo, como antimicrobiano y antiprotozoario (De Ocampo-Jiménez, 1993; Ávila et. al., 1999; Díaz-Sánchez et. al., 2000; Funes et. al., 2010; Hernández-Pasteur, 2018).

Ávila-Álvarez (1992) y Díaz-Sánchez *et. al.* (2000) mostraron el efecto parasitocida del extracto de *B. cordata*, a concentraciones similares en el mismo protozoario parásito *Costia necatrix* el primero con una concentración efectiva de 49 mg/L, con una aplicación al día por tres días; y Díaz-Sánchez *et. al.* (2000), encontraron que la concentración de 50 mg/L, de la fracción 2 del extracto metanólico de *B. cordata* presentó el verbascósido, y que este tiene un efecto parasitocida contra *Costia necatrix*, en dos aplicaciones con 24 horas de diferencia entre ambos (no se menciona el tiempo de duración de los tratamientos). Por lo que se puede suponer que el efecto antiparasitario en *Costia necatrix* del verbascósido extraído de *B. cordata*, podría ser similar al que presenta sobre los tricodínidos, dado que ambos pertenecen al grupo de los protozoarios. Sin embargo, con base en nuestros resultados en el caso de las tricodinas se requieren concentraciones más elevadas para lograr resultados antiparasitarios.

Los glucósidos fenilpropaniodes son compuestos solubles en agua ampliamente distribuidos, la mayoría de ellos derivados de hierbas medicinales; entre ellos el verbascósido o acteósido ha exhibido una amplia actividad biológica, como antiinflamatorio, antimicrobiano, antiparasitario entre otros; la interacción del verbascósido con membranas de fosfolípidos, sobre todo con membranas cargadas negativamente compuestas de fosfatidilglicerol (PG), se ha observado que este compuesto afecta el comportamiento de ionización del grupo fosfato de PG y muy probablemente interactúa con la superficie de las vesículas (Funes *et. al.*, 2010).

La presencia del verbascósido disminuye el tamaño de la partícula en las vesículas de PG a través del aumento del área del grupo de la cabeza del fosfolípido, lo cual explica de alguna manera la deformación del periciclo de las tricodinas de los grupos expuestos a las concentraciones de 500, 750 y 1000 mg/l (figuras 31 y 32).

Por otro lado, Rodríguez-Zaragoza *et. al.* (1999), reportan compuestos como la linarina y el ácido valínico en los extractos metanólico y acuoso de *B. cordata*, los cuales al parecer mostraron actividad amebicida contra varias cepas de *Acanthamoeba*.

Sin embargo, como mencionan Días-Sánchez *et. al.*, 2000, se requiere de mayor esfuerzo de investigación para conocer el modo de acción del verbascósido de *B. cordata* y otras especies de este género *Buddleja* sobre protozoarios, en este caso, su efecto en tricodínidos. Al parecer nuestro trabajo, es el primero en el que se utiliza el extracto metanólico de *B. cordata* contra tricodínidos de tilapia.

Las plantas medicinales se han utilizado para el tratamiento de patógenos de peces desde tiempos prehispánicos de manera empírica (Auró-Jiménez, 1993; Bassols y Gurni, 1996), no obstante, en los últimos años ha tomado mayor importancia y se han comenzado a estudiar más a fondo los extractos crudos de las plantas (componentes químicos) y su acción sobre los patógenos para así tener bases más sólidas de su modo de aplicación en las granjas acuícolas (baños de inmersión, en alimento etc.). La medicina tradicional, por lo tanto, se ha planteado como la terapia del futuro para la prevención y control de enfermedades de organismos acuáticos, esto debido a que se considera que su implementación podría ser amigable con el ambiente y reducir la contaminación generada por medicamentos sintéticos, además de reducir costos de tratamiento (Schmahl and Taraschewski, 1987; O'Neill *et. al.*, 1987; Wright *et. al.*, 1988, 1993; Prieto *et. al.*, 2005; Guo *et. al.*, 2005; Silveira-Coffigny, 2006; Nakao *et al.*, 2009; Wang *et. al.*, 2010; Reverter *et al.* 2017); sin embargo, es un campo que requiere de mayor investigación para demostrar su verdadero potencial, inocuidad y viabilidad para su uso rutinario en peces.

VIII. CONCLUSIONES

- ❖ Los tricodínidos (Familia Trichodinae) se encuentran presentes en la granja ecológica “El pescadito”, Huandacareo, Michoacán.
- ❖ Los tricodínidos *in vitro* tienen un tiempo de sobrevivencia de al menos 8 horas (dejando las branquias en el medio del cultivo), periodo después del cual sus poblaciones comienzan a disminuir notablemente.
- ❖ El DMSO tiene excepcionales propiedades disolventes por lo que fue una buena elección para resuspender el extracto metanólico del tepozán, además de que no presentó toxicidad en los peces aún en su concentración más elevada utilizada en estas pruebas (10 mL/L).
- ❖ El extracto metanólico de *B. cordata* presenta toxicidad a concentraciones de 500, 750 y 1000 mg/L a partir de las 36 y hasta las 48 horas.
- ❖ Los hallazgos obtenidos en el presente estudio proporcionan suficiente evidencia para indicar que el extracto metanólico del tepozán presenta potencial para tratar la tricodiniasis en tilapias a concentraciones de 750 y 1000 mg/L.
- ❖ En la concentración de 750 mg/L se puede ver una reducción parasitaria considerable y una menor toxicidad, por lo que se podría considerar la más adecuada como tratamiento alternativo de primera instancia; empero se sugiere realizar antes más estudios de toxicidad a nivel histológico para conocer mejor el efecto tóxico en las tilapias.

IX. REFERENCIAS

- Ahumada Andrés, Ortega Andrés, Chito Diana, Benítez Ricardo. 2016. Saponinas de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.): un subproducto con alto potencial biológico. *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, Vol. 45(3), 438-469. 32 pp.
- Auro de Ocampo y Jiménez E. M., 1993. La herbolaria medicinal en el tratamiento de las enfermedades de los peces en México. *Vet. Méx*, 24 (4). 5 p.
- Abdel-Meguid, M., 2001. Trichodiniasis as a cause of mortality among infected *Tilapia zillii* with special emphasis on its control using Earthtec™. *Egypt. J. Aquat. Biol.Fish.* 5, 95–104.
- Aguilar Aguilar Rogelio e Islas Ortega Alma Gabriela. 2015. A checklist of ciliate parasites (Ciliophora) of fishes from Mexico. *Zootaxa* 4027 (2): 270-280. 12 pp.
- Álvarez Caro Dora María y Larqué Saavedra Alfonso. 2004. La supermolécula, el dimetil sulfóxido: ¿un nuevo regulador del crecimiento vegetal? *Ciencia*. Pp 5.
- Asmat, G. S. M., 2004. First Record of *Trichodina diaptomi* (Dogiel, 1940) Basson and Van As, 1991, *T. heterodontata* Duncan, 1977 and *T. oligocotti* (Lom, 1970) (Ciliophora: Trichodinidae) from Indian Fishes. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 7 (12): 2066 –2071.
- Asmat G. S. M. y N. Sultana., 2005. Four New Species of *Trichodina* Ehrenberg, 1830 (Ciliophora: Trichodinidae) from Bangladeshi Fish. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 8 (6): 895 – 900.
- Avila-Acevedo José Guillermo, 2002. Estudio fitoquímico de *Buddeja perfoliata* y *Buddeja scordioides*. evaluación de la actividad antibacteriana y fotoprotectora de sus principales metabolitos secundarios. Tesis de doctorado. Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas. 225 pp.
- Balbuena Rivarola Edgar Daniel, Rios-Morinigo Viviana María, Flores-Nava Alejandro, 2011. Manual Básico de Sanidad Piscícola. Ministerio de Agricultura y Ganadería-Viceministerio de Ganadería. 51 pp.
- Balta, F., Kayis, S. and Altinok, I., 2008. External protozoan parasites in three trout species in the Eastern Black Sea region of the Turkey: intensity, seasonality, and their treatments. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 28(4), 157-162.
- Basson, L., Van As, J. G. and Paperna, I., 1983. Trichodinid ectoparasites of cichlid and cyprinid fishes in South Africa and Israel. *Systematic Parasitology*, 5: 245-257.
- Basson, L. y J. G. Van As. 1989. Differential diagnosis of the genera in the family Trichodinidae (Ciliophora: Peritrichida) with the description of a new genus ectoparasitic on freshwater fish from southern Africa. *Systematic Parasitology* 13: 153 – 160.

- Basson, L. y Van Ass, J. G., 1993. First record of the European trichodinids (Ciliophora: Peritrichida), *Trichodina acuta* Lom, 1961 and *T. reticulata* Hirschmann and Partsch, 1955 in South Africa. *Acta Protozoologica*, 32: 101-105.
- Basson, L., & Van As, J. G. (2006). Trichodinidae and other ciliophorans (Phylum Ciliophora)
- Benítez-Villa, G. E., 2010. Tratamientos experimentales para controlar la infección por *Cichlodogyrus sclerosus* (Platyhelminthes: Monogenea) en la tilapia *Oreochromis* spp. Tesis Licenciatura. Universidad Veracruzana. Facultad de Biología. 34 pp.
- Bulfon Chiara, Volpatti Donatella y Galeotti Marco. 2013. Current research on the use of plant-derived products in farmed fish. *Aquaculture Research*, 1–39 p.
- Calvo Fresco José. 2016. Estudio del sistema catecolaminérgico en el encéfalo anterior del pez cebra adulto (*Danio rerio*). Tesis de maestría. Universidad da Coruña. 39 pp.
- Castro-Rivera Rigoberto, Hernández-Girón José de la Paz, Aguilar-Benítez Gisela, 2004. Evaluación del crecimiento de alevines de tres especies de Tilapia (*Oreochromis* sp.) en aguas duras, en la región de la Cañada, Oaxaca, México. *Revista Aquatic*, n° 20, pp. 38-43.
- Cedar Lake Ventures, Inc. El clima promedio en Huandacareo México. <https://es.weatherspark.com/y/4457/Clima-promedio-en-Huandacareo-M%C3%A9xico-durante-todo-el-a%C3%B1o>. Última consulta: 19/09/2018.
- Colorni A. Diamant A., 2005. Hyperparasitism of trichodinid ciliates on monogenean gill flukes of two marine fish. *Dis Aquat Org*. Vol 65: 177-180.
- Collymore, C., White, J. R., & Lieggi, C. 2013. *Trichodina xenopodus*, a ciliated protozoan, in a laboratory-maintained *Xenopus laevis*. *Comparative medicine*, 63(4), 310-312.
- Chasquibol Nancy., Lengua Laura, Delmás Inés, Rivera Dolores, Bazán Dora, Aguirre Rosa, Bravo Martha. Alimentos funcionales o fitoquímicos, clasificación e importancia. *Rev. Per. Quím. Ing. Quím*. Vol. 5 N. 0 2. P. 9-20.
- Chú Lee Angel, Cuenca Buele Sylvana, López Bravo Marcelo. 2015. Anatomía y fisiología del sistema nervioso. Universidad Técnica de Machala. Ediciones utmach. Ecuador. 370 pp.
- Clima en Huandacareo. <https://es.weatherspark.com/y/4457/Clima-promedio-en-Huandacareo-M%C3%A9xico-durante-todo-el-a%C3%B1o>. Última consulta: 02/08/2018.
- De Oliveira Daniella M. S. Miguel Marilis D., Kalegari Milena, Miguel Obdúlio G., Moreira Thais E. 2014. Isolamento do verbacosídeo e validação de método analítico para padronização do extrato bruto das partes aéreas de *Buddleja stachyoides* Cham. & Schltdl. (Scrophulariaceae). *Quim. Nova*, Vol. 37, No. 2, S1.
- De los Santos Alejandra. 2010. Efecto tóxico letal y subletal de los fosfatos en crías de *Skiffia multipunctata* (Pellegrin 1901). Tesis de licenciatura. Facultad de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. 56 pp.

- De los Santos Alejandra. 2013. Determinación del efecto causado por nitritos y fosfatos en *Skkifia multipunctata* y *Goodea atripinis* (Pisces:Goodeidae). Tesis de maestría. Facultad de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. 62 pp.
- Díaz-Báez María Consuelo, Bulus Rossini Gustavo Daniel y Pica Granados Yolanda. 2004. Capítulo 5. Métodos estadísticos para el análisis de resultados de toxicidad. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua. Centro Internacional de Investigaciones para el desarrollo. P 101-190.
- Díaz Reyes Lilia Marina, 1993. Evaluación del efecto del extracto acuoso evaporado del tepozán (*Buddleia americana*) sobre *Costia necatrix* en tilapia híbrida (*Oreochromis* sp.). Tesis de licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM. 30 pp.
- Díaz-Sánchez Blanca, Jiménez Estrada Manuel, Auró de Ocampo Ana, 2000. Evaluación del efecto parasiticida de los extractos acuoso y metanólico de *Buddleja cordata* HBK (Tepozán) sobre *Costia necatrix* en tilapia (*Oreochromis* sp). Vet. Méx., 31 (3). 6 pp.
- Dobberstein, R. C. and Palm W., 2000. Trichodinid Ciliates (*Petrichia*; Trichodinidae) from the bay of Kiel, with description of trichodina claviformis sp.n. Folia Parasitologica 47: 81-90.
- Domínguez, X. A. 1973. Métodos de investigación fitoquímica. Ed. Limusa. México. D.F. 281 p.
- Duncan, B. L., 1977. Urceolariid ciliates, including three new species, from cultured Philippine fishes. Trans. Am. Microsc. Soc. 96: 76-81.
- Ehrenberg, C. G., 1838. Die Infusionstierchen als vollkon. Organismen. Leipzig. (no visto).
- El-Sayed, Abdel-Fattah M., 2006. Tilapia culture. Cabi Publishing Oxfordshire U.K. 277 p.
- FAO. 2016. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2016. Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos. Roma. 224 pp.
- FAO.2017.http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Oreochromis_niloticus/es#tcNA0064 Última consulta: 27/07/2017
- FAO. 2018. <http://www.fao.org/fishery/aquaculture/es>. Última consulta: 05/01/2018.
- FDA. 2001 (1998). Food and Drug Administration. "Chapter 22: Aquaculture Drugs." In Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guide. (Second Edition). FDA: Washington. 14 pp.
- FDA. 2002. Benbrook Charles M. Antibiotic Drug Use in U.S. Aquaculture. The Northwest Science and Environmental Policy Center Sandpoint, Idaho. 18 pp.
- FDA. 2017. Food Code. U.S Public Health Service. U.S. Food & Drug. U.S. Departamento of health and human service.
- Fajer-Ávila Emma J., Abdo-de la Parra Isabel, Aguilar-Zarate Gabriela, Contreras-Arce Roberto, Zaldívar-Ramírez Joel, Betancourt-Lozano Miguel, 2003. Toxicity of

- formalin to bullseye puffer fish (*Sphoeroides annulatus* Jenyns, 1843) and its effectiveness to control ectoparasites. *Aquaculture* 223, 41–50.
- Franco-Rojas Hugo Hernán y Pelaez-Rodriguez Marlon, 2007. Cría y producción de pirarucú en cautiverio. Universidad de la Amazonia. 51 pp.
- Froehlich Halley E., Gentryb Rebecca R., Halpern Benjamin S., 2017. Conservation aquaculture: Shifting the narrative and paradigm of aquaculture's role in resource management. *Biological Conservation* 215, 162–168.
- Gaze, W. and Wootten, R., 1998. Ectoparasitic species of the genus *Trichodina* (Ciliophora: Peritrichida) parasitising British freshwater fish. *Folia Parasitologica*, 45: 177-190.
- González Zuarth Cesar Alberto y David Álvarez. 2015. La conducta de los peces como bioindicadores de la presencia de estresores ambientales. 397-420 p.
- González-Mantilla J. F., 2010. Farmacología y anestesia de peces. Mem. Conf. Interna. Med. Aprovech. Fauna Silv. Exót. Conv. 6:1. 13 p.
- Granados, A.I., M. Garduño y C. Muñoz., 2002. Comparación de crecimiento y evaluación económica entre el genotipo de tilapia gris (*Oreochromis niloticus*) y el híbrido rojo (*Oreochromis mossambicus* y *O. niloticus*). <http://www.ecologia.edu.mx/sigolfo/>. Última consulta: 21/03/2018.
- Hellou, J. 2011. Behavioural ecotoxicology, an “early warning” signal to assess environmental quality. *Environmental Science and Pollution Research*. 18, 1 – 11.
- Herwig N. 1979. Handbook of drugs and Chemicals Used in the Treatment of Fish Diseases. Charles C. Thomas, Springfield, Illinois.
- Houghton P.J. 1986. Ethnopharmacology of some *Buddleja* species. *J Ethnopharmacol* 11:293-308.
- Hu, Y., 2011. Description of a new genus *Heterobladetrichodina* n. g. (Ciliata: Trichodinidae) with a new species from *Ictalurus punctatus* in China. *European Journal of Scientific Research* 60 (3): 334 – 341.
- Hu, Y., 2012. Ciliate ectoparasites (Ciliophora: Trichodinidae/ Chilodonellidae) on gills of *Carassius auratus* from the Yangtze River; China, with the description of *Trichodina luzhoues* sp. n. *Parasitology Research* 111: 433 – 439.
- Islas-Ortega Alma Gabriela. 2013. Registro taxonómico de ciliados parasitos de la familia Trichodinidae del norte de México. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM.
- Islas-Ortega Alma Gabriela. 2017. Caracterización morfológica y molecular del ciliado ectoparásito de peces marinos *Trichodina rectuncinata* (Ciliophora: Trichodinidae), en distintas localidades intermareales de México. Tesis de maestría. Posgrado en ciencias biológicas. Facultad de Ciencias, UNAM.
- INIA. 2012. Resultados preliminares sobre el uso de lodos de pisciculturas sobre suelos agropecuarios de origen volcánico de la Patagonia occidental (Aysén). *Boletín INIA* No 223. 83pp. ISSN 0717-4829

- Jiménez Guzmán Fernando, Garza Fernandez Hilda, Segovia Salinas Feliciano, Galaviz Silva Lucio, Iruegas Buentello Francisco, Adame Juan Manuel, Salinas Lopez Narciso, 1988. Parásitos y enfermedades de la tilapia. FONDEPESCA-UANL. No.3, 2ª edición. 1- 109 p.
- Kane, A. S, Salierno, J. D y Brewer, S. K. 2005. Fish models in behavioral toxicology: Automated techniques, updates and perspectives. In: Ostrander, GK, editor. Methods in Aquatic Toxicology (Chapter 32).2, 559 – 590.
- Kazubski, S. L. and Migala, K., 1968. Urceolariidae from breeding carp *Cyprinus carpio* in Zabieniec and remarks on the season variability of trichodinids”. *Acta Protozoologica* 6: 137-160.
- Kasubski, S. L. and Migala, K., 1974. Studies in the distinctness of *Chilodonella cyprini* (Moroff) and *Chilodonella hexasticha* (Kiernik) Chlamyodontidae, Gymnostomatida, ciliate parasites of fishes. *Acta Protozoologica* 13: 9-40.
- Kasubski, S. L., Piecka-Rapacz M., K., 1981. Morphological variability of *Trichodina nigra* Lom (Ciliata: Peritrichida), a parasite of *Lucioperca lucioperca* (L.) from Szczecin Gulf. *Acta Protozool.* 20: 103-107.
- Kesarcodi-watson, a., kaspar, h., lategan, m.j. & gibson, 2008. Probiotics in aquaculture: the need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture*, 274 (1), 1–14. kiemer, m.c.b. & black, k.d.
- Kołodziejaska M., Maszkowska J., Białk-Bielin´ska A., Steudte S., Kumirska J., Stepnowski P., Stolte S., 2013. Aquatic toxicity of four veterinary drugs commonly applied in fish farming and animal husbandry. *Chemosphere* 92, 1253–1259 pp.
- Lagunas-Calvo, O. (2014) Parásitos de peces dulceacuícolas de la porción oaxaqueña de la provincia biogeográfica Sierra Madre del Sur, México. BSc theses, Escuela de Ciencias, Universidad Autónoma “Benito Juárez” de Oaxaca, Oaxaca, 130 pp.
- Liping B., 1994. Herbs used in Chinese fish farms. Vol.3 No.2. <http://www.agriaqua.ait.ac.th/aahri/seaadcp/AAHRI/Newsletter/art18.htm>
- Lom, J., 1958. A contribution to the systematic and morphology of endoparasite trichodinids from amphibians, with a proposal of uniform specific characteristic. *Journal of Protozoology* 5: 251-263.
- Lom, J., 1960. *Trichodina reticulata* Hirschman and Partsch, 1955 from crucian carp, and *T. domerguei* f. *latispina* Dogiel, 1940 from *Diaptomus*. *Acta Societatis Zoologicae Bohemoslovenicae*, 25: 215-228.
- Lom, J., 1961. Ectoparasitic trichodinids from freshwater fish in Czechoslovakia. *Vestern Cesk, Zool.* 25: 215-228.
- Lom, J. and Hoffman, G. L., 1964. Geographic distribution of some species of trichodinids (Ciliata: Peritrichida) parasitic on fishes. *Journal of Parasitology*, 50: 30-50.
- Lom, J. and Dykova, I., 1992. *Protozoan Parasites of fishes*, Amsterdam: Elsevier, 315 pp.

- López Núñez Oscar Francisco, Amaya Amaya Paola Marcela, Anaya Noubleau Axa María Yosmar, Hoyos Arango William Andrés. 2013. Efecto del dimetil sulfóxido en un modelo animal de nefrotoxicidad inducida por gentamicina en conejos. CIMEL. 18(1). Pp 10.
- López, Quintero Ilse Valeria, 2017. “Efecto del extracto de *Buddleja cordata* en el desarrollo embionario de ratas diabéticas”. Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México. 47 pp.
- Madsen H. C. K., Buchmann K. y Møllgaard S., 2000. *Trichodina* sp. (Ciliophora: Peritrichida) in eel *Anguilla anguilla* in recirculation systems in Denmark: host-parasite relations. Dis. Aquat. Org., vol. 42, 149-152.
- Martins Laterca Mauricio y Romero Garcia Nicolás, 1996. Efectos del parasitismo sobre el tejido branquial en peces cultivados: estudio parasitológico e histopatológico. Revta bras. Zool. 13 (2): 489 – 500. 12pp.
- Martins, ML. y Ghiraldelli, L., 2008. *Trichodina magna* Van As and Basson, 1989 (Ciliophora: Peritrichia) from cultured Nile tilapia in the state of Santa Catarina, Brazil. Braz. J. Biol., 68(1): 169-172.
- Martínez Millán Luis y Fontanillas Pérez Juan Carlos. 2016. Terapéutica en Acuicultura. Unidad de Zoología. Dpto. de Fisiología Animal. UCM. 18 pp.
- Mendoza Hernández Pedro Eloy. 2003. El Tepozán. Ciencias. 2 pp.
- Meyer, D.E., 1999. La calidad del agua. Manual de Introducción a la Acuicultura, Zamorano, Honduras.
- Mojica Sastoque Francisco José, Vivancio Aranda Miroslava, Martínez Cordero Francisco Javier, Trujillo Cabezas Raúl. 2010. Tilapia 2020: Prospectivo del Sistema-Producto Nacional de Tilapia en México. Comité Nacional Sistema Producto Tilapia. CONAPESCA, SAGARPA. Mazatlán, Sinaloa.
- Nakao R., Mizukami C., Kawamura Y., Subeki Bawm, S. Yamasaki, M. Maede, Y. Matsuura, H. Nabeta, K. Nonaka, N. Oku, Y. Katakura, K. 2009. Evaluation of efficacy of bruceine A, a natural quassinoid compound extracted from a medicinal plant, *Brucea javanica*, for canine babesiosis. J. Vet. Med. Sci. 71, 33-41.
- Nandlal, S. and Pickering, T., 2004. Tilapia fish farming in Pacific Island countries. Volume 1. Tilapia hatchery operation. Noumea, New Caledonia: Secretariat of the Pacific Community. 32 pp.
- Nicovita, 2007. Manual de crianza de tilapia. Nicovita ALICORP. <http://www.nicovita.com.pe/paginas/esp/tilapia.htm> Fecha de acceso abril de 2018.
- Nicovita, 2008. Analisis de suelos del fondo de los estanques. Global Aquaculture Advocate 11:91-92, Sep/Oct 2008. https://www.nicovita.com.pe/extranet/Boletines/oct_dic_2008.pdf. Fecha de acceso abril de 2018.

- Obando-Bulla Martha J., Gómez-Ramírez Edwin, Tovar-Bohorquez Mario O., Rincón Laura, Caldas-Martínez María L., Hurtado-Giraldo Hernán. 2013. Estudio morfométrico y topológico del cerebro del pez neón cardenal, *Paracheirodon axelrodi* (characiformes: characidae). *Actual Biol* 35 (98): 45-61.
- Olmo José Luis y Fernández-Galiano Dimas, 1997. Observaciones sobre *Trichodina urinicola urinicola* Fulton, 1923: Infraciliación y condrioma. *Rev. Soc. Mex. Hist. Nat.*, 47:25-28.
- Organización para la Alimentación y la Agricultura (FAO), 2003. Resistencia a los antiparasitarios. Estado actual con énfasis en América Latina. Organización para la Alimentación y la Agricultura: 157:35-37.
- Organización Mundial de la Salud (OMS), 2002. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005. Organización Mundial de la Salud Ginebra. WHO/EDM/TRM/2002.1. 65 pp. http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/mednat/estrategia_de_la_oms_sobre_medicina_tradicional.pdf. Última consulta: 12/06/2018
- Özer Ahmet, 2000. The occurrence of three species of *Trichodina* (Ciliophora: Peritrichia) on *Cyprinus carpio* in relation to culture conditions, seasonality and host characteristics. *Acta Protozool.* 39:61-66.
- Paperna, I., 1996. Parasites, infections and diseases of fishes in Africa-An Update. CIFA Technical paper. No. 31 Rome, FAO. pp.53-54.
- García Batalla N., Venegas Hernández E., Molina Arroyo H., Galicia Isasmendi S., Zumaquero Rios J. L., Mangas-Ramírez E. 2012. Modificaciones en la conducta de escape de *Poecilia latipinna* por efecto del zinc. En Pica Granados Yolanda, Ramírez Romero Patricia. Contribuciones al conocimiento de la ecotoxicología y química ambiental en México. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua. México. 54-61 p.
- Gonzalez Zuarth, C y C. Macías García. 2006. Phenotypic differentiation and pre-mating isolation between allopatric populations of *Girardinichthys multiradiatus*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 273: 301–307.
- Post, G., 1983. Textbook of fish health. TFH, INC, LTD, 70-90 pp.
- Prieto Adela. 2004. La prevención y el control de enfermedades en el cultivo de peces. *RedVet.* 22 pp. www.veterinaria.org
- Prieto Adela, Auró de Ocampo Ana, Fernandez Alexis, Perez Monica B., 2005. El empleo de medicina natural en el control de enfermedades de organismos acuáticos y potencialidades de uso en Cuba y México. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 8(1):38-49.
- Rodríguez, M.A., 2002. Identificación de especies ectoparásitas del género *Trichodina* (Ciliophora: Peritrichida) en *Tilapia nilotica* mediante correlación invariante con filtros compuestos. MSc theses, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Mazatlán, Sinaloa, 96 pp.

- Rodríguez-Gutiérrez Martha, Rodríguez-Cázares Dan Gerson, Monroy-García Yazmín, Mata-Sotres José Antonio, 2001. Manual de enfermedades de peces. UAM. Año 4, volumen 3, número 15. 14 pp.
- Rojas De Astudillo Luisa, Jaramillo Jaramillo Carmita, Lemus Barros Mairin. 2015. Métodos analíticos para la determinación de metabolitos secundarios. Coordinación editorial vicerrectorado académico. Universidad técnica de Machala. 108 pp.
- Rubio-Godoy Miguel, 2013. Infecciones parasitarias y bacterianas de la tilapia mojarra. Fundación Produce Veracruz, A.C. Red Nacional de Información e Investigación en Pesca y Acuicultura. ISBN:978.607.7579.34.2.20 pp.
- SAGARPA, 2013. Acuicultura en México. 3er Foro Económico de Pesca y Acuicultura. https://foroeconomico.conapesca.gob.mx/history/historial/2013/ponencias/01_Conf_Magistral_1_Alfredo_Aranda.pdf
- SAGARPA, 2018. México Décimo Sexto Productor Mundial en Pesca y Acuicultura. Delegación Michoacán. Comunicación Social. Boletín No 008. <http://www.sagarpa.mx/Delegaciones/michoacan/boletines/2018/enero/Documents/B0082018.PDF>
- Samaniego Aguilar Sergio Leonardo. 2015. Determinación de la concentración letal media (CL50) producida por sulfato de aluminio (So4)3Al2 en alevines de tilapia roja *Oreochromis sp.* Y en postlarvas de camarón *Litopenaeus vannamei*. Tesis de licenciatura. Universidad Técnica de Machala. Machala, Ecuador. 57 pp.
- SENASICA, 2016. Productos registrados para su uso en la acuicultura. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/246871/Productos_registrados_para_uso_en_la_acuicultura_8_ago_17.pdf
- Silveira-Coffigny R., 2006. Los productos fitofarmacéuticos en la acuicultura. Revista electrónica de veterinaria ISSN 1695-7504. Centro de investigaciones pesqueras, La Habana, Cuba. 10 pp.
- Sigma-Aldrich. Hoja técnica de seguridad del material. 2013. http://dcb.fi-c.unam.mx/CoordinacionesAcademicas/FisicaQuimica/Quimica/lab_quimica/HOJA_S%20DE%20SEGURIDAD/dimetil%20sulfoxico.pdf. Última consulta: 29/12/2018.
- Scott, G. y Sloman, K. 2004. The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. *Aquatic Toxicology*. 68, 369 – 392.
- Schmahl, G., Taraschewski, H., 1987. Treatment of fish parasites. 2. Effects of praziquantel, niclosamide, levamisole-HCl, and metrifonate on monogenean (*Gyrodactylus aculeati*, *Diplozoon paradoxum*). *Parasitol. Res.* 73, 341–351. Seyfried, E.E., Newton, R.J., Rubert, K.F., Pedersen, J.A., McMahon, Disponible en: http://pubs.ext.vt.edu/600/600-205/600-205_pdf.pdf
- Shinn A. P. y Bron J. E., 2012. Considerations for the use of anti-parasitic drugs in aquaculture. University of Stirling, UK. Woodhead Publishing Limited. Capítulo 8, 1-28 pp.

- Smith, S., 2009. Commercial Fish & Shellfish Technology Fact Sheet. Dealing with Trichodina and Trichodina-like species (en línea). Última consulta 15/09/2017.
- Snieszko, S. F. and Axelrod H., 1971. Book 3: The prevention and treatment of diseases of warm water fishers under subtropical conditions, with special emphasis on intensive fish farming. Laboratory for Research of Fish Diseases Nir-David, Israel. pp 40-57.
- Tavares-Dias, M., Martins, M.L., Moraes, F.R., 2001. Fauna parasitaria de peixes oriundos de “pesque-pague” do município de Franca, Sao Paulo, Brasil. Protozoarios. Rev. Bras. Zool. 18, 67–79.
- Valladão, G.M.R., Pádua, S.B., Gallani, S.U., Menezes-Filho, R.N., Dias-Neto, J., Martins, M.L., et al., 2013. Paratrachodina africana (Ciliophora): a pathogenic gill parasite in farmed Nile tilapia. Vet. Parasitol. 197, 705–710.
- Valladão, G.M.R., Gallani, S.U., Pádua, S.B., Martins, M.L., Pilarski, F., 2014. Trichodina heterodontata (Ciliophora) infestation on Prochilodus lineatus larvae: a host-parasite relationship study. Parasitology 141 (05), 662–669.
- Van As, J. G. and Basson, L., 1984. Checklist of freshwater fish parasites from southern Africa. South African Journal of Wildlife Research, 14: 49-61.
- Van As, J. G. and Basson, L., 1986. Trichodinids (Ciliophora: Peritrichida) ectoparasites of cultured cichlids from Taiwan. Bulletin of the Institute of Zoology, Academia Sinica, 25: 135-139.
- Van As, J. G. and Basson, L., 1987. Host Specificity of Trichodinid Ectoparasites of Freshwater Fish. Parasitology Today 3 (3): 88-90.
- Van As, J. G. and Basson, L., 1989. A further contribution to the taxonomy of the Trichodinidae (Ciliophora: Peritrichida) and a review of the taxonomic.
- Venâncio Ikefuti Cynthia, Patrícia Carraschi Silvia, Barbuio Roberto, Da Cruz Claudinei, Benites de Pádua Santiago, Makoto Onaka Eduardo. Tavares Ranzani-Paiva Maria José. 2015. Teflubenzuron as a tool for control of trichodinids in freshwater fish: Acute toxicity and in vivo efficacy. Experimental Parasitology 154, 108–112. 5pp.
- Wang, J.Y. 2004 Preliminary attempt at the speciation of 25- elements in the Chinese medicinal herbs. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi 29,753-759.
- Wicki, G.A., 1997. Estudio de desarrollo y producción de tilapia (*Oreochromis niloticus*). Secretaria de Agricultura, Pesca y Alimentación. Subsecretaria de Pesca, Buenos Aires Argentina. 11 p.
- Wang Gaoxue, Zhou Zhuang, Cheng Chao, Yao Jiayun, Yang Zhengwei, 2008. Osthonol and isopimpinellin from *Fructus cnidii* for the control of *Dactylogyrus intermedius* in *Carassius auratus*. Veterinary Parasitology 158, 144-151 pp.
- Wagil, Marta & Dołzonek, Joanna & Białk-Bielińska, Anna & Steudte, Stephanie & Kumirska, Jolanta & Stepnowski, Piotr & Stolte, Stefan., 2013. Aquatic toxicity of four veterinary drugs commonly applied in fish farming and animal husbandry. Chemosphere. 92. 10.1016/j.chemosphere.2013.04.057.

- Williams, K., 2000. Tilapia culture in cages and open ponds. Langston University Agricultural Research and Extension Programs. <http://www2.luresext.edu/aquaculture/tilapia%20culture.htm>. Última consulta 18 de Julio 2007.
- Wood I. B., Amaral N. K., Bairden K., Duncan J. L., Kassai T., Malone J. B. Jr., Pankavic J. A., Reinecke R. K., Slocombe O., Taylor S. M., Vercruysse J. 1995. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) second edition of guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine, ovine, caprine). *Veterinary Parasitology*; 58:181-213.67. Yarnell E. 2007. Plant chemistry in veterinary
- Woo, P. T. K., 1999. Fish Diseases and Disorders. Vol 1 Protozoan and Metazoan infections. CABI Publishing, UK., pp. 229-262.
- Wright, C.W., O'Neill, M.J., Phillipson, J.D., Warhurst, D.C., 1988. Use of microdilution to assess in vitro antiamebic activities of Brucea javanica fruits, Simarouba amara stem, and a number of quassinoids. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32, 1725–1729.
- Xu De-Hai, Shoemaker Craig A., Zhang Dunhua, 2015. Treatment of Trichodina sp reduced load of Flavobacterium columnare and improved survival of hybrid tilapia. *Aquaculture Reports* 2 126–131.
- Xu Kuidong, Song Weibo y Warren Alan, 1999. Trichodinid ectoparasites (Ciliophora: Peritrichida) from the gills of mariculture molluscs in China, with the descriptions of four new species of Trichodina Ehrenberg, 1838. *Systematic Parasitology* 42: 229–237.
- Xu Kuidong, Song Weibo y Warren Alan, 2002. Taxonomy of trichodinids from the gills of marine fishes in coastal regions of the Yellow Sea, with descriptions of two new species of Trichodina Ehrenberg, 1830 (Protozoa: Ciliophora: Peritrichia). *Systematic Parasitology* 51: 107–120.
- Yemmen C, Ktari MH, Bahri S. 2011. Seasonality and histopathology of Trichodina puytoraci Lom, 1962, a parasite of flathead mullet (*Mugil cephalus*) from Tunisia. *Acta Adriat* 52(1): 15-20.
- Yi Yang-Lei; Cheng Lu, Xue-Gang Hu, Fei Ling. 2012. Antiprotozoal activity of medicinal plants against *Ichthyophthirius multifiliis* in goldfish (*Carassius auratus*). *Parasitol Res* 111:1771–1778.8 pp
- Zhang liqiang, Li Yuan, Wei Chaohul, Deng Ping, Ding Guizhen, Li Qin, Ai Taoshan, 2017. Correlation Analysis between Abundance of Trichodina spp. And Quality Parameters. *Agricultural Science & Technology*, 18(7): 1318-1321.