



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Maestría en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

EVALUACIÓN *in vivo* DEL EFECTO ANTIHELMÍNTICO DEL EXTRACTO ACUOSO DE
Leucaena leucocephala Y POTENCIALIZADORES ORGÁNICOS PARA EL CONTROL DE
Gyrodactylus spp., EN UNA POBLACIÓN SINTÉTICA DE TILAPIA ROJA: Pargo-UNAM

T E S I S

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

MVZ Leticia León Luna

Tutora Principal:

Dra. Elke von Son de Fernex (FMVZ-UNAM)

Comité tutor:

Dr. Germán Alberto Coscelli (FCV-UNR)

Dr. Miguel Ángel Alonso Díaz (FMVZ-UNAM)

Ciudad de México, Septiembre, 2021



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.

RESUMEN

La gyrodactylosis es una enfermedad provocada por el ectoparásito *Gyrodactylus* spp., el cual representa una amenaza significativa para la producción acuícola. Los tratamientos más utilizados para su control (sal y formalina) han provocado la emergencia de resistencia parasitaria, acumulación de residuos tóxicos en el hospedero y, por ende, en los productos destinados para consumo humano, así como contaminación ambiental. Esta situación requiere de la disponibilidad de métodos alternativos de control parasitario que no comprometan la salud del animal, del ser humano, que sean respetuosos con el medio ambiente y cuya aplicación sea sencilla y eficaz. El uso de compuestos naturales se ha planteado como una alternativa para el control de las parasitosis. *Leucaena leucocephala* es una leguminosa tropical de la cual se han aislado compuestos químicos con propiedades antihelmínticas; sin embargo, su principal limitante es el bajo rendimiento en compuestos bioactivos ($\leq 1\%$), por lo cual se ha propuesto el uso de potencializadores orgánicos que permitan eficientizar la utilización de los extractos naturales. En este estudio se evaluó el efecto antihelmíntico *in vivo* del extracto acuoso de *L. leucocephala* contra *Gyrodactylus* spp. y su interacción con potencializadores orgánicos (rutina y quercetina), en una población sintética de Tilapia Roja: Pargo-UNAM infestadas naturalmente con el parásito. Así mismo, se realizó la evaluación histopatológica de los animales experimentales para determinar posibles cambios producidos por la aplicación del tratamiento. Las Concentraciones Efectivas Medias (EC_{50}) fueron determinadas con cinco experimentos independientes usando cinco concentraciones decrecientes: extracto acuoso de *L. leucocephala* (LL) (6, 3, 1.5, 0.75 y 0.37 mg mL^{-1}), quercetina (Q) y rutina (R) (0.3, 0.15, 0.075, 0.018 mg mL^{-1} cada uno) y la interacción (8:2): LL+Q y LL+R. La naturaleza de las interacciones fue clasificada a través del Índice de Concentración Inhibitoria Fraccional (FIC_{index} , por sus siglas en inglés). La quercetina tuvo efecto antihelmíntico potenciador al reducir la EC_{50} de LL. Los peces tratados con el extracto acuoso de LL + Q a $0.5\text{ mg mL}^{-1}/0.125\text{ mg mL}^{-1}$ respectivamente, redujeron las cargas parasitarias hasta un 100% después de 40 minutos de exposición. Estos hallazgos demuestran el potencial de *L. leucocephala* como una alternativa natural para el control de infecciones por *Gyrodactylus* spp. y el efecto antihelmíntico potenciador de la quercetina.

ABSTRACT

Gyrodactylosis is a common disease caused by the ectoparasite *Gyrodactylus* spp., which poses a significant threat to aquaculture production. Current treatments for its control have led to anthelmintic resistances, risk of residues, environmental contamination, and toxicity to fish; alternative methods of parasitic control have been proposed that do not compromise the animal health, the human being, environmentally friendly and easy to implement. The use of natural compounds has been proposed as an alternative to the control of parasitosis. *Leucaena leucocephala* is a legume from which secondary metabolites with anthelmintic properties have been isolated, however, its main limitation is its low performance ($\leq 1\%$), therefore, the use of organic molecules has been proposed to make the use of natural extracts more efficient. The aim of this work was to evaluate the anthelmintic effect of the aqueous extract of *Leucaena leucocephala* and its interaction with organic molecules, as well as to describe the histopathological effect of the treatment in naturally infected synthetic Red Tilapia: Pargo-UNAM. Mean effective concentrations (EC_{50}) were estimated using five independent assays with five decreasing concentrations: aqueous extract of *L. leucocephala* (LL) (6 to 0.37 mg mL^{-1}), quercetin (Q) and rutin (R) (0.3 to 0.018 mg mL^{-1} each one). Interactions were subsequently assessed combining organic molecules with (8:2): LL+Q y LL+R. The nature of their interaction was classified using the fractional inhibitory concentration index (FIC_{index}). Quercetin acted as an enhancer of the anthelmintic-like activity, reducing EC_{50} of LL extract. Treated fish with aqueous extract of *L. leucocephala* + Quercetin at 0.5 mg mL^{-1} and 0.125 mg mL^{-1} respectively, totally reduced infestations after 40 minutes of exposure. These findings demonstrate the potential of *L. leucocephala* as an alternative to control gyrodactylid infestations with a natural compound. Furthermore, quercetin shows anthelmintic-like activity and also enhances the AH-like activity of LL.

Lista de abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATP	Adenosín trifosfato
BRCA	Breast cancer gene
°C	Grados centígrados
CD	Cluster of differentiation
COX	Ciclooxigenasa
cm	Centímetro
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
g	gramos
GL	Grados de libertad
h	Horas
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia
IL	Interleucina
iNOS	Isoforma inducible de óxido nítrico sintasa
kg	Kilogramo
L	Litro
log	Logaritmo
mg	Miligramo
min	Minuto
µl	Microlitro
ml	Mililitro
mm	Milímetros
µmol	Micromol
mM	Milimolar
NFκB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
pb	Pares de bases
PBS	Amortiguador de fosfatos salino
pH	Potencial de hidrógeno
ppm	Partes por millón
spp	Especies
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
v/v	Volumen/volumen

ÍNDICE

Introducción	9
I.Revisión de literatura	10
1.1. Situación de la acuicultura	10
1.1.1. Panorama mundial e impacto de la intensificación en el sector acuícola.....	10
1.2. Tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>).....	12
1.2.1. Biología de la tilapia	12
1.2.2. Ciclo productivo y reproductivo de la tilapia	12
1.2.3. Híbrido Pargo-UNAM	13
1.3. <i>Gyrodactylus</i> spp.	14
1.3.1. Morfología de <i>Gyrodactylus</i> spp.	14
1.3.2. Biología y reproducción de <i>Gyrodactylus</i> spp.	16
1.3.3. Patogenicidad de <i>Gyrodactylus</i> spp.	17
1.3.4. Transmisión de <i>Gyrodactylus</i> spp.	17
1.4. Control de la girodactilosis.....	19
1.4.1. Control tradicional	19
1.4.2. Uso de formaldehído contra gyrodactylosis	20
1.5. Uso de plantas para el control de gyrodactylosis.....	21
1.5.1. Métodos directos de control.....	21
1.5.2. Acción indirecta de los fitoquímicos: inmunestimulación	23
1.6. <i>Leucaena leucocephala</i>	25
1.6.1. Generalidades agronómicas, composición fitoquímica y bioactividad	25
1.7. Uso de quercetina y rutina como potencializadores en el control parasitario	27
1.8. Inmunología en peces	29
1.8.1. Respuesta inmunológica contra <i>Gyrodactylus</i>	29
II.Justificación.....	30
III. Hipótesis.....	30
IV. Objetivos.....	31
4.1. Objetivo General	31
4.2. Objetivos específicos	31
V.Materiales y Métodos	32
5.1. Etapa 1. Evaluación del extracto acuoso de <i>L. leucocephala</i>, su combinación con potencializadores y la determinación del tiempo efectivo de exposición	32
5.1.1. Área de estudio	32
5.1.2. Material vegetal	32
5.1.3. Potencializadores	33
5.1.4. Animales experimentales.....	33

5.1.5. Evaluación del efecto de potencializadores orgánicos sobre el efecto antihelmíntico del extracto acuoso de <i>L. leucocephala</i>	33
5.1.6. Determinación del Tiempo Efectivo de Exposición al Tratamiento (TEE)	34
5.1.7. Análisis estadístico	35
5.2. Etapa 2. Evaluación en campo de la formulación con mayor eficacia en la etapa previa (<i>L. leucocephala</i> 0.5 mg mL⁻¹ / quercetina 0.125 mg mL⁻¹).....	36
5.2.1. Área de estudio	36
5.2.2. Material vegetal y potencializador.....	36
5.2.3. Peces e infestación.....	36
5.2.4. Aplicación de tratamiento y muestreo para histopatología	36
5.2.5 Análisis estadístico	37
5.3. Etapa 3. Evaluación del efecto del tratamiento sobre la salud del hospedero.....	38
5.3.1. Área de estudio	38
5.3.2. Histopatología	38
VI.Resultados	39
6.1. Etapa 1. Evaluación del extracto acuoso de <i>L. leucocephala</i>, su combinación con potencializadores y la determinación del tiempo efectivo de exposición	39
6.1.1. Evaluación de la eficacia antihelmíntica del extracto acuoso de <i>L. leucocephala</i> y potencializadores orgánicos (quercetina y rutina).....	39
6.1.2. Efecto antihelmíntico de la combinación del extracto acuoso de <i>L. leucocephala</i> con potencializadores orgánicos (quercetina y rutina).....	39
6.1.3. Tiempo efectivo de exposición	40
.....	42
.....	42
.....	42
6.2. Etapa 2. Evaluación en campo de la formulación con mayor eficacia en la etapa previa (<i>L. leucocephala</i> 0.5 mg mL⁻¹ / quercetina 0.125 mg mL⁻¹).....	45
6.2.1. Eficacia del tratamiento en campo y comportamiento de reinfestación.....	45
6.3. Etapa 3. Evaluación del efecto del tratamiento sobre la salud del hospedero.....	47
6.3.1. Histopatología	47
VII.Discusión.....	49
VIII.Conclusiones generales	55
IX. Perspectivas	56
Referencias.....	57

Índice de figuras

Figura 1.	Opisthaptor de <i>Gyrodactylus</i> spp.	14
Figura 2.	Hamuli y barras de <i>Gyrodactylus</i> spp.	14
Figura 3.	Variación de opisthaptor entre especies de <i>Gyrodactylus</i> spp.	15
Figura 4.	Morfología de <i>Gyrodactylus</i> spp.	15
Figura 5.	Reproducción de <i>Gyrodactylus</i> spp.	16
Figura 6.	Peceras de manejo experimental.	35
Figura 7.	Eficacia del extracto acuoso de <i>L. leucocephala</i> sobre la mortalidad (%) de <i>Gyrodactylus</i> spp.	41
Figura 8.	Eficacia de la quercetina sobre la mortalidad (%) de <i>Gyrodactylus</i> spp.	41
Figura 9.	Eficacia de la rutina sobre la mortalidad (%) de <i>Gyrodactylus</i> spp.	42
Figura 10.	Eficacia del extracto acuoso de <i>L. leucocephala</i> y su combinación con quercetina sobre la mortalidad (%) de <i>Gyrodactylus</i> spp.	42
Figura 11.	Parásitos vivos adheridos a la aleta de un pez sin tratamiento.	43
Figura 12.	Parásito vivo desprendido de un pez sin tratamiento.	43
Figura 13.	Parásito muerto desprendido de un pez tratado con el extracto acuoso de <i>L. leucocephala</i> + quercetina.	43
Figura 14.	Parásito muerto desprendido de un pez tratado con el extracto acuoso de <i>L. leucocephala</i> + quercetina.	43
Figura 15.	Tiempo efectivo de exposición.	44
Figura 16.	Mortalidad de <i>Gyrodactylus</i> spp. observada con los tres tratamientos (%).	46
Figura 17.	Curva de reinfestación.	46
Figura 18.	Fotomicrografías de los cambios histológicos observados en piel de Pargo-UNAM.	48

Índice de cuadros

Cuadro 1.	Quimioterapéuticos usados en el control de gyrodactylosis.	19
Cuadro 2.	Plantas bioactivas con potencial antihelmíntico en peces.	22
Cuadro 3.	Ejemplos de plantas usadas como inmunoestimulantes en acuicultura.	24
Cuadro 4.	Interpretación del FIC_{index} .	34
Cuadro 5.	Cálculo del FIC_{index} .	40

INTRODUCCIÓN

La acuicultura es un sector pecuario con gran crecimiento a nivel mundial, que ha tenido una tasa de incremento anual promedio del 5.8% del año 2001 al 2016 (FAO, 2018), posicionándola como una alternativa que podría brindar estabilidad en la seguridad alimentaria, la cual, de acuerdo con la FAO (2006) se encuentra en riesgo debido al crecimiento demográfico (Luchini *et al.*, 2008). No obstante, y asociado al rápido crecimiento e intensificación del sector acuícola, la industria ha enfrentado diversos retos sanitarios, como es la emergencia de enfermedades tanto virales como bacterianas y parasitarias; en particular, las enfermedades parasitarias se han caracterizado por provocar importantes mermas productivas (Almeida *et al.*, 2009; Toranzo *et al.*, 2009). *Gyrodactylus* spp. es un helminto monogeneo que se ha clasificado como uno de los parásitos con mayor patogenicidad en la tilapia y otros organismos acuáticos (Rubio-Godoy *et al.*, 2015); esto debido a su rápida reproducción y a su ciclo de vida directo, ya que produce infestaciones intensas en los sistemas de producción intensivos dando lugar a una alta morbilidad y mortalidad en los peces (Buchmann K *et al.*, 2003). Este parásito se localiza en piel, aletas y branquias del hospedero y se alimenta de la descamación celular y del moco epidérmico (Bakke *et al.*, 2007), causando lesiones erosivas y ulcerativas en la piel, las cuales, llegan a generar un desbalance osmótico que suele derivar en nefropatía (Klaus, 2005; Roberts, 2012; Shephard, 1994). También, la pérdida de continuidad del epitelio favorece el ingreso de patógenos oportunistas micóticos y bacterianos, como *Streptococcus iniae*, provocando mortalidades de hasta el 42% (Xu *et al.*, 2007). Actualmente, el control de la girodactilosis representa un reto para los productores, ya que no existen tratamientos eficaces, que no comprometan la salud del animal, del ser humano, que sean respetuosos con el medio ambiente y cuya aplicación sea sencilla y eficaz. El uso de compuestos naturales se ha planteado como una alternativa para el control de las parasitosis (Alonso *et al.*, 2008). *Leucaena leucocephala* es una leguminosa de la cual se han aislado metabolitos secundarios con propiedades antihelmínticas (Hassan *et al.*, 2014), sin embargo, su principal limitante es su bajo rendimiento de compuestos bioactivos (se necesita mucho material vegetal para producir el extracto liofilizado) ($\leq 1\%$), por lo cual se ha propuesto el uso de potencializadores que permitan eficientizar la utilización del extracto. Dentro de estos potencializadores, un estudio reciente reporta actividad sinérgica de quercetina y rutina, reduciendo concentraciones efectivas contra nematodos gastrointestinales de ganado entre un 50 y un 80% (Escareño *et al.*, 2019; von Son-de Fernex *et al.*, 2015).

I. REVISIÓN DE LITERATURA

1.1. Situación de la acuicultura

1.1.1. Panorama mundial e impacto de la intensificación en el sector acuícola

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) define la acuicultura como el cultivo y cría de organismos acuáticos: peces, moluscos, crustáceos y plantas acuáticas. Esta cría implica la intervención en el proceso de crianza para mejorar la producción, como la repoblación de las especies, la alimentación y la protección contra los depredadores. A nivel mundial, la mayor fuente de producción acuícola está asociada a la cría de peces (FAO, 2016). Este sector ha presentado una tasa de crecimiento anual del 5.8% del año 2001 al 2016 (FAO, 2018). En 2016 la producción total de pescado en acuicultura alcanzó los 80 millones de toneladas, con un valor de 231.6 billones de dólares, lo que representa el 46.8% del pescado para consumo humano (FAO, 2018). Con estos datos, se considera el ámbito pecuario con mayor crecimiento, así como una alternativa para alcanzar la seguridad alimentaria (Luchini *et al.*, 2008). La FAO (2006) menciona que, para poder abastecer el consumo de peces, la producción acuícola mundial deberá alcanzar los 93 millones de toneladas para 2030. En la actualidad, la acuicultura aporta el 50% de los productos mundiales de origen animal destinados al consumo humano (FAO, 2017), denotando la importancia tanto económica como social que ha cobrado dicha actividad pecuaria. La disponibilidad y el uso adecuado de los recursos han permitido un crecimiento sectorial tres veces más rápido en comparación con otros sectores de producción pecuaria (FAO, 2009), lo que ha favorecido también a la generación de empleos, (en 2016 se reportaron, 19.3 millones de nuevos empleos en el sector acuícola (FAO, 2018)). Dentro de la acuicultura, el cultivo de tilapia es uno de los sistemas productivos con mayor rentabilidad, ya que es una especie altamente productiva, posee gran capacidad de adaptación al medio, alta eficiencia en la conversión alimenticia, resistencia a enfermedades, elevada productividad, capacidad para sobrevivir a bajas concentraciones de oxígeno y aceptación de una gran variedad de alimentos; tales características permiten cultivarla y manejarla con relativa facilidad (CONAPESCA, 2010). En el año 2016 la FAO registró una producción mundial de tilapia de 5.89 millones de toneladas, con un valor de 543.8 millones de dólares. Este cultivo continuará en crecimiento y se presenta como una alternativa viable y sustentable para abastecer de productos acuícolas a la población mundial (Téllez Castañeda, 2019).

En México, la acuicultura representa uno de los sectores agropecuarios con mayor crecimiento, ganando terreno en el sector agropecuario, con una tasa de crecimiento media anual del 9.3% del año 2000 al año 2017, más que en otros países de Latinoamérica (7.5%) (FAO, 2019). La actividad acuícola se distribuye en todo el territorio nacional. En el año 2013 se registraron 9,230 centros de producción, de los cuales, el 50% se dedican al cultivo de tilapia (CONAPESCA, 2013). En el año 2017, la producción de tilapia fue de 179,900 toneladas, posicionándose así como uno de los productos de la acuicultura de mayor demanda (El Economista, 2019). Esta especie se cultiva en 31 estados de la República Mexicana, siendo los mayores productores: Chiapas, Tabasco, Guerrero, Estado de México y Veracruz (Diario Oficial de la Federación, 2012).

Debido a la intensificación del sector acuícola, se ha presentado una alarmante emergencia de enfermedades, de las cuales, las bacterianas y las parasitarias provocan importantes mermas productivas. Dentro de las enfermedades parasitarias, las infestaciones por ectoparásitos monogéneos son consideradas prioritarias en tratamiento, ya que pueden causar daño mecánico y provocar infecciones secundarias en piel y branquias (Bakke, 2007). Dentro de la clase monogénea, se encuentra el género *Gyrodactylus* spp., el cual ha sido clasificado como uno de los parásitos con mayor patogenicidad que afecta tanto a la tilapia como a otros organismos acuáticos (Rubio-Godoy *et al.*, 2015). Shinn *et al.* (2016) mencionan que la infestación por este parásito llega a tener pérdidas de entre 13.5 y 18.5 millones de dólares anuales. Los peces son susceptibles a numerosas enfermedades, ya que se encuentran expuestos a numerosos microorganismos patógenos que habitan en el ambiente acuático. Dichas enfermedades pueden llevar a pérdidas parciales o totales de la producción. La alta densidad de crías, las malas condiciones del agua, así como una deficiente alimentación, traen consigo cambios fisiológicos en los peces, como estrés e inmunosupresión, lo que incrementa su susceptibilidad a las infecciones (Stratev *et al.*, 2018).

1.2. Tilapia (*Oreochromis niloticus*)

La tilapia es una especie de la familia Cichlidae del orden de los Perciformes, nativa de África y Medio Oriente; se distribuye en aguas dulces templadas tropicales, siendo su temperatura óptima de crecimiento de 31 a 36°C (Morales, 1991).

1.2.1. Biología de la tilapia

Es una especie omnívora de cuerpo comprimido y alargado, posee labios gruesos, mandíbulas anchas y dientes cónicos. Presenta una aleta dorsal en forma de cresta con espinas y radios en su región terminal, aleta caudal redonda y trunca, y una aleta anal. El macho tiene dos orificios en la papila genital: el ano y el orificio urogenital, mientras que la hembra posee tres: el ano, el poro genital y el orificio urinario (Morales, 1991). Esta especie puede alimentarse de una gran variedad de plantas y bacterias presentes en el agua. Puede vivir más de 10 años y alcanzar un peso de 5 kg (FAO, 2010).

1.2.2. Ciclo productivo y reproductivo de la tilapia

En algunos sistemas de producción semiintensivos, la tilapia alcanza su madurez sexual a los 3-4 meses de edad; presenta cinco etapas previas a la madurez: desarrollo embrionario, alevín, cría, juvenil y adulto. El desarrollo embrionario inicia cuando se lleva a cabo la fecundación. La hembra desova y cuando el macho fertiliza los huevos, la hembra los recoge en su boca y comienza la incubación. El número de huevos es proporcional al peso del cuerpo de la hembra, con una relación de 100g / 100 huevos (FAO, 2010).

Debido a que la incubación es bucal, en un sistema de producción, los huevos son colectados directamente de la boca de la hembra y son transferidos a una incubadora, en donde permanecen de 1 a 3 días. Una vez formada la mayor parte del organismo, se lleva a cabo la eclosión e inicia la etapa de alevín, la cual dura de 3 a 5 días. Los alevines pasan a las charolas para absorción del saco vitelino y permanecen de 5-10 días. Una vez que absorben el saco vitelino, se les considera cría y pasan a tanques en donde inician el proceso de reversión sexual. Aquí permanecen de 21 a 28 días durante los cuales se les administra fluoximesterona en el alimento a una dosis de 10 mg Kg de alimento. Cuando las tilapias tienen entre 7 y 10 cm se consideran en etapa juvenil; pasan a estanques o tanques en donde continúan su crecimiento por 2-3 meses, hasta que pesan de 30 a 40 g. De aquí

se transfieren al estanque de engorda en donde permanecen de 5 a 6 meses hasta que alcanzan su peso de venta (200-500 g) (FAO, 2010).

1.2.3. Híbrido Pargo-UNAM

El pez Pargo-UNAM es un trihíbrido de tilapia, conformado por tres grupos genéticos: 1/2 tilapia roja de Florida, ¼ Tilapia rosa del Nilo y ¼ tilapia Rocky Mountain. Esta especie presenta un característico color rojo para atraer al consumidor, además de poseer características productivas muy similares y en algunos casos superiores, a la tilapia nilótica gris (*Oreochromis niloticus*) (Muñoz-Córdoba *et al.*, 2003).

1.3. *Gyrodactylus* spp.

Gyrodactylus spp. es un helminto perteneciente a la clase de los monogeneos (gusano plano) y a la familia Gyrodactylidae, dentro de la cual se han descrito 409 especies (Harris *et al.*, 2004). Son ectoparásitos poliembriónicos vivíparos, de tamaño pequeño (0.5 – 1 mm) y se caracterizan por contener *in utero* a su cría madura. Fue descrito por primera vez por von Nordmann en 1832. Posee un ciclo biológico directo, progenético, con elevada prolificidad y se estima que la mayoría de los teleósteos son hospederos de al menos una especie de *Gyrodactylus* spp. (Fromm, 2014). Se localiza en la piel y branquias del hospedero, y se alimenta de la descamación celular y del moco epidérmico (Bakke *et al.*, 2007).

1.3.1. Morfología de *Gyrodactylus* spp.

Los helmintos *Gyrodactylus* spp. se consideran los monogeneos más pequeños, su cuerpo fusiforme tiene en la región posterior una estructura llamada opisthaptor, la cual se encuentra armada con 16 ganchos marginales y 2 ganchos centrales llamado haptor (Figura 1). Además, cuenta con otras dos estructuras: hamuli y barras, con las cuales se fija a la piel del pez (Figura 2). La forma del opisthaptor varía entre especies y es una herramienta para la diferenciación morfológica de estos parásitos (Rubio-Godoy *et al.*, 2016) (Figura 3). En la región anterior se encuentra el prohaptor, el cual tiene dos procesos cefálicos que contienen glándulas adhesivas que están involucradas en la adhesión y en la biología sensorial (Bakke *et al.*, 2007). Carecen de un celoma verdadero y no tienen órganos respiratorios ni circulatorios especializados mas que en la epidermis. La cavidad digestiva tiene solo una apertura y de esta manera los gusanos pueden digerir únicamente de una manera discontinua (el alimento debe ser digerido y excretado antes de que se puedan tomar nuevos alimentos) (Fromm, 2014) (Figura 4).

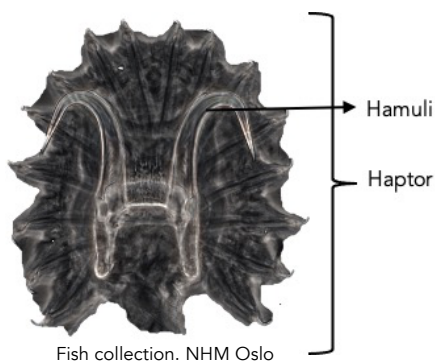


Figura 1. Opisthaptor de *Gyrodactylus* spp.

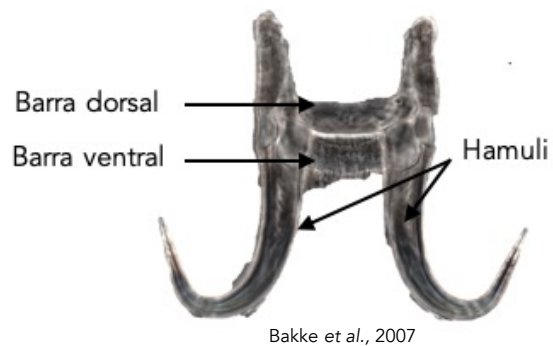
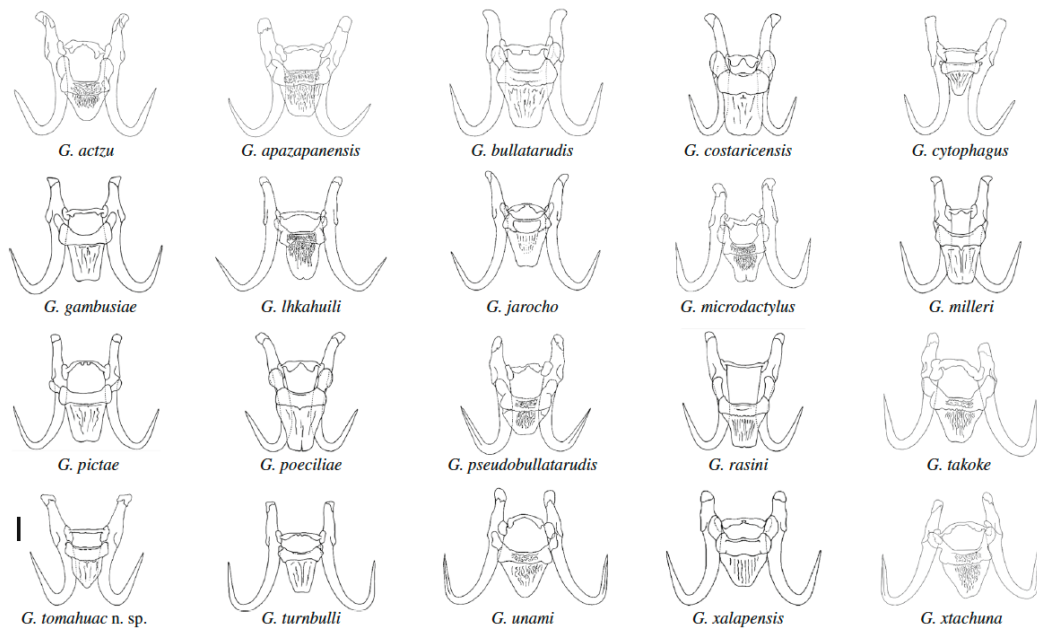
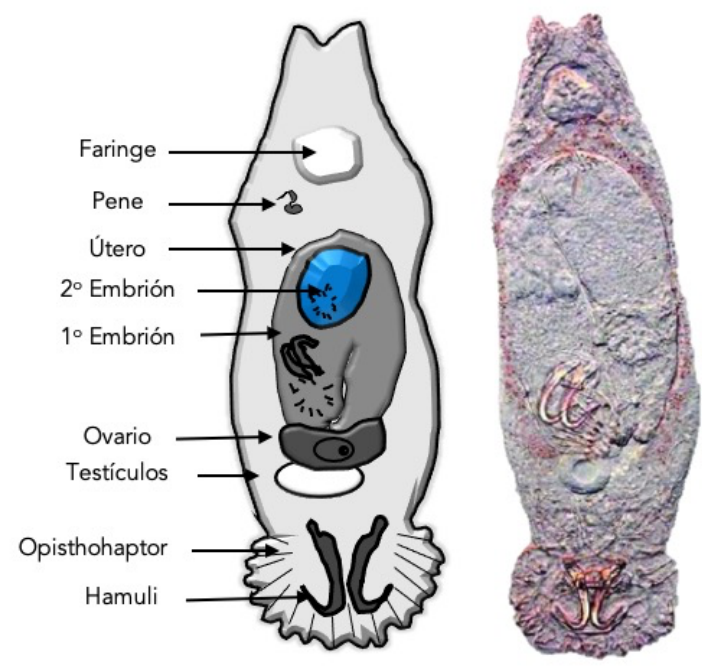


Figura 2. Hamuli y barras de *Gyrodactylus* spp.



Rubio-Godoy et al., 2016

Figura 3. Variación de opisthaptor entre especies de *Gyrodactylus* spp.



Adaptado de: Fromm, 2014

Figura 4. Morfología de *Gyrodactylus* spp.

1.3.2. Biología y reproducción de *Gyrodactylus* spp.

Uno de los aspectos más importantes de la biología de este parásito es su reproducción. El ciclo de vida de *Gyrodactylus* spp., es corto y directo. En condiciones ideales, el periodo de vida del parásito puede ser aproximadamente de 58 días, aunque esto depende de las condiciones de temperatura, salinidad y pH del agua (Jansen *et al.*, 1991); además, pueden reproducirse tanto sexual como asexualmente. La principal característica de estos parásitos es que son vivíparos; el primer embrión contiene en su útero otro embrión, el cual contiene un tercer embrión, alcanzando algunas veces 4 generaciones, una adentro de otra, característica por lo cual es conocido como el parásito “muñeca rusa” (Paladini, 2012). La primera descendencia se desarrolla en el centro de un grupo embrionario inmaduro en el útero de la madre, lo que sugiere que la primera cría nace asexualmente. La segunda cría se desarrolla a partir de los ovocitos por medio de partenogénesis y las crías posteriores se desarrollan sexualmente o por partenogénesis. Estos parásitos se consideran hermafroditas protogínicas, es decir, nacen hembras y después del primer nacimiento desarrollan características externas visibles asociadas con el aparato reproductor masculino. El aparato reproductor femenino es relativamente simple, no poseen vagina y la fertilización cruzada ocurre a través de la impregnación tegumental del esperma. El sistema reproductor masculino se ubica en la porción anterior del cuerpo y consiste en una vesícula seminal anterior conectada al órgano copulador masculino y uno o más testículos posteriores. Este órgano copulador no se encuentra presente en parásitos recién nacidos, se hace evidente después del segundo nacimiento y se vuelve completamente funcional cuando el segundo embrión empieza su desarrollo (Cable *et al.*, 2002; Bakke, 2007) (Figura 5).

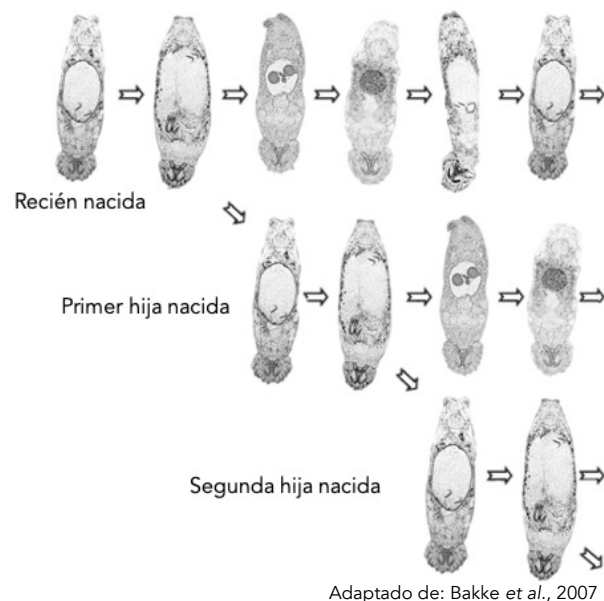


Figura 5. Reproducción de *Gyrodactylus* spp.

1.3.3. Patogenicidad de *Gyrodactylus* spp.

Este parásito se adhiere por medio del haptor y hámuli a las aletas, superficie de la piel, ojos y ocasionalmente branquias; se alimenta de moco y células epiteliales y se mueve libremente sobre el hospedero. Esta adherencia del parásito causa irritación constante sobre la piel del pez, y en respuesta a este estímulo, el hospedero secreta una cantidad excesiva de moco como mecanismo de defensa (Ek-Huchim *et al.*, 2019). Cuando el parásito se fija al hospedero, secreta por medio de los lóbulos cefálicos una sustancia viscosa y pegajosa, la cual ayuda a mantener la adherencia al hospedero; además, cuando el parásito se alimenta, libera una sustancia digestiva que contiene enzimas proteolíticas (proteasas y lisozima) que dañan la piel del pez. Estos productos secretados provocan que las lesiones en la piel del hospedero sean mayores (Grano-Maldonado *et al.*, 2018). Los daños provocados por el parásito pueden ser directos e indirectos.

Los daños directos son debido a las úlceras provocadas en la piel del hospedero y a la erosión de la epidermis, que generan un desbalance osmótico debido a la pérdida de la permeabilidad (Cusack y Cone, 1986) y provocan como consecuencia nefropatías (Roberts 2012; Buchmann K. *et al.*, 2006; Shephard 1994),

Los daños indirectos se deben a que la ulceración en la piel permite la acción de patógenos oportunistas como *Streptococcus iniae*, lo que provoca mortalidades de hasta el 42% (Xu *et al.*, 2007). Si el hospedero solo tiene una pequeña cantidad de parásitos, no representan un problema para el pez, sin embargo, la presencia de abundantes parásitos puede causar la muerte por daño en la función osmorreguladora (Grano-Maldonado *et al.*, 2018).

1.3.4. Transmisión de *Gyrodactylus* spp.

Gyrodactylus spp., es altamente eficiente para localizar y transferirse a un hospedero susceptible; no tiene una etapa específica de transmisión en vida libre, por lo que depende del contacto directo con el hospedero susceptible para poder desarrollarse. Cuando se encuentra con el hospedero adecuado, ocurre una rápida colonización, siendo catastróficas las consecuencias de la infestación en el hospedero y toda la población (Soleng *et al.*, 1999). El parásito tiene 4 posibles rutas de transmisión identificadas por Bakke *et al.* (1992): 1) a través del contacto con otros hospederos vivos, 2) a través de hospedadores muertos, 3) por parásitos que se desprenden y quedan libres en el agua, y 4) por parásitos unidos al sustrato. Es importante tener en cuenta que los parásitos pueden permanecer unas horas adheridos al hospedero una vez muerto éste, por lo que se recomienda retirar los animales muertos para evitar continuar con la propagación de la enfermedad (Olstad *et al.*, 2006). Una vez que el parásito nace, el recién nacido se adhiere directamente al mismo hospedero. Después

de un periodo de tiempo en que el parásito se alimenta o tuvo varias generaciones de hijos, puede quedarse en el mismo hospedero o puede moverse a uno nuevo por medio del contacto directo con otro pez (Paladini, 2012). Cuando un parásito se desprende de un hospedero, es capaz de sobrevivir por un periodo corto de tiempo a bajas temperaturas (60h, 45h y 27h a 3°C, 12°C y 18°C, respectivamente) (Olstad *et al.*, 2006).

1.4. Control de la girodactilosis

1.4.1. Control tradicional

Los compuestos utilizados para dar tratamiento a los peces llegan a ser más tóxicos para el hospedero que para el parásito. Se ha visto que el formaldehído es el único tratamiento 100% efectivo en la eliminación de *Gyrodactylus* spp. en condiciones experimentales, sin embargo, bajo condiciones de gran escala, no elimina completamente los parásitos, ya que solo llega a tener efectividad de hasta el 10% (Schelkle *et al.*, 2009). Debido a sus propiedades antiparasitarias, el formaldehído es comúnmente usado en la acuicultura, a pesar de ser clasificado como carcinógeno en humanos debido a la acumulación en el tejido de los peces. Otros tratamientos como la rotenona se han usado para el control del parásito, pero se ha observado que también causa la muerte del hospedador, aunado a los efectos negativos en el humano (Schelkle *et al.*, 2009). En el caso de quimioterapéuticos tradicionales, se ha probado una amplia variedad de productos (**Cuadro 1**), sin embargo, ninguno ha sido 100% efectivo y pueden llegar a causar daño severo o irreversible al hospedador, como es el caso de la ivermectina (Tojo *et al.*, 1993).

Cuadro 1. Quimioterapéuticos usados en el control de gyrodactylosis.

Compuesto	Eficacia	Fuente
Albendazol	0-95%	Tojo <i>et al.</i> , 1992
Benzimidazol	No efectivo	Tojo <i>et al.</i> , 1993
Ivermectina	96% efectivo	Tojo <i>et al.</i> , 1993
Levamisol	No efectivo	Tojo <i>et al.</i> , 1998
Mebendazol	No efectivo	Tojo <i>et al.</i> , 1998
Niclosamida	No efectivo	Tojo <i>et al.</i> , 1998
Praziquantel	98% efectivo	Santamarina <i>et al.</i> , 1991

Se ha reportado el uso de otros tratamientos, como el percarbonato de sodio, peróxido de sodio, Virkon S® (mezcla de sales orgánicas), aluminio acuoso, organofosforados, entre otros (Schelkle *et al.*, 2009). Sin embargo, a pesar de representar un riesgo para la salud pública, no existen estudios que determinen el impacto que pueden generar directamente sobre la salud del hospedero y sus parámetros productivos, aparte de que no se han probado en animales para consumo humano (Schelkle *et al.*, 2009).

1.4.2. Uso de formaldehído contra gyrodactylosis

El producto más utilizado para su tratamiento, son los baños de formol a una dosis 1:4000 v / v, sin embargo, dicho tratamiento cuenta con importantes limitaciones: 1) no puede ser aplicado en los estanques debido a que mata bacterias y algas benéficas, lo que resulta en un desbalance de organismos benéficos en el agua, y dificulta su uso en producciones a gran escala (Rubio Godoy, 2013); 2) la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer, considera al formaldehído como un compuesto carcinogénico tanto para humanos como animales (IARC, 2004). Estudios recientes reportan que el formaldehído tiende a acumularse en el tejido muscular de los peces, lo cual representa un riesgo para la salud humana (Jaman *et al.*, 2015). El formaldehído promueve la degradación del gen BRCA2, el cual es un gen supresor de tumores involucrado en la reparación del ADN, causando inestabilidad en el genoma (Pontel, 2018). Igualmente, el formol tiene un efecto adverso en los biofiltros, ya que afecta principalmente la oxidación de nitritos; debido a esto, los peces podrían tener un alto riesgo de exposición a amoníaco y nitritos. En cuanto al daño en los peces, el formaldehído puede provocar lesiones severas en branquias, al causar hiperplasia del epitelio del filamento e interferir con la osmoregulación y la actividad respiratoria (Keck *et al.*, 2001).

1.5. Uso de plantas para el control de gyrodactylosis

Las plantas producen una gran diversidad de metabolitos y son una rica fuente de compuestos biológicamente activos que pueden usarse como una alternativa para el control natural de parásitos (Wink, 2012).

1.5.1. Métodos directos de control

El uso de antimicrobianos y antiparasitarios en la acuicultura, ha llevado a la generación de resistencia en microorganismos patógenos. Se han buscado alternativas para reemplazar los fármacos, y las plantas medicinales se han propuesto como una alternativa. Las plantas poseen diversos metabolitos secundarios que han mostrado tener propiedades antivirales, antibacterianas y antiparasitarias. Una de las ventajas del uso de plantas, es la amplia gama de compuestos químicos que actúan sobre el comportamiento y procesos fisiológicos de los parásitos, por lo que las posibilidades de desarrollar resistencias son menos comunes en comparación a los fármacos convencionales, que se basan en un solo principio activo (Adeyemi, 2010).

En el manejo del control parasitario, los diferentes métodos se han clasificado con base en su localización (dentro o fuera del hospedero), manejo de infra y supra poblaciones (Jackson y Miller, 2006) o su mecanismo de acción molecular (directos o indirectos) (Hoste *et al.*, 2012). Se consideran moléculas con acción directa aquellas que actúan directamente sobre estructuras parasitarias y las indirectas aquellas que influyen en el mecanismo regulador mediado por el hospedero, al mejorar la resistencia o la resiliencia (Hoste *et al.*, 2012).

Se han descrito diversos efectos que las plantas producen en peces, tales como promoción del crecimiento, estimulación del apetito, inmunoestimulación, así como propiedades antimicrobianas y antiparasitarias en la acuicultura, esto debido a sus diversos principios activos como alcaloides, terpenoides, taninos, saponinas y flavonoides (Awad *et al.*, 2017; Harikrishnan *et al.*, 2011; Citarasu, 2010). Se sabe que los metabolitos secundarios o compuestos bioactivos que producen algunas plantas, poseen propiedades antihelmínticas (Alonso *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2013), por lo que es de suma importancia identificar las moléculas bioactivas y estandarizar los procedimientos de extracción; de esta manera, se podrá determinar el método de aplicación, la dosis y la duración de los tratamientos. Las plantas pueden ser administradas completas o en partes (hojas, raíces, semillas, frutos), y pueden usarse frescas o como extractos preparados con diferentes solventes (agua, metanol, cloroformo, acetona) (Van Hai, 2015). La actividad biológica y la composición química de las plantas y los extractos puede variar según la parte utilizada y el tipo de extracto que se realizó.

Igualmente, se han observado variaciones estacionales en la producción de metabolitos bioactivos, por lo cual es importante tener en cuenta esta información y así poder determinar las moléculas bioactivas de la planta (Chaves *et al.*, 2013). Conocer la concentración efectiva es crítico para obtener los efectos deseados, ya que las dosis inapropiadas pueden mostrar efectos tóxicos en los peces (Ekanem *et al.*, 2007). Estos extractos pueden ser administrados por inyección (intramuscular e intraperitoneal), vía oral o a través de baños de inmersión (Wu *et al.*, 2011). Los baños de inmersión son usados ampliamente para el tratamiento de ectoparásitos, ya que se requiere poco manejo con los animales. Las plantas medicinales presentan un potencial prometedor para su uso en la acuicultura como un sustituto de la quimioterapia en el tratamiento de brotes de enfermedades. Los análisis etnobotánicos han sido muy útiles en el estudio de especies con potencial actividad frente a parásitos en la acuicultura. Sin embargo, todavía hay poco conocimiento sobre el modo de acción de la mayoría de las plantas bioactivas, así como la forma más adecuada para una administración efectiva y segura (Düğenci *et al.*, 2003). Se ha investigado el efecto antihelmíntico de plantas contra ectoparásitos, como *Gyrodactylus* spp., y el método preferido de administración son los baños de inmersión, ya que se ha visto que es la única opción para que los ectoparásitos se desprendan (Stratev *et al.*, 2018). En el **cuadro 2** se muestran algunos extractos de plantas que se han usado como alternativa de control para la infestación por *Gyrodactylus* spp. Si bien se han hecho pruebas con numerosos extractos de plantas contra *Gyrodactylus*, pocos han mostrado una eficacia del 100% y no todos los extractos son acuosos, lo que dificulta su solubilidad en el medio de administración.

Cuadro 2. Plantas bioactivas con potencial antihelmíntico en peces.

Planta	Extracción	Parásito	Eficacia	Referencia
<i>Artemisa annua</i>	Etanólico	<i>G. elegans</i>	85%	Ekanem <i>et al.</i> , 2010
<i>Santalum album</i>	Cloroformo	<i>G. elegans</i>	100%	Tu <i>et al.</i> , 2013
<i>Allium sativum</i>	Acuoso	<i>G. turnulli</i> <i>Dactylogyrus</i> spp.	Knockout	Fridman <i>et al.</i> , 2014 Schelkle <i>et al.</i> , 2013
<i>Zingiber officinale</i>	Etanólico	<i>G. turnbulli</i>	90%	Levy <i>et al.</i> , 2015

1.5.2. Acción indirecta de los fitoquímicos: inmunoestimulación

Un inmunoestimulante es un compuesto que modula el sistema inmunitario al aumentar la resistencia del hospedero contra enfermedades que, en la mayoría de los casos, son causadas por patógenos (Lazado *et al.*, 2015). Los inmunoestimulantes son sustancias naturales que estimulan los mecanismos de defensa del sistema inmunitario (tanto innatos como adaptativos) y, por lo tanto, hacen que el animal sea capaz de hacer frente a las enfermedades.

Las características biológicas de las plantas medicinales aumentan el interés en su uso como inmunoestimulantes en la acuicultura (Wang *et al.*, 2016). Randelli *et al.* (2008) han informado sobre la activación del sistema inmune y la mejora en su capacidad de resistencia a enfermedades en diversas especies de peces después de la administración de plantas medicinales o extractos, tales como la actividad fagocítica, estallido respiratorio (COX-2), óxido nítrico, contenido de mieloperoxidasa, actividad del complemento, actividad de lisozima, proteína total (globulina y albúmina), reconocimiento y memoria celular (CD3) y actividad antiproteasa. Los componentes activos de las plantas pueden bloquear o inhibir el crecimiento del patógeno en las células hospederas, reduciendo así la replicación del patógeno y estimulando la defensa inmune innata (Vallejos-Vidal *et al.*, 2016). Entre los inmunoestimulantes que se utilizan en la acuicultura, las plantas medicinales han sido uno de los más usados, así como estudiados y avalados científicamente (Chakraborty y Hancz, 2011). En el **Cuadro 3** se muestran algunos ejemplos de plantas usadas como inmunoestimulantes en acuicultura, con sus respectivos resultados.

Cuadro 3. Ejemplos de plantas usadas como inmunoestimulantes en acuicultura.

Planta	Especie en donde se probó	Resultados	Referencia
<i>Astragalus radix</i>	<i>O. niloticus</i>	↑ Fagocitosis leucocítica ↑ Actividad de lisozima	Modificado de Chakraborty y Hancz, 2011.
<i>Astragalus membranaceus</i>	<i>O. niloticus</i>	↑ Fagocitosis leucocítica ↑ Estallido respiratorio	
<i>Ganoderma lucidum</i>	<i>C. carpio</i>	↑ Fagocitosis leucocítica ↑ Actividad de lisozima ↑ Estallido respiratorio	
<i>Achyranthes aspera</i>	<i>L. rohita</i> y <i>C. catla</i>	↑ Especificidad de antígeno-anticuerpo en suero ↑ Globulina en suero	
<i>Allium sativum</i>	<i>L. rohita</i>	↑ Producción de anión superóxido ↑ Actividad de lisozima ↑ Actividad bactericida	
<i>Withania somnifera</i>	<i>L. rohita</i>	↑ Actividad fagocítica ↑ Nivel total de inmunoglobulinas ↑ Actividad de lisozima	
<i>Eleutherococcus senticosus</i>	<i>P. olivaceus</i>	↑ Inmunidad no específica	

1.6. *Leucaena leucocephala*

1.6.1. Generalidades agronómicas, composición fitoquímica y bioactividad

Leucaena leucocephala es una leguminosa mimosoide que pertenece a la familia Fabaceae (Leguminosae), se cultiva para diversos usos, como abono verde, forraje para ganado y para la conservación del suelo. Zayed *et al.* (2016) hacen referencia a esta leguminosa como “árbol milagroso” debido a las características que se han descrito: árbol forrajero de larga vida, altamente nutritivo, se utiliza como leña, madera, alimento para consumo humano, abono verde, sombra y control de la erosión, entre otros. Se estima que cubre 2-5 millones de hectáreas en todo el mundo. Estudios agronómicos y fitoquímicos reportan que en una planta hay gran cantidad de metabolitos secundarios, tanto en la semilla como en el tallo, las hojas y las vainas. Cabe señalar, que la cantidad de metabolitos secundarios que se expresan en las plantas está relacionada con diversos factores. Herrera *et al.* (2017) mencionan que el clima es uno de los principales factores que determinan la cantidad de metabolitos secundarios presentes en *L. leucocephala*; dichos autores reportan que el incremento o la disminución de la temperatura favorece la síntesis de los metabolitos secundarios, la cual está relacionada con la labor que éstos desempeñan como protectores de las plantas. Por tanto, la temperatura es un elemento que debe ser tomado en cuenta al momento de realizar un análisis fitoquímico o estudios de bioactividad con extractos de plantas. Se ha reportado que la semilla de *L. leucocephala* tiene un alto valor nutricional debido al alto contenido de proteínas (24.5–46%); contiene arginina, alanina, cisteína, ácido glutámico, isoleucina, leucina, lisina y metionina como sus aminoácidos esenciales. Las vainas contienen mimosina, un aminoácido no proteico que tiene actividad insecticida y pesticida (Masafu 2006).

Deivasigamani (2018) y Hassan *et al.* (2014) a través de la elaboración de diversos métodos de extracción (éter petróleo, etanólico y acuoso) determinaron la composición fitoquímica de *L. leucocephala*. Los autores reportaron la presencia de flavonoides, saponinas, fenoles, taninos, glicósidos cardiacos y terpenoides, terpenos, cumarinas y esteroides. von Son-de Fernex *et al.*, (2015) demostraron que el extracto acuoso inhibía la eclosión del huevo y el desenvaine larvario de *Cooperia* spp., y determinaron mediante fraccionamiento biodirigido de un extracto acuoso de hojas de *L. leucocephala*, la presencia de una fracción bioactiva con actividad antihelmíntica compuesta por tres fitoquímicos: quercetina (82.21%), ácido caféico (13.42%) y escopoletina (4.37%). Dichos autores reportaron que la modificación en las concentraciones de los dos compuestos principales (quercetina y ácido caféico) tenía un impacto directo sobre la bioactividad y propusieron a la quercetina como un agente potencializador de moléculas orgánicas con actividad antiparasitaria.

Por otro lado, Verma *et al.* (2014, 2013) demostraron que *Leucaena leucocephala* tiene propiedades inmunoestimulantes en peces, al incrementar la producción de radicales de oxígeno, lisozima, óxido nítrico, índice fagocítico y porcentaje de fagocitosis, los cuales son importantes mecanismos de defensa de los organismos contra bacterias y otros patógenos. Así mismo, observaron que incrementa el número de leucocitos y linfocitos, los cuales indican un estímulo en la respuesta inmune inespecífica. Todos estos indicadores nos demuestran que *Leucaena leucocephala* tiene propiedades inmunoestimulantes.

1.7. Uso de quercetina y rutina como potencializadores en el control parasitario

Ciertos compuestos que actúan en sinergia en fórmulas farmacológicas pueden adaptarse a “terapia de combinación”, lo que permite el uso de medicamentos a bajas concentraciones, pero con una eficiencia incrementada (Sun *et al.*, 2016). von Son-de Fernex *et al.* (2015) y Escareño *et al.* (2019) encontraron que la mezcla de quercetina y ácido caféico aislados del extracto acuoso de *L. leucocephala*, tenía efecto sinérgico, pues mejoró la actividad antihelmíntica contra la eclosión de huevos de *Cooperia* spp. No obstante, debido al bajo rendimiento que tienen los extractos de plantas ($\leq 1\%$), dichos autores proponen el uso de potencializadores que permitan eficientizar la utilización de extractos de plantas o moléculas orgánicas. Escareño *et al.* (2019) evalúan el efecto sinérgico, potencializador u antagónico obtenido tras la adición de quercetina y rutina a moléculas orgánicas reportadas previamente con actividad antihelmíntica (von Son-de Fernex *et al.*, 2015, 2016). Este estudio reporta que la incorporación de dichos compuestos puede mejorar el efecto bioactivo, al reducir las concentraciones efectivas máximas entre un 50 y 80%. La quercetina y rutina son compuestos fenólicos que tienen una estructura similar, con dos grupos fenilo unidos con un puente de tres carbonos generalmente ciclado con oxígeno. Se diferencian según el grado de insaturación y el grado de oxidación del segmento de tres carbonos. Además, varias moléculas de azúcar pueden unirse a la estructura de los flavonoides en sus grupos hidroxilo, lo que hace la estructura de estas moléculas más compleja. Suelen existir en forma glicosilada, y esta glicosilación las hace más solubles en agua. Tienen distintas propiedades, como solubilidad y polaridad, lo que les permite tener diferentes interacciones con otras moléculas (Jakobek *et al.*, 2015).

Materska (2008) menciona que la quercetina tiene propiedades antivirales, antibacterianas, anticarcinogénicas y antiinflamatorias. Así mismo, diversos estudios mencionan que el uso de quercetina inhibe el desarrollo de plagas e incrementa su mortalidad en cultivos de tabaco, pinos, vid, entre otros, lo que se ha propuesto como un potente antihelmíntico (Mierziak *et al.*, 2014). Por otro lado, Borges *et al.* (2020), evaluaron el uso de quercetina combinada con ivermectina (IVM) en larvas y adultos de *H. contortus* con distintos grados de resistencia a IVM y observaron que cuando se administraba esta combinación, mejoró el efecto antihelmíntico de la IVM contra *H. contortus*; este efecto puede atribuirse a la modulación de los mecanismos de resistencia dados por la quercetina, principalmente P-glicoproteína (P-gp).

La rutina es un flavonoide que se encuentra en diversas plantas, la cual se ha demostrado que tiene numerosas actividades farmacológicas, tales como antioxidante, crioprotectora, vasoprotectora, anticarcinógena, neuroprotectora, entre otras (Ganeshpurkar *et al.*, 2017).

En un estudio realizado por Dubey *et al.* (2013) se observó que la rutina es un potente antimicrobiano, antihelmíntico, larvicida y tiene potencial citotóxico, ya que causa parálisis y muerte de gusanos. Escareño *et al.* (2009) evaluaron la actividad antihelmíntica de varios polifenoles, entre ellos la rutina, así como sus interacciones, y demostraron actividad sinérgica al combinar la rutina con otros compuestos, ya que esto disminuyó la CE₅₀.

1.8. Inmunología en peces

1.8.1. Respuesta inmunológica contra *Gyrodactylus*

Los monogeneos son ectoparásitos que se encuentran en branquias, orificios nasales, ojos y el tegumento de los peces. La presencia de estos patógenos puede causar debilidad crónica, crecimiento reducido y, en algunos casos, mortalidad de peces como consecuencia del daño al tejido epitelial, que actúa como una puerta de entrada para infecciones secundarias causadas por virus, hongos y bacterias. Con frecuencia se observan alteraciones hematológicas como neutrofilia y linfocitosis. Además se ha descrito el incremento de la concentración de hemoglobina y el número de eritrocitos, la cual se ha relacionado con la reducción de la superficie respiratoria en branquias. Se ha reportado hiperplasia y severo daño en el epitelio lamelar, con inflamación moderada y presencia de macrófagos y linfocitos en las regiones de anclaje del parásito (Esteban, 2012). La respuesta celular a la infestación puede variar, dependiendo del tipo de lesión causada por parásitos y su profundidad de penetración. Uno de los principales mecanismos de defensa que presentan los peces contra *Gyrodactylus*, es el sistema del complemento ya que se ha visto que el parásito es sensible a éste. Se ha observado que C3a se une al parásito y esto provoca un desequilibrio osmótico cuando la integridad del tegumento es interrumpida por complejos de ataque de membrana (Bakke *et al.*, 2007). Matejusová *et al.* (2006) observaron también que en la respuesta temprana a *Gyrodactylus*, incrementa la transcripción de citocinas proinflamatorias, como TNF- α , TGF- β , iNOS y COX-2. La elevación de las dos últimas es responsable de la liberación de óxido nítrico y prostaglandinas, respectivamente. Se piensa que el daño que provocan estas citocinas en el parásito se da al momento de la ingestión de las células del hospedero, por lo que la acción de estas moléculas puede ser dañina dentro del intestino del parásito. Entre otras citocinas efectoras de la respuesta contra *Gyrodactylus*, se encuentra IL-1 β , la cual activa la secreción de moco, por lo que se ha visto que los peces resistentes al parásito moderan la capacidad proliferativa de las células mucosas, lo que hace que el microambiente sea menos adecuado para el parásito. Por otro lado, los peces susceptibles no pueden limitar su respuesta a las citocinas proinflamatorias, lo que lleva a una hipersecreción de moco y a un ambiente del hospedero más adecuado para el parásito (Lindenstrøm *et al.*, 2003).

II. JUSTIFICACIÓN

Uno de los principales problemas que causan pérdidas económicas en la acuicultura, son las infestaciones por el monogeneo *Gyrodactylus* spp. Debido a las alteraciones en la salud de las peces provocadas por el parásito, las pérdidas asociadas a mortalidades y tratamiento, así como la resistencia que los parásitos han generado, se busca evaluar un método alternativo para el control de esta enfermedad, que no sea dañino para el hospedero, el ser humano y el medio ambiente. La creciente emergencia de parásitos resistentes a los diferentes principios activos ha favorecido y motivado estudiar nuevas alternativas para el control de los parásitos en peces, entre ellas, el uso de plantas; por lo cual es de suma importancia la evaluación de los compuestos bioactivos. Es por ello que se considera de gran importancia la evaluación del extracto acuoso de *Leucaena leucocephala* y su interacción con moléculas orgánicas para el control de *Gyrodactylus* spp. en tilapias naturalmente infestadas, así como la evaluación de los efectos del tratamiento sobre el hospedero por medio de histopatología.

III. HIPÓTESIS

El uso de *Leucaena leucocephala* tendrá un efecto antihelmíntico contra *Gyrodactylus* spp. El uso de Quercetina y Rutina como potencializadores disminuirán la CE₉₉ del extracto acuoso de *L. leucocephala* contra *Gyrodactylus* spp. El uso del tratamiento en campo reducirá las poblaciones de *Gyrodactylus* spp. y no afectará la salud del hospedero

IV. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Evaluar el efecto antihelmíntico *in vivo* del extracto acuoso de *Leucaena leucocephala* y potencializadores orgánicos: Quercetina y Rutina para el control de *Gyrodactylus* spp., en una población de la tilapia Pargo-UNAM, así como su efecto sobre la salud del hospedero y los parámetros productivos.

4.2. Objetivos específicos

Laboratorio

- a) Evaluar el efecto del extracto acuoso de *Leucaena leucocephala* sobre la mortalidad de *Gyrodactylus* spp. en tilapias infestadas naturalmente a través de un experimento *in vitro* en un sistema cerrado de circulación del agua.
- b) Evaluar el efecto de Quercetina y Rutina como potencializadores del extracto acuoso de *L. leucocephala* sobre la mortalidad de *Gyrodactylus* spp. en tilapias infestadas naturalmente a través de un experimento *in vitro* en un sistema cerrado de circulación del agua.
- c) Determinar el tiempo efectivo de exposición de los tratamientos en tilapias infestadas naturalmente con *Gyrodactylus* spp. a través de un experimento *in vitro* en un sistema cerrado de circulación del agua.

Campo

- a) Evaluar el tratamiento que haya mostrado mejor eficacia en la etapa de laboratorio a través de un experimento *in vivo* en un sistema abierto de circulación del agua.
- b) Evaluar la reinfestación de los peces infestados con el monogoneo a través de un experimento *in vivo* en un sistema abierto de circulación del agua.
- c) Evaluar la posible toxicidad del tratamiento mediante técnicas histopatológicas.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

El proyecto fue dividido en tres etapas, las cuales consistieron en:

Etapa 1. Evaluación del extracto acuoso de *Leucaena leucocephala*, su combinación con potencializadores y la determinación del tiempo efectivo de exposición.

Etapa 2. Evaluación en campo de la formulación que mostró mayor eficacia en la etapa previa.

Etapa 3. Evaluación del efecto del tratamiento sobre la salud del hospedero.

5.1. Etapa 1. Evaluación del extracto acuoso de *L. leucocephala*, su combinación con potencializadores y la determinación del tiempo efectivo de exposición

5.1.1. Área de estudio

El trabajo experimental se llevó a cabo en el laboratorio de Sanidad Animal del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Ganadería Tropical de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México (CEIEGT-FMVZ-UNAM), localizado en el Km 5.5 Carretera Federal Tlapacoyan-Martínez de la Torre, Veracruz, México.

5.1.2. Material vegetal

El material vegetal; *Leucaena leucocephala*, fue cosechado en agosto del 2019, en el módulo de producción “El Cenzontle”, localizado en el CEIEGT-FMVZ-UNAM. Las hojas frescas fueron secadas en una estufa a 60°C por 72 horas y posteriormente fueron molidas hasta obtener un polvo fino. El material seco se colocó en un vaso de precipitados con agua desionizada calentada previamente a 60°C y se dejó en agitación magnética por 2 horas, seguido de la separación de la materia sólida usando papel filtro (Whatman® CFP4, 0-25µm de diámetro). Finalmente, la porción líquida fue congelada con nitrógeno líquido y fue liofilizada hasta obtener material en polvo. Todos los extractos liofilizados fueron colocados en viales de vidrio y sellados herméticamente hasta su utilización.

5.1.3. Potencializadores

Los compuestos polifenólicos utilizados como potencializadores fueron la Quercetina (C₁₅H₁₀O₇ • 2H₂O) y la Rutina (C₂₇H₃₀O₁₆ • xH₂O), con números del registro Chemical Abstracts Service (CAS): 117-39-5 y 153-18-4, respectivamente, y obtenidos a través de los laboratorios Sigma ® (St. Louis, MO).

5.1.4. Animales experimentales

Los peces experimentales fueron proporcionados por el Módulo de Enseñanza e Investigación Acuícola (MEIA) del CEIEGT. Se utilizaron 315 tilapias (Pargo-UNAM: ½ tilapia roja de Florida, ¼ tilapia rosa del Nilo y ¼ tilapia Rocky Mountain) (2-3 cm de largo, 0.5 g) en etapa de crianza e infestadas naturalmente con el parásito *Gyrodactylus* spp. Los peces permanecieron en tinas de plástico de 1000 litros, los cuales tenían una temperatura y pH promedio de 27.5°C y 7.5 respectivamente durante el periodo de reversión sexual (28 días); se adicionó fluoximesterona junto con el alimento (10 mg kg de alimento) (Phelps *et al.*, 1992).

Todos los procedimientos relacionados con animales se llevaron a cabo en conformidad con las regulaciones del Subcomité Institucional Para el Cuidado y Uso de los Animales Experimentales [SICUAE-UNAM] (Protocolo No: SICUAE.MC-2019/1-3).

5.1.5. Evaluación del efecto de potencializadores orgánicos sobre el efecto antihelmíntico del extracto acuoso de *L. leucocephala*

Para la evaluación del material vegetal y los potencializadores, se realizaron 5 experimentos independientes: *Leucaena leucocephala* (LL) 100%, Quercetina (Q) 100%, Rutina (R) 100%, LL+Q, LL+R; en cada experimento se utilizaron 5 concentraciones decrecientes: 6, 3, 1.5, 0.75 y 0.37 mg mL⁻¹ para el extracto acuoso de *L. leucocephala* y 0.3, 0.15, 0.075, 0.0375, 0.018 mg mL⁻¹ para quercetina y rutina respectivamente. En el caso de las combinaciones (LL+Q, LL+R), las concentraciones fueron las siguientes: 6+0.3, 3+0.15, 1.5+0.075, 0.75+0.037 y 0.37+0.018 mg mL⁻¹ respectivamente. El control positivo fue tratado con formaldehído 1:4000 (v/v) y el control negativo con agua purificada. Cada tratamiento contó con tres repeticiones. Se contó con un total de 21 peceras de manejo experimental (70 mL), incluyendo tratamientos y sus repeticiones (**Figura 6**). Los peces (~60 *Gyrodactylus* spp. / animal) fueron asignados aleatoriamente a las peceras experimentales (n=3) y posteriormente las peceras experimentales fueron asignadas aleatoriamente a los tratamientos. Todos los grupos y sus

repeticiones fueron expuestos al tratamiento durante un periodo de 60 min. Posteriormente, con la finalidad de detener el efecto del tratamiento, el agua de cada una de las peceras experimentales fue recolectada en frascos de vidrio identificados para cada tratamiento y repetición; e inmediatamente después fue sustituida por agua purificada en las respectivas peceras experimentales. Pre y post-tratamiento, los peces fueron examinados para la cuantificación parasitaria con un microscopio de disección 4x (Velab microscope). El agua recolectada se observó para corroborar que los parásitos no se movían. Finalmente, para determinar el tipo de interacción entre los potencializadores orgánicos y el extracto, se utilizó el Índice de Concentración Inhibitoria Fraccional (FIC_{index}), para lo cual, la EC_{50} obtenida por cada compuesto polifenólico se transformó en concentración inhibitoria fraccionada (FIC) según lo reportado por Sanhueza *et al.* (2017). Las interacciones entre las moléculas y el extracto acuoso se determinaron con base en el FIC_{index} (Escareño *et al.*, 2019). Para determinar si las interacciones fueron sinérgicas, aditivas, antagonistas o sin interacción, se realizó la siguiente fórmula: $FIC_{index} = FIC_A + FIC_B$.

En el **cuadro 4** se muestra la interpretación de acuerdo a Mor *et al.* (2015):

Cuadro 4. Interpretación de FIC_{index} (Mor *et al.*, 2015).

Interacción	FIC_{index}
Altamente sinérgico	$\Sigma FIC < 0.5$
Sinérgico	$\Sigma FIC < 1$
Aditivo	$\Sigma FIC = 1$
Sin efecto	$1 < \Sigma FIC < 2$
Antagónico	$\Sigma FIC > 2$

5.1.6. Determinación del Tiempo Efectivo de Exposición al Tratamiento (TEE)

Los peces utilizados fueron seleccionados con base en lo descrito en la secc. 5.1.5. Cada tratamiento (n=3) contó con tres repeticiones. Los peces fueron expuestos a la concentración efectiva 99 obtenida del extracto acuoso + potencializador (0.5 mg mL⁻¹/0.125 mg mL⁻¹ respectivamente). El efecto del tratamiento fue evaluado cada 10 minutos durante 60 min. Se utilizó un control positivo (formaldehído 1:4000) y control negativo (agua purificada). Los peces (~50 *Gyrodactylus* spp. / animal) fueron asignados aleatoriamente a las peceras experimentales (n=3) y posteriormente las peceras experimentales (descritas en la secc. 5.5.1) fueron asignadas aleatoriamente a los tiempos de tratamientos. Cada 10 minutos y con la finalidad de detener el tiempo de exposición al tratamiento,

el agua de cada una de las peceras experimentales correspondientes al tiempo de evaluación (10, 20, 30, 40, 50 y 60 min) fue recolectada en frascos de vidrio identificados para cada tiempo de exposición y sus respectivas repeticiones; inmediatamente después se adicionó agua purificada en las respectivas peceras experimentales. Pre y post-tratamiento, los peces fueron examinados para la cuantificación parasitaria con un microscopio de disección a una magnitud de 4x (Velab microscope). El TEE se seleccionó corriendo una regresión logística con una pendiente variable de cuatro parámetros log (inhibidor) vs respuesta – pendiente variable (4 parámetros).

5.1.7. Análisis estadístico

La eficacia antihelmíntica del extracto y su interacción con los potencializadores se calculó con un modelo de regresión lineal para evaluar el comportamiento dosis-dependiente de cada molécula y el extracto acuoso, utilizando el programa informático GraphPad Prism® V. 6.1. Para ajustar la dosis-respuesta mediante la regresión no lineal, se utilizó una ecuación logística de cuatro parámetros con una pendiente variable utilizando el mismo programa. Todos los análisis se realizaron después de transformar los datos en logaritmos ($X=\log X$) y limitar los valores inferior y superior a 0 y 100 respectivamente. Finalmente se calcularon los intervalos de confianza del 95%, la concentración efectiva media (EC_{50}), y los valores de R^2 .



Figura 6. Peceras de manejo experimental.

5.2. Etapa 2. Evaluación en campo de la formulación con mayor eficacia en la etapa previa (*L. leucocephala* 0.5 mg mL⁻¹ / quercetina 0.125 mg mL⁻¹)

5.2.1. Área de estudio

El trabajo experimental se llevó a cabo en el área mencionada en la sección 5.1.1. Esta fase tuvo una duración de 15 días, en los cuales se buscó evaluar la eficacia del tratamiento *in vivo* y la re-infestación parasitaria en los hospederos.

5.2.2. Material vegetal y potencializador

El material vegetal y el potencializador utilizados fueron los mismos utilizados en la sección 5.1.2 y 5.1.3 respectivamente.

5.2.3. Peces e infestación

Se utilizó un total de 500 tilapias de aproximadamente 3 cm de longitud y 0.5 g de peso, en etapa de crianza e infestadas naturalmente con *Gyrodactylus* sp. Como se describió en la etapa 1 (ver secc. 5.1.4), los peces fueron expuestos al proceso de reversión sexual y posteriormente fueron seleccionados con base en el grado de infestación parasitaria (50-60 parásitos / pez). La evaluación se realizó mediante microscopía directa 4x (Velab Microscope ®). Una vez confirmada la infestación, los peces fueron colocados aleatoriamente en tinas de plástico (n=50) con 10 litros de agua proveniente de los estanques generales de crianza, los cuales poseían los controles con peces infestados naturalmente. A las tinas experimentales se les realizaba el recambio del 100% del agua dos veces al día; contaban con aireación continua y se les administraba alimento 3 veces al día (10% de su peso corporal). Durante todo el periodo experimental, los parámetros de temperatura, oxígeno y pH se monitorearon tres veces al día y el análisis de nitritos, nitratos y amoníaco se realizó cada tercer día.

5.2.4. Aplicación de tratamiento y muestreo para histopatología

Las tinas y los peces dentro de las tinas fueron asignados aleatoriamente en 3 grupos experimentales (n=50) y tres repeticiones: Grupo 1, tratado con el extracto acuoso de *Leucaena leucocephala* +

quercetina (0.5 mg mL^{-1} / 0.125 mg mL^{-1} respectivamente); Grupo 2, tratado con formaldehído (1:4000) y Grupo 3, tratado con agua purificada. Se contó con tres repeticiones para cada tratamiento. El día cero se realizó un muestreo al azar de 10 peces por grupo y se realizó un conteo parasitario mediante microscopía directa 4x (Velab Microscope ®) para corroborar que cada pez se encontraba parasitado con más de 30 ejemplares de *Gyrodactylus* spp. e iniciar con los tratamientos correspondientes para cada grupo experimental y sus respectivas repeticiones. Así mismo, previo a la administración del tratamiento, se tomaron 5 peces de cada grupo y se les aplicó la eutanasia con el método descrito en el Código de los Animales Acuáticos realizando un macerado encefálico con clavija perforadora (OIE, 2017), para histopatología. Los peces fueron seccionados longitudinal/sagitalmente de forma completa con el fin de poder inspeccionar microscópicamente todos los órganos y se fijaron en formol al 10% (v / v). Todos los tratamientos se diluyeron con agua purificada en un vaso de precipitados de 1 litro en una platina de agitación magnética durante 20 minutos. Los tratamientos se realizaron a través de baños de inmersión, para los cuales, el nivel del agua de cada una de las tinas se redujo a un 40% de su capacidad (4 litros); posteriormente se administró el tratamiento previamente diluido y de una manera homogénea. Posterior a la administración de los tratamientos, se midieron los parámetros de: agua, oxígeno y pH. Al finalizar el tratamiento, los peces se colocaron en una tina que contenía 10 litros de agua de los estanques generales de crianza. Post-tratamiento, se revisaron aleatoriamente 10 peces de cada tina para realizar un conteo parasitario mediante microscopía directa; de igual manera se tomaron 5 peces aleatoriamente de cada tina y se les aplicó la eutanasia con el método descrito previamente y fijados en formol 10% (v / v) para su procesamiento en histopatología. Este procedimiento fue realizado cada que se administraba tratamiento. Los días 5, 8, 11 y 15 se realizaron muestreos aleatorios en cada una de las tinas experimentales, con la finalidad de realizar un nuevo conteo parasitario y así determinar la efectividad de los tratamientos y el grado de reinfestación. La decisión de administrar los tratamientos fue determinada cuando al menos un pez del grupo tratado con el extracto acuoso de *L. leucocephala* y quercetina presentaba una infestación ≤ 5 parásitos / pez. Como control negativo, 50 peces que fueron incubados y criados en una pecera con agua purificada y libres de parásitos, fueron usados como grupo comparativo para histología.

5.2.5 Análisis estadístico

Para evaluar la efectividad de los tratamientos se utilizó un análisis de varianzas ANOVA con comparaciones múltiples Tukey (GraphPad Prism vs. 9.2.0). El grado de reinfestación parasitaria

fue determinado a través de una prueba de supervivencia cuadrática lineal (Y = número de ejemplares vivos) (GraphPad Prism vs. 9.2.0).

5.3. Etapa 3. Evaluación del efecto del tratamiento sobre la salud del hospedero

5.3.1. Área de estudio

La evaluación histopatológica se realizó en la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de Rosario (FCV-UNR), Argentina.

5.3.2. Histopatología

Se obtuvieron 225 peces de la etapa previa, descritos en la sección 5.2.4, los cuales se procesaron de forma rutinaria para su inclusión en parafina y evaluación histopatológica. Para cada pez se utilizó la tinción de rutina Hematoxilina y Eosina (H-E) y la tinción especial de ácido peryódico de Schiff (PAS). Las laminillas fueron observadas en un microscopio Leica CME ® con los objetivos 4x, 10x, 20x y 40x.

VI.RESULTADOS

6.1. Etapa 1. Evaluación del extracto acuoso de *L. leucocephala*, su combinación con potencializadores y la determinación del tiempo efectivo de exposición

6.1.1. Evaluación de la eficacia antihelmíntica del extracto acuoso de *L. leucocephala* y potencializadores orgánicos (quercetina y rutina)

A la máxima concentración del extracto acuoso de *Leucaena leucocephala* (6 mg mL^{-1}) se observó una mortalidad del 100% de *Gyrodactylus* spp. Los parásitos se desprendían y morían. Sesenta minutos post-exposición, la concentración efectiva media (CE_{50}) fue de 1.091 mg mL^{-1} y mostró un comportamiento de tipo dosis-dependiente (GL: 16, R^2 : 0.9728 y SyX: 8.44) (**Figura 7**). Los peces expuestos al tratamiento no mostraron un comportamiento alterado, se observaban tranquilos y receptivos a estímulos externos.

La quercetina también mostró poseer un efecto sobre la mortalidad de *Gyrodactylus* spp. de tipo dosis-dependiente, con una CE_{50} de $0.0671 \text{ mg mL}^{-1}$ (GL: 13, R^2 : 0.989) (**Figura 8**). En el tratamiento con este compuesto, se observó que a diferencia del extracto acuoso de *L. leucocephala*, los parásitos morían, pero quedaban adheridos a la piel del pez. Por otro lado, el uso de rutina como tratamiento contra la gyrodactylosis, no mostró poseer propiedades bioactivas (**Figura 9**). Con el control positivo, se observó que el formol (1:4000) posee una efectividad del $99.14 \pm 5.86\%$, donde se observó al igual que los peces tratados con quercetina, que los parásitos morían, pero permanecían adheridos a la piel de los peces. Finalmente, el grupo control negativo presentó una mortalidad de $4.83 \pm 0.66\%$.

6.1.2. Efecto antihelmíntico de la combinación del extracto acuoso de *L. leucocephala* con potencializadores orgánicos (quercetina y rutina)

La quercetina mostró una interacción aditiva con el extracto acuoso de *L. leucocephala* (**Figura 10**). En contraste, la combinación de la rutina con el extracto provocó un efecto antagónico. El FIC_{index} de ambas combinaciones se muestran en el **cuadro 5**. Debido al efecto observado, la combinación del extracto acuoso de *L. leucocephala* con quercetina a una concentración final de 0.5 mg mL^{-1} LL: 0.125 mg mL^{-1} quercetina, fue la concentración final que se determinó para las evaluaciones *in vivo*

del efecto sobre la mortalidad de *Gyrodactylus* spp.; considerando la relación 8:2 planta y potencializador. En la **Figura 11** se observa un par de parásitos vivos adheridos a la aleta caudal del pez sin haber recibido tratamiento. Se observan lisos y traslúcidos. Se puede distinguir el haptor y el prohaptor. En la **Figura 12** se observa un parásito vivo desprendido de la piel del pez sin haber recibido tratamiento. Mostraba movimientos ondulantes, lo que significaba que estaba buscando adherirse a un nuevo hospedero. El parásito se observa traslúcido y se distingue bien el haptor y el prohaptor. En contraste, en las **Figura 13 y 14** se observan parásitos muertos desprendidos de un pez después de haber recibido el tratamiento de *L. leucocephala* + quercetina. Los parásitos se observan opacos, con material vegetal sobre su superficie; además de que no se llegan a distinguir bien las estructuras del haptor y del prohaptor.

Cuadro 5. Cálculo del FIC_{index} .

<i>L. leucocephala</i> + Rutina		<i>L. leucocephala</i> + Quercetina	
$FIC_{leucaena}$	1.538955	$FIC_{leucaena}$	0.2131
FIC_{rutin}	1.679	$FIC_{quercetin}$	0.7819
FIC_{index}	3.33	FIC_{index}	1

Interpretación de los valores FIC (Mor *et al.*, 2015): Altamente sinérgico ($FIC_{index} < 0.5$); sinérgico ($FIC_{index} < 1$); aditivo ($FIC_{index} = 1$); sin efecto ($1 < FIC_{index} < 2$) y antagonista ($FIC_{index} > 2$).

6.1.3. Tiempo efectivo de exposición

Tras exponer los peces al tratamiento, se observó que el 50% de los parásitos se murieron a los 20.2 minutos ($R^2: 0.973$), con lo cual se determinó que los parásitos debían ser expuestos 40.4 minutos al tratamiento para alcanzar una mortalidad del 100% (**Figura 15**).

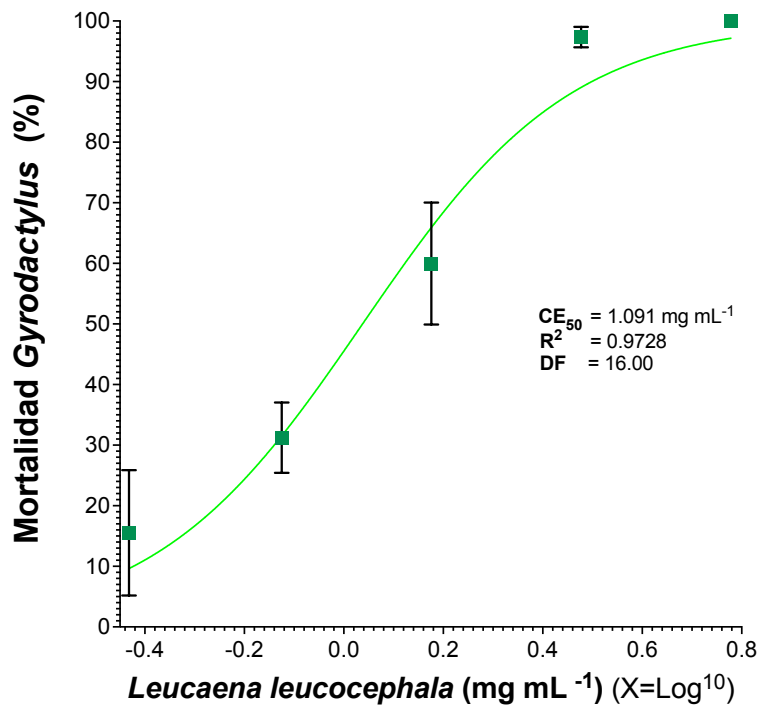


Figura 7. Eficacia del extracto acuoso de *L. leucocephala* sobre la mortalidad (%) de *Gyrodactylus* spp.

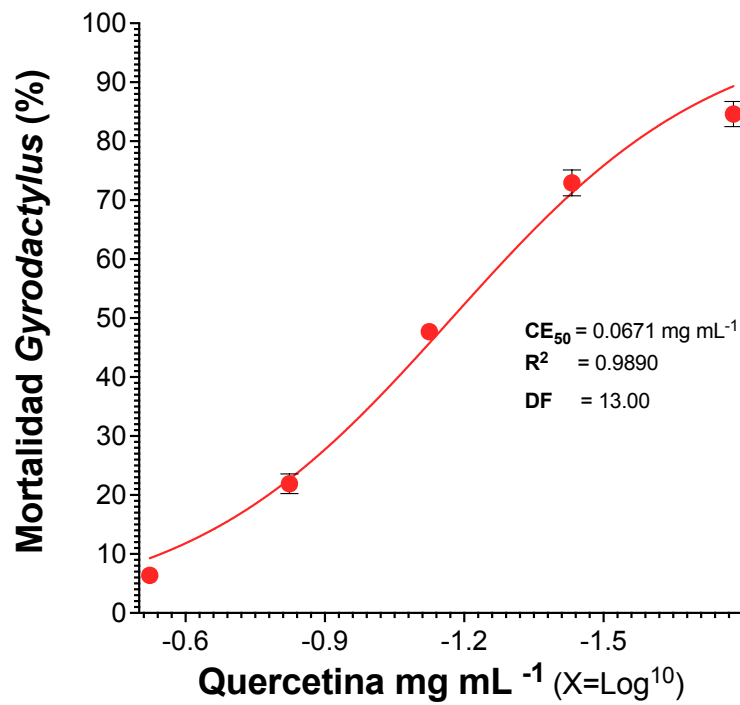


Figura 8. Eficacia de la quercetina sobre la mortalidad (%) de *Gyrodactylus* spp.

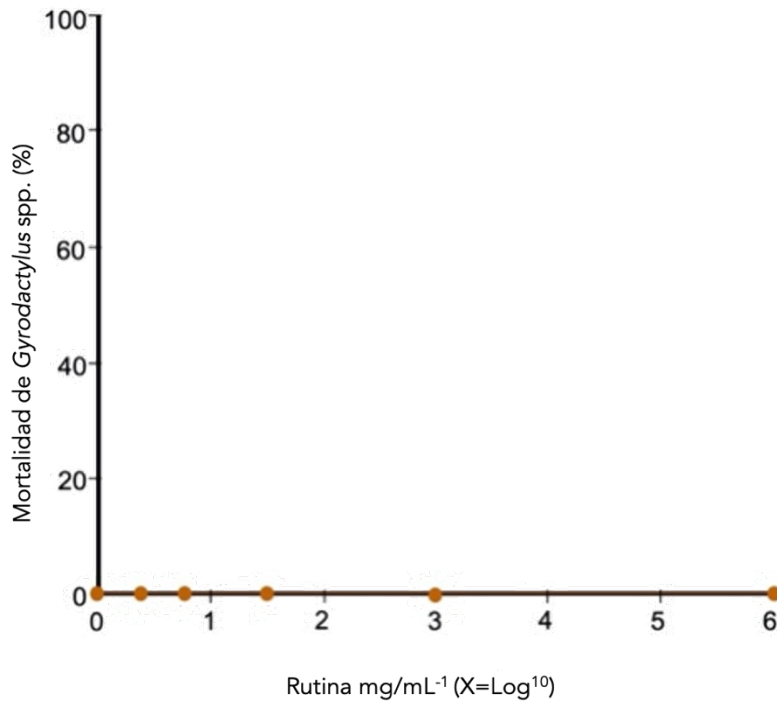


Figura 9. Eficacia de la rutina sobre la mortalidad (%) de *Gyrodactylus* spp.

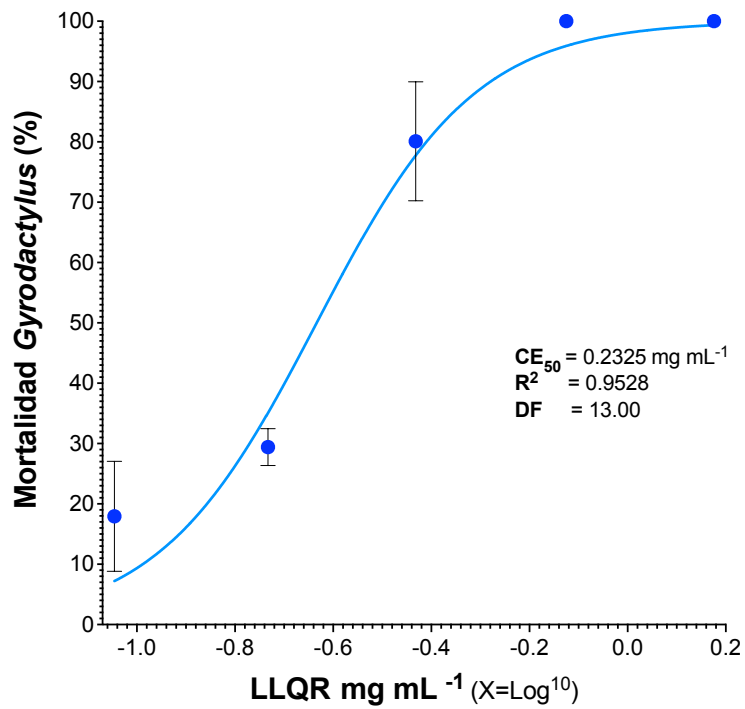


Figura 10. Eficacia del extracto acuoso de *L. leucocephala* y su combinación con quercetina sobre la mortalidad (%) de *Gyrodactylus* spp.

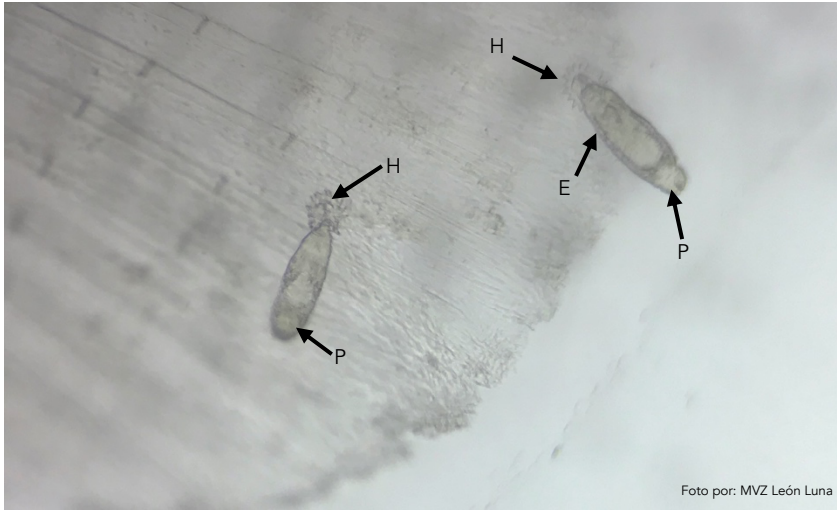


Figura 11. Parásitos vivos adheridos a la aleta de un pez sin tratamiento. Se distingue el haptor (H), prohaptor (P) y un embrión



Figura 12. Parásito vivo desprendido de un pez sin tratamiento. Se observa traslúcido y se distinguen sus estructuras: haptor (H) y prohaptor (P).

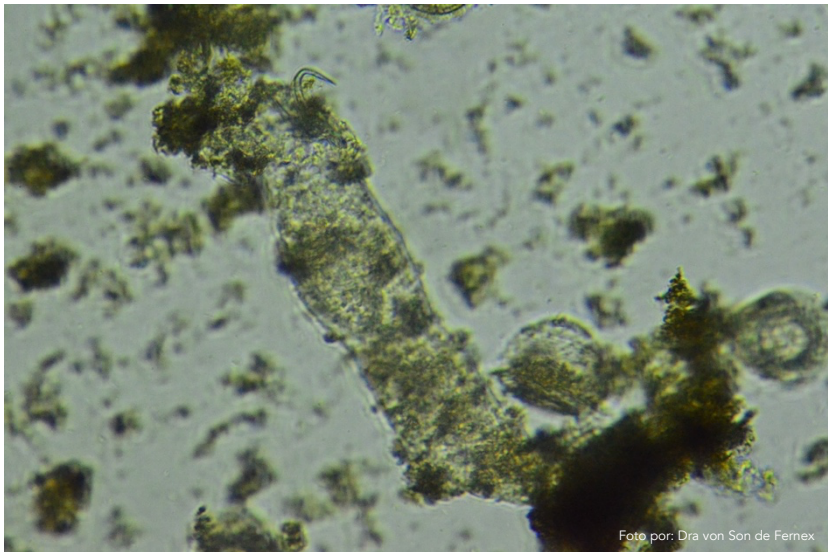


Figura 13. Parásito muerto desprendido de un pez tratado con el extracto acuoso de *L. leucocephala* + quercetina. Se observa opaco y material vegetal sobre su superficie. No se distinguen sus estructuras morfológicas.



Figura 14. Parásito muerto desprendido de un pez tratado con el extracto acuoso. Se observa opaco y material vegetal sobre sus estructuras anterior y posterior.

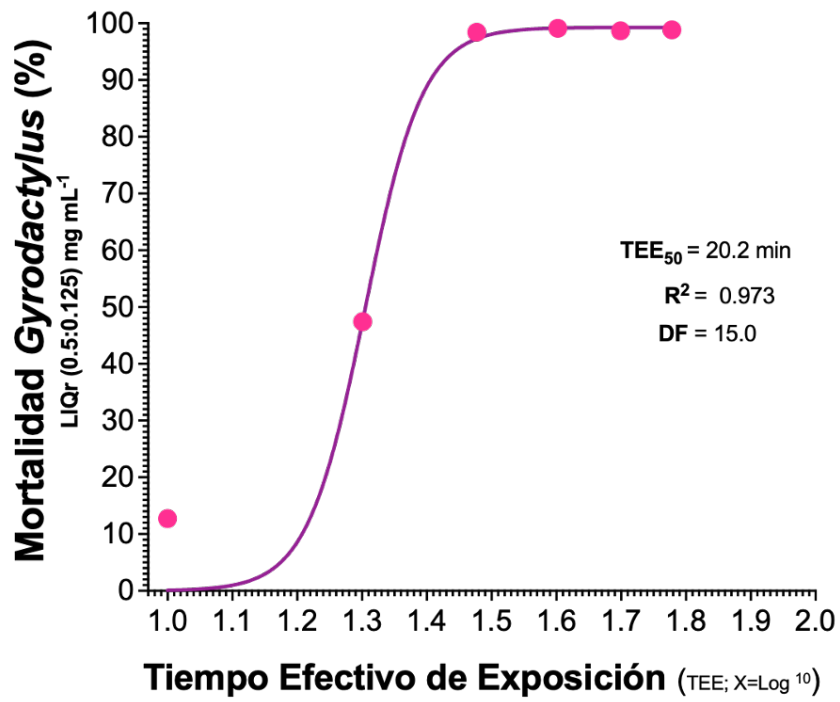


Figura 15. Tiempo efectivo de exposición.

6.2. Etapa 2. Evaluación en campo de la formulación con mayor eficacia en la etapa previa (*L. leucocephala* 0.5 mg mL⁻¹ / quercetina 0.125 mg mL⁻¹)

6.2.1. Eficacia del tratamiento en campo y comportamiento de reinfestación

En esta etapa se evaluó a nivel de campo el tratamiento del extracto acuoso con la adición de quercetina a una concentración de 0.125 mg mL⁻¹. Se realizó una prueba de comparación múltiple para determinar la significancia entre los tres tratamientos administrados. El grupo 3 (tratamiento con agua purificada) mantuvo una cantidad constante de parásitos similares durante los 15 días que duró el experimento, sin embargo, el grupo 1 (tratamiento con extracto acuoso de *L. leucocephala* + quercetina) y el grupo 2 (tratamiento con formaldehído 1:4000) mostraron una respuesta positiva a los tratamientos, teniendo una diferencia significativa con el grupo 1 ($P < 0.05$; $R^2: 0.90$) (**Figura 16**). En ambos tratamientos, se observó una reducción considerable de parásitos, alcanzando casi un 100% de mortalidad y sin mostrar efectos adversos sobre el comportamiento de los peces ni sobre los parámetros de pH, temperatura y oxígeno. En la **figura 17** se muestra el comportamiento que tuvo la reinfestación. El grupo que no tuvo tratamiento se observó que la infestación se mantuvo constante, con un decaimiento negativo durante los 15 días experimentales. Por otro lado, en los grupos tratados (LLQr y Formalina) mostraron una reducción en la constante de reinfestación parasitaria; donde por cada día transcurrido la infestación se redujo en 27.9% y 20.9% en los peces tratados con LLQr y Formalina, respectivamente (**Figura 17**).

6.3. Etapa 3. Evaluación del efecto del tratamiento sobre la salud del hospedero

6.3.1. Histopatología

Los cambios histopatológicos observados en la piel de los tres grupos al día 0 post-tratamiento (DPT) fueron muy similares.

En la epidermis se observaron cambios degenerativos, caracterizados por moderada degeneración hidrópica de las células epidérmicas y espongiosis, principalmente evidente en la región dorsal. En la epidermis y dermis, que en algunos casos se extendía a hipodermis y mioseptos, había un moderado infiltrado inflamatorio mixto multifocal, compuesto por células eosinofílicas granulares (CEG), linfocitos y células plasmáticas (**Figura 18 a, c, e**).

En el grupo control (tratado con agua), las lesiones dermo-epidérmicas, degenerativas e inflamatorias, a los 5 DPT fueron moderadas y a los 8, 11 y 15 DPT, más severas, con marcada degeneración de las células epidérmicas y espongiosis, así como mayor densidad de células inflamatorias linfocíticas y plasmocíticas (**Figura 18 b**).

En el grupo tratado con formol, a los 5, 8 y 11 DPT, el infiltrado inflamatorio dermo-epidérmico presentaba menor densidad de células inflamatorias con respecto al DPT 0. Sin embargo, a los 15 DPT, se observó un intenso infiltrado inflamatorio en la hipodermis, extendiéndose a mioseptos, compuesto principalmente por linfocitos y células plasmáticas (**Figura 18 d**).

En el grupo tratado con el extracto acuoso de *L. leucocephala* y quercetina, se observó en la epidermis un infiltrado inflamatorio y cambios degenerativos de leves a moderados a los 5, 8 y 11 DPT. El infiltrado inflamatorio estaba predominantemente compuesto por CEG a los 5 DPT y por linfocitos y células plasmáticas a los 8 y 11 DPT. A los 15 DPT los cambios degenerativos e inflamatorios fueron leves.

En la dermis, el infiltrado inflamatorio era moderado a los 5, 8 y 11 DPT y leve a los 15 DPT (**Figura 18 f**).

Con la tinción de PAS, en la evaluación histológica no se observaron diferencias en cuanto a la densidad de células caliciformes entre los grupos experimentales.

El resto de los tejidos observados no presentaron cambios histológicos significativos.

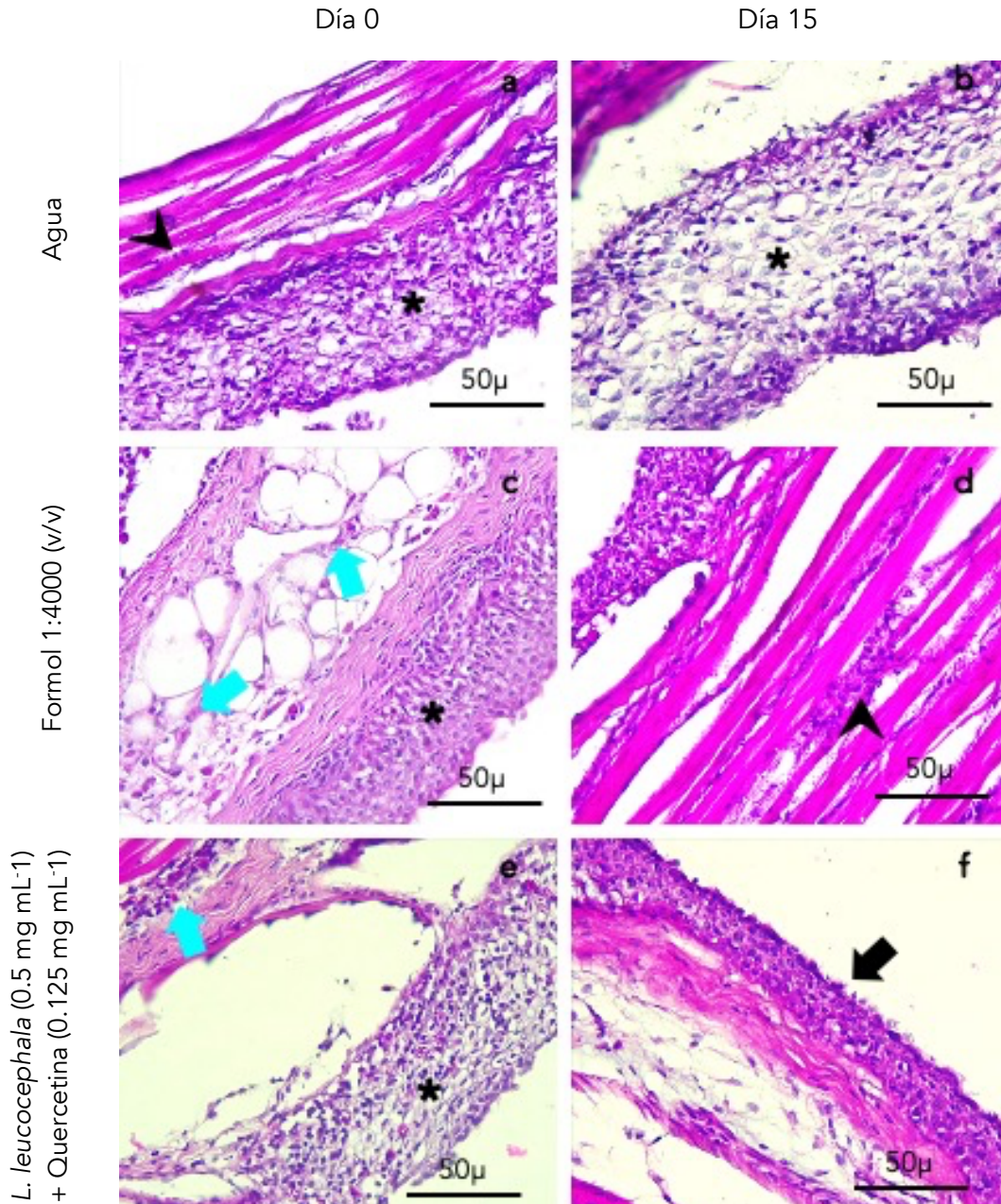


Figura 18. Fotomicrografías de los cambios histológicos observados en piel de Pargo-UNAM, tinción H-E.

a, c y e: Epidermis: degeneración hidrópica, espongiosis e infiltrado inflamatorio de células eosinofílicas granulares y linfoplasmocíticas (asterisco). Dermis: infiltrado inflamatorio eosinofílico granular multifocal moderado que se extiende a hipodermis (flecha turquesa) y mioseptos (cabeza de flecha). **b:** Marcada degeneración de las células epidérmicas y espongiosis. Infiltrado inflamatorio linfoplasmocítico mononuclear (asterisco). **d:** Infiltrado inflamatorio linfoplasmocítico en hipodermis, extendiéndose a mioseptos (cabeza de flecha). **f:** Leves cambios degenerativos e infiltrado inflamatorio dermoepidérmico (flecha negra).

VII.DISCUSIÓN

El primer objetivo de este proyecto de investigación fue determinar la actividad antihelmíntica del extracto acuoso de *Leucaena leucocephala* contra *Gyrodactylus* spp. en tilapia. Diversos estudios han mostrado la actividad biológica de diversas plantas con propiedades antihelmínticas para el control de la girodactilosis; no obstante, el mecanismo de acción y efectividad difieren entre sí. Algunos autores reportan mortalidades que van del 85-100%, con concentraciones efectivas medias de entre 20 y 200 mg / L⁻¹ (Ekanem *et al.*, 2010; Schelkle *et al.*, 2013; Tu *et al.*, 2013; Levy *et al.*, 2015); sin embargo, en su mayoría las extracciones son etanólicas y clorofórmicas, lo cual dificulta su administración en la acuicultura debido a la baja solubilidad en medios acuosos (Abubakar y Haque, 2020). Uno de los factores más importantes a la hora de elegir el solvente para la extracción, es la polaridad del compuesto. En el caso de *L. leucocephala*, los polifenoles han sido reportados como uno de los principales efectores de la actividad antihelmíntica (Alonso-Díaz *et al.*, 2008; von Son-de Fernex *et al.*, 2015; Escareño-Díaz *et al.*, 2019; Compean *et al.*, 2021). Debido a la naturaleza polar de dichos compuestos, la solubilidad que tienen en agua es mucho mayor y por tanto tienen más afinidad para unirse a proteínas y presentan una mayor promiscuidad molecular en los sitios de unión (Ademola *et al.*, 2005). Gupta *et al.* (2012) mencionan que para la selección de los disolventes se aplica el principio de "lo mismo se disuelve en lo mismo"; así, los disolventes polares extraerán las sustancias polares y el material no polar será extraído por los disolventes no polares. En este caso, los metabolitos que se buscaba extraer eran polares, por lo que se usó el agua, ya que es un solvente polar. Así mismo, se eligió una extracción acuosa para evaluar la leguminosa *L. leucocephala* debido a que esta contiene mimosina, un alcaloide de elevada toxicidad; sin embargo, Ademola *et al.* (2005) reportan que en el extracto acuoso de leucaena hay ausencia de alcaloides, por lo que puede administrarse sin el riesgo de toxicidad.

Dentro de las evaluaciones de extractos acuosos, Friedman *et al.* (2014) reportan la actividad biológica de un extracto acuoso de ajo (*Allium sativum*) sobre la mortalidad de *G. turnbulli* y *Dactylogyrus* spp.; y reportan una concentración media de 20 ml / L⁻¹, la cual es menor a la obtenida en este estudio (5 mg / mL⁻¹); y en contraste a los resultados obtenidos en este estudio, el extracto de ajo provocó un efecto de desprendimiento "Knock out" de los monogeneos, en vez de la muerte de los mismos. Este efecto es poco deseable, ya que el desprendimiento del parásito no provoca la interrupción del ciclo biológico, pues éste puede permanecer viable fuera del hospedador por un periodo aproximado de 6 horas hasta encontrar un nuevo hospedador (Fridman *et al.*, 2014; Cable y Harris, 2002).

En un estudio reciente, Compean *et al.* (2021) reportan que el extracto acuoso de *L. leucocephala* tiene actividad antihelmíntica contra *Gyrodactylus* spp. a una CE_{50} de 0.231 mg mL^{-1} ; dichos resultados son inconsistentes con lo observado en este proyecto, donde la CE_{50} fue de 1.091 mg mL^{-1} . En el experimento realizado por Compean *et al.* (2021), la planta utilizada para la elaboración del extracto acuoso fue cosechada en febrero de 2014, mientras que la de este estudio fue cosechada en el mismo lugar, pero en diferente época del año (agosto del 2019) (ver sección 5.1.2), lo cual podría explicar las diferencias entre las concentraciones efectivas obtenidas. Las diferencias en tiempo y época del año pueden influir directamente tanto en la concentración como en la naturaleza de los metabolitos secundarios presentes en el material vegetal, y por ende, modificar la naturaleza y concentración de los compuestos bioactivos presentes en el extracto. Herrera *et al.* (2017) mencionan que el clima es uno de los principales factores que determinan la cantidad de metabolitos secundarios presentes en *L. leucocephala*; ya que el incremento de la temperatura disminuye la síntesis de los mismos. Así mismo, otros autores reportan resultados similares, con una disminución en la concentración de flavonoides cuando la temperatura al momento de la cosecha es elevada (30°C) (Pastore *et al.*, 2017). Esto es consistente con los resultados obtenidos en el estudio de Compean *et al.* (2021) y los obtenidos con este proyecto, donde la CE_{50} fue mayor a lo esperado.

Como segundo objetivo, se evaluó el uso de potencializadores orgánicos, quercetina y rutina, para el control de la gyrodactilosis en tilapia Pargo-UNAM. Un primer estudio realizado por von Son-de Fernex *et al.* (2015) determinó, a través del fraccionamiento biodirigido de un extracto acuoso de *L. leucocephala*, que los principales compuestos bioactivos del extracto contra diferentes fases biológicas del nematodo gastrointestinal *Cooperia punctata*, fueron: quercetina, ácido cafeico y escopoletina. En otro estudio se encontró que en una fracción con menor bioactividad, uno de los compuestos mayoritarios era la rutina (von Son-de Fernex *et al.*, datos sin publicar). Escareño-Díaz *et al.* (2019) reportaron que el uso de quercetina y rutina tiene un efecto sinérgico contra nematodos gastrointestinales de rumiantes.

En este estudio, el uso de rutina como tratamiento contra la gyrodactilosis, no mostró poseer efecto antihelmíntico. Estos resultados son inconsistentes con los estudios realizados por Chauhan *et al.* (2018), quienes reportaron que la rutina tiene la capacidad de disminuir la carga parasitaria de *Leishmania donovani* en bazo de ratones infectados *in vitro*, así como actividad inmunoestimulante a una dosis de 25 mg de rutina / Kg de peso corporal. No obstante, la falta de actividad observada en este estudio es consistente con lo reportado por Mead y McNair *et al.* (2006) quienes mencionan que la rutina no tiene efecto antiparasitario contra *Cryptosporidium parvum* y *Encephalitozoon intestinalis*. Finalmente, un estudio bacteriológico realizado por Arima *et al.* (2012), reporta que la

rutina por sí sola no tiene propiedades antibacterianas, sin embargo, sí mostró un efecto sinérgico sobre la actividad antibacteriana de los flavonoides; no obstante, ambas aseveraciones son inconsistentes con lo observado en este proyecto, ya que la rutina no mostró actividad antihelmíntica ni potencializadora.

Los estudios que han evaluado el efecto de la quercetina como un compuesto con actividad antihelmíntica han tenido resultados controversiales. Adenkule y Aderogba (2008) reportan que el uso de quercetina aislada de hojas de *L. leucocephala*, tiene la capacidad de inhibir la eclosión de huevos del nematodo *Meloidogyne incognita*. De igual manera, Kozan *et al.* (2013) reportaron un efecto contra huevos y larvas de *Trichostrongylus* sp. Estudios más recientes indican que la quercetina por sí sola no afecta ninguna fase el ciclo biológico del nematodo gastrointestinal *Cooperia punctata* (Escareño-Díaz *et al.*, 2019). No obstante, von Son-de Fernex *et al.* (2015) y Escareño-Díaz *et al.* (2019) sugieren que al combinar la quercetina con compuestos de baja actividad antihelmíntica, se puede obtener un efecto potencializador sobre la bioactividad. En parcial consistencia, en este estudio, se observó que el uso de quercetina sí tiene efecto sobre la mortalidad de *Gyrodactylus* spp. y que los parásitos expuestos al baño con quercetina, morían pero permanecían adheridos al pez. Por consiguiente, la suma de los efectos aislados tanto del extracto acuoso como de la quercetina, tuvo un efecto aditivo de la actividad biológica y permitió reducir la concentración efectiva tanto del extracto como de la quercetina.

El mecanismo de acción de las plantas con actividad antiparasitaria, ha sido difícil de determinar, ya que existe una amplia gama de metabolitos secundarios que pudiesen actuar a diferentes niveles celulares; no obstante, estudios han reportado que algunos flavonoides como la quercetina, tienen la capacidad de actuar como inhibidores de la acetilcolinesterasa (Khan *et al.*, 2018). En la fisiología parasitaria, la acetilcolinesterasa es la enzima responsable de hidrolizar al neurotransmisor acetilcolina en el espacio sináptico, provocando así la contracción muscular. Por lo cual, el uso de quercetina genera que la membrana post-sináptica esté en constante estimulación cuando está en contacto con la quercetina, provocando así la parálisis muscular y finalmente la muerte del parásito. Este efecto fue observado en este estudio ya que los parásitos expuestos a la quercetina morían, sin embargo se mantenían firmemente adheridos a la piel del pez (por medio del haptor) y el resto del cuerpo mostraba flacidez. Esta situación puede explicarse debido a que en la región del haptor, el parásito tiene ganglios colinérgicos pre-haptorales (Arafa *et al.*, 2007), los cuales, podrían presentar una inhibición de la acetilcolinesterasa debido a la acción de la quercetina, provocando así una parálisis espástica que no permite que el parásito se desprenda del pez. Por otro lado, la flacidez del cuerpo podría deberse a la estimulación inhibitoria que pueden ejercer los receptores colinérgicos, liberando ácido gamma aminobutírico (GABA), el cual produce relajación muscular. Este tipo de

respuesta fue observada por Hernando y Bouzat (2014), quienes evaluaron el efecto de la ivermectina en *Caenorhabditis elegans* y describieron parálisis flácida, acortamiento y espasmos musculares del parásito cuando fue expuesto a una dosis de 0.3 mM. Esto es debido a que la acetilcolina liberada de las neuronas motoras estimula la contracción muscular en una parte del cuerpo y simultáneamente activa una neurona motora inhibitoria que se proyecta hacia el lado opuesto del cuerpo para liberar GABA, provocando así el efecto descrito anteriormente (Hernando y Bouzat, 2014). Se sugiere que este tratamiento podría ser eficaz sobre la mortalidad de otros parásitos como *Dactylogyrus* spp. y *Trichodina* spp., ya que estudios previos (Compean, datos sin publicar, 2018), demostraron que el extracto acuoso de *L. leucocephala* tenía efecto contra estos parásitos.

El tercer objetivo de este experimento fue la evaluación *in vivo* del tratamiento en campo, así como el comportamiento de la reinfestación parasitaria de los peces tras ser expuestos al tratamiento.

Usando las CE₉₉ obtenidas en la etapa anterior, observamos una elevada mortalidad en los parásitos de los grupos tratados con el extracto acuoso y con el formol (80-100%), consistente con lo mencionado por Compean *et al.*, (2021) y con lo observado en el primer experimento.

También se observó una reducción significativa en la tasa de reinfestación parasitaria de los peces. Dichas observaciones son inconsistentes con lo reportado por Zhou *et al.* (2018), quienes no observaron diferencias significativas en las cargas parasitarias entre los peces con una infección primaria y peces reinfestados. Durante los 15 días bajo un sistema de producción abierto, observamos que las tilapias que no fueron tratados contra *Gyrodactylus* spp. mostraron una carga parasitaria constante con un ligero incremento al final del periodo experimental. Esto contrasta con lo observado en las tilapias tratadas tanto con el extracto acuoso + quercetina y con el formol, en los cuales se observó una reducción significativa de la carga parasitaria conforme avanzaban los días. Dicha reinfestación observada es consistente con lo reportado por Cable *et al.* (2007), quienes demostraron que en una infestación natural, los peces inician una respuesta inmune contra la infestación por *Gyrodactylus* spp., sin embargo, cuando se presenta una reinfestación, la resistencia contra el parásito no mejora y es por ello que los peces siguen siendo susceptibles a las cargas parasitarias. Por tanto, podría sugerirse que adicional al efecto directo del extracto acuoso sobre la mortalidad de *Gyrodactylus* spp., podría haber un efecto modulador del mismo sobre el sistema inmune de la tilapia (Stratev *et al.*, 2018).

Esta disminución en la cantidad de parásitos podría deberse a que, como lo menciona Verma *et al.* (2014, 2013), la *L. leucocephala* estimula la respuesta inmune específica y de esta manera el número de parásitos va disminuyendo conforme avanza el tiempo.

El cuarto objetivo de este trabajo fue la evaluación del tratamiento sobre la salud del hospedero mediante histopatología. Se observó que los peces infestados con el parásito, mostraban lesiones tanto degenerativas como inflamatorias, esto debido a la respuesta frente al daño en la piel. Los ectoparásitos como *Gyrodactylus* tienen contacto directo con el tejido del hospedero, ya que se alimentan principalmente de células epiteliales y moco de la piel, aletas y branquias. En estos tejidos, la presencia del parásito causa daño por efecto mecánico, irritativo y consumo de tejido y moco; produce erosión en las capas de la epidermis e hiperplasia epitelial. Estas reacciones tisulares en el sitio de la fijación, perjudican la función fisiológica normal del órgano, en este caso la piel.

Dependiendo de la densidad parasitaria y la cronicidad, se producen respuestas generales o específicas de la piel frente a la presencia del parásito (Roberts, 2012). Éste cuenta con un órgano de adherencia en su región posterior llamado opisthaptor, el cual es una estructura esclerótica armada con ganchos que ocupa para anclarse a la piel del pez, penetrando las células epiteliales y provocando pequeños agujeros en el sitio de fijación; de esta manera genera un contacto estrecho con el hospedero. Las lesiones cutáneas facilitan las infecciones bacterianas y micóticas oportunistas; también pueden provocar efectos sistémicos como desequilibrios osmoreguladores (Rubio-Godoy, 2007).

En la región anterior se encuentra el prohaptor, el cual cuenta con glándulas cefálicas que le sirven de adherencia y de digestión, ya que producen enzimas asociadas al intestino del parásito, como fosfatasas ácidas y alcalinas, esterases y proteasas. Estas enzimas podrían contribuir a las lesiones cutáneas observadas en los peces infestados (Fromm, 2014).

Bakke (2017) describe adelgazamiento generalizado en la epidermis, degeneración vacuolar e infiltrado de células mononucleares en salmones del Atlántico (*Salmo salar*) infestados con *G. salaris*, lo que concuerda con lo observado en este trabajo, siendo esto más evidente en los peces que no recibieron tratamiento.

Respecto a la respuesta inflamatoria, observamos que en los peces tratados con el extracto de *L. leucocephala* y quercetina, el infiltrado inflamatorio disminuyó considerablemente en comparación con los animales que no fueron tratados. Este resultado coincide con lo reportado previamente en otros estudios en los que se ha demostrado que la quercetina puede disminuir la intensidad del proceso inflamatorio al inhibir la producción de las citocinas proinflamatorias TNF α , IL6 e IL1 β . Esto lo hace reprimiendo las vías de transducción de señales asociadas a p38, ERK1/2 y NF κ B (Jia *et al.*, 2019; Li *et al.* 2019). De igual manera, con el paso de los días, se observó una reducción en la respuesta inflamatoria en los peces tratados con el extracto, lo que es consistente con los estudios de Nehdi *et al.* (2014) quienes mencionan que la *L. leucocephala* tiene propiedades antiinflamatorias.

Además del posible efecto antiinflamatorio, la reducción de la severidad de las lesiones cutáneas indicaría que el tratamiento con el extracto acuoso + quercetina, no indujo efectos lesivos adicionales.

Lindenstrøm *et al.* (2003) y Rubio-Godoy (2007), sugirieron que la producción continua de moco, facilita la proliferación de *Gyrodactylus* spp., sirviendo como quimioatrayente y fuente de alimento, sin embargo, en peces resistentes esta respuesta es reducida unos días después de la invasión, debido a que la expresión de IL-1 β disminuye, moderando así la proliferación de células mucosas y de esta manera creando un microambiente pobre en células goblet. Por otra parte, en peces susceptibles se ha observado hiperplasia de células caliciformes, asociada a la sobreexpresión de esta citocina (Lindenstrøm *et al.*, 2003).

Mediante la evaluación histopatológica cualitativa, en este trabajo no se observó una evidente diferencia en cuanto a la densidad de células goblet. Esto podría asociarse a que las tilapias usadas en este trabajo presentan cierto grado de resistencia al parásito.

En cuanto al grupo tratado con formol, los cambios inflamatorios más extensos, en comparación con el grupo tratado con el extracto acuoso, pueden deberse al daño causado tanto a la presencia del parásito como al uso del formol (coparticipación). El formol es un tratamiento efectivo para muchos monogeneos, pero solo son removidos con una alta dosis de formol (400ppm por 25 minutos), dosis no tolerada por muchos peces, ya que aunado al efecto tóxico que tiene en branquias, tiene efecto irritativo en piel (Noga, 2010; Santos *et al.*, 2011).

Los resultados obtenidos en este trabajo de investigación sugieren que, como se ha reportado en estudios previos, tanto la quercetina como el extracto acuoso de *L. leucocephala* tienen efecto sobre la mortalidad de *Gyrodactylus* spp. Este tratamiento se puede proponer como un método alternativo adecuado, eficaz y seguro para el control de *Gyrodactylus* spp. en granjas de tilapia.

VIII. CONCLUSIONES GENERALES

1. A la máxima concentración del extracto acuoso de *Leucaena leucocephala* (6 mg mL⁻¹) se observó una mortalidad del 100% de *Gyrodactylus* spp. en la fase de laboratorio.
2. La quercetina mostró una mortalidad del 100% sobre *Gyrodactylus* spp a una dosis de 0.1342 mg mL⁻¹ en la fase de laboratorio.
3. El extracto acuoso de *L. leucocephala* y la quercetina tuvieron una interacción aditiva, consiguiendo una mortalidad del 100% sobre *Gyrodactylus* spp. a una dosis de 0.5 mg mL⁻¹ y 0.125 mg / mL⁻¹ respectivamente, en la fase de laboratorio.
4. El tiempo efectivo de exposición de los peces tratados con el extracto acuoso de *L. leucocephala* + quercetina a 0.5 mg mL⁻¹/0.125 mg mL⁻¹ respectivamente, para reducir las cargas parasitarias al 100%, fue de 40 minutos.
5. En las pruebas de campo, el extracto acuoso de *L. leucocephala* + quercetina (0.5 mg mL⁻¹ y 0.125 mg / mL⁻¹ respectivamente), tuvieron un efecto casi del 100% sobre la mortalidad de *Gyrodactylus* spp.
6. Los peces tratados con LLQr y formalina en el experimento *in vivo*, mostraron una reducción del 27.9% y 20.9% respectivamente por cada día transcurrido del experimento.
7. Las tilapias infestadas con el parásito y tratadas con el extracto acuoso de *L. leucocephala* + quercetina (0.5 mg mL⁻¹ y 0.125 mg / mL⁻¹ respectivamente) mostraron una disminución en el infiltrado inflamatorio en la epidermis después de 3 tratamientos. Además de no observarse lesiones sugerentes a un daño adverso para la salud de las tilapias.

IX. PERSPECTIVAS

A partir de estos resultados sería necesario a futuros estudios, profundizar en el perfil fitoquímico de la planta mediante técnicas analíticas de aislamiento y elucidación estructural, así como aquellas que nos permitan determinar el tipo de compuestos presentes en el extracto. Es importante realizar un estudio biodirigido con el extracto y un fraccionamiento de aquellos que resulten tener actividad antihelmíntica.

Es importante considerar la evaluación de la respuesta inmune de los peces tratados con el extracto acuoso de *Leucaena leucocephala* y quercetina mediante técnicas de inmunohistoquímica y biología molecular para poder determinar el posible efecto inmunoestimulante sobre el pez. Así mismo, realizar la evaluación del tratamiento sobre otros parásitos que afectan las producciones acuícolas.

REFERENCIAS

1. Abós B, Bird S, Granja AG, Morel E, More Bayona JA, Barreda DR, Tafalla C. Identification of the first teleost CD5 molecule: Additional Evidence on phenotypical and functional similarities between fish IgM⁺ B cells and mammalian B1 cells. *J Immunol.* 2018;201:465-480.
2. Abubakar AR, Haque M. Preparation of medicinal plants: Basic extraction and fractionation procedures for experimental purposes. *J Pharm Bioallied Sci.* 2020;12(1):1-10.
3. Adekunle OK, Aderogba MA. Characterisation of an antinematocidal compound from *Leucaena leucocephala*. *Australas Plant Dis Notes.* 2008;3:168-170.
4. Ademola IO, Akanbi AI, Idowu SO. Comparative nematocidal activity of chromatographic fractions of *Leucaena leucocephala* seed against gastrointestinal sheep nematodes. *Pharm Biol.* 2005;43:599-604.
5. Adeyemi HMM. The potential of secondary metabolites in plant material as deterrents against insect pests: A review. *Afr J Pure Appl Chem.* 2010;11:243-246.
6. Alonso-Díaz MA, Torres-Acosta JFJ, Sandoval-Castro CA, Capetillo-Leal C, Brunet S, Hoste H. Effects of four tropical tanniniferous plant extracts on the inhibition of larval migration and the exsheathment process of *Trichostrongylus colubriformis* infective stage. *Vet Parasitol.* 2008;153:187-192.
7. Alonso-Díaz MA, Torres-Acosta JFJ, Sandoval-Castro CA, Hoste H. Tannins in tropical tree fodders fed to small ruminants: A friendly foe?. *Small Rumin Res.* 2010;89:164-173.
8. Álvarez de Felipe AI, Pulido Duarte MM. Transportadores de tipo ABC: consecuencias de su interacción con flavonoides. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 2008;76:296-311.
9. Alves C, Nogueira JN, Barriga IB, Dos Santos JR, Santos GG, Tavares-Dias M. Albendazole, levamisole and ivermectin are effective against monogeneans of *Colossoma macropomum* (Pisces: Serrasalmidae). *J Fish Dis.* 2019;42:405-412.
10. Arafa S, El-Naggar MM, El-Abbassy S, Stewart MT, Halton DW. Neuromusculature of *Gyrodactylus rysavyi*, a monogenean gill and skin parasite of the catfish *Clarias gariepinus*. *Paras Int.* 2007;56:297-307.

11. Arima H, Ashida H, Danno G. Rutin-enhanced antibacterial activities of flavonoids against *Bacillus cereus* and *Salmonella enteritidis*. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2002;66:1009-1014.
12. Awad E, Awaad A. Role of medicinal plants on growth performance and immune status in fish. *Fish Shellfish Immunol*. 2017;67:40-54.
13. Bakke TA, Harris PD, Jansen PA, Hansen LP. Host specificity and dispersal strategy in gyrodactylid monogeneans, with particular reference to *Gyrodactylus salaris* (Platyhelminthes, Monogenea). *Dis Aquat Organ*. 1992;13:63-74.
14. Bakke TA, Cable J, Harris PD. The Biology of Gyrodactylid Monogeneans: The “Russian-Doll Killers”. *Adv Parasitol*. 2007;64:161-378.
15. Borges DGL, de Araújo MA, Carollo CA, Carollo ARH, Lifschitz A, Conde MH, de Freitas MG, Freire ZS, Tutija JF, Nakatani MTM, Borges FA. Combination of quercetin and ivermectin: *In vitro* and *in vivo* effects against *Haemonchus contortus*. *Acta Trop*. 2020;201:105-213.
16. Buchmann K. Binding and lethal effect of complement from *Oncorhynchus mykiss* on *Gyrodactylus derjavini* (Platyhelminthes: Monogenea). *Dis Aquat Organ*. 1998;32:195-200.
17. Buchmann K, Bresciani J. Microenvironment of *Gyrodactylus derjavini* on rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: association between mucus cell density in the skin and site selection. *Parasitol Res*. 1998;84:17-24.
18. Buchmann K. Immune mechanisms in fish skin against monogeneans-a model. *Folia Parasitol*. 1999;46:1-9.
19. Buchmann K, Kristensson RT. Efficacy of sodium percarbonate and formaldehyde bath treatments against *Gyrodactylus derjavini* infestation of *Rainbow trout*. *N Am J Aquac*. 2003;65:25-27.
20. Buchmann K, Bresciani J. Monogenea (Phylum Platyhelminthes) en: *Fish Diseases and Disorders Vol 1: Protozoan and Metazoan Infections*. Woo PTK. Second Edition. CAB International. University of Guelph Canada, 2006. 2nd Ed.
21. Cable J, Harris PD, Bakke TA. Population growth of *Gyrodactylus salaris* (Monogenea) on Norwegian and Baltic Atlantic salmon (*Salmo salar*) stocks. *Parasitol*. 2000;121:621-629.
22. Cable J, Harris PD. Gyrodactylid developmental biology: historical review, current status and future trends. *Int J Parasitol*. 2002;32:255-280.

23. Cable J, Van Oosterhout C. The role of innate and acquired resistance in two natural population of guppies (*Poecilia reticulata*) infected with the ectoparasite *Gyrodactylus turnbulli*. Biol J Linn Soc. 2007;90:647-655.
24. Chakraborty SB, Hancz C. Application of phytochemicals as immunostimulant, antipathogenic and antistress agents in finfish culture. Rev Aquac. 2011;3:103-119.
25. Chauhan K, Kaur G, Kaur S. Activity of rutin, a potent flavonoid against SSG-sensitive and resistant *Leishmania donovani* parasites in experimental leishmaniasis. Int Immunopharmacol. 2018;64:372-385.
26. Chaves TP, Santana CP, Vêras G, Brandao DO, Felismino DC, Medeiros AC, Trovao BM. Seasonal variation in the production of secondary metabolites and antimicrobial activity of two plant species used in Brazilian traditional medicine. Afr J Biotechnol. 2013;12:847-853.
27. Citarasu, T. Herbal biomedicines: a new opportunity for aquaculture industry. Aquac Int. 2010;1:403-414.
28. Compean-Martínez J, Salazar-Ulloa M, Chávez-Soriano L, Muñoz-Córdoba G, von Son-de Fernex E. Anthelmintic-like activity of *Leucaena leucocephala* aqueous extract against *Gyrodactylus* spp. in naturally infected tilapia fingerlings. N Am J Aquac. 2021. DOI: 10.1002/naaq.10206.
29. CONAPESCA 2018. Tilapia 2020: Prospectivo del Sistema-Producto Nacional de Tilapia en México.
30. CONAPESCA 2013. Anuario estadístico de acuicultura y pesca 2013.
31. Costa LG. Current issues in organophosphate toxicology. Clin Chim Acta. 2006;366:1-13.
32. Coura R, Prolla JC, Meurer L, Ashton-Prolla P. An alternative protocol for DNA extraction from formalin fixed and paraffin wax embedded tissue. J Clin Pathol. 2005;58:894-895.
33. Deivasigamani R. Phytochemical analysis of *Leucaena leucocephala* on various extracts. J Phytopharmacol. 2018;7:480-482.
34. Diario Oficial de la Federación, 2012. Disponible en: <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/308111/02tilapia.pdf>
35. Dubey S, Ganeshpurkar A, Bansal D, Dubey N. Experimental studies on bioactive potential of rutin. Chronic Y Sci. 2013;4:153-158.

36. Dügenci SK, Arda N, Candan A. Some medicinal plants as immunostimulants for fish. *J Ethnopharmacol.* 2003;88:99-106.
37. Ek-Huchim JP, Jiménez-García I, Rodríguez-Canul R. DNA detection of *Gyrodactylus* spp. in skin mucus of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Vet Parasitol.* 2019;272:75-78.
38. Ekanem AP, Ekpo IA, Morah F, Amanke E, Afangide U. Acute toxicity of ethanol extracts from two ichthyotoxic plants *Adenia cissampeloides* (Passifloraceae) and *Blighia sapida* (Sapindaceae) to one-week old *Heterobranchus longifilis* juveniles. *Niger J Bot.* 2007;20:157-161.
39. Ekanem AP, Brisibe EA. Effects of ethanol extract of *Artemisa annua* against monogenean parasites of *Heterobranchus longifilis*. *Parasitol Res.* 2010;106:1135-1139.
40. Escareño DS, Alonso-Díaz MA, Mendoza de Gives P, Castillo GE, von Son-de Fernex E. Anthelmintic-like activity of polyphenolic compounds and their interactions against the cattle nematode *Cooperia punctata*. *Vet Parasitol.* 2019;274.
41. Esteban MA. An overview of the immunological defenses in fish skin. *ISRN Immunology.* Article ID 853470. 2012, 29 pages.
42. FAO, 2006. Aquaculture topics and activities. *Acuicultura.* In: Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO [en línea]. Roma. Actualizado 11 September 2017. disponible en <http://www.fao.org/fishery/aquaculture/es>.
43. FAO, 2010. Programa de información de especies acuáticas *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). Fisheries and Aquaculture Department.
44. FAO, 2016. World review. The State of World Fisheries and Aquaculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
45. FAO, 2018. The state of world fisheries and aquaculture 2018 – meeting the sustainable development goals, Rome.
46. FAO, 2019. Aquaculture growth potential in Mexico. WAPI factsheet to facilitate evidence-based policy-making and sector management in aquaculture.
47. Fridman S, Sinai T, Zilberg T. Efficacy of garlic-based treatments against monogenean parasites infecting the guppy (*Poecilia reticulata* (Peters)). *Vet Parasitol.* 2014;203:51-58.

48. Fromm B. Occurrence and phylogenetic implications of microRNAs in the fish parasite *Gyrodactylus salaris* (Platyhelminthes: Neodermata: Monogenea) and related species. 2014 Presented for the degree of Philosophiae Doctor. Natural History Museum. University of Oslo.
49. Ganeshpurkar A, Saluja AK. The pharmacological potential of rutin. Saudi Pharm J. 2017;25:149-164.
50. Grano-Maldonado MI, Rodríguez-Santiago MA, García-Vargas F, Nieves-Soto. An emerging infection caused by *Gyrodactylus cichlidarum* Paperna, 1968 (Monogenea: Gyrodactylidae) associated with massive mortality on farmed tilapia *Oreochromis niloticus* (L.) on the Mexican Pacific coast. Lat Am J Aquat Res. 2018;46:961-968.
51. Gupta A, Naraniwal M, Kothari V. Modern extraction methods for preparation of bioactive plant extracts. Int J Appl Nat Sc. 2012;1:8-26.
52. Harikrishnan R, Balasundaram C, Heo MS. Impact of plant products on innate and adaptative immune system of cultured finfish and shellfish. Aquac. 2011;317:1-15.
53. Harris PD, Shinn AP, Cable J, Bakke TA. Nominal species of the genus *Gyrodactylus* von Nordmann 1832 (Monogenea: Gyrodactylidae), with a list of principal host species. Syst Parasitol. 2004;59:1-27.
54. Hassan RA, Tawfik WA, Lobna M. The flavonoid constituents of *Leucaena leucocephala* growing in Egypt, and their biological activity. Afr J Tradit Complement Altern Med. 2014;11:67-72.
55. Hernando G & Bouzat C. *Caenorhabditis elegans* Neuromuscular junction: GABA receptors and Ivermectin action. Plos ONE. 2014;9:1-9.
56. Herrera RS, Verdecia DM, Ramírez JL, García M, Cruz AM. Secondary metabolites of *Leucaena leucocephala*. Their relationship with some climate elements, different expressions of digestibility and primary metabolites. Cuba J Agric Sci. 2017;51:107-116.
57. Huang AG, Yi YL, Ling F, Lu L, Zhong ZQ, Wang GX. Screening of plant extracts for anthelmintic activity against *Dactylogyrus intermedius* (Monogenea) in goldfish (*Carassius auratus*). Parasitol Res. 2013;112:4065-4072.
58. IARC (International Agency for Research on Cancer). Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Vol 88. Formaldehyde, 2-butoxyethanol and 1-tert-butoxy-2-propanol. Lyons. 2004.
59. Jackson F & Miller J. Alternative approaches to control - Quo vadit?. Vet Parasitol. 2006;139:371-384.

60. Jakobek L. Interaction of polyphenols with carbohydrates, lipids and proteins. *Food Chem.* 2015;175:556-567.
61. Jaman N, Hoque S, Chandra CS, Hoq E, Pada SH. Determination of formaldehyde content by spectrophotometric method in some fresh water and marine fishes of Bangladesh. *Int J Fish Aquat Stud.* 2015;6:94-98.
62. Jansen PA, Bakke TA. Temperature-dependant reproduction and survival of *Gyrodactylus salaris* Malmberg, 1957 (Platyhelminthes-Monogenea) on Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Parasitol.* 1991;102:105-112.
63. Jia E, Yan Y, Zhou M, Li X, Jiang G, Liu W, Zhang D. Combined effects of dietary quercetin and resveratrol on growth performance, antioxidant capability and innate immunity of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*). *Animal Feed Sci and Tech.* 2019;256.
64. Jorgensen TR, Raida MK, Kania PW, Buchmann K. Response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in skin and fin tissue during infection with a variant of *Gyrodactylus salaris* (Monogenea: Gyrodactylidae). *Folia Parasitol.* 2009;56:251-258.
65. Kania PW, Evensen O, Larsen TB, Buchmann K. Molecular and immunohistochemical studies on epidermal responses in Atlantic salmon *Salmo salar* L. induced by *Gyrodactylus salaris* Malmberg, 1957. *J Helminthol.* 2010;84:166-172.
66. Khan H, Marya, Amin S, Kamal MA, Patel S. Flavonoids as acetylcholinesterase inhibitors: Current therapeutic standing and future prospects. *Biomed Pharmacother.* 2018;101:860-870.
67. Keck N, Blanc G. Effect of formalin chemotherapeutic treatments in a marine recirculating fish farming system. *Aquat Living Resour.* 2002;15:361-370.
68. Koski P, Anttila P, Kuusela J. Killing of *Gyrodactylus salaris* by heat and chemical disinfection. *Acta Vet Scand.* 2016;58:21.
69. Kountinkov E, Nayak D, Wilson M, Miller NW, Bengtén E. Expression of alternatively spliced CD45 isoforms by channel catfish clonal T and B cells is dependent on activation state of the cell and regulated by protein synthesis and degradation. *Dev Comp Immunol.* 2010;34:1109-1118.
70. Lazado CC, Caipang CMA, Estante EG. Prospects of host-associated microorganisms in fish and penaeids as probiotics with immunomodulatory functions. *Fish Shellfish Immunol.* 2015;45:2-12.

71. Levy G, Zilberg D, Paladini G, Fridman S. Efficacy of ginger-based treatments against infection with *Gyrodactylus turnbulli* in the guppy (*Poecilia reticulata* (Peters)). *Vet Parasitol.* 2015;209:235-241.
72. Li G, Shen X, Wey Y, Si X, Deng X, Wang J. Quercetin reduces *Streptococcus suis* virulence by inhibiting suilysin activity and inflammation. *Int Immunopharmacol.* 2019;69:71-78.
73. Lindenstrøm T, Buchmann K, Secombes CJ. *Gyrodactylus derjavini* infection elicits IL-1 β expression in rainbow trout skin. *Fish Shellfish Immunol.* 2003;15:107-115.
74. Lindenstrøm T, Secombes CJ, Buchmann K. Expression of immune response genes in rainbow trout skin induced by *Gyrodactylus derjavini* infections. *Vet Immunol Immunopathol* 2004;97:137-148.
75. Luchini L, Panne S, Huidobro (2008). Perspectivas en acuicultura: nivel mundial, regional y local. Disponible en http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_peces/piscicultura/113-perspectivas.pdf.
76. Marozzi C, Bertoni F, Randelli E, Buonocore F, Timperio AM, Scapigliati G. A monoclonal antibody for the CD45 receptor in the teleost fish *Dicentrarchus labrax*. *Dev Comp Immunol.* 2012;37:342-353.
77. Masafu MM. The evaluation of *Leucaena leucocephala* (Lam) de Wit: A renewable protein supplement for low-quality forages. Presented for the degree of Doctor of Philosophy. University of South Africa. 2006.
78. Matejusová I, Felix B, Sorsa-Leslie T, Gilbey J, Noble LR, Jones CS, Cunningham CO. Gene expression profiles of some immune relevant genes from skin of susceptible and responding Atlantic Salmon infected with *Gyrodactylus salaris* revealed by suppressive subtractive hybridization. *Int J Parasitol.* 2006;35:1175-1183.
79. Materska M. Quercetin and its derivatives: chemical structure and bioactivity-a review. *Polish J Food Nutr Sci.* 2008;58:407-413.
80. Mead J, McNair N. Antiparasitic activity of flavonoids and isoflavones against *Cryptosporidium parvum* and *Encephalitozoon intestinalis*. *FEMS Microbiol Lett.* 2006;259:153-157.
81. Mierziak J, Kostyn K, Kulma A. Flavonoids as important molecules of plant interactions with the environment, Review. *Molecules.* 2014;19:16240-16265.
82. Mor V, Rella A, Farnoud M., Singh A, Munshi M, Bryan A, Naseem S, Konopka JB, Ojima I, Bullesbach E, Ashbaugh A, Linke MJ, Cushion M, Collins M, Ananthula HK, Sallans L, Desai PB, Wiederhold NP, Fothergill AW, Kirkpatrick WR, Patterson T, Wong LH, Sinha S, Giaever G, Nislow C, Flaherty P, Pan X, Cesar GV, de Melo Tavares P, Frases S, Miranda K, Rodrigues ML, Luberto C, Nimrichter L, Del Poeta M. Identification of a New Class of Antifungals Targeting the Synthesis of Fungal Sphingolipids. *mBio*, 6(3), e00647, 2015.

83. Morales DA. La tilapia en México. Biología, cultivo y pesquerías. Agt Editor. 1991.
84. Muñoz CG, Garduño LM. Mejoramiento genético en tilapia. Sistemas de cruzamiento y mecanismos genéticos en la determinación del color. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México. Sistema de Investigación del Golfo de México del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Veracruz. 2003.
85. Noga EJ. Fish Disease. Diagnosis and Treatment. Second Edition. Wiley-Blackwell, 2010.
86. Oh SJ, Park J, Lee MJ, Park SY, Lee JH, Choi K. Ecological hazard assessment of major veterinary benzimidazoles: acute and chronic toxicities to aquatic microbes and invertebrates. Environ Toxicol Chem. 2006;25:2221-2226.
87. OIE, Código Sanitario para los Animales Acuáticos. Capítulo 7.3: Aspectos Relativos al bienestar en el aturdimiento y el sacrificio de peces de cultivo para consumo humano, 2017.
88. Olstad K, Cable J, Robertsen G, Bakke TA. Unpredicted transmission strategy of *Gyrodactylus salaris* (Monogenea: Gyrodactylidae): survival and infectivity of parasites on dead hosts. Parasitol. 2006;133:33-41.
89. Paladini G. Aspects of systematics and host specificity for *Gyrodactylus* species in aquaculture. Presented for the degree of Doctor of Philosophy. Institute of Aquaculture, School of Natural Sciences. University of Stirling, Stirling, Scotland. 2012.
90. Pastore C, Dal Santo S, Zenoni S, Movahed N, Allegro G, Valentini G, Filippetti I, Battista Tornielli G. Whole plant temperature manipulation affects flavonoid metabolism and the transcriptome of grapevine berries. Front Plant Sci. 2017;8(929).
91. Phelps RP, Cole W, Katz T. Effect of fluoxymesterone on sex ratio and growth of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). Aquac Res. 1992;23:405-410.
92. Pohl PC, Klafke GM, Carvalho DD, Martins JR, Daffre S, da Silva Vaz I, Masuda A. ABC transporter efflux pumps: a defense mechanism against ivermectin in *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*. Int J Paras. 2011;41:1323-1333.
93. Pontel L. Formaldehyde metabolism and its impact on human health. Curr Opin Toxicol. 2018.
94. Prasad V, Bobba K & Swamy P, Rao TS. Antibacterial synergy between quercetin and polyphenolic acids against bacterial pathogens of fish. Asian Pac J Trop Dis. 2014;4:326-329.
95. Randelli E, Buonocore F, Scapigliati G. Cell markers and determinants in fish immunology. Fish Shellfish Immunol. 2008;25:326-340.
96. Reyes AT, Paller VG, Ocampo PP. Sexual selection of parasites in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) Int J Fish Aquat Stud. 2019;7(6):335-339.
97. Roberts RJ. Fish Pathology. Fourth Edition. Wiley-Blackwell. 2012.

98. Rubio-Godoy M. Fish host-monogenean parasite interactions, with special reference to Polyopisthocotylea. *Adv Immunol Parasit Dis.* 2007;91-109.
99. Rubio-Godoy M, Paladini G, García-Vásquez A, Shinn AP. *Gyrodactylus jarocho* sp and *Gyrodactylus xalapensis* sp. (Platyhelminthes: Monogenea) from Mexican poecilids (Teleostei: Cyprinodontiformes), with comments on the known gyrodactylid fauna infecting poecilid fish. ISSN 1175-5326. 2010.
100. Rubio-Godoy M. Infecciones parasitarias y bacterianas de la tilapia mojarra; identificación, prevención, tratamiento. Instituto de Ecología, A.C. Xalapa. 36p. ISBN: 978-607-7579-34-2.2013.
101. Sanhueza L, Melo R, Monthero R, Maisey K, Mendoza L, Wilkens M. Synergistic interactions between phenolic compounds indentified in grape pomace extract with antibiotics of different classes against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Plos One.* 2017. DOI:10.1371/journal.pone.0172273.
102. Santamarina MT, Tojo J, Ubeira FM, Quinteiro P, Sanmartín ML. Anthelmintic treatment against *Gyrodactylus* sp. infecting rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Dis Aquat Org.* 1991;10:39-44.
103. Santos R, Dias HM, Fujimoto RY. Acute toxicity and histopathology in ornamental fish amazon bluespotted corydora (*Corydoras melanistius*) exposed to formalin. *An Acad Bras Cienc.* 2012;84:1001-7.
104. Schelkle B, Shinn AP, Peeler E, Cable J. Treatment of gyrodactylid infections in fish. *Dis Aquat Org.* 2009;86:65-75.
105. Schelkle B, Snellgrove D, Cable J. In vitro and in vivo efficacy of garlic compounds against *Gyrodactylus turnbulli* infecting the guppy (*Poecilia reticulata*). *Vet Parasitol.* 2013;198:96-101.
106. Shephard KL. Functions for fish mucus. *Rev Fish Biol Fish.* 1994;4:401-429.
107. Shinn A, Pratoomyot J, Jiracanichapisal P, Delannoy C, Kijphakapanith N, Paladini G, Griffiths D. Counting the cost of aquatic disease in Asia. *Aqua Culture.* 2016;18:12-14.
108. Soleng A, Jansen PA, Bakke TA. Transmission of the monogenean *Gyrodactylus salaris*. *Folia parasitol.* 1999;46:179-184.
109. Stratev D, Zhelyazkov G, Noundou XS, Krause RWM. Beneficial effects of medicinal plants in fish diseases. *Aquac Int.* 2018;26:289-308.
110. Sun W, Sanderson P, Zheng W. Drug combination therapy increases successful drug repositioning. *Drug Discov Today.* 2016;21:1189-1195.
111. Tanaka T. Leukocyte adhesion molecules, En: *Anatomy and Microanatomy of the Immune System.* 2016. Elsevier.

112. Tavares-Dias M, Martins ML. An overall estimation of losses caused by diseases in the Brazilian fish farms. *J Parasit Dis.* 2017;41:913-918.
113. Téllez Castañeda M. El economista: Perspectivas en la industria del cultivo de tilapia en México, 2019. Disponible en: <https://www.eleconomista.com.mx/opinion/Perspectivas-en-la-industria-del-cultivo-de-tilapia-en-Mexico-20190311-0099.html>
114. The World Bank, 2013. Introduction. Fish to 2030: Prospects for Fisheries and Aquaculture. The World Bank, Washington.
115. Tojo JL, Santamarina MT, Ubeira FM, Estevez J, Sanmartin ML. Anthelmintic activity of benzimidazoles against *Gyrodactylus* sp. infecting rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Dis Aquat Org.* 1992;12:185-189.
116. Tojo J, Santamarina MT, Ubeira FM, Estevez J, Leiro J, Sanmartin ML. Efficacy of anthelmintic drugs against gyrodactylosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Bull Eur Assoc Fish Pathol.* 1993;13:45-48.
117. Tojo JL, Santamarina MT. Oral pharmacological treatments for parasitic diseases of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* II: *Gyrodactylus* sp. *Dis Aquatic Org.* 1998;33:187-193.
118. Tu X, Ling F, Huang A, Zhang Q, Wang G. Anthelmintic efficacy of *Santalum album* (Santalaceae) against monogenean infections in goldfish. *Parasitol Res.* 2013;112:2839-2845.
119. Vallejos-Vidal E, Reyes López F, Teles M, MscKenzie S. The response of fish to immunostimulant diets. *Fish Shellfish Immunol.* 2016;56:34-69.
120. Van Hai N. The use of medicinal plants as immunostimulants in aquaculture: a review. *Aquacult.* 2015;446:88-96.
121. Verma VK, Rani KV, Sehgal N, Prakash O. Immunostimulatory effect of artificial feed supplemented with indigenous plants on *Clarias gariepinus* against *Aeromonas hydrophila*. *Fish Shellfish Immunol.* 2013;35:1924-1931.
122. Verma VK, Rani KV, Sehgal N, Prakash O. Enhanced disease resistance in the Indian snakehead, *Channa punctata* against *Aeromonas hydrophila*, through 5% feed supplementation with *F. benghalensis* (aerial root) and *L. leucocephala* (pod seed). *Aquacult Int.* 2014;23:1127-1140.
123. Verma VK, Rani KV, Kumar SR, Prakash O. *Leucaena leucocephala* pod seed protein as an alternate to animal protein in fish feed and evaluation of its role to fight against infection caused by *Vibrio harveyi* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Fish Shellfish Immunol.* 2018;76:324-332.
124. von Son-de Fernex E, Alonso MA, Mendoza de Gives P, Valles de la Mora B, González CM, Zamilpa A, Castillo ME. Elucidation of *Leucaena leucocephala* anthelmintic-like phytochemicals and the ultrastructural damage generated to eggs of *Cooperia* spp. *Vet Parasitol.* 2015;214:89-95.

125. Wu L, Gao A, Kong L, Wu S, Yang Y, Bian X, Guo Z, Li Y, Li B, Pan X, Ye J. Molecular characterization and transcriptional expression of a B cell transcription factor Pax 5 in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish Shellfish Immunol.* 2019;90:165-172.
126. Wang W, Sun J, Liu C, Xue Z. Application of immunostimulants in aquaculture: current knowledge and future perspectives. *Aquac Res.* 2016;1-23.
127. Wink M. Medicinal Plants: A source of Anti-Parasitic secondary metabolites. *Molecules.* 2012;17:12771-12791.
128. Wu ZF, Zhu B, Wang Y, Lu C, Wang GX. In vivo evaluation of anthelmintic potential of medicinal plant extracts against *Dactylogyrus intermedius* (Monogenea) in goldfish (*Carassius auratus*). *Parasitol Res.* 2011;108:1557-1563.
129. Xu DH, Shoemaker CA, Klesius PH. Evaluation of the link between gyrodactylosis and streptococcosis of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.). *J Fish Dis.* 2007;30:233-238.
130. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinform.* 2012;134(13).
131. Zhou S, Li WX, Zou H, Zhang J, Wu SG, Li M, Wang GT. Expression analysis of immune genes in goldfish (*Carassius auratus*) infected with the monogenean parasite *Gyrodactylus kobayashii*. *Fish Shellfish Immunol.* 2018;77:40-45.
132. Zayed MZ, Samling B. Phytochemical constituents of the leaves of *Leucaena leucocephala* from Malaysia. *Int J Pharm Pharm Sci.* 2016;12:174-179.