

La investigación reportada en esta tesis es parte de los programas de investigación del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, B.C.).

La investigación fue financiada por el CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología).

Todo el material contenido en esta tesis está 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.

CICESE@ 2022. Todos los derechos reservados

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Doctorado en Ciencias
en Acuicultura**

**Capacidad antihelmíntica del ajo contra *Zeuxapta seriolae* y su
efecto en las variables productivas y sanguíneas del jurel
*Seriola dorsalis***

Tesis
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Doctor en Ciencias

Presenta:

Candy Elizabeth Armuelles Bernal

Ensenada, Baja California, México
2022

Tesis defendida por
Candy Elizabeth Armuelles Bernal

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Mónica Hernández Rodríguez
Codirectora de Tesis

Dr. Benjamín Barón Sevilla
Codirector de Tesis

Dr. Miguel Ángel del Río Portilla

Dra. María de Lourdes Virginia Díaz Jiménez

Dr. Miguel Rubio Godoy



Dr. Roberto Cruz Flores
Coordinador del Posgrado en Acuicultura

Dr. Pedro Negrete Regagnon
Director de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Candy Elizabeth Armuelles Bernal** como requisito parcial para la obtención del grado de Doctor en Ciencias en Acuicultura

Capacidad antihelmíntica del ajo contra *Zeuxapta seriolae* y su efecto en las variables productivas y sanguíneas del jurel *Seriola dorsalis*

Resumen aprobado por:

Dra. Mónica Hernández Rodríguez
Codirectora de tesis

Dr. Benjamín Barón Sevilla
Codirector de tesis

En la búsqueda de alternativas preventivas y terapéuticas para organismos de interés acuícola, los estudios del uso de productos derivados de plantas se han incrementado en los últimos años. El presente trabajo evaluó el efecto del uso de ajo en diferentes presentaciones en *Seriola dorsalis*, con tres enfoques, tratamiento contra el parásito *Zeuxapta seriolae*, parámetros productivos y fisiológicos. Para esto, 1) se evaluó el efecto del extracto de ajo (EA) y disulfuro de alilo (DSA) en las fases de huevo y adultos de *Z. seriolae*. La exposición *in vitro* de los adultos a baños con 4 mL/L de EA produjo su desprendimiento de la lamela branquial y la muerte del 100 % del parásito. Los baños de inmersión *in vivo* con 4 mL de EA/L y 0.01 mg DSA/mL redujeron la intensidad media de los parásitos en los jureles. Aunque la concentración de 8 mL/L de EA redujo la cantidad de parásitos en los peces, se registraron signos de afectación. La exposición aguda de huevos a 16 mL/L de EA y 0.01 mg DSA/mL redujo la eclosión de los oncomiracidios, y en la exposición continua, a partir de 8 mL/L y en todos los tratamientos con DSA (0.01, 0.02, 0.03 y 0.04 mg/mL) no hubo eclosión. En la administración preventiva y correctiva de las dietas suplementadas con ajo no se registró un efecto en la intensidad parasitaria. 2) Se cuantificó el efecto de la administración oral de ajo en las variables productivas. En jureles no parasitados se observaron efectos ($p < 0.05$) en el aumento de consumo de dietas suplementadas con ajo, índice hepatosomático y peso. En peces parasitados del experimento oral preventivo se registró la disminución en el peso, ganancia de peso, tasa de crecimiento específica y el incremento en el consumo de alimento ($p < 0.05$); mientras que en el bioensayo correctivo, se encontró la disminución en los índices de condición y hepatosomático y un mayor consumo de alimento. La supervivencia de los peces no fue afectada por el consumo de ajo en el experimento oral preventivo (sin parásitos). Con la administración oral preventiva (fase de infestación parasitaria) y correctiva (peces parasitados), fue evidente una disminución de la supervivencia, particularmente en el grupo experimental que recibió dietas con 10 % de ajo ($p < 0.05$). 3) Se midió el efecto de la administración oral de ajo en los índices sanguíneos. En peces no parasitados, la adición de ajo en las dietas causó el incremento de la concentración de eritrocitos y alanina aminotransferasa (ALT) y la disminución del hematocrito y la concentración de leucocitos, proteínas totales, albúmina, globulinas. Mientras que en los peces parasitados que recibieron dietas con ajo en forma preventiva y correctiva se observaron cambios significativos ($p < 0.05$) en hematocrito y en las concentraciones de eritrocitos y leucocitos, proteínas totales, albúmina, globulinas y alanina aminotransferasa.

Palabras clave: *Allium sativum*, disulfuro de alilo, monogéneos, jurel, sangre, índices productivos

Abstract of the thesis presented by **Candy Elizabeth Armuelles Bernal** as a partial requirement to obtain the Doctor of Science degree in Aquaculture

Anthelmintic capacity of garlic against *Zeuxapta seriolae* and its effect on the productive and blood variables of California yellowtail *Seriola dorsalis*

Abstract approved by:

Dra. Mónica Hernández Rodríguez
Thesis Co-Director

Dr. Benjamín Barón Sevilla
Thesis Co-Director

In the search for preventive and therapeutic alternatives for organisms of aquaculture interest, studies on the use of plant-derived products have increased in recent years. The present work evaluated the effect of the use of garlic in different presentations in *Seriola dorsalis*, with three approaches, treatment against the parasite *Zeuxapta seriolae*, productive and physiological parameters. For this, 1) the effect of garlic extract (GE) and diallyl sulfide (DAS) on the egg and adult stages of *Z. seriolae* was evaluated. The *in vitro* exposure of the adults to baths with 4 mL/L of GE produced their detachment from the gill lamella and the death of 100 % of the parasite. In vivo immersion baths with 4 mL EA/L and 0.01 mg DAS/mL reduced the mean intensity of parasites in fish. Although the concentration of 8 mL/L of GE reduced the amount of parasites in the fish, signs of affectation were recorded. The acute exposure of eggs to 16 mL/L of GE and 0.01 mg DAS/mL reduced the hatching of oncomiracidia, and in continuous exposure, from 8 mL/L and in all treatments with DAS (0.01, 0.02, 0.03 and 0.04 mg/mL) there was no hatching. In the preventive and corrective administration of diets supplemented with garlic, no effect on parasite intensity was recorded. 2) The effect of oral administration of garlic on the productive variables was quantified. In non-parasitized California yellowtail, effects ($p < 0.05$) were observed in the increase in consumption of diets supplemented with garlic, hepatosomatic index and weight. In parasitized fish from the preventive oral experiment, the decrease in weight, weight gain, specific growth rate and increase in food consumption were recorded ($p < 0.05$); while in the corrective bioassay, a decrease in the condition and hepatosomatic indices and a higher feed consumption were found. Fish survival was not affected by garlic consumption in the preventive oral experiment (without parasites). With preventive (parasitic infestation phase) and corrective (parasitized fish) oral administration, a decrease in survival was evident, particularly in the experimental group that received diets with 10% garlic ($p < 0.05$). 3) The effect of oral administration of garlic on blood indices was measured. In non-parasitized fish, the addition of garlic in the diets caused an increase in the concentration of erythrocytes and alanine aminotransferase (ALT) and a decrease in hematocrit and the concentration of leukocytes, total proteins, albumin, globulins. While in the parasitized fish that received preventive and corrective diets with garlic, significant changes ($p < 0.05$) were observed in hematocrit and in the concentrations of erythrocytes and leukocytes, total proteins, albumin, globulins and alanine aminotransferase.

Keywords: *Allium sativum*, allyl disulphide, monogenea, California yellowtail, blood, productive indices

Dedicatoria

A mis padres por ser apoyo y ejemplo que la dedicación, respeto y esfuerzo permite cumplir metas.

A mi hermana por ser siempre la fuerza que necesito cuando siento que no puedo más.

A Abel y Abdiel, los corazones que laten fuera de mi pecho.

A Rodrigo Parra, por ser como el mar que tanto adoro... “Ah, señor, ¡Vivir en el seno del mar! Solo ahí se puede encontrar la independencia. ¡Ahí no reconozco a ningún maestro! Ahí soy libre”. *Julio Verne*.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo económico otorgado durante el periodo de estudios del presente Doctorado en Ciencias en Acuicultura.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE) porque dentro de muchos postulantes a nivel mundial, me seleccionaron y permitieron realizar mis estudios de Doctorado en el Departamento de Acuicultura.

Al equipo de la Dirección de Estudios de Posgrado, porque como una vez se los dije, nunca me hicieron sentir como un “número de matrícula” y siempre estuvieron atentos a resolver dudas y problemas.

A mi querido Departamento de Acuicultura, que fue mi espacio por tantos años. En donde aprendí con los mejores profesionales y donde conocí a tantas personas que hoy por hoy forman parte de mi crecimiento académico, profesional y personal.

A las empresas Ocean Baja Labs S. A. de C. V. y Maricultivos Baja Sel S. A. de C. V., ya que sin el valioso apoyo con la donación de jureles, no hubiese sido posible la realización de los bioensayos que conforman esta tesis.

Al Ing. Roberto Flores y al M. en C. Mauricio Moreno, por su apoyo en la obtención de la donación de peces.

A la Dra. Mónica Hernández por compartir conmigo sus conocimientos, disciplina y cariño por lo que hace. Gracias porque en cada uno de los momentos que la necesité estuvo ahí. Porque me dejó proponer un proyecto de tesis y me ayudó a madurarlo y llevarlo a cabo. Qué dicha que la vida me haya llevado a conocerla, tengo un gran respeto y admiración por usted.

Al Dr. Benjamín Barón Sevilla por sus siempre sabios comentarios que ayudaron a enriquecer este trabajo de tesis. Gracias porque me ayudó a darle forma a un diseño experimental que solo formaba parte de un cúmulo de ideas en mi cabeza y me apoyó en su realización. De usted me llevo el pensamiento crítico y el enfoque para realizar los proyectos. Mi respeto y admiración por lo que hace.

Al Dr. Miguel Ángel del Río por siempre ayudarme a ver las cosas desde diferentes perspectivas y su colaboración con comentarios y observaciones que han ayudado a enriquecer el presente documento.

A la Dra. Lourdes Díaz Jiménez, muchas gracias por sus aportes siempre a tiempo, su paciencia y permitirme obtener conocimientos y experiencias a través de su trayectoria en la academia.

Dr. Miguel Rubio Godoy mil gracias por su colaboración a hacer más claro y nutrido este trabajo. Además, de ayudar a darme cuenta de cómo implementar filtros en la información.

Al Técnico del Laboratorio de Ecofisiología de Organismos Acuáticos, Luis Murillo Valenzuela por su increíble apoyo en el traslado de peces, en el acondicionamiento de unidades de cultivo antes, durante y después de los experimentos, en la construcción de un modelo de sistema de recirculación, en la toma de muestras en cada uno de los bioensayos que se desarrollaron para llevar a cabo la presente tesis. Gracias Sr. Murillo por las agradables conversaciones con tacos de carnitas o caldo de opah en las bancas junto a los demás compañeros.

A las Secretarias: Dalila, Amparo, Sra. Cecilia y Bibiana gracias por su amable apoyo en cada uno de los momentos en que las necesité.

Al personal de seguridad por indicar en tiempo y forma cuando había fallas en el sistema, en especial a Don Mario.

Al M. en C. Abelardo Campos por su colaboración en la estandarización de la metodología para análisis de química sanguínea, uso de HPLC para análisis de la concentración de alicina de diversas fuentes de ajo y aminoácidos en las dietas de los peces, análisis proximal de dietas y polvo de ajo, cuantificación de leucocitos y eritrocitos. Gracias por las profundas conversaciones y momentos compartidos.

Al Dr. Jorge Madrid por su apoyo en instruirme en el procedimiento para elaboración de las dietas.

A la Maestra en Ciencias Yanet Guerrero Rentería, técnico del Laboratorio de Biología y Patología de Organismos Acuáticos del Departamento de Acuicultura, por el entrenamiento técnico en la preparación de muestras de tejidos de jurel *Seriola dorsalis* y su correspondiente procesado histológico; así como también en la elaboración de laminillas teñidas con los protocolos azul alciano, PAS y Hematoxilina-Eosina.

A los técnicos Jesús Mariscal, Francisco Morineau, Carlos Campos y Adrián Celaya por su respaldo en el acondicionamiento de las unidades de cultivo y las correcciones en el sistema de bombeo de agua.

A Danna Chávez, Lidia Cucala, Cristina Comparán, M. en C. Abraham Enrique Atondo, M. en C. Eliasid Nogueda, M. en C. Dora Alejandra Trejos y Dídac Zavala por su colaboración en el desarrollo de la tesis, ya sea participando en un muestreo o por compartir conmigo momentos amenos.

A Uvinai Salgado por ayudarme en el acondicionamiento de las unidades de cultivo y ser ese apoyo emocional en momentos complejos.

Al M. en C. Salvador Villasuso por tu apoyo en la realización de esta tesis. Mi admiración y agradecimiento siempre.

A la Dra. Beatriz Cordero y el Dr. Juan Pablo Lazo, por su colaboración en el uso de equipos y reactivos a su cargo para el desarrollo del análisis de muestras derivadas de los experimentos de tesis.

In memoriam del Dr. Manuel Segovia, el Dr. Luis Fernando Bückle Ramirez, la Dra. Marysabel Báez y el Dr. Eugenio Díaz por compartir consejo, conocimientos y experiencia, mi eterno agradecimiento.

Familia Araiza Zárate y Villasuso Palomares por su apoyo y cariño, por ser mi familia en México.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	xi
Lista de tablas	xiii
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 Antecedentes	1
1.2 Justificación	10
1.3 Objetivos	12
1.3.1 Objetivo general	12
Capítulo 2. Efecto de la administración de ajo en la supervivencia de <i>Zeuxapta seriolae</i>, un parásito de <i>Seriola dorsalis</i>.....	13
2.1 Hipótesis.....	13
2.2 Objetivos específicos.....	13
2.3 Metodología	14
2.3.1 Procedencia de los peces y los parásitos.....	14
2.3.2 Eutanasia	14
2.3.3 Baños de inmersión.....	15
2.3.3.1 Preparación del extracto de ajo (EA) y del disulfuro de alilo (DSA).....	15
2.3.3.2 Exposición <i>in vitro</i> de los adultos de <i>Z. seriolae</i> al extracto de ajo	16
2.3.3.3 Exposición <i>in vitro</i> de los huevos de <i>Z. seriolae</i> al extracto de ajo.....	16
2.3.3.4 Exposición <i>in vivo</i> de extracto de ajo en adultos de <i>Z. seriolae</i>	17
2.3.3.5 Exposición <i>in vivo</i> de adultos de <i>Z. seriolae</i> al disulfuro de alilo	18
2.3.4 Administración oral	18
2.3.4.1 Cuantificación de la alicina en el polvo de ajo.....	18
2.3.4.2 Preparación de las dietas	19
2.3.4.3 Análisis proximal de las dietas.....	20
2.3.4.4 Administración Oral Preventiva.....	20
2.3.4.5 Administración Oral Correctiva	21

2.3.4.6	Prevalencia e intensidad parasitaria media de <i>Z. seriolae</i>	22
2.3.4.7	Análisis estadístico	22
2.4	Resultados	23
2.4.1	Exposición <i>in vitro</i> de los adultos de <i>Z. seriolae</i> al extracto de ajo	23
2.4.2	Exposición <i>in vitro</i> de los huevos de <i>Z. seriolae</i> al extracto de ajo.....	24
2.4.3	Exposición <i>in vivo</i> de extracto de ajo a los adultos de <i>Z. seriolae</i>	25
2.4.4	Exposición <i>in vivo</i> de disulfuro de alilo a los adultos de <i>Z. seriolae</i>	26
2.4.5	Efecto de la administración oral preventiva de alimento suplementado con polvo de ajo a juveniles de <i>S. dorsalis</i> parasitados con <i>Z. seriolae</i>	27
2.4.6	Efecto de la administración oral correctiva de alimento suplementado con polvo de ajo a juveniles de <i>S. dorsalis</i> parasitados con <i>Z. seriolae</i>	28
2.5	Discusión	29

Capítulo 3. Efecto de la administración oral de ajo en las variables productivas de *Seriola dorsalis* antes y después de la infestación con *Z. seriolae*.....

3.1	Hipótesis.....	35
3.2	Objetivos específicos.....	35
3.3	Metodología	36
3.3.1	Tratamiento oral preventivo	36
3.3.2	Tratamiento oral correctivo	36
3.3.3	Manejo de los peces.....	36
3.3.4	Variables productivas	37
3.3.4.1	Peso	37
3.3.4.2	Ganancia de peso (GP)	37
3.3.4.3	Índice de Condición de Fulton (ICF).....	37
3.3.4.4	Índice hepatosomático (IHS)	37
3.3.4.5	Consumo de alimento	38
3.3.4.6	Tasa de crecimiento específico (TCE)	38
3.3.4.7	Factor de conversión alimenticia (FCA)	38
3.3.5	Análisis estadístico	39
3.4	Resultados	39
3.4.1	Efecto de la administración oral preventiva con ajo (día 0 y 32) en peces no parasitados... ..	39

3.4.2	Efecto de la administración oral preventiva (día 60) y correctiva (día 0 y 30) con ajo en peces parasitados	41
3.5	Discusión	44
Capítulo 4. Efecto de la administración oral de ajo en los índices sanguíneos de <i>Seriola dorsalis</i> antes y después de la infestación con <i>Z. seriolae</i>51		
4.1	Hipótesis.....	51
4.2	Objetivos específicos.....	51
4.3	Metodología	52
4.3.1	Obtención y manejo de las muestras de sangre	52
4.3.2	Hematocrito	52
4.3.3	Recuento total de eritrocitos y leucocitos	52
4.3.4	Química sérica	53
4.3.4.1	Proteínas totales	54
4.3.4.2	Albumina	54
4.3.4.3	Globulinas.....	54
4.3.4.4	Aspartato y Alanina aminotransferasa (AST y ALT)	55
4.3.5	Análisis estadístico	55
4.4	Resultados	55
4.4.1	Hematocrito y recuento total de eritrocitos y leucocitos	55
4.4.2	Química sérica	58
4.5	Discusión	62
Capítulo 5. Conclusiones69		
Literatura citada71		

Lista de figuras

Figura	Página
1. Formación de compuestos organosulfurados (Traducido de Corzo-Martínez et al., 2007)....	7
2. Preparación de las dietas: preparación húmeda pasando por el cedazo (izquierda) y partículas de alimento deshidratadas (derecha).....	19
3. Tiempo de desprendimiento (h) registrado para los adultos de <i>Z. seriolae</i> expuestos a baños de inmersión con extracto de ajo (1 a 128 mL/L), agua de mar (control negativo) y agua dulce (control positivo). Media $\pm$ error estándar. Diferentes letras corresponden a diferencias significativas, $p < 0.001$	23
4. Supervivencia de los adultos de <i>Z. seriolae</i> expuestos a agua de mar, agua dulce y extracto de ajo (1 a 128 mL/L). Media $\pm$ error estándar. Letras diferentes representan las diferencias entre los tratamientos, $p < 0.001$	24
5. Porcentaje de eclosión de oncomiracidios de huevos expuestos a baños de inmersión con agua de mar, agua dulce y extracto de ajo (1 a 128 mL/L) durante (A) 1 hora (exposición aguda) y (B) durante todo el tiempo de incubación (exposición continua). Media $\pm$ error estándar. Letras diferentes representan las diferencias significativas entre los tratamientos, $p < 0.001$	25
6. Branquias de jureles: a) no expuestos a extracto de ajo, b) expuestos a 8 mL/L de extracto de ajo.....	26
7. Intensidad parasitaria media de <i>Z. seriolae</i> en peces que recibieron dietas suplementadas con polvo de ajo (0, 4, 10 y 25 %) de forma preventiva. Media $\pm$ error estándar. Diferentes letras representan diferencias significativas entre tratamientos, $p < 0.05$	28
8. Intensidad parasitaria media de peces antes (inicial) y después de ser alimentados correctivamente con dietas suplementadas con polvo de ajo (0, 4 y 25 %). Media $\pm$ error estándar. Diferentes letras representan las diferencias significativas entre tratamientos, $p < 0.05$	29
9. Supervivencia del jurel (<i>Seriola dorsalis</i>) no parasitados y alimentados preventivamente con dietas suplementadas con 0, 4, 10 y 25 % de polvo de ajo. Media $\pm$ error estándar.	41
10. Supervivencia del jurel (<i>Seriola dorsalis</i>) parasitado con <i>Zeuxapta seriolae</i> y alimentados preventivamente con dietas suplementadas con 0, 4 y 25 % de polvo de ajo a partir del día 31. Media $\pm$ error estándar. Letras diferentes representan las diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$).	43
11. Supervivencia del jurel (<i>Seriola dorsalis</i>) parasitados con <i>Zeuxapta seriolae</i> y alimentados correctivamente con dietas suplementadas con 0, 4, 10 y 25 % de polvo de ajo. Media $\pm$ error estándar. Letras diferentes representan las diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$).	44

12. Cámara del hematocitómetro: cuadrantes para el recuento de eritrocitos (cuadro central) y leucocitos (cuadrantes externos identificados con "L").	53
---	----

Lista de tablas

Tabla	Página
1. Contenido de alicina correspondiente a cada concentración de extracto de ajo evaluada.....	16
2. Concentración de alicina en diferentes presentaciones polvo de ajo.....	19
3. Intensidad parasitaria media de <i>Z. seriolae</i> después de la exposición <i>in vivo</i> con extracto de ajo.	26
4. Intensidad parasitaria media de <i>Z. seriolae</i> después de la exposición <i>in vivo</i> con disulfuro de alilo.....	27
5. Análisis proximal del polvo de ajo y las dietas suplementadas con 0, 4, 10 y 25 % de polvo de ajo (PA).	27
6. Variables productivas del jurel (<i>Seriola dorsalis</i>) no parasitados y alimentados preventivamente con dietas suplementadas con 0, 4, 10 y 25 % de polvo de ajo.....	40
7. Variables productivas del jurel (<i>Seriola dorsalis</i>) parasitado con <i>Zeuxapta seriolae</i> y alimentados de forma preventiva y correctiva con dietas suplementadas con polvo de ajo y control sin ajo.	42
8. Parámetros hematológicos de jureles (<i>S. dorsalis</i>) no parasitados y alimentados preventivamente con dietas suplementadas con de polvo de ajo y control sin ajo.	56
9. Parámetros hematológicos de jureles (<i>S. dorsalis</i>) parasitados y alimentados de forma preventiva y correctiva con dietas suplementadas con polvo de ajo y control sin ajo.	57
10. Química sanguínea de jureles (<i>S. dorsalis</i>) sin parásitos, alimentados preventivamente con dietas suplementadas con polvo de ajo y control sin ajo. Evaluados a los 0 y 32 días.	59
11. Química sanguínea de jureles (<i>S. dorsalis</i>) parasitados, alimentados preventivamente (día 60) y correctivamente (días 0 y 30) con dietas suplementadas con polvo de ajo y control sin ajo.....	61

Capítulo 1. Introducción

1.1 Antecedentes

En 2018, la producción acuícola marina mundial fue de 30.8 millones de toneladas (FAO, 2020) y en 2020, incrementó a 33.1 millones de toneladas (FAO, 2022). El abastecimiento de alimentos a una población en continuo crecimiento es uno de los grandes desafíos productivos de los próximos años, por lo que la acuicultura sostenible es una de las fuentes para aportar alimentos a una población que se espera sea de 9.6 mil millones en el 2050 (Msangi et al., 2013; ONU, 2014). Pero este incremento en la producción debe cuidar varios aspectos, tales como la fuente y genotipo del lote de peces, la densidad de cultivo, defectos en el desarrollo, la movilización de organismos, las condiciones ambientales adecuadas para cada especie, la nutrición y las medidas de bioseguridad, así como conocer la biología del entorno, lo que implica entender las interacciones entre los organismos silvestres y los cultivados. El manejo inadecuado de un cultivo acuícola puede producir errores u omisiones que propicien el desarrollo de condiciones clínicas adversas que limitan la salud y el desempeño de los organismos acuáticos (McVicar, 1997; Subasinghe et al., 2001; Olivier, 2002; Bondad-Reantaso et al., 2005; Shinn et al., 2015).

Para evitar el desarrollo de cuadros infecciosos en los organismos de cultivo, se debe tener conocimiento de su biología y de los posibles patógenos; además, se deben implementar monitoreos sanitarios frecuentes que permitan hacer diagnósticos antes que aumente la morbilidad y mortalidad (OIE, 2012a). Así mismo, la aplicación de buenas prácticas de cultivo, tales como evitar altas densidades de cultivo, proveer a los peces de alimentos que cumplan con los requerimientos nutricionales de cada especie en cuanto a cantidad y calidad; monitorear diariamente las variables de la calidad del agua como temperatura, oxígeno, pH y desechos nitrogenados, entre otros, son fundamentales para evitar problemas sanitarios. Estas prácticas, además permiten detectar en forma oportuna las alteraciones del cultivo, lo que permite corregirlas. Además, cuando se manipulen o trasladen a los organismos se deben utilizar instrumentos adecuados y desinfectados, así como técnicas apropiadas para evitar ocasionarles estrés (Johansen et al., 2006; Timmons et al., 2009). Otro punto a destacar es que es recomendable que los lotes de organismos nuevos que se introducirán a las unidades de cultivo permanezcan en cuarentena para monitorear su comportamiento y estado de salud antes de ponerlos en contacto con otros individuos (OIE, 2013). En relación con los protocolos sanitarios, también se deben mantener las instalaciones limpias, tales como estanques, redes y otros materiales, remover los organismos muertos tan pronto sean detectados;

en caso de haber incidencia de enfermedades de notificación obligatoria se debe implementar el sacrificio sanitario para evitar que el patógeno llegue a las unidades de cultivo sanas (Rottmann et al., 1992; Timmons et al., 2009; Peeler & Feist, 2011).

Uno de los grupos de parásitos que tiene mayor impacto en la economía acuícola, son los monogéneos (Ogawa, 1996; Ernst et al., 2002). La presencia de parásitos monogéneos, especialmente *Zeuxapta seriolae*, se ha reportado en peces marinos silvestres de la familia Carangidae como *Seriola lalandi* en Brasil, Australia y México, *Caranx hippos* en México y Australia y *Seriola dumerili* en Italia y España (Lamothe-Argumedo, 1970; Lia et al., 2007; Repullés-Albelda et al., 2013; Mendoza-Garfias et al., 2017; Camargo y Santos, 2020). En condiciones de maricultivo, la presencia de este parásito se ha reportado en *S. dumerili* en España y *S. lalandi* en Australia (Grau et al., 2003; Montero et al., 2004; Hutson et al., 2007; Stephens & Savage, 2010; Fensham et al., 2018). Shinn et al. (2015) indicaron que las pérdidas económicas ocasionadas por los parásitos no se refieren solamente a la mortalidad, sino que hay un impacto directo en la productividad, porque los individuos tienen un crecimiento menor, se registran alteraciones en la tasa de conversión alimenticia y el producto puede ser rechazado por el consumidor, ya que puede tener un aspecto inadecuado; sin embargo, la estimación de los costos asociados a esta reducción de la calidad de los productos acuícolas por la acción de los patógenos es difícil de calcular, debido a que interactúan diferentes factores. Las pérdidas económicas reportadas solamente en cultivos de carángidos afectados por parásitos monogéneos, ascendió a 220 mdd aproximadamente entre el 2003 y 2005 (Shinn et al., 2015).

Los parásitos monogéneos pertenecen al filo platelminta, tienen un ciclo de vida directo y se dividen en dos subclases: monopistocotíleos y poliopistocotíleos. Los primeros se caracterizan por tener un aparato de fijación dividido por septos, tienen de uno a tres pares de ganchos centrales, además de ganchos marginales que utilizan para penetrar la epidermis del hospedero, lo que le ocasiona lesiones que se pueden agravar por el movimiento de fricción contra las superficies, la disminución de la respuesta inmune por deterioro de la salud y el desarrollo de infecciones secundarias (Eiras, 1994; Whittington, 2012). Mediante el uso de secreciones proteolíticas de la faringe, desprenden las células epiteliales del hospedero y las aprovechan como alimento (Whittington, 2012). Los parásitos *Benedenia seriolae* (Sharp et al., 2004; Hutson et al., 2007; Williams et al., 2007), *Neobenedenia girellae* (Ohno et al., 2008, 2009; Hirayama et al., 2009) y *Gyrodactylus salaris* son ejemplos de esta subclase (OIE, 2021). Cabe destacar que este último está listado por la OIE como uno de los patógenos de declaración obligatoria.

Los poliopistocotíleos cuentan en su morfología con complejos de varios ganchos y ventosas que les da la capacidad de adherirse al tejido del hospedero (Eiras, 1994; Rubio-Godoy, 2007). Estos parásitos son hematófagos, y se ha reportado la preferencia en el sitio de fijación y alimentación dependiendo de la especie (Rubio-Godoy, 2007). Tal es el caso de *Discocotyle sagittata* que ha presentado preferencia por el primero y segundo arcos branquiales (Rubio-Godoy, 2008), *Diclidophora merlangi* se ha encontrado mayormente en el primer arco branquial y *Axine belone* en el segundo y tercer arco (Llewellyn, 1956).

Z. seriolae pertenece a la clase poliopistocotílea y presenta un ciclo de vida que está conformado por las fases de huevo, larva y adulto. Los huevos son de tonalidad amarillenta, de forma ovalada y están formados por una cubierta rígida de naturaleza proteica que les permite resistir condiciones ambientales adversas y compuestos químicos; tienen un filamento en uno de sus dos polos que les permite unirse entre sí para formar masas de huevos, lo que facilita la sujeción a las superficies, como las mallas utilizadas en el cultivo de peces (Lamothe-Argumedo, 1970; Yoshinaga et al., 2000; Montero et al., 2004; Ernst et al., 2005; Whittington y Kearn, 2011; Woo y Buchmann, 2012). La incubación de los huevos toma de 5 a 7 días aproximadamente a 21 °C y culmina con la eclosión de la larva infestante u oncomiracidio (Tubbs et al., 2005).

Una vez que los oncomiracidios se adhieren a sus hospederos, comienza el proceso de alimentación hasta llegar a la etapa adulta. *Z. seriolae* alcanza la madurez sexual a los 25 días (a 21 °C) después de la fijación. En esta etapa, un adulto puede llegar a producir y liberar entre 270 a 504 huevos/día a 18 °C (Tubbs et al., 2005; Mooney et al., 2006). Este parásito se alimenta de la sangre de los hospederos, misma que ingiere de los vasos sanguíneos de las branquias (Mooney et al., 2006). La sangre es digerida con mucha rapidez y es ingerida por células ameboides, el producto nutritivo de la hemólisis es la globina y se ha reportado la excreción de la hematina intacta a través de las células epiteliales del intestino de los poliopistocotíleos (Llewellyn, 1954). *Z. seriolae* se adhiere a una o dos lamelas branquiales a través de los ganchos del haptor, donde ocasiona palidez del tejido branquial, hipersecreción de moco, deformación de la estructura lamelar, adhesión y posterior fusión de lamelas contiguas y zonas blanquecinas en el tejido branquial (Montero et al., 2004; Lu et al., 2012). En otros monogéneos hematófagos se ha reportado la infiltración de leucocitos, relacionada con el proceso inflamatorio y un aumento de células ricas en mitocondrias (Ogawa, 2002; del Rio-Zaragoza et al., 2010).

Los parásitos hematófagos producen efectos negativos a nivel sistémico en el hospedero, entre los que se han reportado la disminución del hematocrito y del volumen sanguíneo circulante (Llewellyn, 1954; Montero et al., 2004; Lu et al., 2012). La disminución del hematocrito se relaciona con la ingesta de sangre

por parte del parásito y la pérdida de sangre por la ruptura de los vasos marginales en las branquias, ocasionada por los ganchos del parásito. Además, hay una disminución de la hemoglobina y un aumento de la circulación de eritrocitos inmaduros, lo que indica un estado anémico en los peces y un aumento en la cantidad de eosinófilos en el torrente sanguíneo (Yoshinaga et al., 2001; Molnár y Székely, 2004). Estas respuestas se han asociado con una ligera palidez en el hígado y bazo de *S. dumerili* (Montero et al., 2004). La anemia, las lesiones en las branquias y la interrupción del flujo normal del agua en las branquias por la presencia del parásito, ocasionan un mal funcionamiento de la estructura branquial, lo que dificulta el intercambio gaseoso y el transporte de oxígeno a los tejidos (Montero et al., 2004; Feist y Longshaw, 2008). En esta condición, el hospedero está comprometido inmunológicamente y es posible que otros organismos patógenos oportunistas como virus, hongos y bacterias lo invadan, como es el caso de la epiteliocistis, ocasionada por una bacteria gram negativa, que coloniza las branquias deteriorando aún más la capacidad respiratoria y osmoreguladora, como se describió en *S. dumerili* previamente parasitado con *Z. seriola* (Montero et al., 2004).

La extensión de los daños que puedan ocasionar los parásitos monogéneos está relacionada con la condición de los peces. El análisis de la dinámica estacional de la carga parasitaria de *Z. seriola* en *S. dumerili*, capturado del medio silvestre en los meses más cálidos (abril-octubre), cuando la temperatura del agua se incrementó de 17.3 a 27 °C, indicó que hay una disminución del peso de los peces y un aumento en la intensidad y abundancia parasitaria; lo que podría ser la causa de la mortalidad de los organismos (Repullés-Albelda et al., 2013). El incremento de la temperatura ambiental se relaciona con un aumento del consumo de energía, una disminución de la eficiencia para aprovecharla, una limitación en la disponibilidad de oxígeno y eventualmente un aumento de la mortalidad (Neubauer y Andersen, 2019), que si se suma a las lesiones que ocasiona *Z. seriola* en el tejido branquial de los peces, los individuos tendrán menos posibilidades de sobrevivir a las condiciones térmicas adversas.

Teniendo en perspectiva el impacto negativo de las infestaciones con monogéneos y el efecto fisiológico en los peces, es importante para la industria acuícola encontrar un método eficaz para eliminar o reducir la carga parasitaria. En México es necesario tomar acciones en este sentido, considerando que el cultivo de *S. dorsalis* y *S. rivoliana* está en su fase de crecimiento y que no se han reportado mortalidades masivas hasta el momento (Avilés-Quevedo y Castelló-Orvay, 2004; Valles-Vega et al., 2019; Vivanco-Aranda et al., 2019). Los compuestos químicos comerciales como el prazicuantel, la formalina o el peróxido de hidrógeno (Sharp et al., 2004; Hirazawa et al., 2016) se usan para tratar infestaciones con parásitos monogéneos. El prazicuantel es un antihelmíntico desarrollado para el tratamiento de infecciones con gusanos planos, especialmente en el tratamiento de *Schistosoma* sp. en humanos (WHO, 2020). Se sabe que el prazicuantel

actúa incrementando la permeabilidad de los canales de calcio en el tegumento o músculo del parásito (Martin, 1997; Doenhoff et al., 2008). En peces se ha utilizado con éxito para el tratamiento de monogéneos, aunque sin la aprobación de las entidades internacionales que regulan el uso de fármacos en productos para consumo humano, porque hacen falta evidencias de que realmente no represente un riesgo para los peces, el ambiente y el consumidor (Forwood et al., 2016).

La administración oral de 50 y 75 mg/kg/día de prazicuantel durante 6 días disminuyó la intensidad de *Z. seriolae*, *B. seriolae* y *Lepidotrema bidyana*, pero se registró una baja palatabilidad del alimento (Williams et al., 2007; Forwood et al., 2013). Para resolver el problema de aceptación y el consumo del alimento con prazicuantel, Blumenthal (2014) utilizó 50 mL de extracto de ajo/kg de dieta para poder mejorar la palatabilidad del alimento. En *S. lalandi*, la administración de baños de inmersión con prazicuantel a razón de 2.5 ppm y 10 mg/L durante 48 h removió a *B. seriolae* e inhibió la producción de huevos, y en *Z. seriolae* y *L. bidyana* tuvo un 99 % de efectividad en la remoción de parásitos, sin embargo, no afectó la producción de huevos (Sharp et al., 2004; Forwood et al., 2013). El prazicuantel no es efectivo contra todas las fases del ciclo de vida del parásito (Gönnert y Andrews, 1977; Sharp et al., 2004; Botros et al., 2005) y aunque no hay evidencias de que se presente resistencia en parásitos de peces, se tiene la precaución de lo que pueda suceder si se utiliza en forma indiscriminada, como está ocurriendo en el tratamiento de *Schistosoma* sp. en algunas regiones del mundo (Ismail et al., 1999; Doenhoff et al., 2002, 2008).

La formalina (CH₂O, formaldehído 37% p/p) es otro de los productos químicos utilizados contra infestaciones con parásitos monogéneos. Este compuesto actúa sobre los grupos funcionales de macromoléculas como las proteínas, polisacáridos, glucoproteínas, DNA y RNA (Fox et al., 1985; Leal et al., 2018). Su uso es muy frecuente y está aprobado por la Administración de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos de América (FDA, por sus siglas en inglés U. S. Food and Drug Administration) (FDA, 2021) para el control de hongos en huevos de peces y de parásitos externos de peces como los monogéneos *Cleidodiscus* spp., *Gyrodactylus* spp. y *Dactylogyrus* spp. La aplicación de baños de inmersión con 250 y 400 ppm de formalina durante 1 h, seguido de un baño con agua dulce, removió el 80 % de *B. seriolae* e inhibió la producción de huevos, además removió un 99 % de *Z. seriolae*, pero sin afectar su producción de huevos (Sharp et al., 2004). El uso de 300 ppm de formalina durante un minuto en condiciones *in vitro*, impidió la eclosión de los oncomiracidios y causó la mortalidad de oncomiracidios y adultos de *Sparicotyle chrysophrii* (Sitjà-Bobadilla et al., 2006). Por otro lado, Diggles et al. (1993) reportaron una reducción de la viabilidad y supervivencia de adultos y oncomiracidios de *Polylabroides multispinosus* con 200 ppm de formalina durante 30 min y la remoción total de adultos y juveniles con 400 ppm por 25 min. Sin embargo, el uso de formalina no es efectivo en todas las fases del ciclo de vida de algunos monogéneos (Sharp et al.,

2004), además puede causar daños al medio ambiente (Morley, 2009), tiene actividad alguicida, deteriora la calidad de los biofiltros (Neely, 1963) y puede afectar la salud del personal encargado de manejar estos productos (Wooster et al., 2005).

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es un fármaco que se utiliza frecuentemente en Australia para el tratamiento efectivo de monogéneos de la piel y branquias de *Seriola* sp., su uso no representa riesgos para la seguridad alimentaria y está aprobado por la FDA (Mansell et al., 2005; FDA, 2021). Esta entidad ha aprobado el uso de solamente una forma farmacéutica o medicamento del peróxido de hidrógeno: el 35 % PEROX-AID®. La administración de baños con 300 ppm de peróxido de hidrógeno por 10 min fue suficiente para remover a *Z. seriola* de las branquias de *S. lalandi* (Mansell et al., 2005). Rach et al. (2000) reportaron que el uso de 170 a 560 mg/L de peróxido de hidrógeno eliminó a *Gyrodactylus* sp. de la piel de la trucha arcoiris *Oncorhynchus mykiss*. Hirazawa et al. (2016) argumentaron que la administración de tratamientos con 75 ppm de peróxido de hidrógeno durante 30 min eliminó a *B. seriola*, *N. girellae* y *Z. seriola* de *S. dumerili*, sin afectar la supervivencia del hospedero. Sin embargo, Kierner y Black (1997) argumentaron que hay una correlación positiva entre la concentración de peróxido de hidrógeno y el grado de daño branquial, que aumenta a medida que hay un incremento en la temperatura del agua.

El análisis de las ventajas y desventajas de los tratamientos antes expuestos ha conducido a que la industria y la academia se interesaran en la investigación del potencial de las plantas como una alternativa al uso de las terapias que ya se utilizan (Hirazawa et al., 2000; Wu et al., 2011; Bulfon et al., 2015; Stratev et al., 2018; Trasviña-Moreno et al., 2019; Zorin et al., 2019). La Organización Mundial de la Salud resalta que la medicina tradicional se refiere a los “conocimientos, aptitudes y prácticas con base en las teorías, creencias y experiencias indígenas de las diferentes culturas, sean o no explicables, usadas para conservar la salud, además de la prevención, diagnóstico, la mejora o el tratamiento de enfermedades físicas y mentales” (WHO, 2000). Por otro lado, la medicina alternativa se refiere al conjunto de prácticas de atención de salud que no forman parte de la propia tradición del país y no están integradas en el sistema sanitario principal (WHO, 2000). Además, incluye el estudio de suplementos botánicos de las dietas, incluyendo los remedios herbales, así como la búsqueda de compuestos específicos que puedan llegar a ser medicamentos aprobados por entidades como la FDA (Balunas y Kinghorn, 2005). Tal es el caso del ajo, la cebolla y la papaya, que son plantas aprobadas para su uso como antiparasitario y para mejorar la tasa de eclosión de huevos de peces (FDA, 2011).

El ajo (*Allium sativum*) pertenece a la familia Liliaceae, es una planta originaria de Asia Central que se utiliza en la gastronomía y con fines medicinales (Corzo-Martínez et al., 2007). El bulbo del ajo está compuesto

por 65 % de agua, 28 % de carbohidratos en forma de fructanos, 2.3 % de compuestos organosulfurados, 2 % de proteínas, 1.2 % de aminoácidos libres y 1.5 % de fibra (Santhosha et al., 2013). Esta planta se caracteriza por la concentración de compuestos organosulfurados, el contenido de azufre es cuatro veces mayor que en otros productos como el brócoli, la cebolla y la coliflor, entre otros (Lawson, 1998).

Los compuestos organosulfurados más abundantes en el ajo entero, identificados hasta el momento, son el γ -glutamyl-S-alkil cisteína y el sulfóxido de S-alkil cisteína (Figura 1), que generan compuestos como S-alilcisteína y alina, respectivamente (Lawson, 1998; Lanzotti, 2006; Corzo-Martínez et al., 2007). La alina carece de olor y es el compuesto azufrado más abundante en el ajo (6-14 mg/g de peso húmedo) y es precursor de los compuestos de importancia terapéutica (Lawson, 1998; Prati et al., 2014). La síntesis de los compuestos derivados de la alina se inicia al momento en que el bulbo de ajo es fracturado, ya que las vacuolas liberan la alinasa, que entra en contacto con la alina libre en el citoplasma, de esta manera se producen ácidos sulfénicos intermediarios muy reactivos que por condensación se transforman en alicina (Lanzotti, 2006; Corzo-Martínez et al., 2007; Díaz y Jiménez, 2008; Prati et al., 2014).

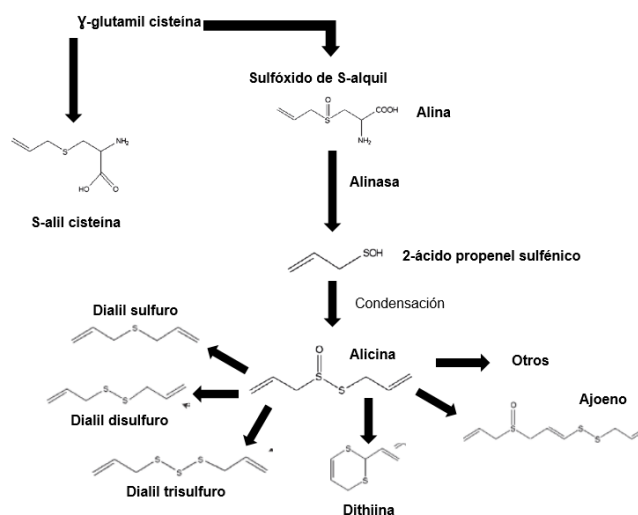


Figura 1. Formación de compuestos organosulfurados (Traducido de Corzo-Martínez et al., 2007)

La alicina (S-2-propenil éster del ácido 2-propenol-1-sulfino) es el producto más abundante en el ajo, ya que representa del 60 al 90 % de productos sulfurados formados a partir de la alina (Lawson, 1998). Es un producto muy inestable (según el solvente con el cual se mezcle, la temperatura y la concentración) y es al que se le atribuye el olor característico del ajo fresco, pero después de 30 min se debe a productos de la descomposición de la alicina, como el dialil disulfuro (Lawson, 1998).

La aplicación de tratamientos con ajo se realiza con mayor frecuencia y exitosamente por vía tópica (baños de inmersión) y oral. La exposición al ajo en baños de inmersión se ha utilizado para el tratamiento de protozoarios como *Ichthyophthirius multifiliis* y *Trichodina* sp. (Chitmanat et al., 2005; Gholipour-Kanani et al., 2012) y de monogéneos como *Neobenedenia* sp. y *Gyrodactylus turnbulli* (Schelkle et al., 2013; Militz et al., 2014). El resultado de estas evaluaciones ha indicado que hay una disminución de la carga parasitaria y que las soluciones a base de ajo con concentraciones de hasta 0.5 mg/mL no causan mortalidad en los hospederos. En cambio, la administración oral de ajo ha demostrado que tiene efectos tanto preventivos como correctivos contra parásitos monogéneos de la piel como *G. turnbulli* (en *Poecilia reticulata*), y *Neobenedenia* sp. (en *Lates calcarifer* y *S. lalandi*) (Militz et al., 2013; Fridman et al., 2014; Ingelbrecht et al., 2020) y en *Zeuxapta seriolae*, parásito branquial de *S. lalandi* (Ingelbrecht et al., 2020) y *Anacanthorus penilabiatus* en *Piaractus mesopotamicus* (Martins et al., 2002). La vía oral es la forma más utilizada para la dosificación de productos con fines terapéuticos, pero el éxito de esta forma de medicación depende en gran medida de que los organismos se mantengan consumiendo el alimento medicado (Rodgers y Furones, 2009). En este sentido, la inclusión del polvo de ajo en las partículas de alimento, es la forma más común de suministrar los compuestos terapéuticos de este vegetal, ya que la concentración de alicina en el polvo de ajo es similar al del ajo fresco (Lawson, 1998).

La forma en que las sustancias vegetales son adicionadas a las dietas toma importancia desde el punto de vista de la concentración del producto en el alimento. El recubrimiento externo es una forma rápida y relativamente sencilla de agregar el ajo. Sin embargo, por su contacto directo con el agua y dependiendo del comportamiento alimenticio de los peces, puede haber pérdida de los compuestos activos por lixiviación. Armuelles Bernal (2016) reportó la pérdida por lixiviación del 28 % de alicina en el alimento suplementado con 2 % de polvo de ajo y del 65 % en el alimento adicionado con el 4 % de polvo de ajo, ambas por 30 s. Por otro lado, Militz et al. (2013), reportaron que con la adición 150 mL de extracto de ajo por kg de dieta, previo al proceso de pelletización, había una importante reducción en la pérdida de alicina, de solo el 3 %, además, esta forma de inclusión previene la pérdida de los compuestos de ajo por procesos de lixiviación (Militz et al., 2013).

Para evaluar el efecto del ajo en el desempeño fisiológico de los peces, se han utilizado las variables sanguíneas. La ingestión de alimentos enriquecidos con ajo ha producido diferentes efectos sobre las variables de la hematología y química sanguínea de *O. mykiss*, *L. calcarifer*, *P. mesopotamicus* y *O. niloticus* (Martins et al., 2002; Cunningham, 2003; Aly et al., 2008; Nya y Austin, 2009; Nya et al., 2010; Talpur e Ikhwanuddin, 2012; Felicitta et al., 2013; Mehrim et al., 2014). La sangre es un tejido compuesto por células y plasma que funcionan como medio de transporte de sustancias como el oxígeno, glucosa, lípidos

y aminoácidos, además de sustancias de desecho como el dióxido de carbono y compuestos nitrogenados, entre otros (Cunningham, 2003). La porción celular de la sangre está conformada por eritrocitos y leucocitos (Stoskopf, 1993).

Los eritrocitos o glóbulos rojos son los elementos encargados del transporte de oxígeno y participan de manera importante en el transporte del dióxido de carbono de la sangre (Randall et al., 1998; Núñez y Bouda, 2007). Para conocer la cantidad de estas células en la muestra se realiza el recuento total de eritrocitos mediante observación directa al microscopio. Otra prueba utilizada para evaluar el contenido de eritrocitos con respecto al volumen total de sangre se expresa en forma porcentual mediante la técnica de microhematocrito (Stoskopf, 1993; Stockham y Scott, 2013). El hematocrito puede aumentar debido a la contracción del bazo o posterior a la extracción de sangre y disminuye en procesos de anemia (Weiss y Wardrop, 2011; Stockham y Scott, 2013).

Los leucocitos o glóbulos blancos están involucrados en la respuesta inmune de los organismos y generalmente se clasifican en monocitos o macrófagos, linfocitos, neutrófilos o heterófilos, eosinófilos y basófilos (Ellis, 1977; Zinkl et al., 1991). El recuento total de leucocitos se realiza por observación directa al microscopio para conocer la cantidad de estas células en la sangre, y el diferencial de leucocitos mediante frotis de sangre fresca para registrar la proporción de cada tipo celular presente en la muestra (Stoskopf, 1993).

La porción líquida de la sangre o plasma está compuesta de agua en mayor proporción y de proteínas (en su mayoría), glucosa, compuestos nitrogenados, electrolitos y otras sustancias (Stoskopf, 1993). Las principales proteínas presentes en el plasma son el fibrinógeno, que está involucrado en la coagulación, además la albúmina y las globulinas, que forman parte de la respuesta inmune y contribuyen al mantenimiento de la presión osmótica y la densidad de la sangre (Sprague, 1990; Cunningham, 2003; Roberts, 2012).

Actualmente, se ha demostrado que el ajo produce efectos tanto benéficos como perjudiciales en la integridad de los tejidos y en la supervivencia de los organismos, dependiendo de la concentración que se utilice. Por lo tanto, es necesario conocer el margen terapéutico de los productos que se utilizan para el tratamiento de enfermedades en animales, ya sean de origen natural o sintético. Las pruebas de letalidad aguda se utilizan cuando no se tiene información sobre la toxicidad y la tolerancia de los organismos a las diferentes concentraciones de un producto. La concentración letal media (CL50) es una forma de estimar la concentración de una sustancia que causa la mortalidad de la mitad de la población expuesta durante

un tiempo específico (Sprague, 1990). Tal es el caso de los ensayos (CL50) por toxicidad aguda en los baños de inmersión con ajo en *P. reticulata*, con el propósito de conocer el margen de tolerancia de los peces a esta planta, donde se registró una disminución de la supervivencia de los organismos expuestos a concentraciones superiores a 15 mL/L de extracto acuoso de ajo (Fridman et al., 2014).

Se ha documentado que la ingestión de ajo produce efectos sobre la función de diferentes órganos, los cuales se pueden evaluar mediante diferentes técnicas; una de ellas es la histológica que permite la evaluación microscópica de los tejidos y ayuda a revelar lesiones que podrían causar alteraciones en la fisiología de los organismos (Genten et al., 2009). Por otra parte, las técnicas de análisis bioquímico de la sangre, como la cuantificación de las proteínas séricas y las enzimas alanino aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST), que están presentes en órganos como hígado, riñón, músculo esquelético y cardíaco, se utilizan principalmente como indicadores de lesiones en el hígado (Anderson et al., 2000; Sedensky y Dufour, 2011). El estudio de las concentraciones séricas de las enzimas ALT y AST ha indicado que el consumo de ajo produce un efecto protector en el hígado de ratas con cuadros de hepatitis aguda (Nakagawa et al., 1989). A su vez, el análisis histológico del intestino e hígado del bagre *Clarias gariepinus* no reveló daños asociados con el consumo de ajo (Agbebi et al., 2013). Sin embargo, en otros peces, como *Chrysichthys auratus* se han reportado lesiones en los hepatocitos, pero que no han afectado las concentraciones de ALT y AST (Al-Salahy y Mahmoud, 2003), además en *P. reticulata* se ha registrado distrofia muscular relacionada con el consumo de ajo (Fridman et al., 2014).

Actualmente, el uso de las plantas como terapia contra los parásitos de organismos acuáticos está tomando gran auge (Bulfon et al., 2015; Van Hai, 2015) y un ejemplo es el ajo. En el caso del jurel, el ajo se ha utilizado como un estimulante del apetito (Harada, 1990; Blumenthal, 2014) y para el tratamiento oral y de inmersión solamente de fases adultas de *Z. seriola* (Ingelbrecht et al., 2020). Sin embargo, conociendo el efecto antihelmíntico del ajo y de algunos metabolitos secundarios, en diferentes especies de parásitos y peces, se hace necesario profundizar en el conocimiento del efecto de esta planta sobre las diferentes fases del ciclo de vida de *Z. seriola*, su margen terapéutico y el efecto que tiene en la fisiología del jurel *Seriola dorsalis*.

1.2 Justificación

El desarrollo del cultivo de peces marinos ha traído consigo un nuevo reto para los productores, el manejo de las enfermedades. Específicamente en el jurel *S. dorsalis*, el parásito monogéneo *Z. seriola* ocasiona

un desequilibrio fisiológico que se ve reflejado en bajos rendimientos productivos y en eventos de mortalidad que afectan a la economía de los productores.

La terapia convencional contra parásitos externos implica el uso de compuestos químicos que han demostrado su efectividad para controlar las infestaciones de este parásito monogéneo; pero en algunos países, la legislación sanitaria restringe o prohíbe su uso en organismos que se destinan al consumo humano. Además, estos fármacos son rechazados por los peces debido a que reducen la palatabilidad del alimento en el que se incluyen (Williams et al., 2007). Con estos antecedentes, desde la década de los años 80, los productos naturales se han utilizado como una alternativa para la prevención o tratamiento de infestaciones parasitarias en organismos acuáticos (Peña et al., 1988; FDA, 2011).

La aplicación de un producto de origen natural como el ajo o sus metabolitos secundarios, utilizado en algunas especies de peces, en su gran mayoría de agua dulce, demostró que tiene la capacidad de prevenir o tratar infestaciones con parásitos monogéneos. Además, confiere otros beneficios a la acuicultura, tales como promotor del crecimiento, estimulante del apetito y agente antibacteriano, sin mencionar el efecto estimulante de la respuesta inmune innata en los peces (Martins et al., 2002; Nya y Austin, 2009; Aly y Mohamed, 2010; Nya et al., 2010; Agbebi et al., 2013; Militz et al., 2013; Mehrim et al., 2014). El ajo es reconocido por la FDA como un producto de baja regulación para su uso en la acuicultura y para el control de helmintos y piojo de mar en salmónidos de todas las edades (FDA, 2011), por lo que tiene potencial para ser utilizado como tratamiento de parásitos en el jurel.

No obstante, es necesario conocer el margen terapéutico de este producto natural para evitar cuadros de toxicidad en los organismos cultivados y alteraciones en la función tisular. Por lo que los objetivos de este trabajo son evaluar la capacidad antihelmíntica del ajo, administrado por vía oral e inmersión, en dos etapas del ciclo de vida de *Z. seriolae*, adultos y huevos; así como evaluar su efecto en las variables productivas y sanguíneas del jurel *Seriola dorsalis*.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Evaluar la capacidad antihelmíntica del ajo contra el parásito *Z. seriolae* cuando se administra por vía oral y baños de inmersión, además de su efecto en las variables productivas y sanguíneas del jurel *Seriola dorsalis* cuando se administra de forma preventiva y correctiva.

Para cumplir con el objetivo general, el estudio se desarrolló en varios capítulos, cada uno con hipótesis y objetivos específicos detallados en el capítulo que le corresponde.

Capítulo 2. Efecto de la administración de ajo en la supervivencia de *Zeuxapta seriola*, un parásito de *Seriola dorsalis*

En este capítulo se describe la administración de los baños de inmersión *in vitro* con extracto de ajo en el ciclo de vida del parásito *Z. seriola*, así como los baños de inmersión con extracto de ajo y disulfuro de alilo en la carga parasitaria de jureles. Por último, se incluye la sección relacionada con la inclusión del ajo en el alimento proporcionado a los juveniles de jurel de forma preventiva y correctiva para determinar la prevalencia e intensidad media del parásito.

2.1 Hipótesis

1. La aplicación de baños de inmersión *in vitro* en concentraciones mayores a 16 mL/L de extracto de ajo disminuye la proporción de huevos eclosionados y la supervivencia de adultos de *Z. seriola*.
2. Los baños de inmersión en concentraciones mayores a 16 mL/L de extracto de ajo y 0.02 mg/mL de disulfuro de alilo reducen la carga parasitaria en juveniles de *S. dorsalis* infestados con adultos de *Z. seriola*.
3. La inclusión de 4 y 10 % de ajo en la dieta del jurel, administrado de forma preventiva o correctiva, disminuye la infestación con *Z. seriola*.

2.2 Objetivos específicos

1. Estudiar el efecto de la administración de baños de inmersión *in vitro* con extracto de ajo en los huevos y adultos de *Z. seriola*, a razón de 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 y 128 mL de extracto de ajo/L.
2. Analizar el efecto de los baños de inmersión con extracto de ajo (1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 y 128 mL/L) y disulfuro de alilo (0.01, 0.02, 0.03 y 0.04 mg/mL) en la carga parasitaria de jureles parasitados con *Z. seriola*.

3. Estimar el efecto del ajo (4, 10 y 25 %) suplementado en el alimento de juveniles de jurel sobre la prevalencia e intensidad media del adulto de *Z. seriolae* cuando se administra de forma preventiva y correctiva.

2.3 Metodología

Todos los procedimientos realizados en este estudio para el cultivo experimental de *S. dorsalis* siguieron las pautas de investigación ética y responsable del National Research Council (National Research Council, 2011).

2.3.1 Procedencia de los peces y los parásitos

Un lote de peces de 5 g fue donado por la empresa Ocean Baja Labs S. A. de C. V., los peces fueron posteriormente cultivados en el Laboratorio de Peces Marinos del Departamento de Acuicultura, en tanques de 7 m³ acoplados a un sistema de recirculación, hasta que alcanzaron un peso de 2 kg (aproximadamente). Diariamente se realizaba la limpieza de los tanques, se hicieron recambios de agua y se monitoreó la temperatura, salinidad y concentración de oxígeno disuelto con un analizador multiparamétrico YSI modelo 85. La concentración de nitrógeno amoniacal total, nitritos y nitratos (test Kit API) se cuantificó dos veces por semana. Los peces fueron alimentados con la dieta Marine Mx de Skretting (46 % de proteína y 11 % de lípidos), siguiendo la tabla de ración propuesta por Orellana et al. (2014). Durante el tiempo de cultivo, los peces fueron expuestos experimentalmente a huevos de *Z. seriolae* provenientes de un sistema de cultivo con peces infestados con este monogéneo. La condición sanitaria de los peces se evaluó diariamente y en el momento que se registró una alteración en el comportamiento asociado a un incremento en la carga parasitaria que ponía en riesgo la salud y el bienestar de los peces (≥ 40 parásitos/pez), se procedió a realizar baños con agua dulce por 5 min (Whitaker, 2001). De estos peces se obtuvieron adultos y huevos de *Z. seriolae*, que fueron utilizados en los diferentes apartados del capítulo.

2.3.2 Eutanasia

Para obtener los ejemplares adultos de *Z. seriolae*, necesarios para el desarrollo de los bioensayos *in vitro*, se disecaron las branquias de los jureles. Previamente se procedió a aplicar la eutanasia con el protocolo propuesto por AVMA (American Veterinary Medical Association, Leary et al., 2013) y se empleó una mezcla de métodos químicos y físicos. El primero consistió en colocar individualmente a cada organismo en un

tanque con una solución anestésica de tricafina (100 mg/L) hasta observar que perdieran el equilibrio y el reflejo de huida. Posteriormente, se utilizó el método físico, que consistió en la transección cervical y punción medular.

2.3.3 Baños de inmersión

2.3.3.1 Preparación del extracto de ajo (EA) y del disulfuro de alilo (DSA)

El ajo fue adquirido en el mercado local y se procesó para obtener un extracto acuoso mediante la metodología utilizada por Militz et al. (2014) que indica la mezcla de 1 g de ajo por cada 5 mL de solvente, en este caso es agua de mar. Se almacenó en un frasco ámbar a 4 °C hasta ser utilizado para preparar las soluciones con las concentraciones desde 1 a 128 mL EA/L. El periodo de almacenamiento no fue mayor a 24 h. El contenido de alicina de cada una de las soluciones se analizó por HPLC mediante la técnica descrita por (Díaz y Jiménez, 2008). El análisis se realizó en un equipo HPLC Agilent Technologies serie 1260 con una columna Zorbax Eclipse Plus C18 de 3 x 100 mm y 3.5 µm, fase móvil metanol:agua (45:55), flujo de 0.3 mL·min⁻¹ y longitud de onda de 230 nm en un detector de arreglo de diodos (DAD) modelo G4212B. Los resultados se integraron a la ecuación propuesta por Baghalian et al. (2005) para calcular la concentración de alicina.

$$Alicina (\%) = \frac{(S_1 m_2) 22.75}{S_2 m_1} \quad (1)$$

Donde:

S_1 = área del pico de alicina en el cromatograma

m_2 = masa de etilparabeno que se utiliza para preparar la solución del estándar interno

S_2 = área del pico de etilparabeno en el cromatograma

m_1 = masa de la matriz de alicina, que es la cantidad de ajo (g) que se utilizó para el análisis

El disulfuro de alilo (DSA) con 80 % de pureza (Sigma Aldrich, CAS# 2179-57-9) se mezcló con 0.01 % de Tween 20 (Sigma Aldrich, CAS# 9005-64-5) para preparar las diluciones de 0.01 a 1.28 mg DSA/mL. Las diluciones se almacenaron en un frasco ámbar de vidrio a 4 °C hasta ser utilizado. El almacenamiento no excedió las 24 h.

2.3.3.2 Exposición *in vitro* de los adultos de *Z. seriolae* al extracto de ajo

A los jureles parasitados con *Z. seriolae* (ver sección 2.3.1) se les realizó el procedimiento de eutanasia (ver sección 2.3.2) y se les disecaron las branquias. Con la ayuda de un microscopio estereoscópico (Discovery V.8, Zeiss) y un bisturí, se disecaron los filamentos branquiales que tenían un parásito adherido. El filamento branquial con el parásito se colocó en un pocillo de una placa de 96 pocillos para su exposición a los siguientes tratamientos: 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 y 128 mL de EA/L de agua de mar y como controles negativo y positivo se utilizaron agua de mar y agua dulce, respectivamente, ambos sin EA. Los tratamientos se hicieron con 12 repeticiones. La equivalencia de la concentración de alicina de cada una de las soluciones utilizadas se presenta en la Tabla 1.

Para evaluar el tiempo transcurrido entre el inicio de la exposición al EA y el momento en que se registraba el desprendimiento del parásito del filamento branquial y su muerte, se realizaron observaciones al inicio del tratamiento y posteriormente cada hora. La muerte del parásito se consideró cuando no había respuesta a los estímulos lumínicos o táctiles (Militz et al., 2014). El tiempo de muerte y la concentración letal 50 (CL50) para cada tratamiento se calculó con el programa Toxicity Relationship Analysis Program (TRAP) versión 1.30a de U. S. EPA.

Tabla 1. Contenido de alicina correspondiente a cada concentración de extracto de ajo evaluada.

Concentración de extracto de ajo (mL/L)	Cantidad de ajo (g/L)	Concentración de alicina (mg/L)
1	0.2	0.05
2	0.4	0.14
4	0.8	0.39
8	1.6	0.82
16	3.2	2.25
32	6.4	3.21
64	12.8	6.12
128	25.6	12.06

2.3.3.3 Exposición *in vitro* de los huevos de *Z. seriolae* al extracto de ajo

Los huevos de *Z. seriolae* se colectaron utilizando hilos de nylon deshebrados que se colocaron en el tanque con peces parasitados por un periodo de 12 a 24 h. Posteriormente, los huevos se separaron en

grupos de 15 a 20 mediante el uso de un microscopio estereoscópico (Discovery V8, Zeiss) y se colocaron en cada pocillo de una microplaca de seis pocillos. Para evaluar el porcentaje de eclosión de los oncomiracidios al tratamiento con el EA, los huevos se expusieron a las concentraciones de 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 y 128 mL EA/L y agua de mar como control; cada tratamiento tuvo 6 repeticiones. La concentración de ajo se calculó con base en un incremento geométrico de 2. Para el tiempo de exposición se siguieron dos aproximaciones: a) la exposición aguda, que consistió en la exposición de los huevos al baño de inmersión por 1 h y posteriormente se incubaron en agua de mar hasta el momento de la eclosión de la larva, y b) exposición continua, donde los huevos permanecieron inmersos en cada una de las soluciones experimentales durante todo el periodo de incubación. En cada tratamiento se tuvieron 6 repeticiones. Las condiciones de incubación de los huevos (establecidas con base en ensayos preliminares) fueron: temperatura de 23 °C, fotoperiodo de 12 h luz y 12 h oscuridad y recambio diario del 75 % del volumen. El desarrollo de los huevos se monitoreó cada 24 h, y la eclosión se verificó cuando se observó el opérculo abierto en el huevo. La evaluación se interrumpió cuando todos los huevos viables (más del 80 %) expuestos al agua de mar (control) eclosionaron, ya que el porcentaje restante correspondió a huevos sin desarrollo embrionario. Se calculó la proporción de oncomiracidios eclosionados del total de huevos incubados por tratamiento.

2.3.3.4 Exposición *in vivo* de extracto de ajo en adultos de *Z. seriolae*

Para evaluar el efecto del EA en el estadio adulto de *Z. seriolae* cuando parasita a su hospedero, se utilizaron jureles con un peso promedio de 171.9 ± 38.5 g, previamente parasitados. La presencia del parásito se comprobó mediante la evaluación de las branquias del hospedero con un microscopio estereoscópico (Discovery V8, Zeiss). Posteriormente, se colocaron grupos de 10 peces parasitados en tanques con 200 L de agua de mar y se expusieron a baños de inmersión con 1, 2, 4 y 8 mL de extracto de ajo/L de agua de mar y un control negativo sin extracto de ajo; cada tratamiento se realizó por triplicado. El tiempo de exposición de cada tratamiento fue de 1 h y durante este tiempo se observó el comportamiento de los peces. Los jureles que presentaron pérdida del equilibrio sin respuesta al tacto durante el experimento fueron retirados inmediatamente, ya que esta condición se consideró como un signo de intolerancia a los tratamientos. Finalizada la exposición al extracto de ajo, se procedió a realizar la eutanasia a los jureles para disecar las branquias (ver sección 2.3.2).

2.3.3.5 Exposición *in vivo* de adultos de *Z. seriolae* al disulfuro de alilo

Para evaluar el efecto del disulfuro de alilo (DSA) en el estadio adulto de *Z. seriolae* cuando parasita a su hospedero, se utilizaron jureles (con un peso promedio de 130.2 ± 3.6 g,) previamente parasitados. Se colocaron 10 peces en 200 L de agua de mar y se expusieron a baños de inmersión con 0.01, 0.02, 0.03 y 0.04 mg de DSA/mL y un control negativo con solamente agua de mar sin DSA; cada tratamiento se realizó por triplicado. El tiempo de exposición de cada tratamiento fue de 1 h y durante este tiempo se observó el comportamiento de los peces. Los jureles que presentaron pérdida del equilibrio sin respuesta al tacto durante el experimento fueron retirados inmediatamente, ya que esta condición se consideró como un signo de intolerancia a los tratamientos. Finalizada la exposición al disulfuro de alilo, se procedió a realizar la eutanasia de los jureles para disecar las branquias (ver sección 2.3.2).

2.3.4 Administración oral

2.3.4.1 Cuantificación de la alicina en el polvo de ajo

Tomando en cuenta la cantidad de ajo que se requería para desarrollar este estudio, se analizaron diferentes presentaciones de ajo (polvo, capsulas, granulado y fresco) adquiridas con diferentes proveedores en Ensenada, B. C., con el objetivo de encontrar el producto que tuviera la mayor concentración de alicina y de manejo práctico. Una muestra de cada presentación se analizó por HPLC en un equipo Agilent Technologies 1260 series, acoplado a un detector DAD G4212B y con una columna Zorbax Eclipse Plus C18 (3 mm x 100 mm, 3.5 μ m), haciendo pasar un flujo de 0.3 ml/min de metanol:agua (45:55). El volumen de inyección de 10 μ l y absorbancia de 230 nm. Se utilizó 4-hidroxibenzoato de etilo como estándar interno. Los resultados de la concentración de alicina se presentan en la Tabla 2.

Para la preparación de las dietas con polvo de ajo se utilizó el ajo granulado de California Kirkland, ya que tuvo una mayor concentración de alicina que las demás presentaciones comerciales de ajo en polvo.

Tabla 2. Concentración de alicina en diferentes presentaciones polvo de ajo.

Producto	Cantidad ajo (g)	Alicina (%)	Alicina (mg)
Polvo de ajo preparado a partir de ajo fresco deshidratado con calor y procesado en CICESE	1.01	2.14	21.59
Polvo de ajo preparado a partir de ajo fresco deshidratado por liofilización y procesado en CICESE	1	1.51	15.12
Allimax Pro®	0.45	0.05	0.22
Ajo en polvo Tone's®	2	0.13	2.6
Nature Made® ajo sin olor	1	0.42	4.2
Ajo granulado de California Kirkland	1.02	0.77	7.82

2.3.4.2 Preparación de las dietas

Se utilizó la dieta Marine MX de Skretting de 8 mm como base (46 % proteína y 11 % lípidos). El pienso se trituro en una licuadora doméstica hasta obtener partículas menores a 1 mm. En una mezcladora Hobart se combinaron las diferentes proporciones de ajo (0, 4, 10 y 25 %) que se combinaron con la dieta base triturada, 5 % de almidón gelatinizado y agua destilada. La mezcla húmeda se hizo pasar 3 veces a través de una placa de molino con perforaciones de 4mm (Figura 2) que se colocaron en charolas de aluminio y se introdujeron a una estufa Thermolyne (Oven serie 9000) por 22 h a 48 °C para secarlas. El alimento seco se seccionó manualmente y se colocó dentro de bolsas plásticas selladas, correctamente identificadas, para almacenarlo a 4 °C por un tiempo no mayor a 7 días.



Figura 2. Preparación de las dietas: preparación húmeda pasando por el cedazo (izquierda) y partículas de alimento deshidratadas (derecha).

2.3.4.3 Análisis proximal de las dietas

Las dietas suplementadas con diferentes concentraciones de polvo de ajo (0, 4, 10 y 25 %) y la materia prima de ajo, se analizaron para determinar el contenido de proteína, lípidos y cenizas siguiendo la metodología AOAC (2005). Las proteínas totales se estimaron con el método de micro Kjeldahl. La cuantificación de lípidos, mediante el método de Soxhlet por extracto con éter petróleo. El contenido de cenizas se determinó por incineración en una mufla Thermolyne (Thermo Scientific, modelo F30438CM) a 550 °C durante 8 h. La fracción soluble e insoluble de los carbohidratos se calculó utilizando la siguiente ecuación (Fuentes Quesada, 2018):

$$\text{ELN (\%)} = 100 - (\% \text{ PC} + \% \text{ LC} + \% \text{ C}) \quad (2)$$

Donde:

ELN = extracto libre de nitrógeno

PC = proteínas crudas

LC = Lípidos crudos

C = cenizas

2.3.4.4 Administración Oral Preventiva

2.3.4.4.1 Cultivo de organismos

Los peces de 5 g fueron donados por la empresa Ocean Baja Labs S. A. de C. V. Posteriormente fueron cultivados en el Laboratorio de Peces Marinos del Departamento de Acuicultura, en tanques de 7 m³ acoplados a un sistema de recirculación y alimentados con la dieta comercial Marine MX de Skretting. Cuando alcanzaron un peso promedio de 167.9 ± 5.46 g, se trasladaron del tanque de mantenimiento de 7 m³ al Laboratorio Húmedo del Departamento de Acuicultura y se colocaron en 12 tanques de 460 L de capacidad. Cada tanque contaba con aireación y un calentador de titanio acoplado a una caja reguladora de la temperatura y un sensor de nivel. Se colocaron 20 peces (sin parásitos) en cada uno de los tanques, que se distribuyeron en cuatro grupos experimentales; cada grupo se evaluó con tres repeticiones. Los peces se aclimataron a las unidades de cultivo durante 15 días, la temperatura del agua se mantuvo a 20 °C, se hicieron seis recambios de agua al día y se alimentaron con la dieta comercial Marine MX de Skretting®, con una ración diaria equivalente al 3.5 % de la biomasa suministrada en dos raciones. Al séptimo día de aclimatación, se procedió a incrementar la temperatura de cultivo, 1 °C cada dos días, para

llevar la temperatura del agua a 25 °C, siguiendo el procedimiento descrito por Rodríguez Fonseca (2014). El régimen de alimentación y recambios de agua se mantuvo durante 10 días más, de manera que los peces se encontraran en las mejores condiciones fisiológicas durante el experimento.

2.3.4.4.2 Diseño experimental

El experimento consistió en cuatro tratamientos, cada uno con 0, 4, 10 y 25 % de polvo de ajo por triplicado. En cada unidad de cultivo (12 en total) se colocaron 20 jureles y durante 60 días los peces fueron alimentados con las dietas experimentales correspondientes a cada tratamiento. Al día 33 se introdujeron hilos con huevos de *Z. seriolae* (aproximadamente 500 huevos) en cada tanque experimental. Los muestreos se realizaron a los 0, 32 y 60 días de experimento, extrayendo cinco peces cada vez de las unidades de cultivo. Para tal fin, se procedió a realizar la eutanasia de los jureles para disecar las branquias utilizando el procedimiento descrito en la sección 2.3.2.

2.3.4.5 Administración Oral Correctiva

2.3.4.5.1 Cultivo de organismos

Los peces de 5 g fueron donados por Ocean Baja Labs S. A. de C. V., y fueron cultivados en el Laboratorio de Peces Marinos del Departamento de Acuicultura en el sistema descrito en la sección 2.3.4.4.1. En este experimento se utilizaron peces parasitados, por lo que para propiciar la infestación parasitaria, del estanque de 7 m³ donde se encontraba un grupo de peces previamente parasitados (de un peso aproximado de 2 kg, ver sección 2.3a), se transfirió agua al tanque de cultivo con los jureles receptores, con un peso promedio de 210.8 ± 8.3 g. Posteriormente, a los 12 días se tomó una muestra de peces para comprobar que estuviesen parasitados y poder trasladarlos al Laboratorio Húmedo del Departamento de Acuicultura. Los jureles, ya parasitados, se colocaron en grupos de 20 en 12 tanques de 460 L de capacidad y se siguió el procedimiento descrito en la sección 2.3.4.4.1.

2.3.4.5.2 Diseño experimental

El experimento consistió en cuatro tratamientos, cada uno con 0, 4, 10 y 25 % de polvo de ajo por triplicado. En cada unidad de cultivo (12 en total) se colocaron 20 jureles parasitados con *Z. seriolae* y durante 30 días los peces fueron alimentados con las dietas experimentales correspondientes a cada tratamiento. Los peces recibieron el alimento correspondiente a su peso promedio según Orellana et al. (2014), dividido en dos raciones al día. Los muestreos de las branquias se realizaron a los 0 y 30 días de

experimento, extrayendo cinco peces cada vez de las unidades de cultivo. Para tal fin, se procedió a realizar la eutanasia de los jureles para disecar las branquias (ver sección 2.3.2).

2.3.4.6 Prevalencia e intensidad parasitaria media de *Z. seriolae*

Las branquias se colocaron en una solución de alcohol etílico al 70 %, en tubos de fondo cónico de 50 mL de capacidad. Para cuantificar el número de parásitos, las branquias de cada pez se colocaron en una caja Petri y con la ayuda de un microscopio estereoscópico (Discovery V8, Zeiss), se contó cada uno de los parásitos adheridos a las branquias y los contenidos en la solución en el tubo. El resultado de cada muestra fue integrado a las ecuaciones propuestas por Bush et al. (1997):

$$\text{Intensidad parasitaria media} = \frac{\text{\# de parásitos}}{\text{\# de hospederos infestados examinados}} \quad (3)$$

$$\text{Prevalencia} = \frac{\text{\# de hospederos infestados}}{\text{número total de hospederos examinados}} \times 100 \quad (4)$$

2.3.4.7 Análisis estadístico

La normalidad de los datos se analizó con la prueba de Shapiro-Wilks y la homogeneidad de varianzas se evaluó con la prueba de Levene. Para evaluar la intensidad parasitaria media, la supervivencia y tiempo de desprendimiento de adultos de *Z. seriolae*, la proporción de organismos eclosionados y la supervivencia de los oncomiracidios se aplicaron pruebas de Kruskal-Wallis, seguidas de pruebas de Dunn. El análisis se realizó con un nivel de significancia de 0.05 con el programa estadístico NCSS 2019. Para analizar la intensidad parasitaria media de peces expuestos a los baños de inmersión y a la administración oral de ajo, se utilizó un ANOVA de 1 vía Bootstrap del software Quantitative Parasitology (Reiczigel et al., 2019). La CL50 se calculó con el U.S. EPA Toxicity Relationship Analysis Program (TRAP) version 1.30 a.

2.4 Resultados

2.4.1 Exposición *in vitro* de los adultos de *Z. seriolae* al extracto de ajo

El desprendimiento de los adultos de *Z. seriolae* del filamento branquial, expuestos al control con agua de mar se registró a las 4.1 ± 0.6 h y con agua dulce a las 2.9 ± 0.08 h (Figura 3, $p < 0.001$). En los parásitos expuestos al EA, salvo el tratamiento con 1 mL/L, el tiempo de desprendimiento fue significativamente menor, de 2.5 ± 0.2 h con 2 mL/L (0.01 mg de alicina/L). Con 32 y 64 mL/L (0.23 y 0.44 mg de alicina/L, respectivamente) los parásitos se desprendieron en 1 h y con 128 mL/L (0.87 mg de alicina/L) el desprendimiento fue inmediato al entrar en contacto con la solución (Figura 3, $p < 0.001$).

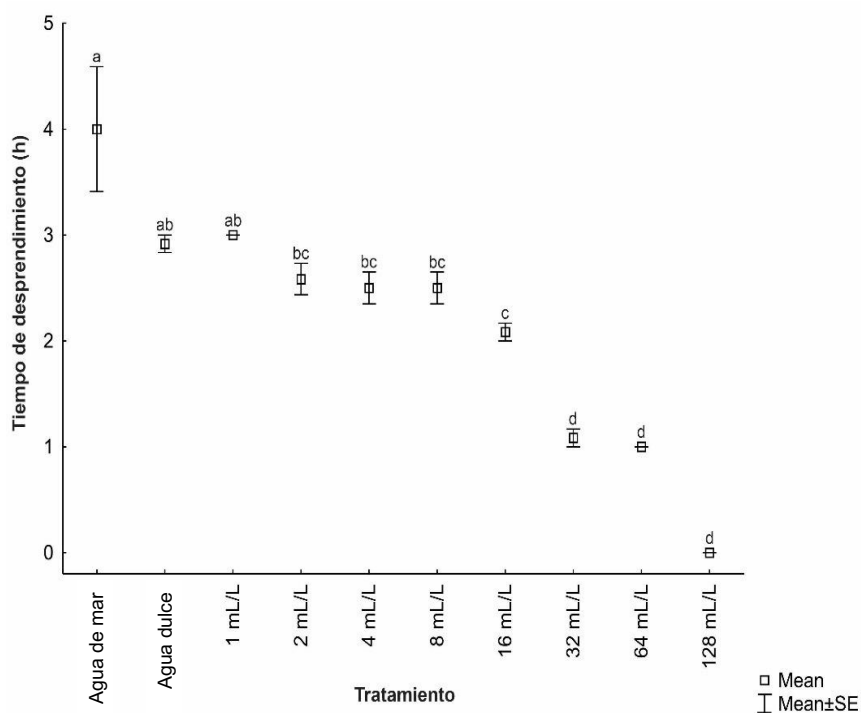


Figura 3. Tiempo de desprendimiento (h) registrado para los adultos de *Z. seriolae* expuestos a baños de inmersión con extracto de ajo (1 a 128 mL/L), agua de mar (control negativo) y agua dulce (control positivo). Media $\pm$ error estándar. Diferentes letras corresponden a diferencias significativas, $p < 0.001$.

El tiempo de vida de los adultos de *Z. seriolae* disminuyó conforme se incrementó la concentración de EA (Figura 4). Para el control con agua de mar sin EA, la supervivencia de los parásitos fue de 13.4 ± 0.4 h, mientras que a partir de la concentración de 4 mL/L (0.03 mg de alicina/L) se registró una disminución significativa de la supervivencia de los parásitos, de 6.2 ± 0.1 h de exposición (Figura 4, $p < 0.001$) y en las

concentraciones de 64 y 128 mL/L (0.44 y 0.87 mg de alicina/L) se observó a las 2 h, un resultado muy similar al registrado con agua dulce (Figura 4, $p < 0.001$).

La CL50 fue de 53.6 ± 1.1 mL/L (~ 0.4 mg de alicina/L) y corresponde a 2 h de exposición.

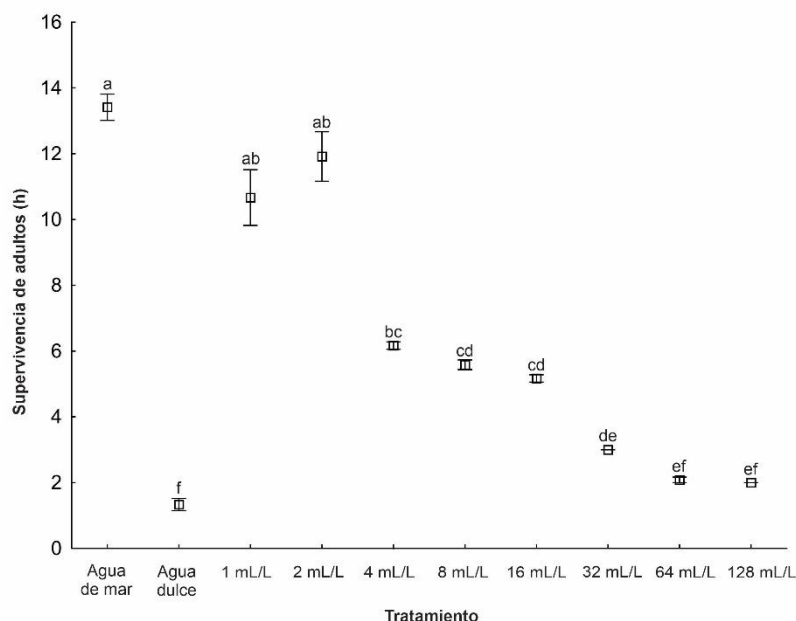


Figura 4. Supervivencia de los adultos de *Z. seriolae* expuestos a agua de mar, agua dulce y extracto de ajo (1 a 128 mL/L). Media $\pm$ error estándar. Letras diferentes representan las diferencias entre los tratamientos, $p < 0.001$.

2.4.2 Exposición *in vitro* de los huevos de *Z. seriolae* al extracto de ajo

En la exposición aguda de los huevos al EA, el porcentaje de eclosión de oncomiracidios disminuyó significativamente a partir de la concentración de 16 mL/L (0.16 mg de alicina/L) de 53.5 ± 9.6 % (Figura 5A, $p < 0.001$) hasta 0 % en el tratamiento con 128 mL/L (0.87 mg de alicina/L). El efecto de la exposición aguda al agua dulce (73.8 ± 7.8 %, $p < 0.001$) no fue significativamente diferente al del agua de mar sin EA (96.2 ± 3.7 %).

En cuanto a la exposición continua al agua de mar sin EA, se registró un 88.9 ± 4.2 % de eclosión de oncomiracidios (Figura 5B, $p < 0.001$). Con las concentraciones de 1 y 2 mL/L la eclosión se redujo a 26.8 ± 7.1 y 36.9 ± 8.7 %. A partir de la concentración de 4 y 8 mL/L de EA (0.03 y 0.06 mg de alicina/L) se redujo la eclosión a 6.3 ± 4.4 y 6.1 ± 6.1 %, respectivamente (Figura 5B, $p < 0.001$). Mientras que, con agua dulce, 16, 32, 64 y 128 mL/L de EA, los oncomiracidios no eclosionaron (Figura 5B, $p < 0.001$).

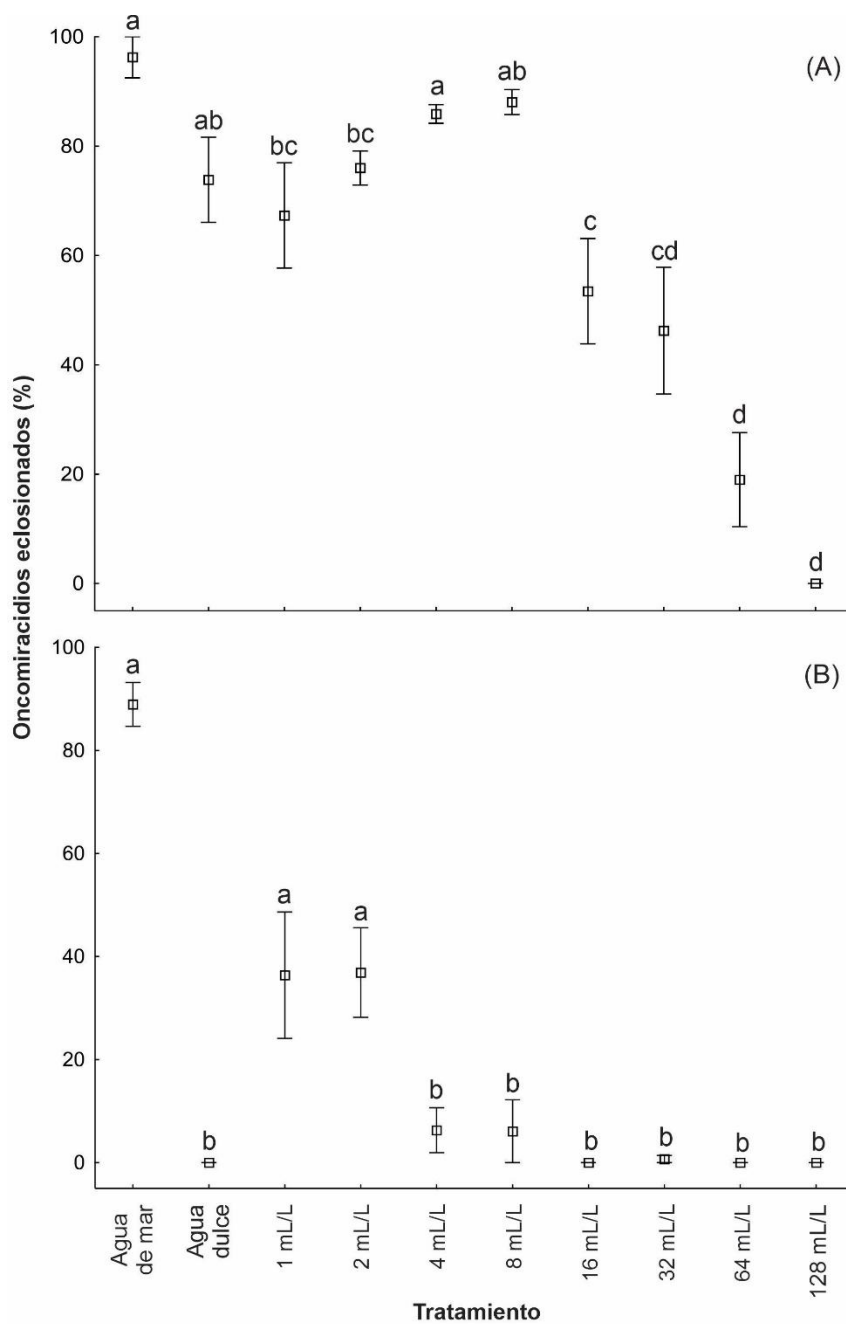


Figura 5. Porcentaje de eclosión de oncomiracidios de huevos expuestos a baños de inmersión con agua de mar, agua dulce y extracto de ajo (1 a 128 mL/L) durante (A) 1 hora (exposición aguda) y (B) durante todo el tiempo de incubación (exposición continua). Media $\pm$ error estándar. Letras diferentes representan las diferencias significativas entre los tratamientos, $p < 0.001$.

2.4.3 Exposición *in vivo* de extracto de ajo a los adultos de *Z. seriolae*

La intensidad parasitaria media se redujo significativamente en los jureles expuestos a los baños con 4 mL/L (6.9 ± 2 parásitos/pez) y 8 mL/L (28.7 ± 11.4 parásitos/pez) comparado con los jureles que no fueron

expuestos al EA (86.3 ± 23.6 parásitos/pez) o que recibieron 1 y 2 mL/L de EA (Tabla 3, $p < 0.001$). La prevalencia no disminuyó significativamente con ninguno de los tratamientos ($p > 0.05$).

Tabla 3. Intensidad parasitaria media de *Z. seriolae* después de la exposición *in vivo* con extracto de ajo.

Producto	Tratamiento	Intensidad media (parásitos/pez)	Peces que completaron 1 h de exposición (%)
Extracto de ajo (mL/L)	Control	86.3 ± 23.6^a	100^a
	1	113.8 ± 16.8^a	100^a
	2	105.7 ± 20.8^a	100^a
	4	6.9 ± 2^b	100^a
	8	$28.7 \pm 11.4^{b*}$	23.3 ± 7.8^b

Media $\pm$ error estándar. Letras diferentes en la misma columna representan diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.001$).

*Tiempo de exposición fue menor a 1 h, los peces reaccionaron adversamente a las concentraciones con EA.

Los jureles que fueron expuestos a la concentración de 8 mL/L (1.6 mg de alicina/L), solo el 23.3 ± 7.8 % completaron el tratamiento de 1 h (Tabla 3). El resto de los peces perdieron el equilibrio y no respondieron al estímulo táctil, por lo que se retiraron del experimento inmediatamente. En las branquias de estos peces se observó una coloración atípica de las branquias, roja muy oscura, que no se registró en ninguno de los demás tratamientos (Figura 6).

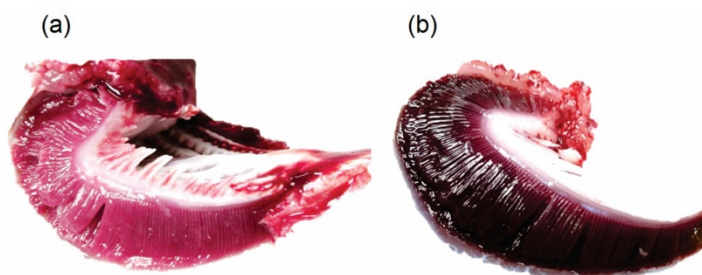


Figura 6. Branquias de jureles: a) no expuestos a extracto de ajo, b) expuestos a 8 mL/L de extracto de ajo.

2.4.4 Exposición *in vivo* de disulfuro de alilo a los adultos de *Z. seriolae*

La intensidad parasitaria media se redujo significativamente en los organismos expuestos a los baños con 0.01 mg DSA/mL (10.3 ± 1.4 parásitos/pez), comparado con los jureles que no fueron expuestos al DSA (501.6 ± 54.9 parásitos/pez) (Tabla 4, $p < 0.001$). Con los tratamientos de 0.02 a 0.04 mg DSA/mL también

se registró una reducción significativa de la intensidad parasitaria, pero no todos los peces lograron completar el tiempo del tratamiento. Al ser expuestos a 0.02 mg DSA/mL, solo 43.3 ± 9.2 % completaron el tratamiento; mientras que con 0.03 y 0.04 mg DSA/mL ningún pez lo completó (Tabla 4, $p < 0.001$). La prevalencia no disminuyó significativamente con ninguno de los tratamientos ($p > 0.05$).

Tabla 4. Intensidad parasitaria media de *Z. seriolae* después de la exposición *in vivo* con disulfuro de alilo.

Producto	Tratamiento	Intensidad media (parásitos/pez)	Peces que completaron 1 h de exposición (%)
Disulfuro de alilo (mg/mL) + 0.01 % Tween 20	Control	501.6 ± 54.9^a	100 ^a
	0.01	10.3 ± 1.4^b	100 ^a
	0.02	$9.7 \pm 1.3^b*$	43.3 ± 9.2^b
	0.03	$53.9 \pm 7^c*$	0 ^c
	0.04	$21.3 \pm 4.3^{d*}$	0 ^c

Media $\pm$ error estándar. Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.001$).

*Tiempo de exposición fue menor a 1 h, los peces reaccionaron adversamente a las concentraciones con DSA.

2.4.5 Efecto de la administración oral preventiva de alimento suplementado con polvo de ajo a juveniles de *S. dorsalis* parasitados con *Z. seriolae*

El análisis proximal de las dietas y del polvo de ajo no reveló diferencias significativas en la concentración de proteínas entre el control, 4 y 10 %, sin embargo, el polvo de ajo tuvo una concentración de proteínas significativamente menor ($p < 0.001$, Tabla 5). El contenido de lípidos fue mayor en las dietas suplementadas con 4 % de polvo de ajo y disminuyó significativamente en forma progresiva en el control, 10 y 25 % de PA y en el polvo de ajo ($p < 0.001$, Tabla 5).

Tabla 5. Análisis proximal del polvo de ajo y las dietas suplementadas con 0, 4, 10 y 25 % de polvo de ajo (PA).

	% Proteínas	% Lípidos	% Cenizas	ELN
Control	45.60 ± 1.30^a	10.47 ± 0.08^a	8.14 ± 0.06^a	32.74 ± 0.49^a
4 %	47.59 ± 1.85^a	11.22 ± 0.05^b	8.46 ± 0.14^{ab}	25.20 ± 1.63^a
10 %	45.81 ± 1.50^a	9.38 ± 0.04^c	7.73 ± 0.16^{ac}	31.29 ± 0.82^a
25 %	39.94 ± 6.65^{ab}	7.70 ± 0.07^d	7.29 ± 0.17^c	42.43 ± 7.36^a
PA	27.01 ± 1.87^b	0.15 ± 0.01^e	4.29 ± 0.13^d	64.53 ± 3.03^b

Media $\pm$ error estándar. ELN, extracto libre de nitrógeno; PA, polvo de ajo. Letras diferentes en la misma columna representan diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0.001$).

La proporción de cenizas fue disminuyendo significativamente a medida que se incrementó la concentración de polvo de ajo ($p < 0.001$, Tabla 5). El extracto libre de nitrógeno (ELN), medida que contiene la proporción de almidones, azúcares y otros carbohidratos, fue significativamente mayor en el polvo de ajo ($p < 0.001$).

Con respecto a la carga parasitaria, el análisis de las branquias de los jureles expuestos a los parásitos por un periodo de 27 días contados a partir del día 33 de cultivo, indicó que la administración preventiva de 0, 4, 10 y 25 % polvo de ajo en las dietas no tuvo efectos significativos en la prevención de la infestación ni en la reducción de la carga parasitaria ($p > 0.05$, Figura 7).

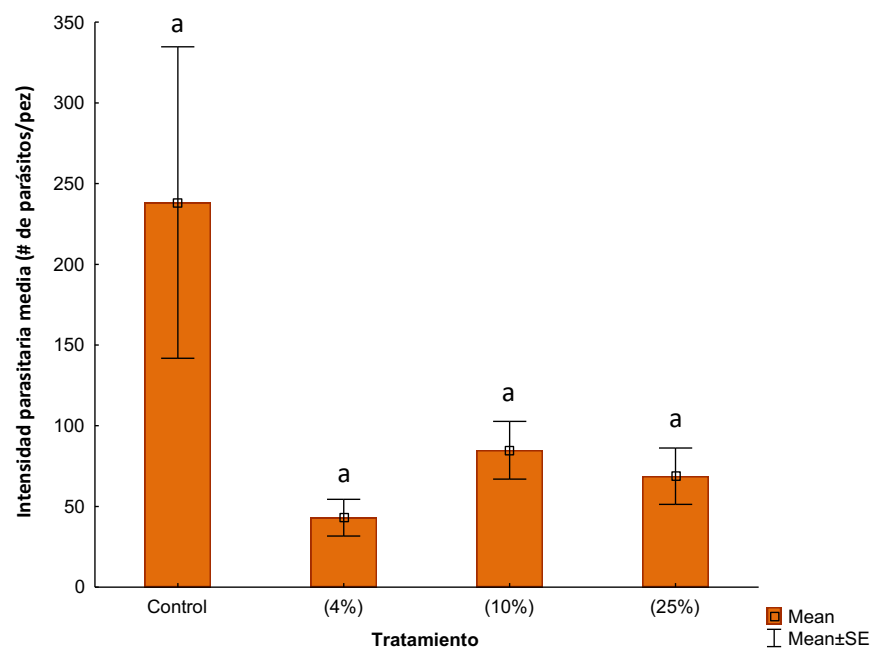


Figura 7. Intensidad parasitaria media de *Z. seriolae* en peces que recibieron dietas suplementadas con polvo de ajo (0, 4, 10 y 25 %) de forma preventiva. Media $\pm$ error estándar. Diferentes letras representan diferencias significativas entre tratamientos, $p < 0.05$.

2.4.6 Efecto de la administración oral correctiva de alimento suplementado con polvo de ajo a juveniles de *S. dorsalis* parasitados con *Z. seriolae*

La intensidad parasitaria registrada antes del inicio de la alimentación experimental fue superior a los 800 parásitos por pez. Después de un periodo de 30 días de suministro de alimento con PA, la intensidad se redujo en forma significativa en todos los tratamientos, incluido el control ($p < 0.01$, Figura 8). Sin embargo, el polvo de ajo no ocasionó la disminución de la intensidad parasitaria, ya que no se observaron diferencias

entre el control y los tratamientos con PA ($p > 0.05$, Figura 8). En el tratamiento del 10 %, no se realizó la evaluación de la carga parasitaria debido a que el 100 % de los organismos murieron durante el bioensayo.

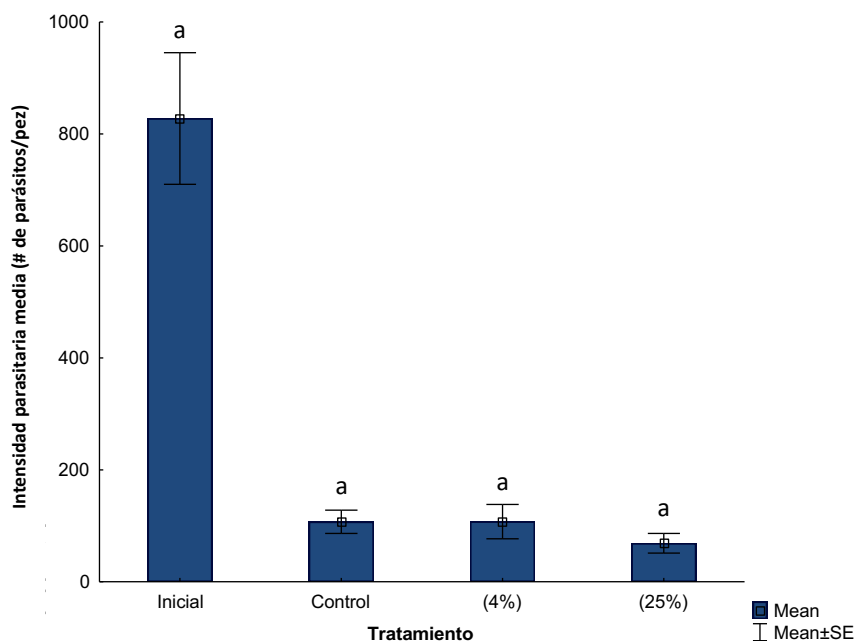


Figura 8. Intensidad parasitaria media de peces antes (inicial) y después de ser alimentados correctivamente con dietas suplementadas con polvo de ajo (0, 4 y 25 %). Media $\pm$ error estándar. Diferentes letras representan las diferencias significativas entre tratamientos, $p < 0.05$.

2.5 Discusión

El uso del ajo (*Allium sativum*) como tratamiento para parásitos internos o externos en organismos cultivados, tiene como antecedentes los resultados descritos en parásitos que afectan a mamíferos. Tal es el caso de la disminución de la supervivencia de las larvas del mosquito *Culex quinquefasciatus*, vector de *Wuchereria bancrofti* (Kalu et al., 2010), *Leishmania mexicana* (Gamboa-León et al., 2007), coccidios (Worku et al., 2009; Dkhil et al., 2011), *Plasmodium* sp. (Coppi et al., 2006) y tremátodos como *Schistosoma mansoni* y *Fasciola hepatica* (El Shenawy et al., 2008; Riad et al., 2009; Singh et al., 2009). Los efectos antiparasitarios del ajo también se han estudiado en algunos parásitos monogéneos de piel y branquias de peces como *Anacanthorus penilabiatu*s, *Gyrodactylus turnbulli*, *Dactylogyrus* sp. y *Neobenedenia* sp., entre otros, donde se han observado efectos positivos en su reducción o eliminación (Militz et al., 2013; Schelkle et al., 2013; Fridman et al., 2014).

La exposición *in vitro* de los adultos de *Z. seriola* a baños con 4 mL/L de EA (0.39 mg/L de alicina) produjo su desprendimiento de la lamela branquial de los jureles a las 2.5 ± 0.2 h y la muerte del 100 % de los parásitos en 6 h. En contraste, Ingelbrecht et al. (2020) registraron una mayor reducción del tiempo de supervivencia de *Z. seriola* *in vitro* de 13-36 h en el control a 39.92 min con 1 g de ajo/100 mL de agua (3 mg alicina/g de ajo) de extracto de ajo sometido a tratamiento térmico. Las diferencias entre ambos trabajos podrían estar relacionadas a la calidad de la materia prima, es decir el polvo de ajo, y a la metodología de extracción utilizada. Esto aumenta la probabilidad de que hubiera una mayor presencia de compuestos, aunque la concentración y composición depende del tratamiento térmico aplicado en el proceso de extracción. La exposición del ajo a procesos térmicos reduce la concentración de alicina, debido a su inestabilidad, pero a su vez incrementa la concentración de metabolitos secundarios (Kim et al., 2002; Charron et al., 2016). El resultado del presente bioensayo demostró la efectividad del extracto de ajo para disminuir la supervivencia del parásito *in vitro*, pero para efectos de conocer el posible mecanismo de acción hacen falta más datos de la composición química del extracto utilizado. En futuras investigaciones con ajo, se debe considerar el análisis no solo de alicina sino de otros compuestos derivados de esta, que también pueden tener efectos tanto positivos como perjudiciales.

El tratamiento de *Neobenedenia* sp., con 7.5 mL/L de EA ocasionó su desprendimiento de la piel de los peces parasitados a los 16 min (Militz et al., 2014) y a las 4h, aproximadamente, cuando se utilizó con una solución etanólica 1:10 de ajo (Trasviña-Moreno et al., 2019). Fridman et al. (2014) documentaron que la exposición *in vitro* de los adultos de *Gyrodactylus turnbulli* al EA, a una concentración de 7.5 mL/L, produjo la muerte del 100 % de los parásitos en 28.2 ± 1.15 min, mientras que cuando los guppies se expusieron a baños de inmersión por 1 h con 7.5 y 12.5 mL/L, se redujo la carga parasitaria en un 89 y 98 %, respectivamente. La muerte de *Gyrodactylus elegans* se registró a los 3 min de exposición a un baño con 8.37 mg de ajo/mL, que correspondería a 32-64 mL EA/L de los tratamientos utilizados en la presente investigación con *Z. seriola*.

Las diferencias en la efectividad del EA en el tiempo de desprendimiento y muerte de las diferentes especies de parásitos también podrían estar relacionadas con las diferencias en las características de su biología. Los monopistocotíleos (subclase a la que pertenece *G. turnbulli*) se fijan a diferentes sitios en el hospedero, poseen una sola unidad de fijación y se alimentan de células epiteliales. Los poliopistocotíleos (subclase a la que pertenece *Z. seriola*) solo parasitan las branquias de sus hospederos, tienen más de una unidad de fijación compuesta por ganchos y tenazas se alimentan de sangre (Hayward y Whittington, 2005).

Adicionalmente, el efecto del EA podría estar asociado a diferencias en la sensibilidad de los parásitos al ajo, que depende de las condiciones ambientales en que se produce, del manejo de la planta antes, durante y después de la cosecha, además de la concentración de sus compuestos químicos (Baghalian et al., 2005; Prati et al., 2014; Zhang et al., 2016). La composición química del ajo puede variar dependiendo del genotipo de la planta, métodos de cultivo y el procedimiento empleado para su extracción (Martins et al., 2016; Doan et al., 2020). El tipo de solventes utilizados (agua o etanol) extrae los metabolitos en forma diferencial y determina su concentración en el extracto (Jang et al., 2018). Cuando se obtienen extractos a partir del etanol, aumenta la probabilidad de encontrar compuestos como la S-alilcisteína y una concentración menor de algunos metabolitos secundarios de la alicina, como el DSA. En contraste, los extractos acuosos contienen una elevada concentración de alicina (Charron et al., 2016). En este trabajo se cuantificó la concentración de alicina en los extractos de ajo, con el objetivo de estandarizar la dosis empleada en cada uno de los tratamientos. Es importante que, en los estudios futuros, la evaluación de los efectos del ajo se haga de acuerdo con la dosis de sus principios activos o que se utilicen los compuestos purificados y en concentraciones estandarizadas. Esta estrategia permitirá identificar con mayor precisión los efectos de los diferentes compuestos de un producto natural como el ajo y al mismo tiempo evitará la interferencia de otros compuestos, como las saponinas y otros derivados organosulfurados.

Los baños de inmersión con 4 mL de EA/L y 0.01 mg DSA/mL redujeron significativamente la intensidad parasitaria media de los jureles, con una eficacia mayor al 90 %. Schelkle et al. (2013) reportaron en los ensayos *in vivo* en guppies (*Poecilia reticulata*) infestados con *G. turnbulli* que la aplicación de 0.5 mg/mL de disulfuro de alilo y 0.03 mg/mL de polvo de ajo liofilizado chino redujeron la cantidad de parásitos con un 95 % de eficacia, mientras que 0.07 mg/mL de ajo picado y gránulos de ajo mostraron 78 % de eficacia. Fridman et al. (2014) informaron que los baños de inmersión de 1 h con 7.5 y 12.5 mL EA/L redujeron la carga de parásitos adultos de *G. turnbulli* en guppies en un 89 y 98 %, respectivamente. La exposición *in vivo* de carpas parasitadas con *G. elegans* a 8.37 mg de ajo/mL durante 3 min redujo la intensidad media en un 14.4 % (Yavuzcan Yildiz y Bekcan, 2020). En el presente estudio y el de Schelkle et al. (2013) son los únicos que hacen referencia que diferentes presentaciones ajo y el uso de metabolitos purificados son exitosos para disminuir la supervivencia de los parásitos. Esto da una pauta importante para evaluar que probablemente la alicina no es el compuesto con el efecto terapéutico como tal, sino destacar su importancia como precursor de metabolitos secundarios más estables que tienen un efecto directo sobre el parásito.

Aunque el mecanismo de acción antihelmíntico del ajo no es claro, en *Fasciola hepatica* se ha reportado que la administración de aceite de ajo produce la parálisis completa del parásito (Singh et al., 2009) y en

Schistosoma mansoni se observaron lesiones en la estructura del tegumento que modifican su estructura, además de la formación de vesículas y úlceras provocadas por la exposición a la alicina, aceite y extracto de ajo (Riad et al., 2009; Lima et al., 2011; Kamel & El-Shinnawy, 2015). La alicina es el compuesto químico del ajo al que se le atribuyen los efectos terapéuticos. En algunos protozoarios se ha reportado que la alicina inhibe las proteasas de cisteína que participan en procesos catabólicos, de la inmunoevasión y del enquistamiento (Ankri et al., 1997; Ankri and Mirelman, 1999; Anthony et al., 2005). Sin embargo, también se ha encontrado que el ajoeno, derivado de la alicina, interfiere en la biosíntesis de fosfatidilcolina, lo que afecta la composición de las membranas celulares (Urbina et al., 1993).

De los compuestos presentes en el ajo, cabe destacar la presencia de las saponinas, que son glucósidos con propiedades detergentes presentes en algunos organismos marinos, bacterias y plantas (Liwa et al., 2017). Las saponinas del ajo inducen la producción de óxido nítrico en los macrófagos infectados con *Leishmania mexicana* (Gamboa-León et al., 2007) y entre sus funciones el óxido nítrico tiene un efecto citotóxico sobre las células (Wink et al., 2011). Las saponinas del árbol *Manilkara rufula* alteran la membrana celular del protozoario *Trichomonas vaginalis*, lo cual le causa la muerte (de Brum Vieira et al., 2017), y las saponinas de *Medicago* spp. tienen efecto nematocida (D'Addabbo et al., 2011; Maestrini et al., 2019). Adicionalmente, a este efecto directo de las saponinas en los parásitos, se ha reportado que estas sustancias con acción detergente tienen la capacidad de remover el mucus en los peces, lo que propicia que los compuestos terapéuticos, en este caso los componentes del EA, tengan contacto directo con los parásitos (Shephard, 1993). Sin embargo, hay que analizar si este tipo de acciones tienen un perjuicio en el sistema de protección innata de los peces, ya que con la remoción de mucus se estarían retirando factores humorales que protegen a los peces de patógenos y alteraciones del ambiente.

Además de tener un efecto antihelmíntico, a las saponinas se les ha relacionado con lesiones en las branquias de los peces. Eeckhaut et al. (2015) reportaron que en algunos peces pomacéntridos, holocéntridos y lábridos, cuando se exponen a las saponinas se producen lesiones en las lamelas branquiales secundarias, tales como desprendimiento del epitelio, edema y formación de poros. En *S. dorsalis* la concentración de 8 mL/L de EA redujo en un 67 % la cantidad de parásitos en los peces; sin embargo, los jureles no toleraron esta concentración por más de 45 min, intolerancia que se manifestó con la pérdida del equilibrio, sin respuesta al estímulo táctil, además se observó una coloración atípica en las branquias. Esta condición podría estar relacionada con el efecto que ocasionan las saponinas del ajo en la estructura celular del epitelio branquial. La toxicidad de las saponinas es el resultado de su naturaleza química, ya que están conformadas por una porción lipofílica (sapogenina) y una hidrofílica (azúcares) que les permite disolverse en medios acuosos y tener afinidad por sustancias lipídicas como los esteroides de

las membranas celulares, lo que propicia la formación de poros que modifican la permeabilidad a iones y otras moléculas, lo que eventualmente causa la lisis celular (Melzig et al., 2000; Rao y Gurfinkel, 2000).

Otro punto para considerar cuando se utilizan tratamientos antihelmínticos en los diferentes estadios del ciclo de vida de los parásitos, son las características de sus huevos, ya que están conformados por un 55 % de proteínas y 12 % de lípidos, de los cuales, 16 % son esteroides y el 52 % son estructurales, lo que le confiere una resistencia a diversas condiciones ambientales y sustancias en el medio donde se desarrollan (Kearn, 1986; Brazenor et al., 2017). Por esta razón, no todos los tratamientos antiparasitarios tienen un efecto perjudicial en el desarrollo y eclosión de la fase larval del parásito. La aplicación de baños hiposalinos es uno de los métodos recomendados para el tratamiento de monogéneos marinos adultos y de sus fases larvales (Whitaker, 2001). En este trabajo se encontró que la exposición continua de los huevos por 7 días al agua dulce inhibe completamente la eclosión de los oncomiracidios de *Z. seriola*. Este efecto también fue observado en los huevos de *Neobenedenia* sp. (Militz et al., 2014) y *Neobenedenia melleni* (Mueller et al., 1992).

En este estudio se pudo registrar un efecto similar del EA al del agua dulce, ya que los baños de inmersión agudos y continuos disminuyeron el porcentaje de eclosión del oncomiracidio de *Z. seriola*. Este efecto fue proporcional al tiempo de exposición y a la concentración utilizada. La exposición aguda a 16 mL/L de EA (0.16 mg/L de alicina) y 0.01 mg DSA/mL redujeron la eclosión de los oncomiracidios con una eficacia de 44.5 % y 52 %, respectivamente. Mientras que en las concentraciones mayores no hubo eclosión. Militz et al. (2014) obtuvieron resultados similares, la exposición aguda de los huevos de *Neobenedenia* sp. a 20 mL/L de EA redujo el éxito de la eclosión a 4.1 %.

En contraste, la exposición continua de los huevos de *Z. seriola* a 4 mL/L de EA (0.03 mg/L de alicina) ocasionó una disminución en la eclosión del oncomiracidio, con una eficacia del 92.9 %, mientras que con 16, 32, 64 y 128 mL/L de EA y en todos los tratamientos con DSA no hubo eclosión. De manera similar, Militz et al. (2014) documentaron en huevos de *Neobenedenia* sp., que la exposición continua a 10 y 20 mL/L de EA redujo la eclosión a 18.7 y 4.8 %, respectivamente; mientras que con el extracto alcohólico de ajo en una concentración 1:100 no hubo eclosión de la larva (Trasviña-Moreno et al., 2019). Es posible que los efectos del ajo en la eclosión de estos monogéneos sea el resultado de la acción de las saponinas (Melzig et al., 2000; Rao and Gurfinkel, 2000) sobre los componentes de la cubierta del huevo (Brazenor et al., 2017), lo que podría ocasionar que los embriones estén expuestos a cambios en la permeabilidad de la cubierta (Gilbert and Avenant-Oldewage, 2016) o a la acción de los componentes del ajo. También hay que destacar que el DSA tuvo un efecto perjudicial en el desarrollo embrionario de *Z. seriola*, por lo

que no se detectó eclosión. El DSA también se encuentra en el extracto de ajo, como metabolito secundario de la alicina.

El uso del EA y DSA en el tratamiento contra los diferentes estadios del parásito *Z. seriolae* en sus diferentes estadios disminuye el éxito de la eclosión de los oncomiracidios y, la supervivencia de los oncomiracidios y adultos, además de reducir la intensidad parasitaria media en *Seriola dorsalis*, por lo que su uso podría ser una opción a los tratamientos químicos que se utilizan actualmente para el tratamiento de *Z. seriolae*.

Por otro lado, en este trabajo se administró de forma preventiva y correctiva el polvo de ajo con el propósito de evaluar su efecto en la carga parasitaria del jurel. Al administrarlo de forma preventiva, no se registró un efecto en la intensidad parasitaria media. Armuelles Bernal (2016) observó que la adición de polvo de ajo al 4 % en el alimento, utilizando un proceso de recubrimiento externo, no fue suficiente para disminuir la carga de *Z. seriolae* en *S. lalandi*. En cambio Militz et al. (2013) reportaron una disminución de la carga parasitaria de *N. girellae* al adicionar 50 y 150 mL/kg de EA e Ingelbrecht et al. (2020) observaron una disminución de la carga de *Z. seriolae* luego de suplementar la dieta con recubrimiento externo de 10 g de polvo de ajo/kg.

En relación con la administración correctiva, en este bioensayo se registró una disminución en la carga de *Z. seriolae* en todos los tratamientos (incluido el control), en comparación con el valor inicial obtenido 30 días antes de la administración con ajo. Por esta razón no es posible atribuirle el efecto al consumo de ajo, sino a la respuesta inmune de los peces. Martins et al. (2002) reportaron un efecto similar con administración oral correctiva de DSA, donde observaron una disminución de la carga de *Anacanthorus penilabiatus* en el grupo control, por lo que concluye que se debe a la propia respuesta inmune del pacú (*Piaractus mesopotamicus*). Mientras que, Ingelbrecht et al. (2020) reportaron una disminución de la presencia de *Z. seriolae* después de 20 días de administración correctiva de 10 g de polvo de ajo/kg de alimento mediante recubrimiento externo.

La administración oral de polvo de ajo en forma preventiva y correctiva no disminuyó la intensidad parasitaria media de *Z. seriolae*. El efecto antihelmíntico que se ha registrado en otros trabajos podría estar relacionado con las diferencias en los genotipos de la planta y manipulación del producto antes, durante y después de su cosecha, lo que modifica el contenido de los compuestos del ajo (Baghalian et al., 2005; Prati et al., 2014; Zhang et al., 2016). Adicionalmente, Doan et al. (2020) mencionan que la sensibilidad a los componentes del ajo puede variar entre las diferentes especies de parásitos y peces, y que las condiciones ambientales también podrían tener un efecto potenciador o retardador.

Capítulo 3. Efecto de la administración oral de ajo en las variables productivas de *Seriola dorsalis* antes y después de la infestación con *Z. seriolae*

En este capítulo se describen las variables productivas en jureles sin parásitos (día 32) y con parásitos evaluados a los 60 días en el experimento oral preventivo y 30 días en el experimento oral correctivo.

3.1 Hipótesis

1. La administración de dietas suplementadas con 4 y 10 % de polvo de ajo, disminuyen la supervivencia del jurel.
2. La administración de dietas suplementadas con 4 y 10 % de ajo mejoran las variables productivas mediante el incremento de la ganancia de peso, la tasa de crecimiento específico y el consumo de alimento sin afectar la tasa de conversión alimenticia, el índice de condición de Fulton y el índice hepatosomático.

3.2 Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto en la supervivencia de los jureles expuestos a la administración oral de polvo de ajo (4, 10 y 25 %).
2. Analizar el efecto de la administración preventiva y correctiva del polvo de ajo suministrado a través de la dieta sobre las variables productivas de *S. dorsalis*: ganancia de peso, tasa de crecimiento específica, tasa de conversión alimenticia, consumo de alimento, índice de condición de Fulton e índice hepatosomático.

3.3 Metodología

3.3.1 Tratamiento oral preventivo

Las condiciones de cultivo de los peces que se emplearon en el experimento oral preventivo, con un peso promedio de 167.9 ± 5.46 g se describe en la sección 2.3.4.4.1. Durante un periodo de 60 días los peces recibieron la ración diaria correspondiente a su peso promedio según Orellana et al. (2014). La ración diaria se dividió en dos y cada fracción se suministró a las 8:00 y 15:00 h.

Para estudiar el efecto de la administración preventiva de ajo, el diseño experimental consistió en cuatro tratamientos, cada uno con 0, 4, 10 y 25 % de polvo de ajo por triplicado. En cada tanque de 460 L (12 en total) se colocaron 20 jureles y durante 60 días los peces fueron alimentados con las dietas experimentales correspondientes a cada tratamiento. A los 33 días de iniciado el bioensayo, se introdujeron hilos con huevos de *Z. seriolae* (aproximadamente 500 huevos) en cada unidad de cultivo. Para evaluar las variables productivas (sección 3.3.4) a los 0, 32 y 60 días de iniciado el experimento, se tomó una muestra de 5 peces de cada tanque.

3.3.2 Tratamiento oral correctivo

Las condiciones de cultivo de los peces que se emplearon en el experimento oral correctivo, con un peso promedio de 210.8 ± 8.26 g se detalla en la sección 2.3.4.5.1. La ración diaria de alimento se calculó de acuerdo con el peso promedio de los peces utilizando la tabla de alimentación propuesta por Orellana et al. (2014). Durante 30 días que duró el experimento, la ración diaria se dividió en dos y cada fracción se suministró a las 8:00 y 15:00 h.

El diseño experimental consistió en cuatro tratamientos, cada uno con 0, 4, 10 y 25 % de polvo de ajo por triplicado. En cada tanque o unidad de cultivo (12 en total) se colocaron 20 jureles parasitados con *Z. seriolae*. Durante 30 días los peces fueron alimentados con las dietas experimentales correspondientes a cada tratamiento. Para evaluar las variables productivas (sección 3.3.4), se tomaron muestras de 5 peces de cada unidad de cultivo.

3.3.3 Manejo de los peces

Para manipular a los peces de forma segura y obtener el resultado de las variables productivas, se procedió a colocar individualmente a cada organismo en un tanque con una solución anestésica de tricaina (100 mg/L) hasta observar la pérdida del equilibrio y sin el reflejo de huida.

3.3.4 Variables productivas

3.3.4.1 Peso

Para cuantificar el peso húmedo (g) de los peces, se colocó individualmente a cada jurel anestesiado en el plato de una balanza digital (Ohaus Adventurer-Pro) y se registró con una precisión de 0.01 g. Este procedimiento se realizó a los 0, 32 y 60 días del experimento preventivo y a los 0 y 30 días del experimento correctivo.

3.3.4.2 Ganancia de peso (GP)

La ganancia de peso se cuantificó a los 32 y 60 días en la administración preventiva y a los 30 días en el bioensayo correctivo, la cual se determinó con el valor del peso promedio inicial y el peso final de cada uno de los individuos muestreados.

$$GP = \frac{\text{Peso final (g)} - \text{Peso inicial (g)}}{\text{Peso final (g)}} \times 100 \quad (5)$$

3.3.4.3 Índice de Condición de Fulton (ICF)

El índice de condición de Fulton (ICF) se calculó los días 0, 32 y 60 en el experimento oral preventivo y a los 0 y 30 días en el experimento oral correctivo. Se utilizaron las medidas del peso húmedo (g) y la longitud estándar (cm), medida con un ictiómetro graduado en milímetros. En cada día de muestreo se consideraron cinco peces de cada unidad de cultivo. Para el cálculo de este índice se utilizó la siguiente ecuación (Ricker, 1975):

$$ICF = \frac{\text{peso húmedo (g)}}{\text{Longitud}^3 \text{ (cm)}} \times 100 \quad (6)$$

3.3.4.4 Índice hepatosomático (IHS)

El índice hepatosomático de los peces se calculó los días 0, 32 y 60 del experimento preventivo y a los 0 y 30 días en la administración correctiva. Para realizar el cálculo se cuantificó el peso total húmedo (g) y el

peso húmedo del hígado (g) de cinco peces de cada unidad de cultivo, y se utilizó la siguiente ecuación (Sadekarpawar y Parikh, 2013):

$$IHS = \frac{\text{Peso del hígado (g)}}{\text{Peso total (g)}} \times 100 \quad (7)$$

3.3.4.5 Consumo de alimento

El consumo de alimento se calculó a los 32 y 60 días en el bioensayo preventivo y a los 30 días en el experimento correctivo, considerando la cantidad de alimento entregada (g) y el número de peces, mediante la siguiente ecuación (Mzengereza et al., 2021):

$$\text{Consumo de alimento} = \frac{\text{cantidad de alimento consumido diariamente (g)}}{\text{cantidad de peces}} \quad (8)$$

3.3.4.6 Tasa de crecimiento específico (TCE)

La tasa de crecimiento específico (TCE) se calculó a los 32 y 60 días en la administración preventiva y a los 30 días en el bioensayo correctivo. Para esto, se consideró el valor del peso final e inicial, además del tiempo de evaluación (Mzengereza et al., 2021):

$$TCE = \frac{\text{Ln Peso final (g)} - \text{Ln Peso inicial}}{\text{Tiempo (días)}} \times 100 \quad (9)$$

3.3.4.7 Factor de conversión alimenticia (FCA)

El factor de conversión alimenticia (FCA) biológico (b) y económico (e) se calculó a los 32 y 60 días en el experimento preventivo y a los 30 días en el bioensayo correctivo. Para realizar el cálculo se midió la biomasa total, correspondiente al peso húmedo total (g) de los peces de cada unidad experimental para calcular la biomasa total, según el tipo de valor requerido, a saber: la biomasa ganada analiza la diferencia de la biomasa final con respecto a la biomasa inicial, la biomasa cosechada cuantifica la biomasa total que se extrae y la biomasa muerta considera la sumatoria total del peso de organismos que murieron antes de

finalizar el periodo de cultivo. Estos datos se relacionaron con la cantidad de alimento consumido en cada periodo, mediante la siguiente ecuación (Toledo Valenzuela, 2005):

$$FCAb = \frac{\text{alimento consumido (kg)}}{\text{Biomasa ganada (kg)} + \text{Biomasa cosechada (kg)} + \text{Biomasa muerta (kg)}} \quad (10)$$

$$FCAe = \frac{\text{alimento consumido (kg)}}{\text{Biomasa ganada (kg)} + \text{Biomasa cosechada (kg)}} \quad (11)$$

3.3.5 Análisis estadístico

La normalidad de los datos se analizó con la prueba de Shapiro-Wilks y la homogeneidad de varianzas se evaluó con la prueba de Levene. Con estas pruebas se demostró que los valores no cumplieron con la normalidad ni homogeneidad de varianzas. Para evaluar las diferencias entre tratamientos en las variables: peso, ganancia de peso, índice de condición de Fulton, índice hepatosomático, consumo de alimento, tasa de crecimiento específico, factor de conversión alimenticia y supervivencia, se aplicaron pruebas de Kruskal-Wallis, seguidas de pruebas de Dunn. Para analizar las diferencias entre los días de muestreo correspondiente a cada variable, se aplicó la prueba de Wilcoxon. Todos los análisis se hicieron con un nivel de significancia de 0.05 con el programa estadístico NCSS 2019.

3.4 Resultados

3.4.1 Efecto de la administración oral preventiva con ajo (día 0 y 32) en peces no parasitados

En el bioensayo preventivo, el peso total inicial de los peces fue 167.98 ± 5.46 g y al día 32 se observó un incremento significativo del peso en todos los tratamientos, incluido el control ($p < 0.05$, Tabla 6). Sin embargo, cuando se analizó el efecto en el peso entre tratamientos, al día 32 no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$, Tabla 6).

El valor del índice hepatosomático se incrementó de forma significativa al día 32 con los tratamientos de 4, 10 y 25 % con respecto al valor observado antes de iniciar el experimento oral preventivo ($p < 0.05$, Tabla 6), pero el índice de los peces que no consumieron ajo (control), no fue diferente. El IHS de los peces analizado entre tratamientos, no mostró diferencias significativas ($p > 0.05$).

El consumo de alimento suplementado preventivamente con 10 y 25 % de ajo, fue significativamente mayor que con las dietas sin ajo (control) y con 4 % de ajo ($p < 0.05$, Tabla 6).

Tabla 6. Variables productivas del jurel (*Seriola dorsalis*) no parasitados y alimentados preventivamente con dietas suplementadas con 0, 4, 10 y 25 % de polvo de ajo.

	Tratamiento	Días de muestreo	
		0	32
Peso (g)	Control	167.98±5.46 ^A	263.46±13.34 ^B
	4 %		261.68±16.87 ^B
	10 %		307.26±16.06 ^B
	25 %		258.47±16.35 ^B
Ganancia de peso (g)	Control	--	56.84±7.94
	4 %	--	55.78±10.04
	10 %	--	82.91±9.56
	25 %	--	53.87±9.73
ICF	Control	1.01±0.03	1.10±0.05
	4 %		1.04±0.03
	10 %		1.06±0.03
	25 %		0.98±0.03
TCE (%/día)	Control	--	1.45±0.17
	4 %	--	1.40±0.22
	10 %	--	1.96±0.17
	25 %	--	1.36±0.21
IHS	Control	1.04±0.05 ^A	1.13±0.07 ^A
	4 %		1.27±0.07 ^B
	10 %		1.25±0.08 ^B
	25 %		1.26±0.07 ^B
Consumo de alimento (g alimento/pez/día)	Control	--	4.64±0.07 ^a
	4 %	--	4.69±0.12 ^a
	10 %	--	5.06±0.14 ^b
	25 %	--	4.99±0.15 ^b
	Tratamiento	Días de muestreo	
		0	32
FCAb	Control	--	0.36±0.04
	4 %	--	0.37±0.02
	10 %	--	0.32±0.04
	25 %	--	0.36±0.04
FCAe	Control	--	0.59±0.03
	4 %	--	0.59±0.04
	10 %	--	0.57±0.01
	25 %	--	0.66±0.08

-- No aplica Media ± error estándar. Se utilizaron letras mayúsculas para la comparación entre los días de evaluación de cada tratamiento y letras minúsculas para la comparación entre tratamientos. Letras diferentes del mismo tipo (mayúsculas o minúsculas) indican diferencias significativas ($p < 0.05$). ICF=índice de condición de Fulton, TCE=tasa de crecimiento específica, IHS=índice hepatosomático, FCAb=factor de conversión alimenticia biológico, FCAe= factor de conversión alimenticia económico.

En las variables de crecimiento, ganancia de peso, tasa de crecimiento específica, índice de condición de Fulton, índice hepatosomático y el factor de conversión biológico y económico ($p > 0.05$, Tabla 6), además de la supervivencia (Figura 9) no se registraron diferencias significativas entre los tratamientos al día 32 ($p > 0.05$).

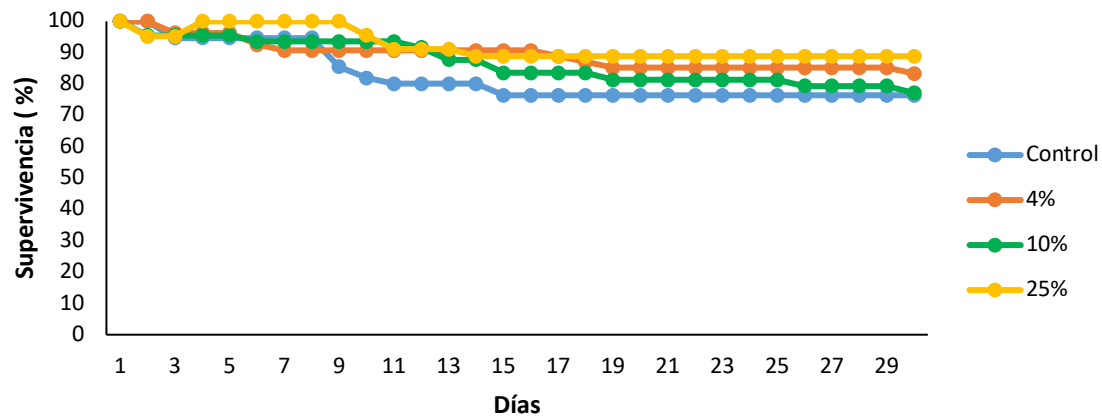


Figura 9. Supervivencia del jurel (*Seriola dorsalis*) no parasitados y alimentados preventivamente con dietas suplementadas con 0, 4, 10 y 25 % de polvo de ajo. Media $\pm$ error estándar.

3.4.2 Efecto de la administración oral preventiva (día 60) y correctiva (día 0 y 30) con ajo en peces parasitados

La administración preventiva de peces parasitados, evaluado a los 60 días de haber iniciado el experimento, ocasionó un incremento en el peso total de los grupos control y 4 % PA, comparado con el peso de los tratamientos 10 % y 25 % PA ($p < 0.05$, Tabla 7). Mientras que con la administración correctiva no se registraron diferencias significativas ($p > 0.05$, Tabla 7). En la administración oral correctiva, los resultados del tratamiento con 10 % PA aparecen con el acrónimo “ND” que indica que no hay datos, debido a que este grupo experimental no sobrevivió hasta el final del bioensayo.

Con respecto a la ganancia de peso de los jureles parasitados que recibieron la dieta preventiva, en los grupos control y 4 % PA fue significativamente mayor que con el 10 % y 25 % PA ($p < 0.05$, Tabla 7). En la administración correctiva no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$, Tabla 7).

El índice de condición de Fulton (ICF) de los peces parasitados (día 60) no fue afectado significativamente por la administración preventiva de las dietas suplementadas con ajo ($p > 0.05$, Tabla 7). En relación con el tratamiento correctivo de los peces parasitados, se observó que al contrastar el valor promedio entre el inicio del experimento y los 30 días, no se observaron diferencias en los tratamientos control y 25 %. Sin

embargo, el tratamiento con 4 % PA fue diferente ($p < 0.05$, Tabla 7). Para esta misma forma de administración del ajo, a los 30 días no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ($p > 0.05$, Tabla 7).

Tabla 7. Variables productivas del jurel (*S. dorsalis*) parasitado con *Z. seriolae* y alimentados de forma preventiva y correctiva con dietas suplementadas con polvo de ajo y control sin ajo.

	Tratamiento	Preventivo	Correctivo	
		60	0	30
Peso (g)	Control	439.70±36.83 ^a	210.77±8.26	291.64±9.21
	4 %	420.30±21.10 ^a		308.17±13.02
	10 %	313.28±20.86 ^b		ND
	25 %	286.32±17.95 ^b		294.75±11.61
Ganancia de peso (g)	Control	161.76±21.93 ^a	--	38.36±4.37
	4 %	150.21±12.56 ^a	--	46.21±6.18
	10 %	86.49±12.42 ^b	--	ND
	25 %	70.44±10.69 ^b	--	39.84±5.51
ICF	Control	1.51±0.19	1.04±0.02 ^A	1.07±0.02 ^A
	4 %	1.50±0.09		1.13±0.02 ^B
	10 %	0.99±0.12		ND
	25 %	0.85±0.11		1.08±0.02 ^A
TCE	Control	1.51±0.19 ^a	--	1.06±0.11
	4 %	1.50±0.09 ^a	--	1.22±0.15
	10 %	0.99±0.12 ^b	--	ND
	25 %	0.85±0.11 ^b	--	1.09±0.14
IHS	Control	1.19±0.06	0.98±0.04 ^A	1.47±0.08 ^B
	4 %	1.27±0.06		1.42±0.04 ^B
	10 %	1.13±0.05		ND
	25 %	1.25±0.10		1.43±0.04 ^B
Consumo de alimento (g alimento/pez/día)	Control	6.88±0.19 ^a	--	5.33±0.18 ^a
	4 %	7.54±0.07 ^b	--	5.79±0.22 ^b
	10 %	7.33±0.21 ^b	--	ND
	25 %	6.05±0.19 ^c	--	5.45±0.27 ^{ab}
FCAb	Control	0.29±0.05 ^a	--	0.27±0.02
	4 %	0.30±0.04 ^a	--	0.27±0.04
	10 %	0.26±0.05 ^a	--	ND
	25 %	0.23±0.03 ^a	--	0.22±0.01
FCAe	Control	0.65±0.08	--	0.67±0.02
	4 %	0.68±0.06	--	0.62±0.03
	10 %	0.65±0.03	--	ND
	25 %	0.72±0.05	--	0.45±0.07

-- No aplica Media ± error estándar. Se utilizaron letras mayúsculas para la comparación entre los días de evaluación de cada tratamiento y letras minúsculas para la comparación entre tratamientos. Letras diferentes del mismo tipo (mayúsculas o minúsculas) indican diferencias significativas ($p < 0.05$). *ND=no hay datos, debido a que este grupo experimental no sobrevivió hasta el final del bioensayo. ICF=índice de condición de Fulton, TCE=tasa de crecimiento específica, IHS=índice hepatosomático, FCAb=factor de conversión alimenticia biológico, FCAe= factor de conversión alimenticia económico.

La tasa de crecimiento específico (TCE) en el bioensayo preventivo fue significativamente mayor en el control y 4 % PA, comparado con 10 y 25 % PA ($p < 0.05$, Tabla 7). Con la administración oral correctiva no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ($p > 0.05$, Tabla 7).

La administración preventiva de las dietas suplementadas con polvo de ajo en peces parasitados (día 60), no tuvo efectos significativos en el índice hepatosomático (IHS) ($p > 0.05$, Tabla 7). En el experimento oral correctivo, se encontraron diferencias significativas entre el valor del IHS de los peces analizados antes de que recibieran las dietas suplementadas con ajo (inicial) y los grupos control, 4 % y 25 % PA al día 30 ($p < 0.05$, Tabla 7); sin embargo, cuando se realizó la comparación entre tratamientos, no se registraron diferencias significativas ($p > 0.05$, Tabla 7).

La administración preventiva de ajo provocó un incremento del consumo de alimento en los tratamientos con 4 % y 10 %, con respecto al grupo control, en contraste con 25 % PA el consumo de alimento fue significativamente menor ($p < 0.05$, Tabla 7). En la administración correctiva, solo los peces que recibieron la suplementación con 4 % de PA incrementaron el consumo de alimento en los peces con respecto al control y 25 % PA ($p < 0.05$, Tabla 7).

El factor de conversión biológico y económico del alimento (FCAb y FCAe) no fue afectado por la suplementación de dietas con ajo en ambas formas de administración, preventiva y correctiva ($p > 0.05$, Tabla 7).

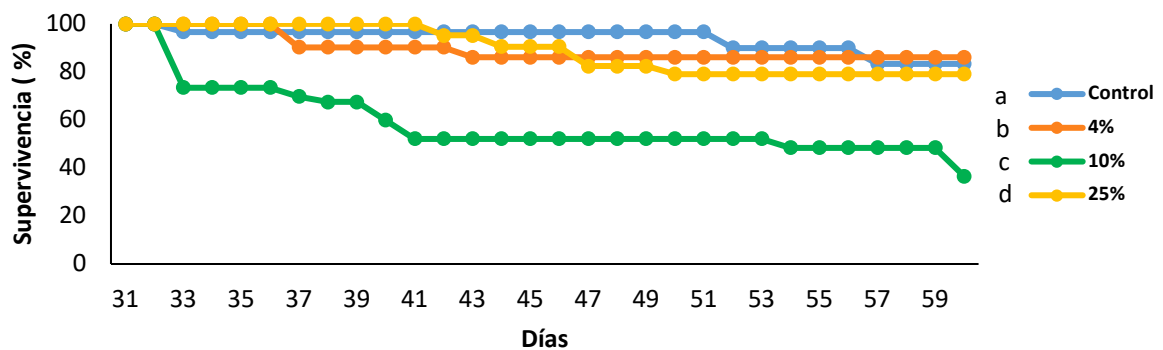


Figura 10. Supervivencia del jurel (*S. dorsalis*) parasitado con *Z. seriolae* y alimentados preventivamente con dietas suplementadas con 0, 4 y 25 % de polvo de ajo a partir del día 31. Media $\pm$ error estándar. Letras diferentes representan las diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$).

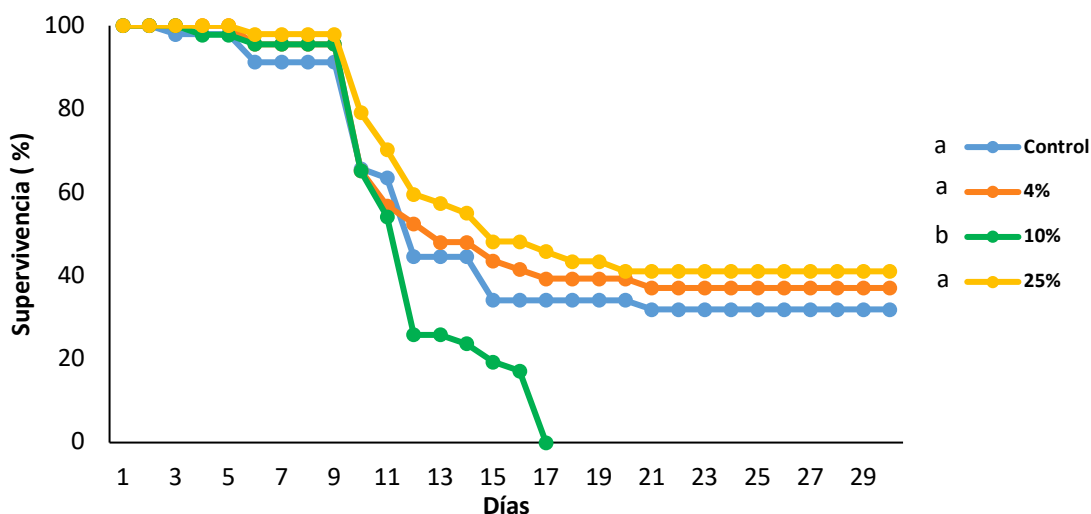


Figura 11. Supervivencia del jurel (*S. dorsalis*) parasitados con *Z. seriolae* y alimentados correctivamente con dietas suplementadas con 0, 4, 10 y 25 % de polvo de ajo. Media $\pm$ error estándar. Letras diferentes representan las diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$).

La suplementación de las dietas con polvo de ajo tuvo efectos en la supervivencia de los peces parasitados en el experimento oral preventivo, comprendida desde el día 31 al día 60. La mayor supervivencia (86 %) fue registrada en los peces que recibieron 4 %, seguido por 83 % en los peces alimentados con dietas sin ajo (control), 72 % con 25 % de PA y 37 % con 10 % de PA ($p < 0.05$, Figura 10).

En el experimento oral correctivo, se registró una mayor supervivencia en los peces que recibieron dietas con 25 %, 4 % y 0 % (control) de polvo de ajo con respecto al grupo que recibió 10 % de PA, ya que ningún individuo sobrevivió en este grupo experimental ($p < 0.05$, Figura 11).

3.5 Discusión

La rentabilidad de la producción acuícola recae, en gran medida, en la cantidad y calidad de los alimentos que sean utilizados (Baki y Yüssel, 2017). Es por ello que aprovechar al máximo las dietas, resulta imperante y más si existen productos, como el ajo, que tienen probabilidades de mejorar el desempeño productivo.

En el presente bioensayo, la administración oral de polvo de ajo en las dietas se realizó de dos maneras, preventiva y correctiva. Esto con el propósito de evaluar el efecto que tienen ambas formas de tratamiento terapéutico en el desempeño productivo de los peces, en ausencia o presencia de desafíos con parásitos,

en este caso la presencia de *Z. seriolae*. En general, fueron pocos los hallazgos relacionados con una alteración, positiva o negativa, de las variables productivas.

Uno de los objetivos productivos de un cultivo acuícola es el incremento de la biomasa a partir de la ganancia de peso, sin que esto incurra en un incremento en los costos de producción. En este estudio se analizó el efecto de la administración preventiva y correctiva de dietas suplementadas con polvo de ajo en el peso de los peces. En ausencia de parásitos, después de un periodo de 32 días de alimentación, con y sin suplementación con ajo, se observó un incremento en el peso, pero que no fue afectado por el nivel de inclusión del ajo en el alimento. Resultados similares se obtuvieron en un estudio previo con *S. lalandi*, alimentado con una dieta con diferentes niveles de inclusión de ajo (Armuelles Bernal, 2016). La diferencia en los métodos utilizados en ambos bioensayos, además de la especie de jurel, es el uso de diferentes fuentes de polvo de ajo y el procedimiento utilizado para su inclusión en la partícula de alimento. En el presente trabajo se utilizó polvo de ajo comercial y fue adicionado en la premezcla, mientras que Armuelles Bernal (2016) obtuvo polvo de ajo a partir de ajo fresco y lo incluyó en la partícula de alimento mediante recubrimiento externo. Sin embargo, estos cambios en el método no fueron suficientes para ocasionar una diferencia en el peso de los peces al comparar diferentes niveles de inclusión. Sin embargo, estos cambios en la metodología no fueron suficientes para ocasionar un efecto en el peso de los peces. Esto podría estar relacionado con una baja concentración de metabolitos secundarios que pudiesen estar involucrados en el incremento del peso de los peces, ya que la calidad de la planta depende de las condiciones ambientales en las que se produce, del manejo antes, durante y después de la cosecha (Baghalian et al., 2005; Prati et al., 2014; Zhang et al., 2016). La concentración de los componentes químicos del ajo puede ser diferentes dependiendo de la calidad genética de la planta, métodos de cultivo y el procedimiento empleado para su extracción (Martins et al., 2016; Doan et al., 2020).

El presente estudio, destacó que en jureles parasitados alimentados preventivamente el peso fue mayor en el control y en la dieta con 4 % de PA. Este resultado indica que no hay una influencia directa del ajo sobre estas variables de crecimiento en los peces. En contraste, en *S. lalandi* parasitado con *Z. seriolae* (Armuelles Bernal, 2016) y en *O. mykiss* infectado con *Aeromonas hydrophila* (Nya et al., 2010), alimentados con dietas conteniendo diferentes porcentajes de ajo, no se observaron diferencias significativas en el crecimiento. En el presente estudio, la administración correctiva del ajo en el alimento no produjo cambios significativos en el peso entre los días de muestreo ni entre tratamientos. Este efecto coincide con lo observado por Martins et al. (2002) con *P. mesopotamicus*, infestado con *A. penilabiatu*s, cuando fue alimentado con dietas suplementadas con disulfuro de alilo, un metabolito secundario de la

alicina. Por tanto, el ajo no tiene efectos en el peso en presencia o ausencia de desafíos, como la presencia de patógenos.

De igual forma, se registró que el suministro oral de ajo en forma preventiva con peces no parasitados ni en la correctiva con peces parasitados no tuvo efecto en la ganancia de peso ni en la tasa de crecimiento. El tratamiento oral preventivo en peces parasitado registró un mayor valor de la tasa de crecimiento y la ganancia de peso en los individuos que recibieron la dieta control y la suplementada con 4 % de polvo de ajo. Hassaan y Soltan (2016) encontraron que el uso de ajo en la dieta de *O. niloticus* incrementó la ganancia de peso.

De igual forma, Lee et al. (2014) reportaron el incremento de la ganancia de peso de *Acipenser ruthenus* a medida que incrementaba la inclusión de ajo en la dieta. En cuanto a la tasa de crecimiento específico, Sahu et al. (2007) reportaron que no hubo diferencias entre los diferentes niveles de inclusión de ajo en las dietas de *L. rohita* infectada con *Aeromonas hydrophila* y por el contrario, Hassaan y Soltan (2016) encontraron un mejor desempeño productivo en esta variable cuando se utilizó ajo, en comparación con otros fitobióticos. En contraste, Zare et al. (2021) no reportaron ventajas en estas variables productivas en juveniles de *Perca fluviatilis* alimentados con dietas suplementadas con ajo (10, 20 y 30 g de ajo/kg de dieta) por 87 días.

En los estudios mencionados anteriormente, se observa que no hay una tendencia del efecto del ajo en algunas de las variables relacionadas con el crecimiento de los peces, lo que podría estar relacionado con la calidad de la planta y la composición química del ajo (Baghalian et al., 2005; Prati et al., 2014; Martins et al., 2016; Zhang et al., 2016; Doan et al., 2020). Esta última no solo está regida por la concentración de compuesto organosulfurados, sino por la composición nutricional, la cual está relacionada con las condiciones de cultivo (Martins et al., 2016). En el presente estudio no se observaron diferencias en la concentración de proteínas totales en la dieta, pero el aporte de esta macromolécula en el polvo de ajo fue mucho menor, por lo que se puede inferir que no es suficiente como fuente proteica.

En relación con los lípidos, fue evidente que a medida que incrementaba la suplementación de ajo en la dieta la concentración disminuía, con excepción de 4 % de polvo de ajo. Tanto los aminoácidos como los ácidos grasos forman parte del metabolismo de los peces asociado al crecimiento (Li et al., 2009; Mejri et al., 2021), por lo que en futuras investigaciones sería importante el análisis de estas dos variables a partir de la suplementación de las dietas con ajo y así evaluar el efecto que podrían tener en el crecimiento de los peces. La inclusión de polvo de ajo en las dietas no debe alterar la composición nutricional del alimento

de los peces, ya que se propician desbalances fisiológicos que aumentan la probabilidad de que los organismos sean vulnerables a patógenos y al estrés por alteraciones en las condiciones ambientales.

En peces no parasitados, se observó que las dietas con ajo no tuvieron un efecto sobre el ICF. En peces parasitados, que recibieron dietas de forma preventiva tampoco se observó un efecto que estuviese relacionado con la suplementación con ajo. En la forma de administración correctiva, con el tratamiento con 4 % de ajo se registró un incremento del valor del ICF al día 30 con respecto al valor inicial, pero no se observaron diferencias entre los tratamientos. En *S. lalandi* (Armuelles Bernal, 2016) y *O. mykiss* (Nya et al., 2010) no se reportaron cambios en el ICF por alguna de las dietas suplementadas con ajo y alicina, respectivamente.

En contraste, en *Ascipenser ruthenus* se registró un mayor índice en los peces alimentados con una dieta suplementada con 2 % de polvo de ajo (Lee et al., 2014). En *Perca fluviatilis* se encontró un mayor índice de condición en ausencia o bajas dosis con ajo (Zare et al., 2021). Adicionalmente, se ha documentado en *Lutjanus guttatus* parasitado con dactilogíridos (del Rio-Zaragoza et al., 2010) y en *S. dumerili* con *Z. seriolae* (Montero et al., 2004) la ausencia de efectos en el índice de condición debido a la intensidad parasitaria. En el presente trabajo, el incremento en el ICF con la dieta con 4 % de polvo de ajo podría relacionarse con el consumo de alimento que presentó el grupo que recibió esta dieta de forma correctiva, ya que destacó un mayor consumo de alimento en comparación con el resto de los tratamientos. Al contrastar la información reportada por diversos autores, esta variable tampoco sigue una tendencia, lo que puede estar relacionado a la especie, las condiciones de cultivo, la presencia o ausencia de factores estresantes y la calidad de la planta utilizada.

En los mamíferos se ha registrado la presencia de receptores que han sido identificados como TRPA1 y TRPV1, que están involucrados en procesos de termosensación, pero también se ha identificado su actividad ante la presencia de ciertos químicos, entre esos los de olores pungentes, que generalmente están relacionados a compuestos organosulfurados como la alicina (Macpherson et al., 2005). El ajo es utilizado en gastronomía como un potenciador del sabor, debido a la razón química y fisiológica que estimula la ingesta del alimento suplementado con ajo.

En los peces, también se han encontrado estos receptores (Oda et al., 2017; Nisembaum et al., 2022), razón por la cual se sugiere considerar que el ajo podría tener un efecto positivo en el incremento de su consumo de alimento. En el presente bioensayo, la adición del ajo en las dietas incrementó el consumo de alimento en los jureles. Esto fue registrado en peces antes de realizar la infestación parasitaria, con un

mayor consumo de alimento a medida que aumentaba la cantidad de ajo en las dietas; este efecto se mantuvo en los peces parasitados, con excepción del grupo que consumió 25 % de PA en la dieta. Armuelles Bernal (2016), observó el mismo efecto antes y después de la infestación parasitaria con la suplementación de las dietas por recubrimiento con 2 y 4 % de polvo de ajo. De manera similar, Militz et al. (2013) y Zare et al. (2021) observaron en *L. calcarifer* y en *P. fluviatilis* que la adición de ajo al alimento no disminuyó la palatabilidad, pero tampoco incrementó el consumo. Mientras que Hassaan y Soltan (2016) también encontraron que *O. niloticus* consumió una mayor cantidad de alimento con ajo, en comparación con otros extractos vegetales, sin que se incrementara el FCA. Blumenthal (2014) observó el aumento de la palatabilidad de las dietas suplementadas con prazicuantel cuando se adicionaba ajo, a pesar del efecto negativo que tiene este agente antihelmíntico sobre la palatabilidad del alimento.

El aumento del consumo de alimento se debe correlacionar en forma positiva con el crecimiento de los peces, ya que de otra forma habría un aprovechamiento ineficiente del alimento, que afectaría el rendimiento productivo (e.g. FCA). El factor de conversión alimenticia analiza el rendimiento del alimento con respecto al crecimiento de los peces (Fry et al., 2018). En este trabajo, se analizó el efecto de las dietas sobre el factor biológico y económico de conversión, donde la primera además de la biomasa neta considera la mortalidad (Flores y Vergara, 2012).

Estas dos variables no fueron afectadas por las dietas experimentales, en ninguno de los escenarios evaluados, es decir, peces sin parasitar alimentados de forma preventiva y peces parasitados alimentados de forma preventiva y correctiva. Esto indica que el ajo no afectó el factor de conversión alimenticia en las condiciones experimentales descritas previamente. Armuelles Bernal (2016) reportó la ausencia de efecto de la inclusión del ajo en el alimento en el FCA después de un periodo de alimentación de 32 días, y Sahu et al. (2007) tampoco encontraron diferencias entre los tratamientos que consistían en la administración de dietas con ajo a *Labeo rohita* infectado con *Aeromonas hydrophila*. De igual forma, Zare et al. (2021) no observaron cambios en el FCA en juveniles de *Perca fluviatilis* alimentados con dietas suplementadas con ajo por 87 días. Por el contrario, Adineh et al. (2020) registraron un mejor aprovechamiento de las dietas con 0.5, 1 y 2 % de ajo en la dieta de *O. mykiss* por 40 días.

En relación con el índice hepatosomático, que explica la proporción que corresponde al hígado con respecto al peso total de los peces (Sadekarpawar y Parikh, 2013), en este experimento se observó un incremento del valor del IHS entre los días 0 y 32 en el tratamiento oral preventivo y entre los días 0 y 30 en el tratamiento oral correctivo. Shalaby et al. (2006), Adineh et al. (2020) y Zare et al. (2021) no encontraron cambios significativos en el IHS cuando *O. niloticus*, *O. mykiss* y *P. fluviatilis*, respectivamente,

consumieron dietas suplementadas con ajo. Mientras que, Metwally (2009) reportaron la disminución del IHS de *O. niloticus* cuando se suplementó la dieta con diferentes presentaciones de ajo, esta tendencia también fue reportada en *Asciopenser ruthenus* por Lee et al. (2014), al observar la disminución del IHS a medida que aumentaba la cantidad de ajo en la dieta. Para evidenciar la causa del incremento de la proporción del hígado con respecto al peso corporal, es necesario la cuantificación en sangre o tejidos de sustancias involucradas en la integridad del tejido hepático como las aminotransferasas, además del análisis histopatológico del hígado.

La supervivencia de los organismos es otra variable que se toma en cuenta cuando se prueban dietas que han sido suplementadas con otros ingredientes. En este estudio, la supervivencia de los peces no se vio afectada por el consumo de ajo en el experimento oral preventivo (etapa sin parásitos), así como se reportó también en *O. mykiss* que recibieron dietas suplementadas con ajo por 40 días (Adineh et al., 2020) y en *P. fluviatilis* durante 87 días (Zare et al., 2021). Sin embargo, con la administración oral preventiva (fase de infestación parasitaria) y correctiva (peces parasitados), fue evidente una disminución de la supervivencia, en particular en el grupo experimental que recibió dietas con 10 % de ajo. En este sentido, Amorin et al. (2019) no detectaron que la adición de ajo en las dietas produjera mejoras directas en la supervivencia de *Rhamdia quelen* infestada con *I. multifilis*.

El método para la preparación de las dietas utilizadas en el presente estudio fue el mismo en todos los tratamientos, así como la ubicación de las unidades experimentales de forma aleatoria. La preparación de las dietas con las diferentes concentraciones de ajo se hacía el mismo día, comenzando por la dieta control y finalizando con la de 25 %. La supervivencia observada en el tratamiento con 10 % de inclusión de ajo podría ser una consecuencia de los compuestos del ajo, sin embargo, en el tratamiento con una mayor cantidad de ajo (25 %) no se observó esta repuesta. Es posible que la mortalidad esté asociada a algún factor estresante relacionado con el ambiente, la ubicación de los tanques y la presencia de parásitos. En este experimento se detectó un incremento súbito del flujo de entrada de agua y aire a todas las unidades de cultivo (control, 4, 10 y 25 %), que produjo ruido y turbulencia, lo que pudo ocasionar una reducción en el consumo de alimento y un disturbio suficiente para que los peces se alteraran y chocaran contra las paredes del tanque.

A partir de este disturbio ambiental, se registró la muerte paulatina de todos los individuos del grupo experimental que recibió 10 % PA. En un estudio en el que se expuso a *Carassius auratus* a una fuente de ruido controlado, se observó nado errático y reflejo de huida, además, se registró un incremento en la concentración de cortisol y glucosa durante los primeros 60 min de exposición a este agente estresor, y

posteriormente los niveles se mantenían normales. Esta reducción de los niveles de cortisol a pesar de la persistencia del estímulo estresor puede ser el resultado del agotamiento del sistema endocrino, de que el pez se habituó a la condición o que el estímulo ocasiona una lesión en el oído interno, que disminuye el grado de percepción del ruido (Hontela et al., 1992; Smith, 2004; Martínez-Porchas et al., 2009). Es posible que la dieta con 10 % PA tenga diferencias en la composición de metabolitos secundarios de ajo, aminoácidos o ácidos grasos, entre otros, que causen alteraciones fisiológicas en los peces y los hagan vulnerables a patógenos o situaciones de estrés.

Adicionalmente hay que considerar que este incremento en la mortalidad se deba a un tema ambiental, ya que en dos experimentos diferentes se observó la disminución de la supervivencia en individuos pertenecientes al mismo grupo experimental que fueron colocados en las mismas unidades de cultivo, pero en tiempos diferentes. La mortalidad fue total en el bioensayo oral correctivo porque a diferencia del preventivo, recibió un estrés ambiental adicional, el incremento del flujo de agua y aire.

Capítulo 4. Efecto de la administración oral de ajo en los índices sanguíneos de *Seriola dorsalis* antes y después de la infestación con *Z. seriolae*

En este apartado se analiza el efecto del ajo en las variables sanguíneas: hematocrito, recuento total de eritrocitos y leucocitos, proteínas totales, albúmina, globulinas y enzimas aminotransferasas. Se evaluó su efecto al suministrarlo por vía oral, de forma preventiva (sin presencia de parásitos), y correctiva (con presencia de parásitos), para lo cual se siguieron dos aproximaciones experimentales:

1. Preventiva, con evaluación a los 32 días de alimentación con las dietas suplementadas con ajo, sin exposición al parásito, seguido de la evaluación después de treinta días adicionales de alimentación con ajo y con exposición al parásito.
2. Correctiva, con evaluación a los 30 días de alimentación con ajo utilizando peces parasitados.

4.1 Hipótesis

1. Las dietas suplementadas con 4 y 10 % de ajo disminuyen el hematocrito, el recuento total de eritrocitos y la actividad de las enzimas aminotransferasas, mientras que aumenta el valor de leucocitos totales y globulinas.

4.2 Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto de la adición de polvo de ajo en las dietas de *S. dorsalis*, administrado de forma preventiva y correctiva en las variables sanguíneas: recuento de eritrocitos y leucocitos totales, proteínas totales, albumina, globulinas y enzimas aminotransferasas (aspartato y alanina).

4.3 Metodología

4.3.1 Obtención y manejo de las muestras de sangre

Las muestras de sangre se obtuvieron de jureles que fueron parte de los experimentos de suplementación de las dietas con 0, 4, 10 y 25 % de PA, administradas de forma preventiva y correctiva. La metodología de cultivo y desarrollo de ambos bioensayos fue descrita en las secciones 2.3.4.4 para administración preventiva y 2.3.4.5 para la administración correctiva.

En el bioensayo preventivo se realizaron muestreos a los 0, 32 y 60 días y se tomaron cinco peces de cada unidad de cultivo, mientras que en el experimento correctivo los muestreos se llevaron a cabo a los 0 y 30 días, de donde se extrajeron cinco peces de cada unidad de cultivo.

Para realizar la extracción de sangre de los peces fue necesario inducirlos previamente a anestesia general, mediante la inmersión en una solución de 100 mg/L (0.38 mmol/L) de Tricaine-S® (Leary *et al.*, 2013). La sangre de los peces se obtuvo mediante la punción de la vena caudal con una jeringa de 3 mL y se colocó una parte en un tubo con anticoagulante EDTA y otra fracción en un tubo de 1.5 mL sin anticoagulante. El tubo con anticoagulante se conservó en refrigeración a 8°C hasta su uso, no mayor de 24 h. La sangre en los tubos sin anticoagulante se dejó reposar durante una hora en refrigeración para permitir que se formara el coágulo (Stockham y Scott, 2013) y posteriormente se centrifugó por 10 min a 7,000 RPM (5,040 X·g) en una centrífuga refrigerada Megafuge 16R (Thermo Scientific) para obtener el suero, el cual se conservó en ultracongelación (-80°C) hasta el momento de su análisis.

4.3.2 Hematocrito

La muestra de sangre con anticoagulante se utilizó para llenar $\frac{3}{4}$ partes de la capacidad de los tubos capilares de microhematocrito (Corning), se selló uno de sus extremos con plastilina y se colocaron en la centrífuga de microhematocrito (Clay Adams) por 10 minutos a 7,000 RPM (5117.1 X·g). Posteriormente, los capilares se colocaron en el lector de microhematocrito (Clay Adams) para evaluar la proporción de los componentes celulares en el plasma. Los resultados se expresaron como porcentaje del volumen total.

4.3.3 Recuento total de eritrocitos y leucocitos

La sangre con anticoagulante se mezcló con la solución de Natt-Herrick en una proporción 1:200 (Natt y Herrick, 1952) por 30 minutos para teñir las células sanguíneas del jurel. Posteriormente, se colocaron

alícuotas de la sangre teñida en cada cámara de un hematocitómetro (Hausser Scientific®) y se dejó reposar por 10 minutos. Para el recuento total de eritrocitos y leucocitos (RTE y RTL, respectivamente) se utilizó el microscopio Axio Scope A1 (Zeiss®) con un aumento de 400X. En cada cámara del hematocitómetro se identificaron los cuadrantes correspondientes, para eritrocitos los 5 cuadrantes resaltados en color rojo en el cuadro central de la cámara y para los leucocitos los 4 cuadrantes externos resaltados en color azul (Figura 12). Se utilizaron las siguientes ecuaciones para calcular los resultados de cada variable (Román Vega, 2013):

$$RTE = \left(\frac{\text{número total de eritrocitos} \times 4000}{80} \right) \times 200 \quad (12)$$

$$RTL = \left(\frac{\text{número total de leucocitos contados} \times 10}{8} \right) \times 200 \quad (13)$$

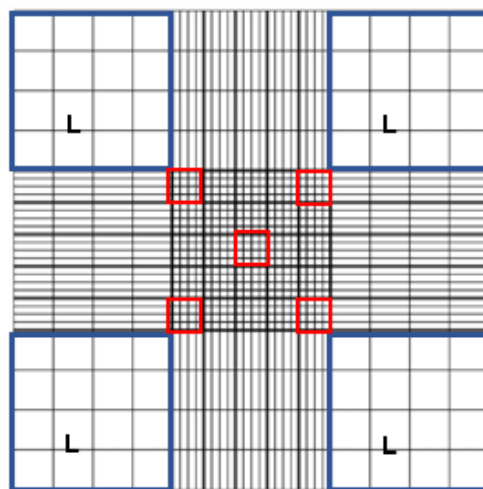


Figura 12. Cámara del hematocitómetro: cuadrantes para el recuento de eritrocitos (cuadro central) y leucocitos (cuadrantes externos identificados con "L").

4.3.4 Química sérica

El suero previamente ultracongelado (-80 °C) se descongeló a temperaturas de refrigeración (4 °C) para posteriormente realizar el análisis de proteínas totales, albúmina, globulinas y enzimas aminotransferasas.

4.3.4.1 Proteínas totales

El análisis de la concentración de proteínas totales se realizó por la técnica de Biuret estandarizada para microplaca por Yen-Ortega y Campos-Espinoza (Laboratorio de Ecofisiología de Organismos Acuáticos, 2017) a partir del kit Randox TP245. Para preparar la curva de calibración se utilizó el estándar de calibración del kit de 58.56 g/L y se calculó un decremento geométrico de base 2 para preparar las diluciones. Las concentraciones preparadas en tubos para microcentrífuga de 0.5 mL fueron: 58.56, 29.28, 14.64, 7.32 y 3.66 g/L. En una microplaca de 96 pocillos se colocó por triplicado 250 μ L de reactivo de biuret y 5 μ L de las diluciones para la curva de calibración o de suero. La microplaca se introdujo en el espectrofotómetro Varioskan Flash 4.00.53 (Thermo Scientific) para la incubación a 25 °C por 30 min y posterior registro de la absorbancia a una longitud de onda de 546 nm. Para obtener la concentración de proteínas totales de cada muestra se utilizó la ecuación de la regresión lineal de la curva de calibración con un coeficiente de determinación ≥ 0.98 .

4.3.4.2 Albúmina

El análisis de la concentración de albumina se realizó por la técnica estandarizada para microplaca por Yen-Ortega y Campos-Espinoza (Laboratorio de Ecofisiología de Organismos Acuáticos, 2017) a partir del kit Randox AB362. Para preparar la curva de calibración se utilizó el estándar de calibración del kit de 46 g/L y se calculó un decremento geométrico de base 2 para preparar las diluciones. Las concentraciones preparadas en tubos para microcentrífuga de 0.5 mL fueron 46, 23, 11.5, 5.75 y 2.88 g/L. En una microplaca de 96 pocillos se colocó por triplicado 300 μ L de reactivo de BCG y 1 μ L de las diluciones para la curva de calibración o de suero. La microplaca se introdujo en el espectrofotómetro Varioskan Flash 4.00.53 (Thermo Scientific) para la incubación a 25 °C por 10 min y posterior registro de la absorbancia a una longitud de onda de 578 nm. Para obtener la concentración de albumina de cada muestra se utilizó la ecuación de la regresión lineal de la curva de calibración con un coeficiente de determinación ≥ 0.98 .

4.3.4.3 Globulinas

La concentración de globulinas se calculó por la diferencia entre proteínas totales y albúmina (Criveleni *et al.*, 2011).

4.3.4.4 Aspartato y Alanina aminotransferasa (AST y ALT)

La cuantificación de estas enzimas se realizó mediante la técnica estandarizada para microplaca por Yen-Ortega y Campos-Espinoza (Laboratorio de Ecofisiología de Organismos Acuáticos, 2017) a partir del kit Randox AS1202 y AL1200. En una microplaca de 96 pocillos se colocaron por triplicado 200 μ L de reactivo y 20 μ L de suero. La microplaca se introdujo en el espectrofotómetro Varioskan Flash 4.00.53 (Thermo Scientific) para la incubación a 37 °C por 1, 2 y 3 min, posteriormente se registró la absorbancia a una longitud de onda de 340 nm. Para obtener la concentración de AST y ALT, se calculó la diferencia de las absorbancias al minuto 2 y 3. Este valor fue multiplicado por 1746 como indica el fabricante.

4.3.5 Análisis estadístico

La normalidad de los datos se analizó con la prueba de Shapiro-Wilks y la homogeneidad de varianzas se evaluó con la prueba de Levene. Con estas pruebas se demostró que los valores no cumplieron con la normalidad ni homogeneidad de varianzas. Para evaluar las diferencias entre tratamientos en las variables: hematocrito, concentración total de eritrocitos y leucocitos, proteínas totales, albúmina, globulinas y enzimas aminotransferasas, se aplicaron pruebas de Kruskal-Wallis, seguidas de pruebas de Dunn. Para analizar las diferencias entre los días de muestreo correspondiente a cada variable, se aplicó la prueba de Wilcoxon. El análisis se realizó con un nivel de significancia de 0.05 con el programa estadístico NCSS 2019.

4.4 Resultados

4.4.1 Hematocrito y recuento total de eritrocitos y leucocitos

a. Peces sin parásitos

El valor del hematocrito, al ser contrastado entre el día 0 y 32 de la administración preventiva registró diferencias significativas entre el valor inicial (52.06 ± 0.87 %) y los evaluados al día 32 con 4, 10 y 25 % ($p < 0.05$, Tabla 8). Mientras que en el análisis entre tratamientos al día 32, se observó que la adición de 4, 10 y 25 % de polvo de ajo a la dieta causó la disminución del hematocrito de 55.46 ± 1.48 % en el control a 42.92 ± 0.87 %, 38.33 ± 1.16 % y 29.25 ± 1.66 % con 4, 10 y 25 %, respectivamente ($p < 0.05$, Tabla 8).

En el experimento preventivo, se observó que antes de la administración de las dietas suplementadas con ajo (día 0) la cantidad de eritrocitos circulantes era de $5.05 \pm 1.48 \times 10^5$ cel/mm³ (Tabla 8). Este valor fue significativamente mayor al control ($3.98 \pm 0.47 \times 10^5$ cel/mm³), pero menor que los registrados en los peces expuestos a 4 % ($8.18 \pm 1.23 \times 10^5$ cel/mm³), 10 % ($1.15 \pm 0.12 \times 10^6$ cel/mm³) y 25 % ($1.52 \pm 0.19 \times 10^6$ cel/mm³) de PA al día 32 ($p < 0.05$, Tabla 8). En esta misma forma de administración al día 32, fue evidente un incremento de la concentración de eritrocitos a medida que aumentaba el contenido de PA en la dieta ($p < 0.05$, Tabla 8).

La concentración de leucocitos registrada antes de que los peces recibieran preventivamente las dietas suplementadas con ajo (día 0), fue de 517.19 ± 57.72 cel/mm³. Este valor fue significativamente menor que los registrados en los individuos del grupo control con 1129.17 ± 120.28 cel/mm³, 4 % con 722.92 ± 94.77 cel/mm³ y 10 % con 772.92 ± 177.94 cel/mm³ ($p < 0.05$, Tabla 8). En la evaluación a los 32 días, se observó que el valor del grupo control (1129.17 ± 120.28 cel/mm³) fue significativamente mayor con los tratamientos con 4, 10 y 25 % de PA ($p < 0.05$, Tabla 8).

Tabla 8. Parámetros hematológicos de jureles (*S. dorsalis*) no parasitados y alimentados preventivamente con dietas suplementadas con polvo de ajo y control sin ajo.

	Tratamiento	Día 0	Día 32
Hematocrito (%)	Control	52.06 ± 0.87^A	55.46 ± 1.48^{aA}
	4 %		42.92 ± 0.87^{bB}
	10 %		38.33 ± 1.16^{bB}
	25 %		29.25 ± 1.66^{cB}
Eritrocitos (cel/mm ³)	Control	$5.05 \pm 1.48 \times 10^5^A$	$3.98 \pm 0.47 \times 10^5^{aB}$
	4 %		$8.18 \pm 1.23 \times 10^5^{bB}$
	10 %		$1.15 \pm 0.12 \times 10^6^{bcB}$
	25 %		$1.52 \pm 0.19 \times 10^6^{cB}$
Leucocitos (cel/mm ³)	Control	517.19 ± 57.72^A	1129.17 ± 120.28^{aB}
	4 %		722.92 ± 94.77^{bB}
	10 %		772.92 ± 177.94^{bB}
	25 %		714.58 ± 87.93^{bA}

*Media $\pm$ error estándar.

*Se utilizaron letras mayúsculas para la comparación entre los días de evaluación de cada tratamiento y letras minúsculas para la comparación entre tratamientos. Letras diferentes del mismo tipo (mayúsculas o minúsculas) indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

a. Peces parasitados

Con el tratamiento preventivo, las dietas experimentales ocasionaron una disminución significativa de los valores de hematocrito a medida que aumentaba la suplementación con ajo, en el grupo control con $49.54 \pm 1.38 \%$, 4 % de PA con $46.08 \pm 1.12 \%$, 10 % de PA con $42.92 \pm 1.39 \%$ y 25 % de PA con $37.29 \pm 1.34 \%$ al día 60 ($p < 0.05$, Tabla 9).

Con el tratamiento oral correctivo se observaron diferencias significativas entre las concentraciones registradas al día 0 ($43.27 \pm 1.20 \%$) y las observadas en todos los tratamientos (0, 4, 25 % PA) al día 30 ($p < 0.05$, Tabla 9). Al comparar las concentraciones observadas entre los tratamientos a los 30 días, se observó la disminución del valor del hematocrito a medida que aumentaba la cantidad de ajo en las dietas ($p < 0.05$, Tabla 9). En este análisis no se consideraron los valores del tratamiento del 10 % de PA, debido a que los individuos no sobrevivieron hasta el final del bioensayo (30 días).

Tabla 9. Parámetros hematológicos de jureles (*S. dorsalis*) parasitados y alimentados de forma preventiva y correctiva con dietas suplementadas con polvo de ajo y control sin ajo.

	Tratamiento	Preventivo	Correctivo	
		Día 60	Día 0	Día 30
Hematocrito (%)	Control	49.54 ± 1.38^a	43.27 ± 1.20^A	49.04 ± 1.99^{aB}
	4 %	46.08 ± 1.12^{ab}		38.97 ± 0.92^{bB}
	10 %	42.92 ± 1.39^b		ND
	25 %	37.29 ± 1.34^c		24.63 ± 0.65^{cB}
Eritrocitos (cel/mm³)	Control	$5.68 \pm 0.36 \times 10^6^a$	$3.35 \pm 1.01 \times 10^5^A$	$2.45 \pm 0.54 \times 10^5^{aA}$
	4 %	$5.87 \pm 0.35 \times 10^6^a$		$0.94 \pm 0.21 \times 10^5^{bB}$
	10 %	$6.05 \pm 0.42 \times 10^6^a$		ND
	25 %	$4.54 \pm 0.22 \times 10^6^b$		$0.6 \pm 0.10 \times 10^5^{bB}$
Leucocitos (cel/mm³)	Control	968.75 ± 124.13^a	1937.50 ± 276.29^A	6811.54 ± 547.35^{aB}
	4 %	610.42 ± 113.42^{bc}		5680.36 ± 222.84^{aB}
	10 %	489.58 ± 63.47^c		ND
	25 %	743.75 ± 113.32^{ab}		701.79 ± 120.65^{bB}

*Media $\pm$ error estándar.

*Se utilizaron letras mayúsculas para la comparación entre los días de evaluación de cada tratamiento y letras minúsculas para la comparación entre tratamientos. Letras diferentes del mismo tipo (mayúsculas o minúsculas) indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

*ND=no hay datos, debido a que este grupo experimental no sobrevivió hasta el final del bioensayo.

Con el tratamiento preventivo, al día 60, la concentración de eritrocitos fue significativamente menor con la suplementación del 25 % de PA ($4.54 \pm 0.22 \times 10^6$ cel/mm³) que con la observada en los grupos control ($5.68 \pm 0.36 \times 10^6$ cel/mm³), 4 % ($5.87 \pm 0.35 \times 10^6$ cel/mm³) y 10 % ($6.05 \pm 0.42 \times 10^6$ cel/mm³) ($p < 0.05$, Tabla 9). Con el tratamiento correctivo, el valor inicial de eritrocitos no fue significativamente diferente después de 30 días en el grupo control. En contraste, las concentraciones observadas con los niveles de inclusión de 4 y 25 % de PA ($0.94 \pm 0.21 \times 10^5$ cel/mm³ y $0.6 \pm 0.10 \times 10^5$ cel/mm³, respectivamente), resultaron significativamente menores ($p < 0.05$, Tabla 9). Además, se observó una disminución significativa, de más del 100 %, en la concentración de eritrocitos a medida que se incrementaba la inclusión de ajo en la dieta ($p < 0.05$, Tabla 9).

La administración preventiva de alimento suplementado con 4 y 10 % PA a peces parasitados causó una disminución en la concentración de leucocitos circulantes (610.42 ± 113.42 y 489.58 ± 63.47 cel/mm³) comparado con el control y 25 % PA (968.75 ± 124.13 y 743.75 ± 113.32 cel/mm³, respectivamente) ($p < 0.05$, Tabla 9). Mientras que en el experimento oral correctivo, se encontró que el valor inicial (1937.50 ± 276.29 cel/mm³) fue menor que el control (6811.54 ± 547.35 cel/mm³) y 4 % PA (5680.36 ± 222.84 cel/mm³) al día 30, pero mayor que 25 % al día 30 (701.79 ± 120.65 cel/mm³) ($p < 0.05$, Tabla 9). La comparación entre tratamientos al día 30, indicó que en los peces que recibieron una dieta suplementada con 25 % de polvo de ajo, la concentración de leucocitos disminuyó en forma significativa (701.79 ± 120.65 cel/mm³), comparado con el control y 4 % (6811.54 ± 547.35 y 5680.36 ± 222.84 cel/mm³ respectivamente) ($p < 0.05$, Tabla 9).

4.4.2 Química sérica

a. Peces sin parásitos

En el experimento preventivo, el valor inicial (40.54 ± 1.30 g/L) de la concentración de proteínas totales fue significativamente mayor que los obtenidos con 10 y 25 % de PA (35.41 ± 0.8 y 35.33 ± 1.35 g/L respectivamente) a los 32 días ($p < 0.05$, Tabla 10). En los peces de los tratamientos con 4, 10 y 25 % de PA (37.29 ± 1.37 , 35.41 ± 0.89 y 35.33 ± 1.35 g/L, respectivamente) se redujo la concentración de proteínas totales con respecto al control (44.42 ± 1.42 g/L) ($p < 0.05$, Tabla 10).

Al contrastar el valor inicial (19.41 ± 0.51 g/L) de la concentración de albúmina con el observado a los 32 días, solo se encontraron diferencias significativas con los tratamientos de 4, 10 y 25 % de PA ($p < 0.05$, Tabla 10). Los peces sin presencia de parásitos, que fueron alimentados de forma preventiva por 32 días

con las dietas que contenían 4, 10 y 25 % de polvo de ajo, registraron valores de albúmina de 17.66 ± 0.61 , 18.05 ± 0.64 y 16.37 ± 0.64 g/L, respectivamente, los cuales fueron menores con respecto al grupo control con 21.24 ± 0.74 g/L ($p < 0.05$, Tabla 10).

Tabla 10. Química sanguínea de jureles (*S. dorsalis*) sin parásitos, alimentados preventivamente con dietas suplementadas con polvo de ajo y control sin ajo, evaluados a los 0 y 32 días.

	Tratamiento	Día 0	Día 32
Proteínas totales (g/L)	Control	40.54 ± 1.30^A	44.42 ± 1.42^{aA}
	4 %		37.29 ± 1.37^{bA}
	10 %		35.41 ± 0.89^{bB}
	25 %		35.33 ± 1.35^{bB}
Albúmina (g/L)	Control	19.41 ± 0.51^A	21.24 ± 0.74^{aA}
	4 %		17.66 ± 0.61^{bB}
	10 %		18.05 ± 0.64^{abA}
	25 %		16.37 ± 0.64^{bB}
Globulinas (g/L)	Control	21.13 ± 0.91^A	23.18 ± 0.91^{aA}
	4 %		19.63 ± 1.02^{abA}
	10 %		17.36 ± 0.60^{bB}
	25 %		18.97 ± 1.17^{bB}
ALT (g/L)	Control	8.71 ± 2.04^A	4.59 ± 2.41^{aB}
	4 %		2.40 ± 0.45^{aB}
	10 %		8.11 ± 0.66^{bA}
	25 %		27.33 ± 1.84^{cB}
AST (g/L)	Control	20.69 ± 2.57^A	8.73 ± 1.71^{aB}
	4 %		2.40 ± 0.45^{bB}
	10 %		12.41 ± 1.66^{abB}
	25 %		11.53 ± 3.44^{abB}

*Media $\pm$ error estándar.

*Se utilizaron letras mayúsculas para la comparación entre los días de evaluación de cada tratamiento y letras minúsculas para la comparación entre tratamientos. Letras diferentes del mismo tipo (mayúsculas y minúsculas) indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

La concentración de globulinas, antes de que los peces fueran alimentados con las dietas que contenían ajo, fue de 21.13 ± 0.91 g/L. Al contrastar este resultado con los obtenidos 32 días después de consumir ajo en la dieta, se observó la disminución de los valores de globulina con 10 y 25 % de PA (17.36 ± 0.60 y 18.97 ± 1.17 g/L) ($p < 0.05$, Tabla 10). Al realizar las comparaciones estadísticas entre los tratamientos al día 32, fue evidente que con la adición de 10 y 25 % de polvo de ajo en la dieta, se observó una disminución de las globulinas con respecto al control (23.18 ± 0.91 g/L) ($p < 0.05$, Tabla 10).

En cuanto a las enzimas aminotransferasas, entre los días 0 y 32 se encontraron diferencias significativas en la concentración de ALT, debido a que el valor inicial (8.71 ± 2.04 g/L) fue significativamente mayor que el control (4.59 ± 2.41 g/L) y 4 % (2.40 ± 0.45 g/L), pero menor que 25 % (27.33 ± 1.84 g/L) ($p < 0.05$, Tabla 10). Al comparar los tratamientos al día 32, se registró un incremento significativo de la ALT en los grupos que recibieron dietas con 10 y 25 % de PA (8.11 ± 0.66 y 27.33 ± 1.84 g/L) con respecto al control y 4 % (4.59 ± 2.41 y 2.40 ± 0.45 g/L) ($p < 0.05$, Tabla 10). Por otro lado, la concentración inicial de AST (20.69 ± 2.57 g/L), fue significativamente mayor que la observada en todos los grupos experimentales evaluados a los 32 días. La comparación entre los tratamientos para el día 32, indicó que 4 % fue significativamente menor que el control, 10 y 25 % ($p < 0.05$, Tabla 10).

b. Peces parasitados

En los peces que fueron alimentados de forma preventiva, al día 60 se observó una disminución significativa de la concentración de proteínas totales con 10 y 25 % de suplementación de ajo en la dieta (35.43 ± 1.05 y 31.58 ± 1.69 g/L, respectivamente) en comparación con el control (39.59 ± 1.14 g/L) ($p < 0.05$, Tabla 11). Con la terapia correctiva, el valor inicial de 38.42 ± 1.01 g/L fue significativamente diferente del control y 25 % de PA (50.49 ± 1.91 y 32.30 ± 1.72 g/L, respectivamente) evaluados al día 30 ($p < 0.05$, Tabla 11). La comparación de los tratamientos al día 30, indicó que a medida que se incrementó la cantidad de ajo en la dieta se registró una disminución de la concentración de proteínas totales (40.84 ± 1.50 y 32.30 ± 1.72 g/L para 4 y 25 % de ajo, respectivamente), en contraste con el control (50.49 ± 1.91 g/L) ($p < 0.05$, Tabla 11).

Después de que los peces consumieron las dietas con ajo por 60 días, la concentración de albúmina disminuyó en los tratamientos con mayor concentración de ajo (17.08 ± 0.63 y 14.15 ± 0.63 g/L para 10 y 25 %, respectivamente) con respecto al control (30.79 ± 2.59) y 4 % (30.73 ± 1.02 g/L) ($p < 0.05$, Tabla 11). Mientras que con la administración correctiva, el valor inicial (12.39 ± 0.42 g/L) fue significativamente menor que el control y 4 % el día 30 ($p < 0.05$, Tabla 11). Asimismo, la comparación entre tratamientos al día 30, indicó que la suplementación de la dieta con 25 % de PA (12.24 ± 0.34 g/L) ocasiona la reducción de la concentración de albúmina circulante, con respecto al control (13.86 ± 0.49 g/L) y 4 % (14.62 ± 0.41 g/L) ($p < 0.05$, Tabla 11).

La concentración de globulinas de los peces que recibieron de manera preventiva las dietas suplementadas con 10 y 25 % de ajo, se incrementó significativamente a 18.35 ± 0.67 g/L y 17.43 ± 1.18 g/L, respectivamente, en comparación con los grupos control (9.68 ± 2.31 g/L) y 4 % (7.74 ± 1.02 g/L) ($p < 0.05$,

Tabla 11). Por otro lado, con la administración correctiva, la concentración inicial de globulinas (26.02 ± 0.79 g/L) fue significativamente menor que en el control (36.63 ± 1.72 g/L) y mayor con 25 % (20.06 ± 1.87 g/L) al día 30 ($p < 0.05$, Tabla 11). Con esta terapia, la comparación estadística entre tratamientos indicó que a los 30 días, la suplementación con 4 y 25 % de polvo de ajo produjo una disminución de las globulinas circulantes (26.22 ± 1.43 y 20.06 ± 1.87 g/L, respectivamente) en contraste con el control (36.63 ± 1.72 g/L) ($p < 0.05$, Tabla 11).

Tabla 11. Química sanguínea de jureles (*S. dorsalis*) parasitados, alimentados preventivamente (día 60) y correctivamente (días 0 y 30) con dietas suplementadas con polvo de ajo y control sin ajo.

	Tratamiento	Preventivo	Correctivo	
		Día 60	Día 0	Día 30
Proteínas totales (g/L)	Control	39.59 ± 1.14^a	38.42 ± 1.01^A	50.49 ± 1.91^{aB}
	4 %	38.47 ± 0.75^{ab}		40.84 ± 1.50^{bA}
	10 %	35.43 ± 1.05^{bc}		ND
	25 %	31.58 ± 1.69^c		32.30 ± 1.72^{cB}
Albúmina (g/L)	Control	30.79 ± 2.59^a	12.39 ± 0.42^A	13.86 ± 0.49^{aB}
	4 %	30.73 ± 1.02^a		14.62 ± 0.41^{aB}
	10 %	17.08 ± 0.63^b		ND
	25 %	14.15 ± 0.63^b		12.24 ± 0.34^{bA}
Globulinas (g/L)	Control	9.68 ± 2.31^a	26.02 ± 0.79^A	36.63 ± 1.72^{aB}
	4 %	7.74 ± 1.02^a		26.22 ± 1.43^{bA}
	10 %	18.35 ± 0.67^b		ND
	25 %	17.43 ± 1.18^b		20.06 ± 1.87^{bC}
ALT (g/L)	Control	3.51 ± 0.99^a	3.72 ± 0.98^A	8.13 ± 1.13^{aB}
	4 %	4.11 ± 2.06^a		13.69 ± 1.82^{bB}
	10 %	6.57 ± 1.09^b		ND
	25 %	2.90 ± 0.60^a		2.57 ± 0.53^{cA}
AST (g/L)	Control	15.14 ± 2.60	17.22 ± 1.33^A	10.15 ± 1.82^B
	4 %	15.09 ± 3.65		10.72 ± 2.59^B
	10 %	24.84 ± 5.88		ND
	25 %	13.35 ± 3.12		11.94 ± 2.00^B

*Media $\pm$ error estándar.

*Se utilizaron letras mayúsculas para la comparación entre los días de evaluación de cada tratamiento y letras minúsculas para la comparación entre tratamientos. Letras diferentes del mismo tipo (mayúsculas y minúsculas) indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

*ND=no hay datos, debido a que este grupo experimental no sobrevivió hasta el final del bioensayo.

La concentración de ALT, en los peces que recibieron la dieta preventiva con 10 % de ajo, se incrementó a 6.57 ± 1.09 g/L al día 60, a diferencia de 4 % (4.11 ± 2.06 g/L) y 25 % (2.90 ± 0.60 g/L), los cuales fueron similares al control (3.51 ± 0.99 g/L) ($p < 0.05$, Tabla 11). Con la administración correctiva, la concentración inicial (3.72 ± 0.98 g/L) fue significativamente menor al valor registrado en los peces que recibieron las dietas control (8.13 ± 1.13 g/L) y 4 % PA (13.69 ± 1.82 g/L) ($p < 0.05$, Tabla 11). A los 30 días se encontraron diferencias significativas en la concentración de ALT entre los tratamientos control (8.13 ± 1.13 g/L), 4 % (13.69 ± 1.82 g/L) y 25 % (2.57 ± 0.53 g/L) ($p < 0.05$, Tabla 11).

La administración preventiva no produjo diferencias significativas en las concentraciones de la enzima AST entre los tratamientos ($p > 0.05$, Tabla 11). Con la administración correctiva, el valor observado al día 0 (17.22 ± 1.33 g/L) fue significativamente mayor que en el control (10.15 ± 1.82 g/L), 4 % (10.72 ± 2.59 g/L) y 25 % (11.94 ± 2.00 g/L) al día 30 ($p < 0.05$, Tabla 11). No se registraron diferencias significativas entre los tratamientos al día 30 ($p > 0.05$, Tabla 11).

4.5 Discusión

En el presente bioensayo, antes de la suplementación de las dietas con ajo o la infestación con parásitos, se registró que el valor basal del hematocrito se encontraba dentro del intervalo de referencia para *Seriola* sp. y *S. lalandi*, entre 48.6 y 66.4 % (Filho et al., 1992; Armuelles Bernal, 2016). Posteriormente, se registró el efecto que tuvo la inclusión de ajo en el alimento de los jureles, de 4 a 25 %, donde se registró la disminución del hematocrito a medida que incrementaba la proporción de ajo en la dieta. En *O. niloticus* se suministró una dieta suplementada con polvo de ajo al 1 y 2 % por 90 días y se registró una disminución del 16 % en el valor del hematocrito (Shalaby et al., 2006). Por el contrario, en *O. niloticus* alimentadas durante 60 días con una dieta enriquecida con el 1 % de polvo de ajo, el incremento fue del 55 % (Mehrim et al., 2014). En la tilapia *O. mossambicus*, se observó un incremento cuando se alimentó durante 60 días con una dieta que contenía el 3 % de polvo de ajo (Felicitta et al., 2013). En peces parasitados, en el tratamiento oral preventivo y correctivo, también se observó un efecto negativo en el valor del hematocrito a medida que incrementaba la suplementación de ajo en la dieta. En *S. dumerili* parasitado con *Z. seriolae* se registró la disminución del porcentaje del hematocrito solo como consecuencia de la presencia de este parásito hematófago (Montero et al., 2004). En otras especies, como *O. mykiss* infectado con *A. hydrophila*, que recibió alimento con polvo de ajo a razón de 0.05 a 1 g/100 g de la dieta, la concentración de hematocrito fue mayor (de 29 % a 26 %, respectivamente) con respecto al control (Nya y Austin, 2009). Sin embargo, también se han reportado casos donde la adición de ajo a la dieta de

Rhamdia quelen infestado con el protozoo de piel y branquias *I. multifiliis*, a razón de 0.5 a 5 % por 77 días, no tuvo efectos en el hematocrito (de Amorin et al., 2020).

En los estudios mencionados anteriormente, se observa con mayor frecuencia la tendencia a incrementar el valor del hematocrito, también se reportan casos donde en presencia de ajo, en diferentes presentaciones y métodos de manejo, ha habido una tendencia a disminuir el valor del hematocrito. Sin embargo, muy pocos estudios cuantifican la concentración de alguno de los compuestos químicos presentes en la fuente vegetal. En este trabajo se analizó la composición proximal (como proteínas, lípidos y cenizas) y se cuantificó la concentración de alicina del ajo, ya que por ser un producto natural, su composición puede ser muy variable. A partir de los resultados de este estudio se recomienda que en este tipo de investigaciones se realice un análisis más profundo que incluya aminoácidos, ácidos grasos y compuestos del ajo como saponinas y metabolitos secundarios de la alicina como el dialil sulfuro, disulfuro y trisulfuro, por mencionar algunos, con el propósito de tener más información que permita explicar los resultados tan diversos relacionados a la biología de los peces, las condiciones de cultivo y la calidad de la fuente vegetal.

Los eritrocitos o glóbulos rojos son los elementos encargados del transporte de oxígeno y participan de manera importante en el transporte del dióxido de carbono de la sangre (Randall et al., 1998; Núñez y Bouda, 2007). En *S. dorsalis* el valor basal de la concentración de eritrocitos en peces sin parásitos y sin exposición al polvo de ajo fue de $0.50 \text{ cel} \times 10^6/\text{mm}^3$, el cual estuvo por debajo a lo reportado por Filho et al. (1992) y Armuelles Bernal (2016) donde el intervalo de referencia para *Seriola* sp. va de 3.96 a $11.4 \times 10^6 \text{ cel}/\text{mm}^3$. En la administración oral preventiva se observó una mayor concentración de eritrocitos a los 32 días de recibir dietas suplementadas con 4, 10 y 25 % de PA e incrementaba a medida que aumentaba la presencia de ajo en las dietas. En *P. fluviatilis* se registró el incremento de esta variable en los organismos que recibieron dietas con 10 y 30 g de ajo/kg de dieta (Zare et al., 2021). Esto se contrasta con lo reportado por Armuelles Bernal (2016), ya que en *S. lalandi* al día 32 se observó una disminución de la concentración de eritrocitos con 4 % de ajo ($8.50 \times 10^6 \text{ cel}/\text{mm}^3$) en la dieta, sin embargo, este valor es superior al reportado en el presente bioensayo.

En los peces parasitados que fueron alimentados preventivamente, la concentración de eritrocitos no fue afectada por las dietas con PA, excepto con 25 % ($4.54 \times 10^6 \text{ cel}/\text{mm}^3$) donde se registró una disminución, sin embargo, dicha concentración fue mayor que el valor inicial. En contraste, en el tratamiento oral correctivo, sí se registró una disminución significativa del recuento de eritrocitos a medida que aumentaba la suplementación con ajo (control $2.45 \times 10^5 \text{ cel}/\text{mm}^3$ y 4 % PA $0.94 \times 10^5 \text{ cel}/\text{mm}^3$ y 25 % PA 0.6×10^5

cel/mm³). En el caso de jureles parasitados con *Z. seriolae*, Armuelles Bernal (2016) tampoco encontró que el recubrimiento externo de las partículas de alimento con 2 y 4 % de PA durante 60 días tenga efectos en la concentración de eritrocitos. Por el contrario, en juveniles de *R. quelen* parasitado con *I. multifilis* se observó una mayor concentración de glóbulos rojos cuando fueron alimentados con 0.5, 2.5 y 5 % de ajo durante 77 días (de Amorin et al., 2020). Estos resultados indican que en las condiciones experimentales anteriormente descritas para este trabajo, la administración preventiva de dietas suplementadas con polvo de ajo confiere a los peces una ventaja fisiológica y de alguna forma les permite prepararse para enfrentar factores estresantes como la presencia de un parásito que se alimenta de su sangre. En bovinos, equinos y caninos se ha reportado que el consumo de ajo causa la destrucción de los eritrocitos, lo que también es conocido como anemia hemolítica en los individuos debido al daño oxidativo de los glóbulos rojos (Rae, 1999; Pearson et al., 2005; Yamato et al., 2005; Weiss y Wardrop, 2011). Aunque habría que comprobar anomalías en la morfología de los eritrocitos, la razón de la disminución en el experimento oral correctivo podría estar más relacionado con su incapacidad de estimular órganos hematopoyéticos como el bazo y el riñón anterior, ya que no hay una preparación previa, como sí ocurrió con el tratamiento oral preventivo. Sin embargo, esto solo es una hipótesis que debe ser analizada en trabajos futuros.

El valor basal de la concentración de leucocitos en peces sin parásitos y sin exposición al polvo de ajo fue de 517.19 cel/mm³, un valor muy por debajo al reportado por Armuelles Bernal (2016) de 5.1 a 12.3 cel x 10³/mm³. En la administración oral preventiva en ausencia de parásitos el valor de leucocitos se incrementó cuando se comparó el control y los tratamientos con el valor inicial, excepto con 25 % de PA, por lo que se puede inferir que no es un efecto exclusivo de la administración de ajo; sin embargo, la comparación entre tratamientos al día 32 demostró que todos los tratamientos con ajo tuvieron menor concentración de leucocitos. En *S. lalandi*, también se registró disminución de la concentración de leucocitos en los grupos que recibieron las dietas suplementadas con ajo por 32 días (Armuelles Bernal, 2016). En contraste, Isroni et al. (2020) reportaron el incremento de la concentración de leucocitos en la carpa (*Cyprinus carpio*) que recibieron dietas suplementadas con ajo. Zare et al. (2021) encontraron que solamente la dieta con 10 g/kg tuvo un efecto en incrementar la concentración de glóbulos blancos de *P. fluviatilis*. En la tilapia (*O. niloticus*) se registró un incremento en los leucocitos cuando fueron alimentadas con el 1 % de polvo de ajo durante 60 días (Mehrim et al., 2014). La diferencia en las respuestas en una parte del sistema inmune innato de los peces atiende a lo reportado anteriormente, relacionado con la calidad de la procedencia de la fuente vegetal y la especie animal que es la base de la investigación, así como las condiciones de cultivo.

El resultado de los valores de leucocitos totales en peces parasitados varió con respecto a la forma de administración de las dietas suplementadas con ajo. En el bioensayo preventivo (60 días), se registró la disminución de esta variable, excepto en el tratamiento de 25 % de PA. Mientras que en el experimento correctivo se observó la disminución de la concentración de leucocitos con 25 % de PA. Por tanto, estos resultados dan indicios a que no es un efecto de la administración de ajo, más bien podría estar asociado a factores estresores como la presencia de parásitos o algún evento en el ambiente. En *S. lalandi*, también se registró disminución de la concentración de leucocitos en los grupos parasitados con *Z. seriolae* que recibieron las dietas suplementadas con ajo por 60 días (Armuelles Bernal, 2016). En la trucha *O. mykiss* alimentada con dietas suplementadas con 0.5 y 1 mL de alicina pura por cada 100 g de alimento durante 14 días, y posterior infección con *A. hydrophila*, fue notable la disminución en la concentración de leucocitos a medida que aumentaba la dosis de alicina (Nya et al., 2010). En resultados diferentes, *O. mykiss* alimentado con 1 g/100 g de polvo de ajo durante 14 días y posteriormente infectada con *A. hydrophila*, se registró un incremento en la concentración de los leucocitos totales (Nya and Austin, 2009). Talpur e Ikhwanuddin (2012), reportaron el incremento en los valores de glóbulos blancos totales en *L. calcarifer* con la dieta suplementada con 15 g PA/kg de alimento antes y después de la infección experimental con *V. harveyi*. Por su parte, la alimentación durante 45 días con disulfuro de alilo a razón de 1 a 2 g/kg de la dieta de *P. mesopotamicus* infestado naturalmente con *A. penilabiatatus*, no registró un efecto sobre la concentración de leucocitos entre los tratamientos, sin embargo, fue evidente un incremento a medida que aumentaba la duración del tratamiento (Martins et al., 2002). En *C. gariepinus* se observó una mayor concentración de leucocitos en los peces que recibieron dietas con 0.5 % de ajo por 12 semanas, pero con 1 y 3 % este efecto fue el contrario. Mientras que Amorin et al. (2019) no encontraron efectos en esta variable por la adición de ajo de 0.5 a 5 % en la dieta de *Rhamdia quelen* parasitado con *I. multifiliis*.

El intervalo de referencia para globulinas reportado para *S. lalandi*, en ausencia de parásitos y sin haber sido expuestos a dietas con ajo, es de 46.6 a 66.8 g/L (Armuelles Bernal, 2016). En el presente estudio, el valor basal de globulinas para *S. dorsalis* fue 21.13 g/L. La concentración de globulinas en el tratamiento preventivo (32 días) en ausencia de parásitos fue disminuyendo con concentraciones elevadas de PA (10 y 25 %). En contraste en *S. lalandi*, también se registró disminución de las globulinas con los tratamientos con polvo de ajo (2 y 4 %) (Armuelles Bernal, 2016). Esto parece indicar que en ambas especies de carángidos, en las condiciones de cultivo descritas, no hay un efecto inmunoestimulante en los peces. Sin embargo, en presencia de parásitos se observaron dos efectos: en el tratamiento preventivo, un incremento de los valores de globulinas con 10 y 25 % de PA, y en el tratamiento correctivo, la disminución de la concentración de globulinas en los peces que recibieron dietas con polvo de ajo. Armuelles Bernal

(2016), reporta que en *S. lalandi* no se observaron efectos del polvo de ajo sobre las globulinas de peces parasitados y alimentados con ajo. En estudios con diferentes especies de peces y diferentes tiempos de administración (14 a 60 días) de dietas con 1 y 2 % de ajo, en *O. niloticus*, *O. mykiss* y *L. calcarifer* se registró el incremento del valor de las globulinas (Nya y Austin, 2009; Nya et al., 2010; Talpur e Ikhwanuddin, 2012; Mehrim et al., 2014). Se recomienda que en futuros ensayos relacionados al tema, se considere la integración de resultados obtenidos de otros parámetros de la respuesta inmune innata de los peces, tales como la actividad de la lisozima y proteasa, el estallido respiratorio, factores del complemento, inmunoglobulinas y eicosanoides, entre otros, que permita comprender mejor los efectos del ajo en el sistema inmune de los peces (Van Muiswinkel and Vervoorn-Van Der Wal, 2006; Rubio-Godoy, 2010).

Si se consideran algunos de los resultados del presente bioensayo, tal parece que el ajo administrado por vía oral no tiene un efecto inmunoestimulante en los peces, por lo que posiblemente la respuesta antihelmíntica (discutida en el capítulo 2) esté asociada al efecto de uno o varios metabolitos del ajo directamente sobre el parásito. Esta idea se respalda con el trabajo de Leef y Lee (2009) que consistió en la exposición de *Z. seriolae* a los fluidos (suero y mucus) de organismos parasitados y no parasitados bajo condiciones *in vitro* y no registraron mortalidad. En contraste, los fluidos tuvieron un efecto letal en *B. seriolae*. Por lo que se concluye que la supervivencia de *Z. seriolae* no está o está mínimamente influenciada por la respuesta inmune innata de los peces. Esto se puede asociar al efecto que se discutió en el capítulo 2, el efecto de la administración de ajo en baños y a través del alimento, donde fue evidente que el ajo tiene un efecto directo sobre la supervivencia del parásito y no así mediante la ingesta y metabolismo digestivo. De este efecto diferencial se presume que este parásito branquial es posiblemente resistente a la respuesta inmunológica del hospedero y que, por lo tanto, la respuesta inmune puede que no sea directamente responsable del efecto antiparasitario y que posiblemente se deba a la acción directa del extracto de ajo (4 mL EA/L) o alguno de sus metabolitos secundarios (0.01 mg DSA/mL).

En *S. dorsalis* el valor basal de proteínas totales fue de 40.54 g/L, en cambio en *S. lalandi* el intervalo de referencia reportado por Armuelles Bernal (2016) fue de 57.1 a 76.1 g/L. En el experimento oral preventivo antes de la infestación experimental con *Z. seriolae* se observó una disminución en los valores de proteínas totales en los peces que recibieron las dietas suplementadas con polvo de ajo. Esta tendencia se mantuvo en organismos parasitados, ya que en los tratamientos preventivo y correctivo se registró hipoproteinemias en los jureles que recibieron dietas con polvo de ajo. En *S. lalandi* antes de la infestación experimental se encontró disminución con 2 % de PA y posteriormente un incremento con 4 %, lo cual no fue igual a lo observado en el presente bioensayo. Esto puede deberse a que en el experimento de Armuelles Bernal (2016) se haya perdido en la lixiviación parte de las sustancias que tienen este efecto en la disminución

del valor de proteínas totales, ya que realizó recubrimiento externo de la partícula de alimento, que a diferencia del presente estudio se incluyó el polvo de ajo en la premezcla. Según lo reportado por Zare et al. (2021), en *P. fluviatilis* no fueron evidentes los cambios en esta variable asociada a la suplementación de las dietas con ajo por 87 días. En *O. niloticus* se observó que la adición de 2 y 3 % de polvo de ajo durante 60 días disminuye la concentración de proteínas totales (Mehrim et al., 2014). Este comportamiento también fue documentado en *L. calcarifer* alimentado con dietas suplementadas con ajo de 5 a 20 g/kg por dos semanas, al registrar la disminución en los valores de proteínas totales y posteriormente una disminución en presencia de *V. harveyi* en los peces que recibieron 10 y 20 g/kg de ajo en la dieta (Talpur e Ikhwanuddin, 2012). Sin embargo, Onomu (2018) reportó el incremento de esta variable sérica en *Clarias gariepinus* al final la administración oral de 0.5, 1 y 3 % de ajo por 12 semanas, y Adineh et al. (2020) con 0.5 y 1 % de ajo en *O. mykiss* después de 40 días.

La albúmina es la principal proteína en el plasma de los vertebrados, lo que corresponde a más de 50 % de las proteínas totales. La albúmina cumple con funciones en el mantenimiento de la presión osmótica de la sangre, ayuda en el transporte de metabolitos y filtrado de fluidos en los tejidos corporales (de Smet et al., 1998; Baker, 2002; Silva et al., 2015). Actualmente, la albúmina proveniente de fuentes acuáticas ha tomado gran importancia debido a que está siendo utilizada como suplemento nutricional en condiciones de hipoalbuminemia en el humano (Fatma et al., 2020). En el presente experimento, la concentración basal de albúmina (en ausencia de parásitos y ajo) fue de 19.41 g/L, cercana al límite máximo del intervalo de referencia reportado en *S. lalandi* por Armuelles Bernal (2016) de 7.1 a 16.4 g/L. Después de 32 días de alimentación suplementada con polvo de ajo, en *S. dorsalis* (en ausencia de parásitos) se registró la disminución de los valores de albúmina. La concentración de albúmina en peces parasitados correspondientes al bioensayo preventivo y correctivo fue mayor en organismos que recibieron dietas control y 4 % de PA. En *S. lalandi* se observaron cambios en los organismos que consumieron dietas suplementadas con 4 % de PA, antes de la infestación experimental con *Z. seriolae*, se registró hipoalbuminemia y posteriormente se observó el incremento de esta variable (Armuelles Bernal, 2016). Talpur e Ikhwanuddin (2012) encontraron que antes y después de un desafío sanitario, en este caso con *Vibrio harveyi*, la concentración de albúmina fue menor en los peces (*L. calcarifer*) que recibieron la dieta suplementada con 10 g de ajo/kg de dieta. En *O. mykiss* la alimentación con dietas adicionadas con polvo de ajo o alicina, no causaron cambios en la concentración de albúmina, en presencia o ausencia de *A. hydrophila* (Nya and Austin, 2009; Nya et al., 2010). El bioensayo desarrollado por Adineh et al. (2020) con 0.5 y 1 % de ajo resultó en el incremento de la concentración de albúmina en *O. mykiss* después de 40 días de suplementación. La adición de 1 y 2 % de ajo en la dieta de *P. fluviatilis* por 87 días aumentó el valor de proteínas totales circulantes (Zare et al., 2021).

En relación con las enzimas aminotransferasas, alanino (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST), su importancia radica en que se utilizan como indicadores de lesiones en tejidos como músculo esquelético y cardíaco, riñón y principalmente el hígado (Anderson et al., 2000; Sedensky y Dufour, 2011). El estudio de las concentraciones séricas de las enzimas ALT y AST ha indicado que el consumo de ajo produce un efecto protector en el hígado de ratas con cuadros de hepatitis aguda (Nakagawa et al., 1989). En jureles (*S. dorsalis*) no parasitados, se registró que después de 32 días de alimentación suplementada con 10 y 25 % de PA, la concentración de ALT fue mayor en comparación con los diferentes tratamientos. En presencia de parásitos, en el experimento preventivo la concentración de ALT solo fue mayor con 10 % PA y en el experimento oral correctivo fue mayor en el control y 4 % PA. La concentración de AST en peces no parasitados fue menor con 4 %, lo que parece indicar que la adición de ajo a bajas concentraciones no altera la condición de los tejidos. El valor de AST en peces parasitados correspondientes al bioensayo preventivo y correctivo, no tuvo cambios en ninguno de los tratamientos. Adineh et al. (2020) observaron en *O. mykiss* una disminución en la concentración de ALT y AST circulante en los peces que consumieron dietas suplementadas con ajo. Por el contrario, Zare et al. (2021) no encontraron cambios en el contenido de ALT y AST circulante con la adición de ajo en las dietas de *P. fluviatilis*, lo que también coincide con lo reportado por Fazlolahzadeh et al. (2011) en *O. mykiss*. Es necesario destacar que al haber daño hepático, la presencia de concentraciones elevadas de ALT se mantiene sobre las de AST, debido a que la primera cuenta con un mayor tiempo de vida plasmática/sérica (Kim et al., 2008), por lo que posiblemente este sea el caso del resultado en el bioensayo preventivo con 25 % de PA en peces sin parásitos. Sin embargo, en *Chrysichthys auratus* se han reportado lesiones en los hepatocitos, pero que no han afectado las concentraciones de ALT y AST (Al-Salahy y Mahmoud, 2003), por lo que lo más recomendable es complementar el resultado de estas enzimas con análisis histopatológicos para determinar el grado de severidad de las lesiones.

Capítulo 5. Conclusiones

En diferentes investigaciones, el ajo y sus metabolitos secundarios han demostrado tener efectos positivos para el tratamiento de parásitos monogéneos, el desempeño productivo y fisiológico. En el presente trabajo, fue evidente que la exposición de adultos *Z. seriolae* al extracto de ajo y el disulfuro de alilo propició el desprendimiento de las lamelas branquiales y supervivencia del parásito en el bioensayo *in vitro* y redujo la carga parasitaria en el experimento *in vivo*, en concentraciones que demostraron que no afectaron la supervivencia del hospedero (4 mL EA/L y 0.01 mg DSA/mL). El uso de concentraciones mayores a 4 mL EA/L y 0.01 mg DSA/mL, en las condiciones experimentales antes descritas, ocasiona efectos adversos como hemorragia branquial, lo que impidió que se pudiese completar este bioensayo. Aunque pocos estudios incluyen el análisis de la concentración de compuestos organosulfurados y saponinas, es importante que se realice para conocer los compuestos involucrados tanto en los efectos positivos, como en los perjudiciales. Por su parte, en los huevos también fue evidente el efecto en la disminución de la eclosión de los oncomiracidios cuando fueron expuestos al extracto de ajo y disulfuro de alilo, pero solamente este último demostró su efectividad en concentraciones que no afectan la supervivencia de los jureles.

En cuanto a la administración oral de dietas suplementadas con polvo de ajo, la administración preventiva y correctiva no redujeron la intensidad parasitaria media y prevalencia de *Z. seriolae* en *S. dorsalis*. En ausencia de parásitos, la adición de ajo en las dietas de *S. dorsalis* tuvo pocos efectos en el desempeño productivo, por lo que su adición no representó ventajas en este sentido, a excepción del índice hepatosomático y el consumo de alimentos. En presencia de parásitos, estas mismas dietas tuvieron efectos diversos cuando se administraban de forma preventiva y correctiva, destacándose el incremento en el consumo de alimento. En cuanto a la hematología de peces sin parásitos, las dietas con ajo incrementaron el valor de eritrocitos totales a medida que aumentaba la concentración de ajo en la dieta, mientras que disminuyó el hematocrito y la concentración de leucocitos totales. En presencia de parásitos, se observa un mejor efecto en los peces que recibieron dietas preventivas, ya que el consumo de sangre de estos peces no alteró la concentración de eritrocitos. La química sanguínea presentó disminución en la concentración de proteínas totales, albúmina, e incremento en la concentración de globulinas circulantes y ALT, principalmente en peces alimentados de forma preventiva. Por lo tanto, cobra mucha importancia que la administración preventiva tiene un efecto de preparación fisiológica en los peces, que les permite sobrellevar mejor los desafíos sanitarios.

En posteriores investigaciones, sería importante considerar periodos preventivos de 15, 45 y 60 días, por ejemplo, con el objetivo de evaluar si hay cambios en los resultados. Adicionalmente, se debe seguir considerando el analizar el contenido nutricional de las dietas suplementadas con ajo o sus metabolitos secundarios, ya que alteraciones en su composición podrían causar alteraciones en el desarrollo y susceptibilidad a eventos perjudiciales. El alcance de este tipo de investigaciones permite ampliar las opciones terapéuticas en peces de cultivo y encontrar cuáles pueden ser los riesgos en su aplicación. A futuro, sería interesante y necesario realizar una evaluación amplia de la concentración de los metabolitos secundarios y su relación con variables fisiológicas y efectos terapéuticos en los peces.

Literatura citada

- Adineh, H., Harsij, M., Jafaryan, H., and Asadi, M. 2020. The effects of microencapsulated garlic (*Allium sativum*) extract on growth performance, body composition, immune response and antioxidant status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles. *Journal of Applied Animal Research*. Taylor and Francis Ltd., 48(1), pp. 372–378. doi: 10.1080/09712119.2020.1808473
- Agbebi, O. T., Ogunmuyiwa, T. G., and Herbert, S. M. 2013. Effect of Dietary Garlic Source on Feed Utilization, Growth and Histopathology of the African Catfish (*Clarias gariepinus*). *Journal of Agricultural Science*, 5(5), pp. 26–34. doi: 10.5539/jas.v5n5p26
- Al-Salahy, M. B. and Mahmoud, A. A. B. 2003. Metabolic and histological studies on the effect of garlic administration on the carnivorous fish *Chrysichthys auratus*. *Egyptian Journal of Biology*, 5(5), pp. 94–107.
- Aly, S. M., Atti, N. M. A., and Mohamed, M. F. 2008. Effect of garlic on the survival, growth, resistance and quality of *Oreochromis niloticus*. 8th International Symposium on Tilapia in Aquaculture, pp. 277–296.
- Aly, S. M. and Mohamed, M. F. 2010. Echinacea purpurea and *Allium sativum* as immunostimulants in fish culture using Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 94(5), pp. e31–e39. doi: 10.1111/j.1439-0396.2009.00971.x
- Anderson, F. H., Zeng, L., Rock, N. R., and Yoshida, E. M. 2000. An assessment of the clinical utility of serum ALT and AST in chronic hepatitis C. *Hepatology Research*, 18(1), pp. 63–71. doi: 10.1016/S1386-6346(99)00085-6
- Ankri, S. and Mirelman, D. 1999. Antimicrobial properties of allicin from garlic. *Microbes and Infection*, 1(2), pp. 125–129. doi: 10.1016/S1286-4579(99)80003-3
- Ankri, S., Miron, T., Rabinkov, A., Wilchek, M., and Mirelman, D. 1997. Allicin from garlic strongly inhibits cysteine proteinases and cytopathic effects of *Entamoeba histolytica*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41(10), pp. 2286–2288. doi: 10.1128/AAC.41.10.2286
- Anthony, J. P., Fyfe, L., and Smith, H. 2005. Plant active components - A resource for antiparasitic agents? *Trends in Parasitology*, 21(10), pp. 462–468. doi: 10.1016/j.pt.2005.08.004
- AOAC. 2005. Official Method of Analysis. Association of Officiating Analytical Chemist, Ed.; 18th ed. Washington DC.
- Armuelles Bernal, C. E. 2016. Efecto del ajo (*Allium sativum*) adicionado a la dieta del jurel (*Seriola lalandi*) para el tratamiento preventivo contra infestaciones de *Zeuxapta seriolae* (Meserve, 1938) Price, 1962. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California, 104 pp.
- Avilés-Quevedo, A. and Castelló-Orvay, F. 2004. Manual para el Cultivo de Jurel. Inapesca. Pridsa. México.
- Baghalian, K., Ziai, S. A., Naghavi, M. R., Badi, H. N., and Khalighi, A. 2005. Evaluation of allicin content and botanical traits in Iranian garlic (*Allium sativum* L.) ecotypes. *Scientia Horticulturae*, 103(2), pp. 155–166. doi: 10.1016/j.scienta.2004.07.001

- Baker, M. E. 2002. Beyond carrier proteins Albumin, steroid hormones and the origin of vertebrates. In *Journal of Endocrinology* (Vol. 175). <http://www.endocrinology.org>
- Balunas, M. J. and Kinghorn, A. D. 2005. Drug discovery from medicinal plants. *Life Sciences*, 78(5), pp. 431–441. doi: 10.1016/j.lfs.2005.09.012
- Blumenthal, A. R. 2014. Using garlic (*Allium sativum*) as a masking agent to improve palatability of praziquantel-medicated feed for juvenile yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*). Issue May. University of Miami.
- Bondad-Reantaso, M. G., Subasinghe, R. P., Arthur, J. R., Ogawa, K., Chinabut, S., Adlard, R., Tan, Z., and Shariff, M. 2005. Disease and health management in Asian aquaculture. *Veterinary Parasitology*, 132(3–4), pp. 249–272. doi: 10.1016/j.vetpar.2005.07.005
- Botros, S., Pica-Mattoccia, L., William, S., El-Lakkani, N., and Cioli, D. 2005. Effect of praziquantel on the immature stages of *Schistosoma haematobium*. *International Journal for Parasitology*, 35(13), pp. 1453–1457. doi: 10.1016/j.ijpara.2005.05.002
- Brazenor, A. K., Francis, D. S., Hutson, K. S., and Carton, A. G. 2017. Biochemical composition of marine monogenean parasite eggs. *Molecular and Biochemical Parasitology*. Elsevier, 218(April), pp. 1–3. doi: 10.1016/j.molbiopara.2017.08.007
- Bulfon, C., Volpatti, D., and Galeotti, M. 2015. Current research on the use of plant-derived products in farmed fish. *Aquaculture Research*, 46(3), pp. 513–551. doi: 10.1111/are.12238
- Bush, A. O., Lafferty, K. D., Lotz, J. M., and Shostak, A. W. 1997. Parasitology Meets Ecology on Its Own Terms: Margolis et al. Revisited. *The Journal of Parasitology*, 83(4), pp. 575–583. doi: 10.2307/3284227
- Camargo, A. C. A. and Santos, C. P. 2020. Morphological and molecular analyses of *Pseudomazocraes sulamericana* n. sp., *Pseudomazocraes selene* Hargis, 1957, *Cemocotyle carangis* (MacCallum, 1913) and *Zeuxapta seriolae* (Meserve, 1938) (Monogenea: Mazocraeidea) from carangid fishes in the south-west. *Journal of Helminthology*, 94, pp. e28. doi: 10.1017/S0022149X18000949
- Charron, C. S., Milner, J. A., and Novotny, J. A. 2016. Garlic. In *Encyclopedia of Food and Health*. Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-12-384947-2.00346-9
- Chitmanat, C., Tongdonmuan, K., and Nunsong, W. 2005. The use of crude extracts from traditional medicinal plants to eliminate *Trichodina* sp. in tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 27(1), pp. 359–364. [http://www.thaiscience.info/Article for ThaiScience/Article/5/Ts-5 the use of crude extracts from traditional medicinal plants to eliminate trichodina sp. in tilapia \(oreochromis niloticus\) fingerlings.pdf](http://www.thaiscience.info/Article%20for%20ThaiScience/Article/5/Ts-5%20the%20use%20of%20crude%20extracts%20from%20traditional%20medicinal%20plants%20to%20eliminate%20trichodina%20sp.%20in%20tilapia%20(oreochromis%20niloticus)%20fingerlings.pdf)
- Coppi, A., Cabinian, M., Mirelman, D., and Sinnis, P. 2006. Antimalarial activity of allicin, a biologically active compound from garlic cloves. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(5), pp. 1731–1737. doi: 10.1128/AAC.50.5.1731-1737.2006
- Corzo-Martínez, M., Corzo, N., and Villamiel, M. 2007. Biological properties of onions and garlic. *Trends in Food Science and Technology*, 18(12), pp. 609–625. doi: 10.1016/j.tifs.2007.07.011
- Cunningham, J. G. 2003. *Fisiología veterinaria*. 3ª. ed. Elsevier España, España.

- D'Addabbo, T., Carbonara, T., Leonetti, P., Radicci, V., Tava, A., and Avato, P. 2011. Control of plant parasitic nematodes with active saponins and biomass from *Medicago sativa*. *Phytochemistry Reviews*, 10(4), pp. 503–519. doi: 10.1007/s11101-010-9180-2
- de Amorin, D. G., Nunes, M. A., Romão, S., Ramos, C. J. R., and Cazarolli, L. H. 2020. Effect of Garlic extract on physiological and biochemical parameters of *Rhamdia quelen* and their response to an infestation with *Ichthyophthirius multifiliis*. *Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology*, 23(1), pp. 23. doi: 10.14210/bjast.v23n1.13470
- de Brum Vieira, P., Silva, N. L. F., Menezes, C. B., da Silva, M. V., Silva, D. B., Lopes, N. P., Macedo, A. J., Bastida, J., and Tasca, T. 2017. Trichomonocidal and parasite membrane damaging activity of bidesmosic saponins from *Manilkara rufula*. *PLOS ONE*, 12(11), pp. e0188531. doi: 10.1371/journal.pone.0188531
- de Smet, H., Blust, R., and Moens, L. 1998. Absence of albumin in the plasma of the common carp *Cyprinus carpio*: binding of fatty acids to high density lipoprotein. In *Fish Physiology and Biochemistry* (Vol. 19). <http://expasy.hcuge.ch/sprot/sprot->
- del Rio-Zaragoza, O. B., Fajer-Avila, E. J., and Almazán-Rueda, P. 2010. Haematological and gill responses to an experimental infection of dactylogyrid monogeneans on the spotted rose snapper *Lutjanus guttatus* (Steindachner, 1869). *Aquaculture Research*, 41(11), pp. 1592–1601. doi: 10.1111/j.1365-2109.2009.02471.x
- Díaz, L. J. and Jiménez, K. L. 2008. Validación de un Método de Extracción de Alicina en Ajo y su Cuantificación por HPLC. *Simposio de Metrología*, pp. 1–6.
- Diggles, B. K., Roubal, F. R., and Lester, R. J. G. 1993. The influence of formalin, benzocaine and hyposalinity on the fecundity and viability of *Polylabroides multispinosus* (Monogenea: Microcotylidae) parasitic on the gills of *Acanthopagrus australis* (Pisces: Sparidae). *International Journal for Parasitology*, 23(7), pp. 877–884. doi: 10.1016/0020-7519(93)90053-2
- Dkhil, M. A., Abdel-Baki, A. S., Wunderlich, F., Sies, H., and Al-Quraishy, S. 2011. Anticoccidial and antiinflammatory activity of garlic in murine *Eimeria papillata* infections. *Veterinary Parasitology*. Elsevier B.V., 175(1–2), pp. 66–72. doi: 10.1016/j.vetpar.2010.09.009
- Doan, H. van, Soltani, E., Ingelbrecht, J., and Soltani, M. 2020. Medicinal Herbs and Plants: Potential Treatment of Monogenean Infections in Fish. *Reviews in Fisheries Science and Aquaculture*. Taylor & Francis, 28(2), pp. 260–282. doi: 10.1080/23308249.2020.1712325
- Doenhoff, M. J., Cioli, D., and Utzinger, J. 2008. Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 21(6), pp. 659–667. doi: 10.1097/QCO.0b013e328318978f
- Doenhoff, M. J., Kusel, J. R., Coles, G. C., and Cioli, D. 2002. Resistance of *Schistosoma mansoni* to praziquantel: is there a problem? *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 96(5), pp. 465–469. doi: 10.1016/S0035-9203(02)90405-0
- Eeckhaut, I., Caulier, G., Brasseur, L., Flammang, P., Gerbaux, P., and Parmentier, E. 2015. Effects of holothuroid ichthyotoxic saponins on the gills of free-living fishes and symbiotic pearlfishes. *Biological Bulletin*, 228(3), pp. 253–265. doi: 10.1086/BBLv228n3p253

- Eiras, J. C. 1994. Elementos de ictioparasitologia. In Fundação Eng. Antônio de Almeida.
- el Shenawy, N. S., Soliman, M. F. M., and Reyad, S. I. 2008. The effect of antioxidant properties of aqueous garlic extract and *Nigella sativa* as anti-schistosomiasis agents in mice. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 50(1), pp. 29–36. doi: 10.1590/S0036-46652008000100007
- Ellis, A. E. 1977. The leucocytes of fish: A review. *Journal of Fish Biology*, 11, pp. 453–491. doi: 10.1111/j.1095-8649.1977.tb04140.x
- Ernst, I., Whittington, I. D., Corneillie, S., and Talbot, C. 2002. Monogenean parasites in sea-cage aquaculture. *Austasia Aquaculture*, 16(1), pp. 46–48.
- Ernst, I., Whittington, I. D., Corneillie, S., and Talbot, C. 2005. Effects of temperature, salinity, desiccation and chemical treatments on egg embryonation and hatching success of *Benedenia seriolae* (Monogenea: Capsalidae), a parasite of farmed *Seriola* spp. *Journal of Fish Diseases*, 28(3), pp. 157–164. doi: 10.1111/j.1365-2761.2004.00605.x
- FAO. 2020. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2020. La sostenibilidad en acción. FAO, Roma. doi: 10.4060/ca9229es
- FAO. 2022. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2022. FAO. doi: 10.4060/cc0463es
- Fatma, N., Nurilmala, M., Metusalach, Nurfaidah, and Astuti, N. 2020. Low Economic Benefits of Fish as Source of Fish Albumin Besides Cork Fish. doi: <https://dx.doi.org/10.2991/aebmr.k.200514.013>
- Fazlolahzadeh, Keramati, F., and Seifi, S. 2011. Effect of Garlic (*Allium sativum*) on Hematological Parameters and Plasma Activities of ALT and AST of Rainbow trout in Temperature Stress. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 5(9), pp. 84–90.
- FDA. 2011. Enforcement priorities for drug use in aquaculture. Center for Veterinary Medicine, HFV-200. Consultado el 29 de abril de 2021 de: <https://www.fda.gov/media/70193/download#:~:text=All%20products%20granted%20low%20enforcement,listed%20per%2021%20CFR%20207.>
- FDA. 2021. Approved Aquaculture Drugs. Consultado el 29 de abril de 2021 de: <https://www.fda.gov/animal-veterinary/aquaculture/approved-aquaculture-drugs>
- Feist, S. W. and Longshaw, M. 2008. Histopathology of fish parasite infections - Importance for populations. *Journal of Fish Biology*, 73(9), pp. 2143–2160. doi: 10.1111/j.1095-8649.2008.02060.x
- Felicitta, J., Manju, R. A., Ronald, J., Sakthika, T., and Nagarajan, R. 2013. Effect of Different Concentrations Garlic (*Allium sativum*) and Onion (*Allium cepa*) on Growth, Survival, and Hematology of Juvenile Tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, 65.
- Fensham, J. R., Bubner, E., D'Antignana, T., Landos, M., and Caraguel, C. G. B. 2018. Random and systematic sampling error when hooking fish to monitor skin fluke (*Benedenia seriolae*) and gill fluke (*Zeuxapta seriolae*) burden in Australian farmed yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*). *Preventive Veterinary Medicine. Elsevier B.V.*, 153, pp. 7–14. doi: 10.1016/j.prevetmed.2018.02.012
- Filho, D. W., Eble, G. J., Kassner, G., Caprario, F. X., Dafré, A. L., and Ohira, M. 1992. Comparative hematology in marine fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 102(2), pp. 311–321. doi: 10.1016/0300-9629(92)90141-C

- Flores, H. and Vergara, A. 2012. Environment and Resources of the South Pacific. In Latin American Journal of Aquatic Research 536 Lat. Am. J. Aquat. Res (Vol. 40, Issue 3). doi: 103856/vol40-issue3-fulltext-3
- Forwood, J. M., Bubner, E. J., Landos, M., D'Antignana, T., and Deveney, M. R. 2016. Praziquantel treatment for yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*): dose and duration safety study. *Fish Physiology and Biochemistry*. Springer Netherlands, 42(1), pp. 103–109. doi: 10.1007/s10695-015-0121-2
- Forwood, J. M., Harris, J. O., and Deveney, M. R. 2013. Efficacy of bath and orally administered praziquantel and fenbendazole against *Lepidotrema bidyana* Murray, a monogenean parasite of silver perch, *Bidyanus bidyanus* (Mitchell). *Journal of Fish Diseases*, 36(11), pp. 939–947. doi: 10.1111/jfd.12089
- Fox, C. H., Johnson, F. B., Whiting, J., and Roller, P. P. 1985. Formaldehyde fixation. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 33(8), pp. 845–853. doi: 10.1177/33.8.3894502
- Fridman, S., Sinai, T., and Zilberg, D. 2014. Efficacy of garlic based treatments against monogenean parasites infecting the guppy (*Poecilia reticulata* (Peters)). *Veterinary Parasitology*. Elsevier B.V., 203(1–2), pp. 51–58. doi: 10.1016/j.vetpar.2014.02.002
- Fry, J. P., Mailloux, N. A., Love, D. C., Milli, M. C., and Cao, L. 2018. Feed conversion efficiency in aquaculture: do we measure it correctly? *Environmental Research Letters*. Institute of Physics Publishing, 13(2), pp. 024017. doi: 10.1088/1748-9326/aaa273
- Fuentes Quesada, J. P. 2018. Optimization of alternative ingredients in low fishmeal diets using functional nutrients in *Totoaba macdonaldi* juveniles. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California, 152 pp.
- Gamboa-León, M. R., Aranda-González, I., Mut-Martín, M., García-Miss, M. R., and Dumonteil, E. 2007. In vivo and in vitro control of *Leishmania mexicana* due to garlic-induced NO production. *Scandinavian Journal of Immunology*, 66(5), pp. 508–514. doi: 10.1111/j.1365-3083.2007.02000.x
- Genten, F., Terwinghe, E., and Danguy, A. 2009. Atlas of Fish Histology. Science Publishers. https://books.google.com.mx/books?id=up_wAAAAMAAJ
- Gholipour-Kanani, H., Sahandi, J., and Taheri, A. 2012. Influence of Garlic (*Allium sativum*) and Mother worth (*Matricaria chamomilla*) Extract on *Ichthyophthirius multifiliis* Parasite Treatment in Sail Fin Molly (*Poecilia latipinna*) Ornamental Fish. *APCBEE Procedia*, 4, pp. 6–11. doi: 10.1016/j.apcbee.2012.11.002
- Gilbert, B. M. and Avenant-Oldewage, A. 2016. Hatchability and survival of oncomiracidia of *Paradiplozoon ichthyoxantho* (Monogenea: Diplozoidae) exposed to aqueous aluminium. *Parasites and Vectors*. Parasites & Vectors, 9(1), pp. 1–11. doi: 10.1186/s13071-016-1706-z
- Gönnert, R. and Andrews, P. 1977. Praziquantel, a new broad-spectrum antischistosomal agent. *Zeitschrift Für Parasitenkunde*, 52(2), pp. 129–150. doi: 10.1007/BF00389899
- Grau, A., Crespo, S., Pastor, E., González, P., and Carbonell, E. 2003. High infection by *Zeuxapta seriola* (Monogenea: Heteraxinidae) associated with mass mortalities of amberjack *Seriola dumerili* Risso reared in sea cages in the Balearic Islands (Western Mediterranean). *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 23(3), pp. 139–142.

- Harada, K. 1990. Attraction activities of spices for oriental weatherfish and yellowtail. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 56(12), pp. 2029–2033. doi: 10.2331/suisan.56.2029
- Hayward, C. and Whittington, I. D. 2005. Helminth parasites: Monogenea Monopisthocotylea and Polyopisthocotylea. In K. Rohde (Ed.), *Marine Parasitology*. CSIRO publishing, Australia.
- Hirayama, T., Kawano, F., and Hirazawa, N. 2009. Effect of *Neobenedenia girellae* (Monogenea) infection on host amberjack *Seriola dumerili* (Carangidae). *Aquaculture*. Elsevier B.V., 288(3–4), pp. 159–165. doi: 10.1016/j.aquaculture.2008.11.038
- Hirazawa, N., Ohtaka, T., and Hata, K. 2000. Challenge trials on the anthelmintic effect of drugs and natural agents against the monogenean *Heterobothrium okamotoi* in the tiger puffer *Takifugu rubripes*. *Aquaculture*, 188(1–2), pp. 1–13. doi: 10.1016/S0044-8486(00)00334-3
- Hirazawa, N., Tsubone, S., and Takano, R. 2016. Anthelmintic effects of 75ppm hydrogen peroxide treatment on the monogeneans *Benedenia seriolae*, *Neobenedenia girellae*, and *Zeuxapta japonica* infecting the skin and gills of greater amberjack *Seriola dumerili*. *Aquaculture*. Elsevier B.V., 450, pp. 244–249. doi: 10.1016/j.aquaculture.2015.07.028
- Hontela, A., Rasmussen, Joseph B., Audet, C., and Chevalier, G. 1992. Impaired cortisol stress response in fish from environments polluted by PAHs, PCBs, and mercury. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 22(3), pp. 278–283. doi: 10.1007/BF00212086
- Hutson, K. S., Ernst, I., and Whittington, I. D. 2007. Risk assessment for metazoan parasites of yellowtail kingfish *Seriola lalandi* (Perciformes: Carangidae) in South Australian sea-cage aquaculture. *Aquaculture*, 271(1–4), pp. 85–99. doi: 10.1016/j.aquaculture.2007.03.020
- Ingelbrecht, J., Miller, T. L., Lymbery, A. J., Maita, M., Torikai, S., and Partridge, G. 2020. Anthelmintic herbal extracts as potential prophylactics or treatments for monogenean infections in cultured yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*). *Aquaculture*. Elsevier, 520(November 2019), pp. 734776. doi: 10.1016/j.aquaculture.2019.734776
- Ismail, M., Botros, S., Metwally, A., William, S., Farghally, A., Tao, L. F., Day, T. A., and Bennett, J. L. 1999. Resistance to praziquantel: Direct evidence from *Schistosoma mansoni* isolated from Egyptian villagers. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 60(6), pp. 932–935. doi: 10.4269/ajtmh.1999.60.932
- Isroni, W., Bahri, A. S., and Siswarini. 2020. Effect of garlic extract (*Allium sativum*) on the non-specific immune response of carp (*Cyprinus carpio*). *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. Institute of Physics Publishing, 493(1), pp. 012015. doi: 10.1088/1755-1315/493/1/012015
- Jang, H.-J., Lee, H.-J., Yoon, D.-K., Ji, D.-S., Kim, J.-H., and Lee, C.-H. 2018. Antioxidant and antimicrobial activities of fresh garlic and aged garlic by-products extracted with different solvents. *Food Science and Biotechnology*. The Korean Society of Food Science and Technology, 27(1), pp. 219–225. doi: 10.1007/s10068-017-0246-4
- Kalu, I. G., Ofoegbu, U., Eroegbusi, J., Nwachukwu, C. U., and Ibeh, B. 2010. Larvicidal activities of ethanol extract of *Allium sativum* (garlic bulb) against the filarial vector, *Culex quinquefasciatus*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(6), pp. 496–498. doi: 10.5897/JMPR09.173

- Kamel, R. O. A. and El-Shinnawy, N. A. 2015. Immunomodulatory effect of garlic oil extract on *Schistosoma mansoni* infected mice. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. Elsevier (Singapore) Pte Ltd, 8(12), pp. 999–1005. doi: 10.1016/j.apjtm.2015.11.016
- Kearn, G. C. 1986. The Eggs of Monogeneans. In *Advances in Parasitology* (Vol. 25). doi: 10.1016/S0065-308X(08)60344-9
- Kiemer, M. C. B. and Black, K. D. 1997. The effects of hydrogen peroxide on the gill tissues of Atlantic salmon, *Salmo solar* L. *Aquaculture*, 153(3–4), pp. 181–189. doi: 10.1016/S0044-8486(97)00037-9
- Kim, J. Y., Lee, Y. C., and Kim, K. S. 2002. Effect of heat treatments on the antimicrobial activities of garlic (*Allium sativum*). *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 12(2), pp. 331–335.
- Kim, W. R., Flamm, S. L., di Bisceglie, A. M., and Bodenheimer, H. C. 2008. Serum activity of alanine aminotransferase (ALT) as an indicator of health and disease. *Hepatology*, 47(4), pp. 1363–1370. doi: 10.1002/hep.22109
- Lamothe-Argumedo, R. 1970. Monogéneos de Peces II. Reporte de tres especies de Monogenea parásitas de las branquias de *Caranx hippos* del Pacífico mexicano y redescrición de *Zeuxapta seriolae* (Meserve, 1938) Price, 1962. *Rev. Biol. Trop.*, 16(2), pp. 153–169.
- Lanzotti, V. 2006. The analysis of onion and garlic. *Journal of Chromatography A*, 1112(1–2), pp. 3–22. doi: 10.1016/j.chroma.2005.12.016
- Lawson, L. D. 1998. Garlic: A Review of Its Medicinal Effects and Indicated Active Compounds. In *Phytomedicines of Europe* (Vol. 691, Issue 1). doi: 10.1021/bk-1998-0691.ch014
- Leal, J. F., Neves, M. G. P. M. S., Santos, E. B. H., and Esteves, V. I. 2018. Use of formalin in intensive aquaculture: properties, application and effects on fish and water quality. *Reviews in Aquaculture*, 10(2), pp. 281–295. doi: 10.1111/raq.12160
- Leary, S., Underwood, W., Anthony, R., Cartner, S., Corey, D., Grandin, T., Greenacre, C., Gwaltney-Brant, S., McCrackin, M., Meyer, R., Miller, D., Shearer, J., and Yanong, R. 2013. AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition. Schaumburg, Illinois. <https://www.avma.org/kb/policies/documents/euthanasia.pdf>
- Lee, D. H., Lim, S. R., Han, J. J., Lee, S. W., Ra, C. S., and Kim, J. D. 2014. Effects of Dietary Garlic Powder on Growth, Feed Utilization and Whole Body Composition Changes in Fingerling Sterlet Sturgeon, *Acipenser ruthenus*. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 27(9), pp. 1303–1310. doi: 10.5713/ajas.2014.14087
- Leef, M. J. and Lee, P. S. 2009. Preliminary investigation into the killing effect of kingfish (*Seriola lalandi*) serum and mucus against the monogenean parasites *Benedenia seriolae* and *Zeuxapta seriolae*. *Aquaculture International*, 17(6), pp. 607–614. doi: 10.1007/s10499-008-9228-0
- Li, P., Mai, K., Trushenski, J., and Wu, G. 2009. New developments in fish amino acid nutrition: towards functional and environmentally oriented aquafeeds. *Amino Acids*, 37(1), pp. 43–53. doi: 10.1007/s00726-008-0171-1

- Lia, R. P., Zizzo, N., Tinelli, A., Lionetti, A., Cantacessi, C., and Otranto, D. 2007. Mass mortality in wild greater amberjack (*Seriola dumerili*) infected by *Zeuxapta seriolae* (Monogenea: Heteraxinidae) in the Jonian Sea. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 27(3), pp. 108–111.
- Lima, C. M. B. L., Freitas, F. I. de S., Morais, L. C. S. L. de, Cavalcanti, M. G. dos S., Silva, L. F. da, Padilha, R. J. R., Barbosa, C. G. S., Santos, F. A. B. dos, Alves, L. C., and Diniz, M. de F. F. M. 2011. Ultrastructural study on the morphological changes to male worms of *Schistosoma mansoni* after in vitro exposure to allicin. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 44(3), pp. 327–330. doi: 10.1590/S0037-86822011005000023
- Liwa, A. C., Barton, E. N., Cole, W. C., and Nwokocha, C. R. 2017. Bioactive Plant Molecules, Sources and Mechanism of Action in the Treatment of Cardiovascular Disease. In *Pharmacognosy*. Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-12-802104-0.00015-9
- Llewellyn, J. 1954. Observations on the food and the gut pigment of the *Polyopisthocotylea* (Trematoda: Monogenea). *Parasitology*, 44(3–4), pp. 428–437. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13214918>
- Llewellyn, J. 1956. The host-specificity, micro-ecology, adhesive attitudes, and comparative morphology of some trematode gill parasites. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, 35, pp. 113–127.
- Lu, C. H., Ku, C. C., Wen, C. M., and Chen, S. N. 2012. Effects of the gill parasite *Zeuxapta seriolae* (Monogenea: Heteraxinidae) on the sea cage-cultured Amberjack *Seriola dumerili* (Risso, 1810) at Penghu Island (Pescadores), Taiwan. *Journal of The Fisheries Society of Taiwan*, 39(2), pp. 107–114.
- Macpherson, L. J., Geierstanger, B. H., Viswanath, V., Bandell, M., Eid, S. R., Hwang, S., and Patapoutian, A. 2005. The Pungency of Garlic: Activation of TRPA1 and TRPV1 in Response to Allicin. *Current Biology*, 15(10), pp. 929–934. doi: 10.1016/j.cub.2005.04.018
- Maestrini, M., Tava, A., Mancini, S., Salari, F., and Perrucci, S. 2019. In vitro anthelmintic activity of saponins derived from *Medicago* spp. Plants against donkey gastrointestinal nematodes. *Veterinary Sciences*, 6(2). doi: 10.3390/vetsci6020035
- Mansell, B., Powell, M. D., Ernst, I., and Nowak, B. F. 2005. Effects of the gill monogenean *Zeuxapta seriolae* (Meserve, 1938) and treatment with hydrogen peroxide on pathophysiology of kingfish, *Seriola lalandi* Valenciennes, 1833. *Journal of Fish Diseases*, 28(5), pp. 253–262. doi: 10.1111/j.1365-2761.2005.00625.x
- Martin, R. J. 1997. Modes of action of anthelmintic drugs. *Veterinary Journal*, 154(1), pp. 11–34. doi: 10.1016/S1090-0233(05)80005-X
- Martínez-Porchas, M., Rafael Martínez-Córdova, L., and Ramos-Enriquez, R. 2009. Cortisol and Glucose: Reliable indicators of fish stress? *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, 4(2), pp. 158–178.
- Martins, M. L., Moraes, F. R., Miyazaki, D. M. Y., Brum, C. D., Onaka, E. M., Fenerick, Jr. J., and Bozzo, F. R. 2002. Alternative treatment for *Anacanthorus penilabiatatus* (Monogenea: Dactylogyridae) infection in cultivated pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthyes: Characidae) in Brazil and its haematological effects. *Parasite*, 9(2), pp. 175–180. doi: 10.1051/parasite/2002092175
- Martins, N., Petropoulos, S., and Ferreira, I. C. F. R. 2016. Chemical composition and bioactive compounds of garlic (*Allium sativum* L.) as affected by pre- and post-harvest conditions: A review. *Food Chemistry*, 211, pp. 41–50. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.05.029

- McVicar, A. H. 1997. Disease and parasite implications of the coexistence of wild and cultured Atlantic salmon populations. *ICES Journal of Marine Science*, 54(6), pp. 1093–1103. doi: 10.1016/S1054-3139(97)80014-8
- Mehrim, A. I., Khalil, F. F., and Refaey, M. M. 2014. Evaluation of Dietary Addition of Garlic (*Allium Sativum* L.) Lobes on Growth Performance, Feed utilization, and Physiological Responses of *Oreochromis Niloticus*, Fingerlings. *Abbassa Int. J. Aqua*, 7(2), pp. 342–361.
- Mejri, S. C., Tremblay, R., Audet, C., Wills, P. S., and Riche, M. 2021. Essential Fatty Acid Requirements in Tropical and Cold-Water Marine Fish Larvae and Juveniles. *Frontiers in Marine Science*. Frontiers Media S.A., 8. doi: 10.3389/fmars.2021.680003
- Melzig, M. F., Bader, G., and Loose, R. 2000. Investigations of the mechanism of membrane activity of selected triterpenoid saponins. *Planta Medica*, 67(1), pp. 43–48.
- Mendoza-Garfias, B., García-Prieto, L., and Pérez-Ponce De León, G. 2017. Checklist of the monogenea (Platyhelminthes) parasitic in mexican aquatic vertebrates. *Zoosystema*, 39(4), pp. 501–598. doi: 10.5252/z2017n4a5
- Metwally, M. A. A. 2009. Effects of Garlic (*Allium sativum*) on Some Antioxidant Activities in *Tilapia Nilotica* (*Oreochromis niloticus*). *World Journal of Fish and Marine Sciences*, 1(1), pp. 56–64.
- Militz, T. A., Southgate, P. C., Carton, A. G., and Hutson, K. S. 2013. Dietary supplementation of garlic (*Allium sativum*) to prevent monogenean infection in aquaculture. *Aquaculture*. Elsevier B.V., 408–409, pp. 95–99. doi: 10.1016/j.aquaculture.2013.05.027
- Militz, T. A., Southgate, P. C., Carton, A. G., and Hutson, K. S. 2014. Efficacy of garlic (*Allium sativum*) extract applied as a therapeutic immersion treatment for *Neobenedenia* sp. management in aquaculture. *Journal of Fish Diseases*, 37(5), pp. 451–461. doi: 10.1111/jfd.12129
- Molnár, K. and Székely, C. 2004. Occurrence and pathology of *Sinergasilus lienii* (Copepoda: Ergasilidae), a parasite of the silver carp and bighead, in Hungarian ponds. *Acta Veterinaria Hungarica*, 52(1), pp. 51–60. doi: 10.1556/AVet.52.2004.1.6
- Montero, F., Crespo, S., Padrós, F., de la Gándara, F., García, A., and Raga, J. A. 2004. Effects of the gill parasite *Zeuxapta seriolae* (Monogenea: Heteraxinidae) on the amberjack *Seriola dumerili* Risso (Teleostei: Carangidae). *Aquaculture*, 232(1–4), pp. 153–163. doi: 10.1016/S0044-8486(03)00536-2
- Mooney, A. J., Ernst, I., and Whittington, I. D. 2006. An egg-laying rhythm in *Zeuxapta seriolae* (Monogenea: Heteraxinidae), a gill parasite of yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*). *Aquaculture*, 253(1–4), pp. 10–16. doi: 10.1016/j.aquaculture.2004.11.029
- Morley, N. J. 2009. Environmental risk and toxicology of human and veterinary waste pharmaceutical exposure to wild aquatic host-parasite relationships. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 27(2), pp. 161–175. doi: 10.1016/j.etap.2008.11.004
- Msangi, S., Kobayashi, M., Batka, M., Vannuccini, S., Dey, M. M., and Anderson, J. L. 2013. Fish to 2030: Prospects for Fisheries and Aquaculture. World Bank Report, 83177-GLB.

- Mueller, K. W., Watanabe, W. O., and Head, W. D. 1992. Effect of Salinity on Hatching in *Neobenedenia melleni*, a Monogenean Ectoparasite of Seawater-Cultured Tilapia. *Journal of the World Aquaculture Society*, 23(3), pp. 199–204. doi: 10.1111/j.1749-7345.1992.tb00769.x
- Mzengereza, K., Ishikawa, M., Koshio, S., Yokoyama, S., Yukun, Z., Shadrack, R. S., Seo, S., Kotani, T., Dossou, S., el Basuini, M. F., and Dawood, M. A. O. 2021. Growth performance, growth-related genes, digestibility, digestive enzyme activity, immune and stress responses of de novo camelina meal in diets of red seabream (*Pagrus major*). *Animals*. MDPI, 11(11). doi: 10.3390/ani11113118
- Nakagawa, S., Kasuga, S., and Matsuura, H. 1989. Prevention of liver damage by aged garlic extract and its components in mice. *Phytotherapy Research*, 3(2), pp. 50–53. doi: 10.1002/ptr.2650030203
- National Research Council. 2011. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. 8th ed. National Academies Press, Washington, D.C. doi: 10.17226/12910
- Neely, W. B. 1963. Action of formaldehyde on microorganisms. III. Bactericidal action of sublethal concentrations of formaldehyde on *Aerobacter aerogenes*. *Journal of Bacteriology*, 85(5), pp. 445–448. doi: 10.1128/JB.85.5.1028-1031.1963
- Neubauer, P. and Andersen, K. H. 2019. Thermal performance of fish is explained by an interplay between physiology, behaviour and ecology. *Conservation Physiology*, 7(1), pp. 1–14. doi: 10.1093/conphys/coz025
- Nisembaum, L. G., Loentgen, G., L'Honoré, T., Martin, P., Paulin, C.-H., Fuentès, M., Escoubeyrou, K., Delgado, M. J., Besseau, L., and Falcón, J. 2022. Transient Receptor Potential-Vanilloid (TRPV1-TRPV4) Channels in the Atlantic Salmon, *Salmo salar*. A Focus on the Pineal Gland and Melatonin Production. *Frontiers in Physiology*. Frontiers Media S.A., 12. doi: 10.3389/fphys.2021.784416
- Núñez, L. and Bouda, J. 2007. *Patología Clínica Veterinaria*. 2ª ed. FMVZ-UNAM. México.
- Nya, E. J. and Austin, B. 2009. Use of garlic, *Allium sativum*, to control *Aeromonas hydrophila* infection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*, 32(11), pp. 963–970. doi: 10.1111/j.1365-2761.2009.01100.x
- Nya, E. J., Dawood, Z., and Austin, B. 2010. The garlic component, allicin, prevents disease caused by *Aeromonas hydrophila* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*, 33(4), pp. 293–300. doi: 10.1111/j.1365-2761.2009.01121.x
- Oda, M., Saito, K., Hatta, S., Kubo, Y., and Saitoh, O. 2017. Chemical and thermal sensitivity of medaka TRPA1 analyzed in heterologous expression system. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Elsevier B.V., 494(1–2), pp. 194–201. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.10.057
- Ogawa, K. 1996. Marine parasitology with special reference to Japanese fisheries and mariculture. *Veterinary Parasitology*, 64(1–2), pp. 95–105. doi: 10.1016/0304-4017(96)00962-4
- Ogawa, K. 2002. Impacts of diclidophorid monogenean infections on fisheries in Japan. *International Journal for Parasitology*, 32(3), pp. 373–380. doi: 10.1016/S0020-7519(01)00338-1
- Ohno, Y., Kawano, F., and Hirazawa, N. 2008. Susceptibility by amberjack (*Seriola dumerili*), yellowtail (*S. quinqueriata*) and Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) to *Neobenedenia girellae*

- (Monogenea) infection and their acquired protection. *Aquaculture*, 274(1), pp. 30–35. doi: 10.1016/j.aquaculture.2007.11.013
- Ohno, Y., Kawano, F., and Hirazawa, N. 2009. The effect of oral antibiotic treatment and freshwater bath treatment on susceptibility to *Neobenedenia girellae* (Monogenea) infection of amberjack (*Seriola dumerili*) and yellowtail (*S. quinquerradiata*) hosts. *Aquaculture*. Elsevier B.V., 292(3–4), pp. 248–251. doi: 10.1016/j.aquaculture.2009.04.012
- OIE. 2012a. Anemia infecciosa del salmón. In *Manual Acuático de la OIE 2012*.
- OIE. 2021. Código Sanitario para los Animales Acuáticos. Paris. Consultado el 29 de abril de 2021 de: <https://www.woah.org/es/que-hacemos/normas/codigos-y-manuales/acceso-en-linea-al-codigo-acuatico/>
- OIE. 2021. Infection with *Gyrodactylus salaris*. *Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals*. Consultado el 29 de abril de 2021 de: https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahm/current/2.3.03_G_salaris.pdf
- Olivier, G. 2002. Disease interactions between wild and cultured fish- Perspectives from the American Northeast (Atlantic Provinces). *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 22(2), pp. 103–109.
- Onomu, A. J. 2018. Growth and Haematological Response of *Clarias gariepinus* to Garlic (*Allium sativum*) Supplemented Diet. *Sustainable Agriculture Research*. Canadian Center of Science and Education, 8(1), pp. 67. doi: 10.5539/sar.v8n1p67
- ONU. 2014. La situación demográfica en el mundo, 2014. Informe conciso. Departamento de Asuntos Económicos y Sociales, pp. 1–38.
- Orellana, J., Waller, U., and Wecker, B. 2014. Culture of yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) in a marine recirculating aquaculture system (RAS) with artificial seawater. *Aquacultural Engineering*, 58, pp. 20–28. doi: 10.1016/j.aquaeng.2013.09.004
- Pearson, W., Boermans, H. J., Bettger, W. J., McBride, B. W., and Lindinger, M. I. 2005. Association of maximum voluntary dietary intake of freeze-dried garlic with Heinz body anemia in horses. *American Journal of Veterinary Research*, 66(3), pp. 457–465. doi: 10.2460/ajvr.2005.66.457
- Peeler, E. J. and Feist, S. W. 2011. Human intervention in freshwater ecosystems drives disease emergence. *Freshwater Biology*, 56(4), pp. 705–716. doi: 10.1111/j.1365-2427.2011.02572.x
- Peña, N., Auró, A., and Sumano, H. 1988. A comparative trial of garlic, its extract and ammonium-potassium tartrate as antihelmintics in carp. *Journal of Ethnopharmacology*. Cambridge. Cambridge University Press, 24(2–3), pp. 199–203. doi: 10.1016/0378-8741(88)90152-3
- Prati, P., Henrique, C. M., Souza, A. S. D., Silva, V. S. N. D., and Pacheco, M. T. B. 2014. Evaluation of allicin stability in processed garlic of different cultivars. *Food Science and Technology (Campinas)*, 34(3), pp. 623–628. doi: 10.1590/1678-457x.6397

- Rach, J., Gaikowski, M., and Ramsay, R. 2000. Efficacy of Hydrogen Peroxide to Control Parasitic Infestations on Hatchery-Reared Fish. *Journal of Aquatic Animal Health*, 12(4), pp. 267–273. doi: 10.1577/1548-8667(2000)012<0267:EOHPTC>2.0.CO;2
- Rae, H. A. 1999. Onion toxicosis in a herd of beef cows. *The Canadian Veterinary Journal*, 40(1), pp. 55–57.
- Randall, D., Burggren, W., and French, K. 1998. *Fisiología Animal. Mecanismos y Adaptaciones*. 4ta Edició. McGraw-Hill/Interamericana de España, S.A.U, Madrid, España.
- Rao, A. V. and Gurfinkel, D. M. 2000. The Bioactivity of Saponins: Triterpenoid and Steroidal Glycosides. *Drug Metabolism and Drug Interactions*, 17(1–4), pp. 211–235. doi: 10.1515/DMDI.2000.17.1-4.211
- Reiczigel, J., Marozzi, M., Fábán, I., and Rózsa, L. 2019. Biostatistics for Parasitologists – A Primer to Quantitative Parasitology. *Trends in Parasitology*, 35(4), pp. 277–281. doi: 10.1016/j.pt.2019.01.003
- Repullés-Albelda, A., Kostadinova, A., Raga, J. A., and Montero, F. E. 2013. Seasonal population dynamics of *Zeuxapta seriolae* (Monogenea: Heteraxinidae) parasitizing *Seriola dumerili* (Carangidae) in the Western Mediterranean. *Veterinary Parasitology*. Elsevier B.V., 193(1–3), pp. 163–171. doi: 10.1016/j.vetpar.2012.12.013
- Riad, N. H. A., Taha, H. A., and Mahmoud, Y. I. 2009. Effects of garlic on albino mice experimentally infected with *Schistosoma mansoni*: A parasitological and ultrastructural study. *Tropical Biomedicine*, 26(1), pp. 40–50.
- Ricker, W. E. 1975. Computation and interpretation of biological statistics of fish population. *Bulletin of the Fisheries Research Board of Canada*, 191(0), pp. 1–382.
- Roberts, R. J. 2012. *Fish Pathology*. In R. J. Roberts (Ed.), John Wiley & Sons. Oxford, UK.
- Rodgers, C. J. and Furones, M. D. 2009. Antimicrobial agents in aquaculture: practice, needs and issues. In C. Rogers & B. Basurco (Eds.), *The use of veterinary drugs and vaccines in Mediterranean aquaculture* (Issue 86). Options Méditerranéennes, Zaragoza.
- Rodríguez Fonseca, M. Á. 2014. Efecto de la temperatura de aclimatación sobre el comportamiento térmico y de alimentación de los juveniles de jurel cola amarilla *Seriola lalandi*. *Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada*, 1–71 pp.
- Rottmann, R. W., Francis-Floyd, R., and Durborow, R. 1992. *The Role of Stress in Fish Disease*. Southern Regional Aquaculture Center, 474, pp. 2.
- Rubio-Godoy, M. 2007. Fish host-monogenean parasite interactions, with special reference to *Polyopisthocotylea*. *Advances in the Immunobiology of Parasitic Diseases*, 1(6), pp. 91–109.
- Rubio-Godoy, M. 2008. Microhabitat selection of *Discocotyle sagittata* (Monogenea: Polyopisthocotylea) in farmed rainbow trout. *Folia Parasitologica*, 55(4), pp. 270–276.
- Rubio-Godoy, M. 2010. Inmunología de los peces óseos. Revisión Teleost fish immunology. Review. In *REVISIÓN Rev Mex Cienc Pecu* (Vol. 1, Issue 1). 47–57 pp.
- S Hassaan, M. and A Soltan, M. 2016. Evaluation of Essential Oil of Fennel and Garlic Separately or Combined with *Bacillus licheniformis* on the Growth, Feeding Behaviour, Hemato-biochemical

- Indices of *Oreochromis niloticus* (L.) Fry. Journal of Aquaculture Research & Development. OMICS Publishing Group, 07(04). doi: 10.4172/2155-9546.1000422
- Sadekarpawar, S. and Parikh, P. 2013. Gonadosomatic and Hepatosomatic Indices of Freshwater Fish *Oreochromis mossambicus* in Response to a Plant Nutrient. World Journal of Zoology, 8(1), pp. 110–118. doi: 10.5829/idosi.wjz.2013.8.1.7268
- Sahu, S., Das, B. K., Mishra, B. K., Pradhan, J., and Sarangi, N. 2007. Effect of *Allium sativum* on the immunity and survival of *Labeo rohita* infected with *Aeromonas hydrophila*. Journal of Applied Ichthyology, 23(1), pp. 80–86. doi: 10.1111/j.1439-0426.2006.00785.x
- Santhosha, S. G., Jamuna, P., and Prabhavathi, S. N. 2013. Bioactive components of garlic and their physiological role in health maintenance: A review. Food Bioscience. Elsevier, 3, pp. 59–74. doi: 10.1016/j.fbio.2013.07.001
- Schelkle, B., Snellgrove, D., and Cable, J. 2013. In vitro and in vivo efficacy of garlic compounds against *Gyrodactylus turnbulli* infecting the guppy (*Poecilia reticulata*). Veterinary Parasitology. Elsevier B.V., 198(1–2), pp. 96–101. doi: 10.1016/j.vetpar.2013.08.027
- Sedensky, A. and Dufour, J.-F. 2011. Liver Physiology. In P. Ginès, P. S. Kamath, & V. Arroyo (Eds.), Chronic Liver Failure: Mechanisms and Management. Humana Press, Totowa, NJ. doi: 10.1007/978-1-60761-866-9
- Shalaby, A. M., Khattab, Y. A., and Abdel Rahman, A. M. 2006. Effects of Garlic (*Allium sativum*) and chloramphenicol on growth performance, physiological parameters and survival of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases, 12(2), pp. 172–201. doi: 10.1590/S1678-91992006000200003
- Sharp, N. J., Diggles, B. K., Poortenaar, C. W., and Willis, T. J. 2004. Efficacy of Aquil-S, formalin and praziquantel against the monogeneans, *Benedenia seriolae* and *Zeuxapta seriolae*, infecting yellowtail kingfish *Seriola lalandi lalandi* in New Zealand. Aquaculture, 236(1–4), pp. 67–83. doi: 10.1016/j.aquaculture.2004.02.005
- Shephard, K. L. 1993. Mucus on the epidermis of fish and its influence on drug delivery. Advanced Drug Delivery Reviews, 11(3), pp. 403–417. doi: 10.1016/0169-409X(93)90018-Y
- Shinn, A. A. P., Pratoomyot, J., Bron, J. E., Paladini, G. G., Brooker, E., and Brooker, A. J. 2015. Economic impacts of aquatic parasites on global finfish production. Global Aquaculture Advocate, Setembro/Outubro, pp. 82–84.
- Shinn, A. P., Pratoomyot, J., Bron, J. E., Paladini, G., Brooker, E. E., and Brooker, A. J. 2015. Economic costs of protistan and metazoan parasites to global mariculture. Parasitology, 142(1), pp. 196–270. doi: 10.1017/S0031182014001437
- Silva, D., Cortez, C. M., Nogueira, N. P., and Bastos, F. F. da C. 2015. Purification and physico-chemical study of serum albumins of two neotropical fish species from the São Francisco River Basin, Brazil. Biota Neotropica. Universidade Estadual de Campinas UNICAMP, 15(3), pp. 1–4. doi: 10.1590/1676-0611-BN-2014-0179

- Singh, T. U., Kumar, D., Tandan, S. K., and Mishra, S. K. 2009. Inhibitory effect of essential oils of *Allium sativum* and *Piper longum* on spontaneous muscular activity of liver fluke, *Fasciola gigantica*. *Experimental Parasitology*. Elsevier Inc., 123(4), pp. 302–308. doi: 10.1016/j.exppara.2009.08.002
- Sitjà-Bobadilla, A., de Felipe, M. C., and Alvarez-Pellitero, P. 2006. In vivo and in vitro treatments against *Sparicotyle chrysophrii* (Monogenea: Microcotylidae) parasitizing the gills of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture*, 261(3), pp. 856–864. doi: 10.1016/j.aquaculture.2006.09.012
- Smith, M. E. 2004. Noise-induced stress response and hearing loss in goldfish (*Carassius auratus*). *Journal of Experimental Biology*, 207(3), pp. 427–435. doi: 10.1242/jeb.00755
- Sprague, J. B. 1990. *Aquatic Toxicology*. In C. B. Schreck & P. B. Moyle (Eds.), *Methods for fish biology*. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland.
- Stephens, F. and Savage, A. 2010. Two mortality events in sea-caged yellowtail kingfish *Seriola lalandi* Valenciennes, 1833 (Nannoperidae) from Western Australia. *Australian Veterinary Journal*, 88(10), pp. 414–416. doi: 10.1111/j.1751-0813.2010.00625.x
- Stockham, S. L. and Scott, M. A. 2013. *Fundamentals of veterinary clinical pathology*. John Wiley & Sons.
- Stoskopf, M. K. 1993. *Fish medicine*. WB Saunders Company.
- Stratev, D., Zhelyazkov, G., Noundou, X. S., and Krause, R. W. M. 2018. Beneficial effects of medicinal plants in fish diseases. *Aquaculture International*. *Aquaculture International*, 26(1), pp. 289–308. doi: 10.1007/s10499-017-0219-x
- Subasinghe, R. P., Bondad-Reantaso, M. G., and McGladdery, S. E. 2001. *Aquaculture Development, Health and Wealth*. In R.P. Subasinghe, P. Bueno, M.J. Phillips, C. Hough, S.E. McGladdery & J.R. Arthur, Eds. *Aquaculture in the Third Millennium*. <http://www.fao.org/docrep/003/ab412e/ab412e09.htm>
- Talpur, A. D. and Ikhwanuddin, M. 2012. Dietary effects of garlic (*Allium sativum*) on haemato-immunological parameters, survival, growth, and disease resistance against *Vibrio harveyi* infection in Asian sea bass, *Lates calcarifer* (Bloch). *Aquaculture*. Elsevier B.V., 364–365, pp. 6–12. doi: 10.1016/j.aquaculture.2012.07.035
- Timmons, M. ben, Ebeling, J. M., and Piedrahita, R. H. 2009. *Acuicultura en sistemas de recirculación*. 1st ed. Cayuga Aqua Ventures.
- Toledo Valenzuela, R. J. 2005. *Estudio Comparativo de Tres Sistemas de Distribución de Alimento y su Influencia en las Tasas de Crecimiento de Salmón del Atlántico (Salmo salar)*. Tesis de Licenciatura. Universidad Austral de Chile, 01–68 pp. Consultado el 12 de mayo de 2021 de: <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2005/fat649e/doc/fat649e.pdf>
- Trasviña-Moreno, A. G., Ascencio, F., Angulo, C., Hutson, K. S., Avilés-Quevedo, A., Inohuye-Rivera, R. B., and Pérez-Urbiola, J. C. 2019. Plant extracts as a natural treatment against the fish ectoparasite *Neobenedenia* sp. (Monogenea: Capsalidae). *Journal of Helminthology*, 93(1), pp. 57–65. doi: 10.1017/S0022149X17001122
- Tubbs, L. A., Poortenaar, C. W., Sewell, M. A., and Diggles, B. K. 2005. Effects of temperature on fecundity in vitro, egg hatching and reproductive development of *Benedenia seriolae* and *Zeuxapta seriolae*

- (Monogenea) parasitic on yellowtail kingfish *Seriola lalandi*. *International Journal for Parasitology*. Elsevier Ltd, 35(3), pp. 315–327. doi: 10.1016/j.ijpara.2004.11.008
- Urbina, J. A., Marchan, E., Lazard, K., Visbal, G., Apitz-Castro, R., Gil, F., Aguirre, T., Piras, M. M., and Piras, R. 1993. Inhibition of phosphatidylcholine biosynthesis and cell proliferation in *Trypanosoma cruzi* by ajoene, an antiplatelet compound isolated from garlic. *Biochemical Pharmacology*, 45(12), pp. 2381–2387. doi: 10.1016/0006-2952(93)90217-K
- Valles-Vega, I., Ascencio, F., Sicard-González, T., Angulo, C., Fajer-Avila, E. J., Inohuye-Rivera, R. B., and Pérez-Urbíola, J. C. 2019. Effects of temperature on the life cycle of *Neobenedenia* sp. (Monogenea: Capsalidae) from *Seriola rivoliana* (Almeco jack) in Bahía de La Paz, BCS Mexico. *Parasitology Research*, 118(12), pp. 3267–3277. doi: 10.1007/s00436-019-06460-1
- van Hai, N. 2015. The use of medicinal plants as immunostimulants in aquaculture: A review. *Aquaculture*. Elsevier B.V., 446, pp. 88–96. doi: 10.1016/j.aquaculture.2015.03.014
- van Muiswinkel, W. B. and Vervoorn-Van Der Wal, B. 2006. The immune system of fish. In *Fish diseases and disorders* (Vol. 1).
- Vivanco-Aranda, M., Lechuga-Sandoval, C., del Río-Zaragoza, O. B., and Viana, M. T. 2019. Mixed parasitism induced experimentally in yellowtail, *Seriola dorsalis* reared in RAS: Intensity and spatial distribution on the skin and gills. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 47(1), pp. 156–163. doi: 10.3856/vol47-issue1-fulltext-17
- Weiss, D. J. and Wardrop, K. J. 2011. *Schalm's veterinary hematology*. John Wiley & Sons, Iowa, USA.
- Whitaker, B. R. 2001. Ocular disorders. In W. H. Wildgoose (Ed.), *BSAVA Manual of Ornamental Fish* (2nd ed.). British Small Animal Veterinary Association, Gloucester, England.
- Whittington, I. D. 2012. *Benedenia seriola* and *Neobenedenia* Species. In P. T. K. Woo (Ed.), *Fish Parasites: Pathobiology and Protection*. CAB International, Oxfordshire.
- Whittington, I. D. and Kearn, G. C. 2011. Hatching Strategies in Monogenean (Platyhelminth) Parasites that Facilitate Host Infection. *Integrative and Comparative Biology*, 51(1), pp. 91–99. doi: 10.1093/icb/icr003
- WHO. 2000. General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicine. Geneva. Consultado el 15 de mayo de 2021 de: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/66783/WHO_EDM_TRM_2000.1.pdf;jsessionid=E C25880F1B6EB3C7C4B322CE6353DFFD?sequence=1
- WHO. 2020. World Health Organization Schistosomiasis Strategy. Consultado el 9 de abril de 2020 de: <https://www.who.int/schistosomiasis/strategy/en/>
- Williams, R., Ernst, I., Chambers, C., and Whittington, I. 2007. Efficacy of orally administered praziquantel against *Zeuxapta seriola* and *Benedenia seriola* (Monogenea) in yellowtail kingfish *Seriola lalandi*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 77(3), pp. 199–205. doi: 10.3354/dao01824
- Wink, D. A., Hines, H. B., Cheng, R. Y. S., Switzer, C. H., Flores-Santana, W., Vitek, M. P., Ridnour, L. A., and Colton, C. A. 2011. Nitric oxide and redox mechanisms in the immune response. *Journal of Leukocyte Biology*, 89(6), pp. 873–891. doi: 10.1189/jlb.1010550

- Woo, P. T. K. and Buchmann, K. 2012. Fish Parasites: Pathobiology and Protection. CAB International, Oxfordshire.
- Wooster, G., Martinez, C., Bowser, P., and O'Hara, D. 2005. Human Health Risks Associated with Formalin Treatments Used in Aquaculture: Initial Study. *North American Journal of Aquaculture*, 67(2), pp. 111–113. doi: 10.1577/A04-026.1
- Worku, M., Franco, R., and Baldwin, K. 2009. Efficacy of garlic as an anthelmintic in adult Boer goats. *Archives of Biological Sciences*, 61(1), pp. 135–140. doi: 10.2298/abs0901135w
- Wu, Z.-F., Zhu, B., Wang, Y., Lu, C., and Wang, G.-X. 2011. In vivo evaluation of anthelmintic potential of medicinal plant extracts against *Dactylogyrus intermedius* (Monogenea) in goldfish (*Carassius auratus*). *Parasitology Research*, 108(6), pp. 1557–1563. doi: 10.1007/s00436-010-2211-5
- Yamato, O., Kasai, E., Katsura, T., Takahashi, S., Shiota, T., Tajima, M., Yamasaki, M., and Maede, Y. 2005. Heinz Body Hemolytic Anemia With Eccentrocytosis From Ingestion of Chinese Chive (*Allium tuberosum*) and Garlic (*Allium sativum*) in a Dog. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 41(1), pp. 68–73. doi: 10.5326/0410068
- Yavuzcan Yildiz, H. and Bekcan, S. 2020. Control of ectoparasitosis in carp (*Cyprinus carpio*) induced by *Gyrodactylus elegans* (Monogenea) with garlic (*Allium sativum*) and onion (*Allium cepa*) extracts. *Ecocycles*, 6(1), pp. 10–17. doi: 10.19040/ecocycles.v6i1.157
- Yoshinaga, T., Kamaishi, T., Segawa, I., Yamano, K., Ikeda, H., and Sorimachi, M. 2001. Anemia caused by challenges with the Monogenean *Neoheterobothrium hirame* in the Japanese Flounder. *Fish Pathology*, 36(1), pp. 13–20.
- Yoshinaga, T., Segawa, I., Kamaishi, T., and Sorimachi, M. 2000. Effects of Temperature, Salinity and Chlorine Treatment on Egg Hatching of the Monogenean *Neoheterobothrium hirame* Infecting Japanese Flounder. *Fish Pathology*, 35(2), pp. 85–88. doi: 10.3147/jsfp.35.85
- Zare, M., Tran, H. Q., Prokešová, M., and Stejskal, V. 2021. Effects of Garlic *Allium sativum* Powder on Nutrient Digestibility, Haematology, and Immune and Stress Responses in Eurasian Perch *Perca fluviatilis* Juveniles. *Animals*. MDPI, 11(9), pp. 2735. doi: 10.3390/ani11092735
- Zhang, X., Li, N., Lu, X., Liu, P., and Qiao, X. 2016. Effects of temperature on the quality of black garlic. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(7), pp. 2366–2372. doi: 10.1002/jsfa.7351
- Zinkl, J. G., Cox, W. T., and Kono, C. S. 1991. Morphology and cytochemistry of leucocytes and thrombocytes of six species of fish. *Comparative Haematology International*, 1, pp. 187–195. doi: 10.1007/BF00235368
- Zorin, B., Gibson-Kueh, S., and Zilberg, D. 2019. A novel treatment against the monogenean parasite, *Gyrodactylus turnbulli*, infecting guppies (*Poecilia reticulata*), using a plant-based commercial insecticide Timor C. *Aquaculture*. Elsevier, 501(October 2018), pp. 313–318. doi: 10.1016/j.aquaculture.2018.11.038