



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

USO DEL CLORURO DE SODIO Y
FORMALINA COMO TRATAMIENTO
CONTRA MONOGENOIDEOS
BRANQUIALES EN *Colossoma*
macropomum “GAMITANA”
CULTIVADAS EN IQUITOS, PERÚ.

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAESTRA EN SANIDAD ACUÍCOLA

GABRIELA ELIZABETH TORRES
BOCANEGRA

LIMA – PERÚ

2023

ASESOR DE TESIS:

Dr. Marcos Enrique Serrano Martínez

CO - ASESOR:

Dr. Germán Augusto Murrieta Morey

JURADO DE TESIS

DRA. FRANCESCA SCHIAFFINO SALAZAR

PRESIDENTE

MG. CLARISA ELIZABETH HINOSTROZA MEZA

VOCAL

MG. CARLOS EDUARDO SMITH DAVILA

SECRETARIO

DEDICATORIA

Dedicado especialmente a una de las personas más importantes en mi vida, mi madre Silvia, que siempre fue mi apoyo incondicional, a mi padre Luis, que me demuestra que día a día se puede salir adelante y a mi compañero y amor de mi vida Daniel, por ser la voz que me da aliento cuando siento que ya no puedo, gracias por depositar toda la confianza en mí en todo este camino que duró la maestría.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto de Investigación de la Amazonia Peruana, por brindarme las facilidades y permitirme realizar toda la parte experimental de mi proyecto en sus instalaciones.

Al Dr. Germán Augusto Murrieta Morey por acceder a ser mi asesor en toda esta etapa, por su ayuda con todo el proceso experimental, sus indicaciones, consejos y enseñanzas.

Al Dr. Marcos Enrique Serrano Martínez por la confianza brindada en esta investigación.

Al Blgo. Luciano Rodriguez Chu, por las facilidades brindadas en la entrega de peces para el proceso de investigación.

A mi colega y amiga Nataly Gonzales Villacis, por todo su apoyo y ayuda desde el inicio de todo este proceso de investigación.

A mi compañera de maestría y amiga Miriam Caceda, por su amistad, consejos y orientación en algunos temas en toda esta etapa que duró la maestría.

A la Sra. Rosario Lapa quien nos ayudó y facilitó nuestros trámites y materiales relacionados con la maestría en estos años.

A todas las personas que de alguna u otra manera me apoyaron en este proceso para que la tesis se realice satisfactoriamente.

FUENTE DE FINANCIAMIENTO

La realización de esta tesis para optar el grado de Magister en Sanidad Acuícola ha sido posible gracias al apoyo financiero brindado al Programa de Maestría en Sanidad Acuícola de la UPCH subvencionado por FONDECYT del CONCYTEC (Convenio de Gestión [N° 230-2015-FONDECYT-DE-PROMOCIÓN 4](#)).

USO DEL CLORURO DE SODIO Y FORMALINA COMO TRATAMIENTO CONTRA MONOGENOIDEOS BRANQUIALES EN *Colossoma macropomum* "GAMITANA" CULTIVADAS EN IQUITOS, PERÚ

INFORME DE ORIGINALIDAD



FUENTES PRIMARIAS

1	repositorio.ufsc.br Fuente de Internet	2%
2	www.alice.cnptia.embrapa.br Fuente de Internet	2%
3	Yohana M. Velasco-Santamaría, Pablo E. Cruz-Casallas. "Behavioural and gill histopathological effects of acute exposure to sodium chloride in moneda (<i>Metynnis orinocensis</i>)", <i>Environmental Toxicology and Pharmacology</i> , 2008 Publicación	1%
4	docplayer.com.br Fuente de Internet	1%
5	pubmed.ncbi.nlm.nih.gov Fuente de Internet	1%
6	portal.findresearcher.sdu.dk Fuente de Internet	<1%

TABLA DE CONTENIDOS

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
II.	ANTECEDENTES.....	4
	2.1. Gamitana: Clasificación taxonómica.....	4
	2.2. Descripción biológica de <i>C. macropomum</i>	4
	2.3. Gamitana en la acuicultura.....	5
	2.4. Sanidad y Patología en la Gamitana	7
	2.5. Principales patógenos en Gamitana	8
	2.6. Monogeenos: Descripción	10
	2.7. Monogeenos en <i>C. macropomum</i>	11
	2.8 Tratamientos contra monogenoideos en Gamitana	14
	2.9. Aplicación del cloruro de sodio en la acuicultura.....	16
	2.10. Aplicación del formol en la acuicultura.....	18
III.	HIPÓTESIS.....	22
IV.	OBJETIVOS.....	22
	4.1. Objetivo general.....	22
	4.2. Objetivos específicos.....	22
V.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
	5.1. Lugar de estudio.....	23

5.1.1. Descripción del área de estudio.....	23
5.2. Población objetivo.....	24
5.2.1. Tamaño de muestra	24
5.2.2. Criterios de inclusión.....	24
5.3. Agente químico.....	24
5.4. Evaluación de la efectividad del cloruro de sodio y formalina... ..	25
5.4.1. Ensayo <i>in vitro</i> del NaCl y formalina	26
5.4.2. Ensayo <i>in vivo</i> del NaCl y formalina.....	28
5.5. Análisis parasitológico.....	30
5.5.1. Fijación y conservación de parásitos.....	30
5.5.2. Montaje e Identificación	30
5.5.3. Índices parasitarios.....	30
5.6. Análisis histopatológico.....	31
5.6.1. Fijación y procesamiento de muestras.....	31
5.6.2. Evaluación de lesiones histopatológicas.....	31
5.7. Plan de análisis de datos.....	34
5.8. Consideraciones éticas.....	34
5.9. Limitaciones.....	34

VI.	RESULTADOS.....	35
6.1.	Índices parasitarios.....	35
6.2.	Prueba in vitro del NaCl y formalina.....	36
6.3.	Prueba in vivo del NaCl y formalina	39
6.4.	Identificación de monogeneos.....	41
6.4.1.	<i>Anacanthorus spathulatus</i>	41
6.4.2.	<i>Anacanthorus penilabiatus</i>	42
6.4.3.	<i>Notozothecium janauachensis</i>	44
6.5.	Evaluación histopatológica.....	45
VII.	DISCUSIÓN.....	51
VIII.	CONCLUSIONES.....	59
IX.	RECOMENDACIONES.....	60
X.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61
XI.	ANEXOS	

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Tratamientos contra monogenoideos branquiales en *Colossoma macropomum*

Tabla 2. Dosificación de los agentes químicos a utilizar en los ensayos.

Tabla 3. Índices parasitarios registrados por cada tratamiento

Tabla 4. Índices parasitarios de monogeneos registrados en *C. macropomum*

Tabla 5. Tiempo de muerte de los parásitos por tratamiento

Tabla 6. Análisis estadístico de la prueba *in vitro* de los diferentes tratamientos

Tabla 7: Análisis prueba de tukey en los diferentes tratamientos

Tabla 8. Análisis estadístico de la prueba *in vivo* de los diferentes tratamientos

Tabla 9. Lesiones Histopatológicas en branquias de acuerdo al tipo de lesión y grado de afección presentes en *C. macropomum*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. A-C. *Anacanthorus spathulatus*. A. Cuerpo entero B. Complejo copulatorio (vista ventral). C. Haptor.

Figura 2. A-B. *Anacanthorus penilabiatus* A. Complejo copulatorio (vista ventral). B. Haptor.

Figura 3. A-B. *Notozothecium janauachensis*. A. Complejo copulatorio, vista ventral. B. Haptor.

Figura 4. Branquia de *C. macropomum*, A, B y C - monogéneos (asterisco) causando hiperplasia interlamelar generalizada (flecha negra) e hiperplasia de las lamelas secundarias (cabeza de flecha).

Figura 5. A, B y C - Hiperplasia interlamelar severa y fusión de las lamelas (flecha roja). (10x. Tinción con H&E).

Figura 6. Desprendimiento del epitelio de la lamela secundaria (flecha roja) además de una hiperplasia interlamelar (flecha negra). (40x. Tinción con H&E).

Figura 7. Dilatación y congestión de la vena central (asterisco). (10x. Tinción con H&E).

Figura 8. A,B y C - Monogéneos presentes causando una hiperplasia severa (flechas rojas), severa pérdida del epitelio lamelar (flecha negra) con infiltración de células eosinófilas y linfocitarias. (10x. Tinción con H&E).

LISTA DE GRAFICOS

Gráfico 1: Esquema de la distribución de los tratamientos prueba *in vitro*

Gráfico 2: Esquema de la distribución de los tratamientos con sus repeticiones pruebas *in vivo*

Gráfico 3: Resultado del tiempo de aplicación de los tratamientos hasta la muerte del parásito. Las letras distintas indican diferencia estadística significativa entre los grupos ($p < 0.05$).

Gráfico 4: Resultados de la eficacia de los diferentes tratamientos, el gráfico muestra una mayor eficacia en el grupo tratado con 0.5ml y 0.8 ml de formol.

RESUMEN

Se determinó la eficacia del uso del cloruro de sodio y formalina como tratamiento para parásitos monogenoideos en *Colossoma macropomum*, mediante ensayos *in vitro* e *in vivo*, así mismo a través de análisis histológico evidenciar las lesiones causadas por estos parásitos. Se utilizaron 99 juveniles de gamitana, provenientes de estanques de tierra, con un peso promedio de 32,6 gr y 13 cm de longitud. Se realizaron ensayos *in vitro* para determinar el tiempo de las concentraciones capaz de detener el movimiento de los parásitos, se colocaron cada arco branquial en placas de Petri con 10 ml de las diferentes soluciones de cloruro de sodio (20gr/L y 30gr/L), formalina (0.5ml/L y 0.8ml/L), siendo la dosis de 30gr/L de sal la que tuvo un menor tiempo 3.23 min. Para los ensayos *in vivo* se realizaron baños terapéuticos de 30 min por tres días, haciendo un total de 9 peces por tratamiento, todos los tratamientos fueron eficaces siendo las dosis con formol de 0,5ml/L y 0.8ml/L las que tuvieron un mayor porcentaje 99.81% y 99.85% de eficacia respectivamente. Se realizó la identificación y cuantificación de los parásitos monogenoideos, identificando a *Anacanthorus spathulatus*, registrando la mayor prevalencia (87.1%). El análisis histopatológico evidenció las lesiones más frecuentes causadas por monogenoideos branquiales: hiperplasia interlamelar en 93.33%, hiperplasia de las lamelas secundarias en un 80%, infiltración de células eosinofílicas y linfocitarias en 86.6%, así como fusión lamelar en 73.33%.

PALABRAS CLAVES: cloruro de sodio; *Colossoma macropomum*; formalina; gamitana; monogenoideos,

ABSTRACT

The efficacy of the use of sodium chloride and formalin as a treatment for monogenoide parasites in *Colossoma macropomum* was determined through in vitro and in vivo tests, as well as through histological analysis to show the lesions caused by these parasites. 99 juvenile gamitana were used, from earthen ponds, with an average weight of 32.6g and 13 cm in length. In vitro tests were carried out to determine the time of the concentrations capable of stopping the movement of the parasites, each branchial arch was placed in Petri dishes with 10ml of the different solutions of sodium chloride (20gr/L and 30gr/L), formalin (0.5ml/L and 0.8ml/L), being the dose of 30gr/L of salt the one that had a shorter time 3.23 min. For the in vivo tests, therapeutic baths of 30 min for three days were carried out, making a total of 9 fish per treatment, all treatments were effective, being the formalin doses of 0.5ml/L and 0.8ml/L the ones that had a highest percentage 99.81% and 99.85% of efficiency respectively. The identification and quantification of the monogenoide parasites was carried out, identifying *Anacanthorus spathulatus*, registering the highest prevalence (87.1%). Histopathological analysis revealed the most frequent lesions caused by branchial monogenoides: interlamellar hyperplasia in 93.33%, hyperplasia of secondary lamellae in 80%, infiltration of eosinophilic and lymphocytic cells in 86.6%, as well as lamellar fusion in 73.33%.

KEYWORDS: sodium chloride; *Colossoma macropomum*; formalin; gamitana; monogenoide

I. INTRODUCCIÓN

La acuicultura surge como alternativa generadora de soluciones para aumentar la oferta de alimento a una creciente población mundial, de esta manera la producción de peces constituye una fuente excelente de proteína animal de elevado valor nutricional (FAO, 2003). Esta es una actividad importante en el desarrollo de la Amazonía peruana, considerada como fuente de nutrición, ingresos y trabajo en el cual se cultivan diversas especies de peces amazónicos, siendo las principales: *Colossoma macropomum* “gamitana”, *Piaractus brachypomus* “paco”, *Prochilodus nigricans* “boquichico”, *Brycon amazonicus* “sábalo cola roja” y *Arapaima gigas* “paiche” (Mendoza, 2011).

Los peces generalmente, tanto en ambientes naturales como en sistemas de cultivo, suelen ser atacados fácilmente por agentes infecciosos, que normalmente no afectan el estado de salud del pez, debido a que presentan un equilibrio entre el parásito, el hospedador y el ambiente en el que se encuentran. Sin embargo, si las condiciones se tornan desfavorables para los peces (cambios drásticos de temperatura, deficiencia de oxígeno, alta densidad, toxicidad en el agua), se rompe este equilibrio debilitando el sistema inmune del pez y el organismo atacante se convierte en un agente patógeno, causando graves daños y ocasionando altas tasas de mortalidad en los sistemas de cultivo. (Vargas *et al.*, 2015).

Dentro de los principales patógenos que atacan a peces de agua dulce, destacan los monogenoideos. Estos ectoparásitos presentes en el cuerpo y branquias de peces marinos y dulceacuícolas, exhiben una alta especificidad de hospedador

(Whittington et al. 2000) y a veces en condiciones de cultivo, las altas cargas parasitarias causan graves problemas en la acuicultura de peces en todo el mundo (Venmathi Maran *et al.* 2014).

Menos del 3% de monogenoideos de peces dulceacuícolas son conocidos, estas estimaciones son consideradas, en su mayoría de evaluaciones recientes de especies de peces neotropicales (Thatcher, 2006). Si bien está descrito que estos parásitos no son nocivos en condiciones naturales, en peces de cultivo pueden presentar cargas elevadas y ocasionar lesiones en branquias como laceración de los filamentos, destrucción del epitelio, bordes branquiales más gruesos y opérculos abiertos con áreas necrosadas, generando anastomosis que obstruyen el intercambio de gases en los capilares, disminuyendo así la función respiratoria que en casos graves llegan a ocasionar muerte por asfixia (Flores-crespo y Flores 2003).

El cloruro de sodio (NaCl) o llamado comercialmente sal, es un producto accesible y de fácil disponibilidad, es seguro para las personas además que no deja restos en la carne de pescado, considerada en muchos países adecuada para la acuicultura (Kubitza 2016). La sal es de bajo costo y esencial en el manejo diario de los peces dulceacuícolas porque ayuda a controlar el estado de estrés, reponer la osmorregulación, prevenir y controlar las enfermedades, mejorar el estado general y la supervivencia de los peces en el transporte, ayuda a aliviar duras condiciones ambientales, entre otros usos y beneficios. Así mismo, en el cultivo de peces, una de las formas de controlar y tratar enfermedades para reducir las pérdidas económicas ha sido la aplicación de productos químicos como la formalina (Andrade-Porto *et al.*, 2017). Más allá de eso, las concentraciones

terapéuticas se utilizan sin tener en cuenta el tiempo de exposición adecuado, la toxicidad, los cambios tisulares y los residuos acumulados en el músculo de los peces tratados (Jung et al., 2001), así como cambios en la homeostasis de los animales expuestos. Por lo tanto, se requieren estudios sobre la eficacia de la formalina para peces de interés comercial, así como sus efectos al tratar peces infectados con parásitos. Por esta razón el siguiente trabajo tiene como objetivo evaluar la eficacia del cloruro de sodio y la formalina como tratamiento contra monogenoideos presentes en la gamitana "*C. macropomum*".

II. ANTECEDENTES

2.1. Gamitana: clasificación taxonómica

Filo:	Chordata
Clase:	Actinopterygii
Orden:	Characiformes
Familia:	Serrasalminidae
Género:	<i>Colossoma</i>
Especie:	<i>Colossoma macropomum</i> CUVIER, 1816

2.2. Descripción Biológica de *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818)

Perteneciente a la familia de los Serrasalminidae, la gamitana cuyo nombre científico es *Colossoma macropomum*, es considerada el segundo pez de escamas más grande después del paiche en la Amazonía (Goulding & Carvalho, 1982). Además es una de las especies de mayor demanda en la acuicultura de peces amazónicos debido a sus excelentes características, entre las cuales destacan un rápido crecimiento, aceptación al alimento balanceado, rusticidad y de fácil manipuleo, y alta aceptabilidad en el mercado (Campos, 2005). *Colossoma macropomum* es comúnmente llamado “gamitana” en Perú, “tambaqui” en Brasil, “cachama negra” en Colombia y “cachama” en Venezuela. (Campos, 2015).

Es característico de esta especie presentar un cuerpo de apariencia romboidal generalmente alto; los peces adultos son exclusivamente frugívoros, comen

mayormente frutas y semillas y los juveniles suelen alimentarse además de zooplancton (Goulding, 1982). Este pez presenta una serie de radios en la aleta anal, la cual es una característica morfológica propia de la especie que ayuda a la diferenciación entre otros carácidos (Goulding, 1982). No puede reproducirse naturalmente en ambientes controlados, requiere de inducción hormonal, produciendo alrededor un millón de ovas en cada fase de desove. Se ha reportado que la gamitana logra alcanzar hasta 100 cm en longitud y 36 kg en peso, así mismo, el tamaño comercial está en longitud entre 25 a 30 cm y en peso en 1 a 5 kg (FONDEPES, 2004). La gamitana llega a los 3 a 5 cm de longitud total durante su fase juvenil y llegando a la madurez sexual con unos 55 cm de longitud, aproximadamente a los 4 años (Campos, 2015).

2.3. La Gamitana en la Acuicultura

La gamitana, es una especie amazónica la cual inicio su cultivo en cautiverio hace tres décadas, cuyos avances obtenidos en su reproducción inducida, para la producción de carne permiten generar posibilidades interesantes de un producto estandarizado y de buena calidad, esta especie es considerada una de la más adecuada para desarrollar la acuicultura en la parte amazónica del Perú lo cual la hace una especie idónea para el desarrollo de la acuicultura en los países latinoamericanos, al igual que otras especies como el Paco y la Tilapia (Sistema nacional de acuicultura, 2022)

Campos (2015), indica que la gamitana es excelente para el desarrollo de la acuicultura en Latinoamérica gracias a sus características, además que su cultivo así como el de otras especies relacionadas, son económica, ecológica y

nutricionalmente beneficiosas para los habitantes de la región amazónica. La elevada calidad de su carne asegura su demanda en el mercado con un precio atractivo (Campos, 2015). Una de las principales ventajas de la comercialización de esta especie amazónica es que presenta un mayor período de conservación en comparación con otras especies de carne blanca. (ONUDI, 2017).

El cultivo de gamitana a nivel nacional, en los periodo 2009-2014 registró una cosecha similar, ya en el 2015 fue donde obtuvo su punto más bajo, indicando una cosecha de 299 t, en el 2016 alcanzó su punto más alto registrando 1 863 t, en los años siguientes ha venido decreciendo y en 2021 se reportó una cosecha de 793 t. (PRODUCE, 2021)

El más alto consumo de este pez se da en los países productores, siendo aquellos que conforman la región amazónica. Como Brasil que tiene como estrategia la introducción del mercado interno para la gamitana, mediante festivales en diferentes ciudades con el objetivo de dar a conocer la especie a nivel nacional y aumentar su consumo como una opción más rentable a otro tipo de especies provenientes de la zona costera (RNIA, 2022). En cuanto al mercado internacional, Brasil es el principal exportador mundial de gamitana, con exportaciones incrementadas en \$ 172,934 durante el primer periodo de 2020. Es la tercera principal especie de acuicultura exportada de Brasil siendo superada solamente por la tilapia y el curimatá. En 2019, las exportaciones de gamitana en Brasil tuvieron como destino a Surinam y la presentación comercializada fue entera congelada, la cual se ofrece en los principales mercados minoristas de este mercado (Sistema nacional de acuicultura, 2022).

En el Perú actualmente se ha incrementado el Programa Nacional a Comer Pescado (PNACP) el cual viene promoviendo la participación de los acuicultores de esta especie amazónica entre otras, en mercados itinerantes y ferias de promoción de productos hidrobiológicos (mi Pescadería PNACP, mercados temporales locales, mercados satélites, otros), para la venta directa al consumidor. En muchos eventos y ferias internacionales dedicadas a la promoción de productos de la acuicultura, como la Seafood Expo North America (Boston, E.E.U.U.) podemos encontrar a la gamitana como parte de la oferta exportable de algunos productores privados (PRODUCE, 2021).

De esta manera el desarrollo e incremento de nuevas acuiculturas de especies como el Paiche, la Gamitana, el Paco así como la Tilapia en la región amazónica está teniendo un notable crecimiento, generando una buena fuente de ingreso para los productores accediendo a los mercados locales, nacionales e internacionales con productos de altísima calidad e inocuidad.

2.4. Sanidad y Patología en la Gamitana

Parte del éxito para generar un cultivo de recursos hidrobiológicos satisfactorio radica en la prevención y control de las enfermedades que podrían presentarse en las diferentes etapas productivas. Estas enfermedades se inician por el desequilibrio entre los 3 factores principales, el Huésped, el ambiente y el agente patógeno, estableciendo de esta forma un costo biológico y sobre todo económico (Tafur et al., 2017).

La Bioseguridad en la acuicultura, representa una variedad de acciones teniendo como objetivo principal reducir el impacto negativo sobre los animales cultivados, preservar al hombre de los riesgos biológicos, imponer medidas contra riesgos químicos y físicos, así como conservar el medio ambiente. Debido a que el eje de la acuicultura son consideradas importantes la sanidad, el medio ambiente y los aspectos ecológicos (Sistema nacional de acuicultura, 2022).

Si mantenemos el equilibrio entre estos tres factores se obtendrán peces saludables durante el cultivo. Los factores manejables por el acuicultor con mayor rigurosidad durante el periodo de cultivo son el ambiente y los peces, puesto que se debe mantener las condiciones óptimas del agua y el manejo de los peces, reduciendo todo el estrés posible en todas las etapas productivas, con una adecuada alimentación, buena manipulación, y aplicando Buenas Prácticas Acuícolas, todo esto es clave para mantener una adecuada condición de cultivo de la gamitana, lo cual reduciría la posibilidad de desarrollarse una enfermedad (Fischer et al, 2003).

2.5. Principales agentes patógenos en Gamitana

Enfermedades bacterianas como la Pseudomoniasis y Aeromoniasis son las más frecuentes ya que estas bacterias son oportunistas, encontrándose de forma natural en los cuerpos de agua (Márques et al., 2016). Son transmitidos por vía cutánea, digestiva o respiratoria, los cuadros clínicos se presentan cuando las condiciones ambientales son desfavorables y los peces tienen un déficit en el sistema inmune,

ocasionando graves lesiones sobre el tejido de los peces, presentando hemorragias, descamación, úlceras y necrosis (Márques et al., 2016).

También podemos encontrar enfermedades causadas por hongos como la Saprolegniasis siendo el más importante de los agentes fúngicos que ataca a los peces de agua dulce, generalmente actúa como un patógeno secundario de peces enfermos o que estén inmunodeprimidos por la presencia de otras infecciones o por desnutrición. Los factores que determinan la aparición y en consecuencia la alta carga fúngica en el agua son la presencia de una gran cantidad de materia orgánica, densidades altas, animales muertos o huevos de peces en descomposición. El signo clínico más importante es la presencia de copos algodonosos en la piel y branquias. Suele estar acompañadas de infecciones bacterianas (Centeno et al., 2004)

Otros agentes infecciosos son los protozoarios causantes de enfermedades como la Ichthyophthiriosis, enfermedad más común en peces de agua dulce, conocida también como la enfermedad de los puntos blancos o Ich. Los peces infectados se frotan contra el fondo u otros objetos, saltan o se mantienen sobre la superficie del agua. Esa conducta es consecuencia de la irritación que produce los trofozoitos maduros al destruir los tejidos cutáneos para salir al exterior y terminar su ciclo de vida. En una infestación masiva se generaran grandes lesiones que puede exponer al animal a infecciones, también a alteraciones en la osmorregulación. (Marques et al., 2016)

Al igual que la Trichodiniasis, afecta la piel de los peces además puede infectar las branquias, los síntomas muestran características típicas de infestación con ectoparásitos, secreción excesiva de mucus en piel y branquias, descamación, enrojecimiento de la zona infectada y oscurecimiento en la piel (Tafur et al., 2017).

Una de las enfermedades más importantes en la piscicultura son las causadas por metazoarios parásitos como los Monogenoideos, los daños que generan en los peces están relacionados con la especie de parásito, lugar de fijación, cantidad de individuos colectados en los peces (Alcantara-Bocanegra et al., 2105). La mayoría de los monogenoideos se alimentan de mucus y células epiteliales, sin embargo, otras especies pueden consumir sangre (Godoi et al., 2012). Si se encuentra en las branquias ocasionan hiperplasia celular, hipersecreción de mucus, fusión de las lamelas. En la piel pueden ocasionar necrosis de las células, descamación y secreción abundante de mucus. En algunos casos, las lesiones ocasionan infecciones secundarias por otros patógenos (Vargas et al. 2015).

Otro ectoparásito que podemos encontrar son los Copépodos, las lesiones que pueden ocasionar en los peces dependen del lugar de fijación. Cuando se encuentran en las branquias generan oclusión parcial o total del vaso sanguíneo de las lamelas, esa acción es realizada por la presión de las garras de los parásitos, provocando reducción de la respiración en las branquias (Alcantara-Bocanegra et al., 2105). Cuando están adheridas a la piel de los peces, dañan el tegumento, perforando los tejidos con sus ganchos de fijación. Esas lesiones pueden ser entrada para otros agentes oportunistas como hongos y bacterias (Campos, 2015).

En la Amazonía, uno de los copépodos más frecuentes en el cultivo de gamitana es *Perulernaea gamitanae*, parasitando branquias y cavidad bucal, causando inflamaciones en el lugar de fijación, en peces altamente infestados, puede llevar a cuadros de apatía y anorexia, logrando la muerte (Arbildo-Ortiz, 2019).

2.6. Monogenoideos: Descripción

La clase Monogenoidea, son generalmente parásitos externos hermafroditas que presentan un ciclo de vida directo. Son helmintos pequeños que rara vez superan los 3 cm de longitud, se encuentran habitualmente en branquias, tegumento, narinas, vías urinarias y rara vez en intestino (Roberts, 2012). La característica distintiva que se utiliza para el reconocimiento e identificación de estos parásitos es el aparato de fijación llamado haptor, observándose de forma plana y está compuesta de partes esclerotizadas como áncoras, barras y ganchos. A excepción de algunas especies, en donde el aparato de fijación puede estar compuesta de ventosas, pinzas o lóbulos en reemplazo de las partes esclerotizadas. Además, estos parásitos suelen tener algún tipo de órgano de unión en la parte anterior, que le permite unirse a tejido huésped mediante secreciones adhesivas, también se pueden observar dos pares de manchas oculares en la parte superior, característica que ha desaparecido en algunas especies (Roberts, 2012; Boeger y Vianna, 2006).

Los monogenoideos presentan un sistema digestivo simple, compuesto por una boca, seguido de una faringe que conecta a un esófago y generalmente solo presenta dos ciegos intestinales. En el aparato reproductor femenino se puede distinguir un ovario, un oviducto, el útero, un receptáculo seminal y una o un par

de vaginas. En la parte masculina se observa uno o más testículos, un conducto deferente, una vesícula seminal y un órgano copulador, el cual se compone de dos partes principalmente: un órgano copulador masculino (OCM) que suele ser muscular como esclerotizado y una pieza accesorio, que está ausente en algunas ocasiones. La característica morfológica de este complejo copulador es de gran importancia para la identificación y clasificación taxonómica de estos parásitos (Boeger y Vianna, 2006).

2.7. Monogenoideos en *Collossoma macropomum*

Boeger y Vianna (2006) mencionan que los monogenoideos son tal vez la clase de parásitos más presentes en peces de la Amazonia (Boeger y Brianna, 2006). Estos ectoparásitos, en su mayoría son altamente específicos en peces estrechamente relacionados y la diversidad por especie hospedadora parece ser sumamente variable (Fischer et al, 2003). Se considera que aproximadamente solo el 3% de estos parásitos en peces dulceacuícolas se han identificado, estos cálculos se han considerado generalmente de evaluaciones actuales de muchas especies neotropicales de peces (Boeger y Vianna, 2006), y se considera que esta cantidad determinada de monogenoideos podría incrementarse, y tener grandes variaciones determinadas por la ubicación geográfica y la especificidad del parásito (Boeger y Kritsky, 1988), esto tiene similitud con lo indicado por Šimková *et al.* (2006), sobre la especificidad de estos parásitos podría ser debido a la coevolución con sus huéspedes. Thatcher (2006) menciona que, entre los peces, los serrasalmidos presentan una mayor variedad de especies de monogenoideos.

Entre las especies de monogenoideos, se ha reportado que la gamitana ha sido parasitada por *Notozothecium janauachensis* (Cohen y Kohn, 2009; Godoi *et al.*, 2012), *Notozothecium euzeti* (Cohen y Kohn, 2009), *Anacanthorus spathulatus* (Varella *et al.*, 2003; Tavares-Dias *et al.*, 2006; Morais *et al.*, 2009; Godoi *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2013), *Linguadactyloides brinkmanni* (Ceccarelli *et al.*, 1990; Varella *et al.*, 2003; Morais *et al.*, 2009; Godoi *et al.*, 2012), *Mymarothecium boegeri* (Cohen y Kohn, 2005; Cohen y Kohn, 2009; Morais *et al.*, 2009; Godoi *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2013), *Mymarothecium iiapensis* (Murrieta *et al.*, 2019) y *Anacanthorus penilabiatus* (Pamplona- Basilio *et al.*, 2001).

Sin embargo, *L. brinkmanni* (Thatcher, 2006) y *A. spathulatus* (Morais *et al.*, 2009; Godoi *et al.*, 2012) se consideran las más patógenas para este hospedador debido a que se alimentan de sangre. Como lo indicado por Aragort *et al.* (2002), quienes determinaron la asociación entre las helmintosis por monogenoideos y cuadros patológicos, los resultados indicaron la presencia de una infestación mixta (*Anacanthorus spatulatus* + *Linguadactyloides brinkmanni*) y se observó un descenso significativo de los valores de hematocrito e hiperplasia severa de lamelas y filamentos branquiales, lo cual está asociado con la presencia de *L. brinkmanni* (Aragort *et al.*, 2002)

Posteriormente un estudio realizado por Alcántara *et al.* (2015), mostró la fauna parasitaria presente en alevinos de *P. brachypomus* paco y *C. macropomum* gamitana, logrando identificar monogenoideos de ambas familias. En el cual, la gamitana demostró una mayor prevalencia, intensidad e índice de infestación. De igual manera, Vargas *et al.* (2015), identifico monogenoideos pertenecientes a la

familia Dactylogyridae, además de la frecuencia y prevalencia de estos en branquias de *C. macropomum*. Así mismo, realizaron análisis histopatológicos, observando dentro de las lesiones hiperplasia del epitelio branquial, fusión de las lamelas y atrofia lamelar. En la actualidad, se vienen realizando nuevos estudios que nos permiten conocer la variedad de monogenoideos presentes en peces amazónicos, así como el estudio realizado por Cayulla-Quispe *et al.* (2021), en el cual registró una nueva especie de monogenoideo en *C. macropomum*, *Mymarothecium tantaliani n. sp*, la cual es la tercera especie del género descrita en *C. macropomum*. Estas nuevas especies se han caracterizado por un OCM ligeramente sigmoide y la pieza accesoria con varilla distal sinuosa con proceso en forma de gancho y una bifurcación en la parte media. Además, la proyección anteromedial de la varilla ventral tiene un pequeño filamento visible en ambos anclajes. Con la descripción de esta nueva especie, se han registrado ocho especies de *Mymarothecium* en peces Serrasalmidos originarios en la Amazonía.

2.8. Tratamiento contra parásitos monogenoideos en *Colossoma macropomum*

Para el control y tratamiento de parásitos como los monogenoideos en *Colossoma macropomum* se han empleado diferentes agentes químicas como el paraziquantel, sulfato de cobre (CuSO₄), levamisol, eugenol, mebendazol y lavimasol. Sin embargo, el tiempo de exposición y la forma de aplicación del tratamiento es variable, y las diferentes especies de peces suelen tener un grado de tolerancia distinta a los agentes químicos, así como los monogenoideos (Schalch *et al.*, 2009). La aplicación de estos tratamientos suelen ser mediante

baños terapéuticos (inmersión, corta duración, larga duración), administración en el alimento y aplicación de inyecciones (Tavares et al, 2014).

Tabla 1. Tratamientos contra monogenoideos branquiales en *Colossoma macropomum*

Agente químico	Tratamiento				Referencia
	Administración	Dosis	Tiempo de exposición	Eficacia	
Paranzigantel	Baño	12.5 mg/L	24h	61.8%	Maciel, 2009
Sulfato de cobre	Baño	4.37 mg/L	48h	99.3%	Tavares-Días et al., 2011
Levamisol	Baño	125 mg/L	24h	88.2%	Alvez et al., 2018
Eugenol	Baño	10 mg/L	60 min	81%	Miranda et al., 2009
Mebendazol	Baño	10 mg/L	24h	81.3%	Martins et al., 2001
Lavimasol	Alimento	1200 mg/ Kg	10 días	84.1%	Nogueira et al., 2009

También se han probado métodos terapéuticos alternativos para eliminar monogenoides en *Colossoma macropomum*, como el uso de la fitoterapia. Vargas (2022), realizó un estudio empleando extracto de *Allium sativum* (ajo) reduciendo notablemente los monogenoideos en Gamitana con una eficacia de 97.11% en baños terapéuticos con una concentración de 30ml/L.

Barriga et al. (2020), utilizo el aceite esencial de *Lippia grata* en baños de 30 minutos obteniendo una eficacia del 95.1% contra los Monogenoideos. De igual manera Valentín (2020), evaluó la actividad antiparasitaria in vitro de nanoemulsiones conteniendo aceite de resina de *Copaifera officinalis* y aceite esencial de *Pterodon emarginatus* contra monogenoideos en branquias de *Colossoma macropomum*, obteniendo una eficacia del 100% contra *Anacanthorus spathulatus*, *Notozothecium janauachensis* e *Mymarothecium boegeri* después de 15 minutos de exposición.

De lima et al, (2016) empleó el aceite esencial de *Ocimum gratissimum* para evaluar su actividad antihelmíntica, obteniendo una eficacia del 100% con 15 mg/L de concentración durante 15 minutos. Así mismo Andrade et al, (2016) evaluó el uso de baños terapéuticos con extracto acetónico de semillas de *Bixa orellana*, El extracto mostró 100% de eficacia en todas las concentraciones y tiempos de baño evaluados.

2.9. Aplicación del Cloruro de sodio (NaCl) en la acuicultura

Las sustancias químicas se utilizan comúnmente en la acuicultura para prevenir y tratar muchas enfermedades infecciosas que atacan a los peces. Aunque estas sustancias están ampliamente disponibles, su uso generalmente produce problemas debido a la falta de conciencia de sus niveles de toxicidad, así como el desarrollo de resistencia a diferentes patógenos (King y Farrell, 2002). Además, muchas de estas sustancias no están autorizadas para su uso en peces, debido a la variación de la tolerancia química entre especies de peces. Por lo tanto, la

sensibilidad relativa de una especie debe determinarse antes de cualquier tratamiento con productos químicos (King y Farrell, 2002).

El cloruro de sodio (NaCl) o la sal es uno de los químicos comúnmente utilizado en acuicultura para el control de parásitos en piel y branquias, hongos (Schreier et al., 1996) y bacterias (Noga, 2000; Roberts, 2001; Plante et al., 2002), a través del aumento en la producción de moco y deshidratación de patógenos. Al mismo tiempo, NaCl mantiene el equilibrio del gradiente osmótico reduciendo la difusión de iones en el agua y reduciendo el estrés durante el transporte (Carneiro y Urbinati, 2001). Además, mantiene la homeostasis corporal (De Carvalho et al., 2002; King y Farrell, 2002) y mejora la supervivencia de los peces (Tsuzuki *et al.*, 2001).

La exposición de parásitos de agua dulce a condiciones salinas afectan la osmoregulación resultando en una deshidratación del parásito. Generalmente los parásitos que presentan estadios inmaduros de vida libre son más susceptibles a problemas de osmoregulación comparados a sus hospederos. Baños terapéuticos de sal empleando altas concentraciones durante un corto periodo de exposición actúan agresivamente contra parásitos y son más efectivos que tratamientos de mayor duración (Shephard, 1994).

Varios estudios han evaluado los efectos de la sal en el crecimiento (Buckel *et al.*, 1995; Likongwe *et al.*, 1996; Deacon y Hecht, 1999), sobre el comportamiento (Brown *et al.*, 2001) y sobre la supervivencia (Deacon y Hecht, 1999; Tsuzuki *et al.*, 2001). Adicionalmente, se han realizado estudios de la toxicidad del uso de NaCl en peces como lo describen Velasco-Santamaría et al. (2007), quienes

evaluaron la toxicidad del cloruro de sodio (NaCl), en juveniles y adultos de *Metynnis orinocensis* durante 96 h, estudio en el cual describen que la congestión lamelar, la hiperplasia y la fusión fueron las alteraciones microscópicas comunes a concentraciones más altas. Estos resultados sugieren que la sal a concentraciones inferiores a 5g/L son seguras para las prácticas preventivas y terapéuticas en *Metynnis orinocensis*; mientras que la exposición prolongada mayor de 10g/L es perjudicial en esta especie.

De igual manera Murrieta et al. (2019) realizaron un estudio en el cual probaron la efectividad de la sal como tratamiento contra el parásito monogenoideo *Dawestrema cycloancistrum* en paiches, en baños de 30 min, teniendo como resultado que la concentración de 30 g/L mostró ser el más efectivo contra la infestación de este parásito.

Así mismo Vargas *et al.* (2003), describe en su estudio que el tratamiento con 3% de sal en baños terapéuticos durante 10 min es eficaz contra parásitos monogenoideos de las especies *Gyrodactylus* pero es menos eficiente contra especies de *Dactylogyrus*.

2.10. Aplicación de la Formalina en la acuicultura

La Formalina (gas formaldehído acuoso al 40%), que reemplazó al verde malaquita en el tratamiento de enfermedades parasitarias, se ha destacado por su eficacia antiparasitaria (Martins 2004). También proporciona otras ventajas, como la fácil metabolización por los organismos y bajo potencial de bioacumulación (Picón Camacho *et al.* 2012). El principal inconveniente de la formalina es su alta toxicidad para los peces. Si los peces están expuestos a altas concentraciones por

un tiempo prolongado, la sobredosis de formalina afecta la morfología macroscópica e histológica del epitelio branquial y como consecuencia los procesos que ocurren en estas estructuras (Godoy 2015). Sin embargo, el tiempo de recuperación es relativamente corto cuando se aplica correctamente, incluso en peces pequeños (Schmahl 1991).

Andrade-Porto et al. (2017) evaluó la efectividad antiparasitaria de la formalina, así como su acción residual en la carne del pescado, el residuo de formalina en el músculo *A. gigas*, en este estudio, después de 96 h de recuperación fue bajo, sin presentar riesgo de intoxicación para los consumidores en las concentraciones probadas.

Xu y Rogers (1993) demostraron que en *Morone saxatilis* expuesto a 25 y 250 mg/L de formalina durante 1 h y 24 h respectivamente, ya no se detectó formalina en el músculo del pescado después del cuarto día de exposición.

Así mismo se ha considerado a la formalina como bactericida por su capacidad de penetrar dentro de las esporas bacterianas. La interacción de la formalina con las proteínas bacterianas se da a partir de la combinación con la amida primaria, así como también con los grupos aminos. Es complicado determinar con seguridad los mecanismos responsables para la inactivación microbiana inducida por la formalina, aunque sus propiedades interactivas y de unión cruzada con macromoléculas desempeñan un rol importante en su actividad (McDonnell y Russell, 1999).

El formaldehído es un biocida extremadamente reactivo que interacciona con proteínas, DNA y RNA interrumpiendo las funciones celulares. Concentraciones

altas producen precipitación de proteínas generando la muerte celular. Actúa también como un agente mutagénico y como un agente alquilante por reacción con grupos carboxilo, sulfhidrilo e hidroxilo (Morales-Serna et al, 2018).

De igual manera, la formalina posee un efecto antimicótico, empleándose para controlar la presencia de hongos generalmente de la familia Saprolegniaceae (FDA, 1989). La formalina es particularmente aplicada contra protozoos entre ellos se puede mencionar el *Ichthyobodo sp.* *Trichodina sp.* así como *Chilodonella sp.* y Monogeneos de las familias Dactylogyridae y Gyrodactylidae, parásitos del cuerpo superficie y de las branquias de los peces (Scott 1993).

El uso de formalina está indicado en algunos protocolos en forma de baños cortos hasta 1 h, en concentraciones que varían entre 150 y 250 mg/L o en baños de larga duración de 24 h en concentraciones que oscilan entre 10 y 15 mg/L (Thoney y Hargis 1991; Martins 2004). La resistencia de los peces a los productos químicos puede variar dependiendo de algunos factores, en donde se incluyen la especie, edad y condiciones de cultivo (Dolezelova et al. 2009).

Por tanto, el tratamiento con formalina se ha investigado para uso en piscifactorías comerciales, analizando su eficacia, toxicidad y qué dosis son seguras para las especies de peces. Sin embargo, hay escasa información sobre el efecto directo de este producto en el parásito y en las concentraciones que son realmente eficaces y seguras para los peces.

Recientemente un estudio realizado por Andrade-Porto et al. (2017) en donde evaluaron el efecto antiparasitario *in vitro* e *in vivo* de la formalina contra *Dawestrema cycloancistrum*, las concentraciones de 660 y 880 mg/L de

formalina tuvieron una mortalidad del 100% de este parásito después de 1h de exposición en las pruebas *in vitro*. En cuanto al ensayo *in vivo*, los baños de 1 h con 440 y 550 mg/L, la formalina mostró una eficacia del 93,3% y 99,3%, respectivamente.

De igual manera Pahor-Filho et al. (2012) estudio la eficacia de la forma lima mediante baños profilácticos de 1h en los cuales todos los parásitos fueron eliminados en concentraciones de formalina entre 135 y 540 mg/L.

Así mismo Paixao et al. (2013) evaluó la eficacia de la formalina contra monogenoideos en juveniles de *Hemigrammus sp.*, siendo 0.025mg/L a dosis con una exposición de 24h por 3 días el cual tuvo mejores resultados con una eficacia del 77,7% y una disminución significativa de los índices parasitológicos.

III. HIPÓTESIS

El uso de la sal y formalina serán eficaces para reducir la cantidad de monogenoideos presentes en las branquias de *C. macropomum*.

IV. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Evaluar la eficacia del cloruro de sodio y formalina como tratamiento en *Colossoma macropomum* infestados con monogenoideos branquiales.

4.2. Objetivos específicos

- Determinar el tiempo en qué los monogenoideos mueren a través de la acción de cloruro de sodio (20gr/L y 30gr/L) y formalina (0.5ml/L y 0.8ml/L) mediante pruebas *in vitro* contra monogenoideos presentes en *C. macropomum* “gamitana”.
- Determinar la eficacia de cloruro de sodio (20gr/L y 30gr/L), y formalina (0.5ml/L y 0.8ml/L) como tratamientos en pruebas *in vivo* contra los monogenoideos presentes en *C. macropomum* “gamitana”.
- Realizar la identificación de monogenoideos que parasitan branquias de *C. macropomum* “gamitana”.
- Determinar los índices parasitarios de los monogenoideos presentes en las branquias de *C. macropomum* “gamitana antes y después de la aplicación de los tratamientos.
- Describir las lesiones histopatológicas a nivel branquial en *C. macropomum* “gamitana” asociadas a la presencia de monogenoideos.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Lugar de Estudio

Los ensayos experimentales y el estudio parasitológico se realizaron en el Instituto de Investigación de la Amazonía Peruana (IIAP), dentro del centro de investigación Fernando Alcántara Bocanegra (CIFAB), ubicado alrededor del km 4.5 de la carretera Iquitos-Nauta en la ciudad de Iquitos.

5.1.1. Descripción del área de estudio

Los peces fueron adquiridos de un estanque piscícola del IIAP, destinados al crecimiento de juveniles de *C. Macropomum*, estos peces fueron trasladados al inicio de la investigación al laboratorio de peces ornamentales del IIAP, en donde tuvieron un periodo de aislamiento y aclimatación de 7 días, para ello fueron colocados en tanques con capacidad de 250 L. Previo a la experimentación se analizaron cinco peces, antes y después del periodo de aclimatación para verificar si se había incrementado la carga parasitaria. El área de estudio contó con entrada de luz natural y reservorios de agua, con una temperatura ambiental variable que va de los 24°C a los 30°C debido a las frecuentes lluvias presentes todo el año. El agua contenida en los tanques mantiene una temperatura promedio de 27°C, pH de 7.5, los cuales se midieron diariamente y oxigenación constante mediante aireadores. Se alimentó a los peces diariamente dos veces con alimento vivo, larvas de quironómidos, los cuales son cultivados en el Laboratorio de elaboración de alimento vivo del IIAP.

5.2. Población Objetivo

La población estuvo conformada por juveniles de gamitana “*Colossoma macropomum*” procedentes del Instituto de Investigación de la Amazonía Peruana (IIAP), carretera Iquitos-Nauta km 4.5, de la ciudad de Iquitos. Para el estudio se seleccionaron ejemplares de *C. macropomum* aleatoriamente, procedentes de estanques de cultivo.

5.2.1. Tamaño de muestral

Se realizó un muestreo no probabilístico por conveniencia, se utilizaron un total de 99 peces para la investigación, 12 peces para las pruebas in vitro, 72 peces para las pruebas in vivo y 15 peces para el análisis histopatológico.

5.2.1. Criterios de inclusión

Peces juveniles mayores de 10 cm de longitud pero menores de 20 cm, que presentaban reflejos de fuga y aparentes signos de buena salud como, aletas enteras, coloración vivaz y branquias rojizas.

5.3. Agente químico

Ambos productos utilizados en los ensayos experimentales fueron proporcionados por el IIAP, se usó sal (cloruro de sodio) de pesca de forma granulada de uso común en acuicultura y formalina líquida solución al 40%. Tanto la sal (20gr/L y 30gr/L), como la formalina (0.5ml/L y 0.8ml/L) fueron diluidas en las peceras (10L) antes de colocar a los peces para la

experimentación; las dosis establecidas para su utilización en el presente estudio se indica en la tabla 2.

Tabla 2. Dosificación de la sal y formalina a utilizar en los ensayos.

Agente químico	Dosis	Baño	Duración de tratamiento	Número de peces
Control	-	-	-	9
NaCl	20 gr/L	30 min	3 días	9
	30 gr/L	30 min	3 días	9
Formalina	0.5ml/L	30 min	3 días	9
	0.8ml/L	30 min	3 días	9

5.4. Evaluación de la efectividad del cloruro de sodio y formalina

Para la evaluación de la efectividad de los agentes químicos empleados en este estudio como tratamiento para peces infectados por monogenoideos, se realizaron ensayos tanto *in vivo* como *in vitro*. Se realizó el ensayo *in vitro* para determinar el tiempo necesario para detener el movimiento de los parásitos, para cada una de las concentraciones. Posteriormente se llevaron a cabo experimentos *in vivo* para determinar que dosis resultaba más efectiva para su uso como posible tratamiento en peces. Tanto la sal como la formalina fueron aplicadas por separado, un primer grupo con NaCl que contó con dos tratamientos (T1: 20 gr/L y T2: 30gr/L), y otro

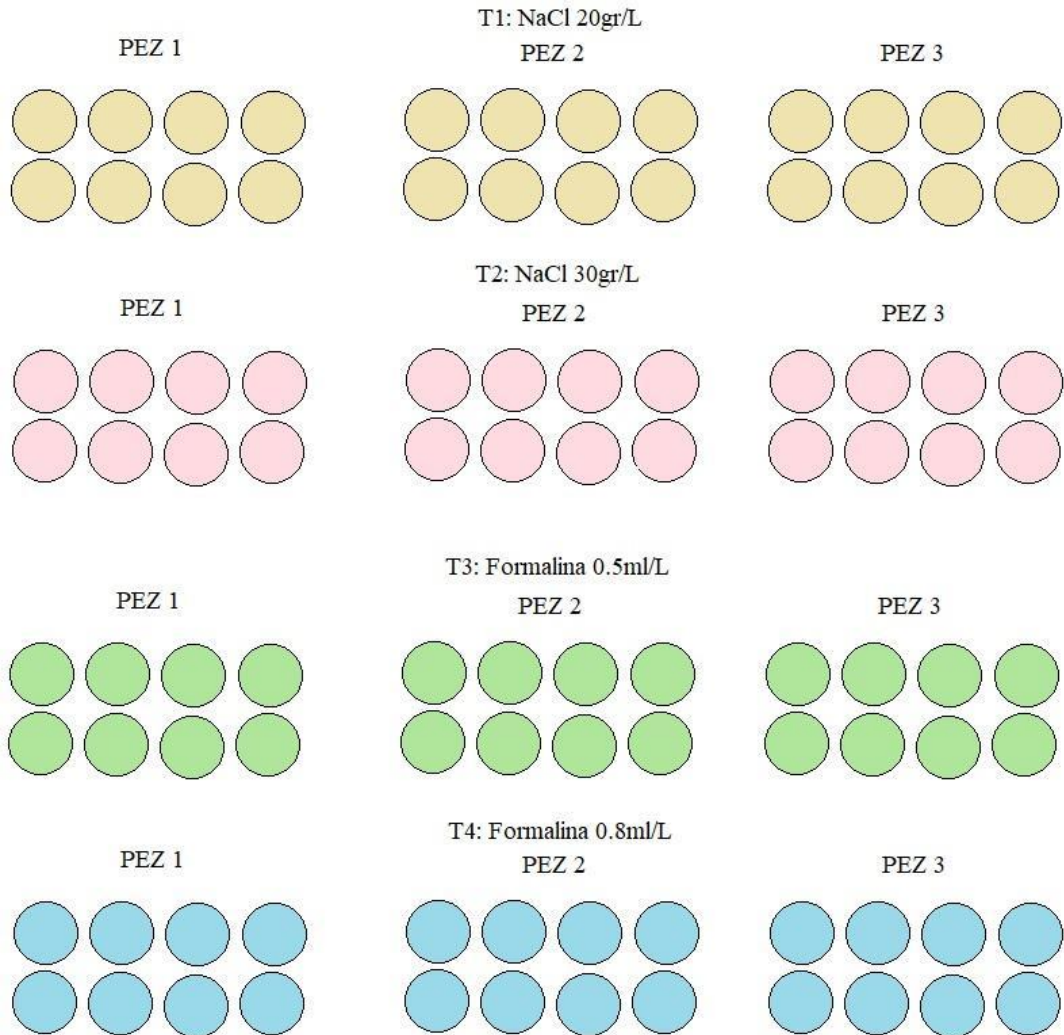
grupo con la formalina (T1: 0.5ml/L y T2: 0.8ml/L) cada uno con un grupo control.

5.4.1. Ensayo *in vitro* del NaCl y formalina contra los parásitos

Para este ensayo se utilizaron 96 arcos branquiales, haciendo un total de 24 arcos branquiales por tratamiento (Gráfico 1). Los peces fueron anestesiados con metasulfonato de tricaina 100 mg/L (Velasco *et al.* 2008), seguidamente fueron sacrificados mediante punción cefálica para extraer las branquias y colocar cada arco branquial en placas de Petri.

Para el ensayo de inmovilización se agregó a cada placa 10 ml de las diferentes soluciones de NaCl (T1: 20 gr/L y T2: 30gr/L), formalina (T1: 0.5ml/L y T2: 0.8ml/L) por separado, luego se colocaron los arcos branquiales extraídos en las placas y se mantuvieron en observación constante verificando el tiempo utilizando un estereoscopio. Los parásitos eran estimulados con un estilete y se consideraron muertos cuando se detectó la ausencia de movimiento, y la observación de las características típicas de la mortalidad por monogenoideos, como arrugas corporales (Reimschuessel *et al.* 2011). Se tomó el tiempo de cada parásito por arco branquial para luego sacar el promedio.

Gráfico 1: Esquema de la distribución de los tratamientos prueba *in vitro*.



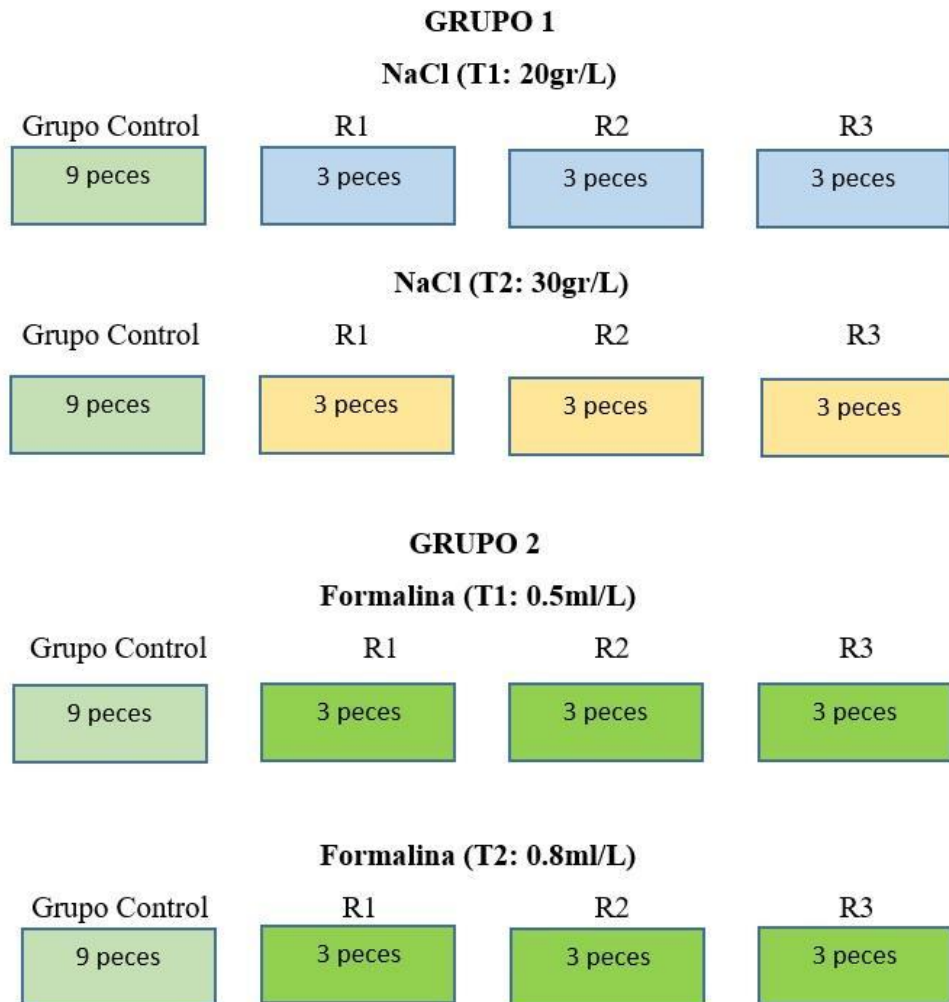
5.4.2. Ensayo *in vivo* de la efectividad del NaCl y Formalina

Para analizar el efecto de la exposición de los agentes químicos se realizarán baños terapéuticos de 30 min por tres días, cada tratamiento contó con tres repeticiones cada uno, haciendo un total de 9 peces por tratamiento. Cada tratamiento contó con un grupo inicial o control (Gráfico 2), el cuál no se le aplicó ninguna dosis de los tratamientos y sirvió para contabilizar los parásitos y comparar con los grupos tratados. Para evaluar la efectividad de los tratamientos, los peces fueron colocados en peceras con capacidad de 10L de agua, en donde previamente se disolvió por separado la dosis determinada del químico a utilizado para cada grupo, NaCl (T1: 20 gr/L y T2: 30gr/L), formalina (T1: 0.5ml/L y T2: 0.8ml/L), una vez transcurrido el tiempo se colocaron los peces en su respectiva unidad experimental con agua limpia. Después de finalizar los tres días de tratamiento los peces fueron sacrificados para la extracción de las branquias, las cuales fueron fijadas y examinadas con estereoscopio para el análisis parasitológico e identificación de los parásitos monogénicos.

El porcentaje de la eficacia se determinó mediante la fórmula a continuación (Onaka et al. 2003):

$$\% \text{ Eficacia} = \frac{\text{Número promedio de parásitos del grupo control} - \text{Número promedio de parásitos del grupo tratado}}{\text{Número promedio de parásitos de grupo control}} \times 100$$

Gráfico 2: Esquema de la distribución de los tratamientos con sus repeticiones de las pruebas *in vivo*.



5.5. Análisis parasitológico

5.5.1. Fijación y conservación de parásitos

Después de los ensayos *in vivo*, las branquias extraídas se colocaron en envases de plástico a los cuales se adiciono agua caliente (65-70°C) agitando el envase por unos segundos para lograr que los monogenoideos mueran con el cuerpo extendido, con la finalidad de poder observar las estructuras esclerotizadas para su identificación, seguidamente se añadió a los envases formalina 4% o alcohol 96° (Murrieta, 2019), para la conservación de estos parásitos, realizándose posteriormente la cuantificación e identificación en el microscopio.

5.5.2. Montaje e identificación

Los monogenoideos se colocaron entre porta y cubreobjetos con solución Hoyer para su clarificación y observación de las estructuras esclerotizadas tales como barras, áncoras, ganchos y complejo copulador, así como para su identificación en la cual se utilizaron clave taxonómica para monogenoideos neotropicales dulceacuícolas descrita por Cohen et al. (2013).

5.5.3. Índices Parasitarios

La cuantificación de los índices parasitarios se expresó según lo descrito por Bush et al. (1997):

Prevalencia (%)	NP= cantidad de individuos infectados por una determinada especie de parásito NE= cantidad total de individuos examinados	$P = \frac{NP}{NE} \times 100$
Intensidad media	Nsp1= cantidad total de parásitos de una determinada especie NPsp1= cantidad de individuos infectados por una misma especie de parásito	$IMI = \frac{Nsp1}{NPsp1}$
Abundancia media	NTP= cantidad total de parásitos de una determinada especie NPE= cantidad total de individuos examinados de una muestra	$AM = \frac{NTP}{NPE}$

5.6. Análisis histopatológico

Para este análisis se utilizaron 15 peces del total de la muestra que no fueron sometidos a ninguno de los tratamientos que se realizaron anteriormente.

5.6.1. Fijación y Procesamiento de muestras

Las muestras fueron fijadas al 10% de formalina y neutralizada con carbonato de calcio, colocadas en envases de plástico correctamente embalados para su traslado al Laboratorio de Parasitología Animal de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, en donde fueron procesadas

siguiendo el protocolo convencional como se describe en el Anexo 2, en primer lugar, se deshidrataron las muestras en una serie de concentraciones crecientes de alcoholes, seguidamente fueron incluidas en parafina, clarificadas y seccionadas en 3 micras. Finalmente se colorearon con la tinción de Hematoxilina y Eosina. Las láminas se observaron usando un Microscopio Diferencial de Contraste de Fases.

5.6.2. Evaluación de lesiones Histopatológicas

El objetivo de la evaluación histopatológica fue describir las lesiones presentes en las branquias causadas por la presencia de monogenoideos, las cuales pueden llegar a afectar el estado de salud de los peces. Las observaciones de las alteraciones histológicas se clasificaron en trastornos inflamatorios, de circulación, del crecimiento y degenerativos descritos por Reimschuessel *et al.* (1992), especificados en el siguiente cuadro:

Cuadro1. Clasificación de las alteraciones histológicas

Alteraciones	Tipos de lesiones
Inflamatorios	Infiltración de células eosinofílicas y linfocitarias
Del crecimiento	Hiperplasia del epitelio interlamelar
	Hiperplasia de las lamelas secundarias.
	Fusión lamelar
Circulatorio	Congestión en la base de las lamelas
	Congestión de la vena central
	Dilatación de la vena central
	Dilatación del seno venoso
Degenerativos	Desprendimiento del epitelio lamelar
	Telangiectasia

El grado de afección fue clasificadas de acuerdo a su extensión descrito en el siguiente cuadro:

Cuadro 2: Clasificación del grado de afección de las lesiones histológicas

Escasa	De 0% hasta los 25%
Leve	Por encima del 25% hasta el 50%
Moderada	Por encima del 50% hasta el 75%
Severa	Por encima del 75% hasta el 100%

5.7. Análisis de datos

La cantidad de parásitos por cada tratamiento luego de finalizada la fase experimental fue utilizada para determinar posibles diferencias significativas entre los tratamientos utilizados. Para ello, se utilizó en Análisis de Varianza ANOVA, el cual fue calculado utilizando el programa estadístico Bio Estat 5.0.

5.8. Consideraciones éticas

El presente trabajo de investigación fue revisado y aprobado por el Comité Institucional de Ética para el uso de animales (CIEA) - UPCH, con código 205315, continuando su realización respetando las consideraciones éticas que establece.

5.9. Limitaciones

La principal limitante para realizar esta investigación fue la accesibilidad a la cantidad de peces a disposición para la ejecución del proyecto, sin embargo se obtuvieron resultados positivos a pesar de no ser un extenso tamaño muestral, no obstante los resultados aún podrían ser ampliamente aplicables ya que ayudaría al tratamiento específico contra monogenoideos branquiales.

VI. RESULTADOS:

6.1. Índices parasitarios

De un total de 62 individuos de gamitana examinadas, 54 se encontraron parasitadas con monogenoideos en branquias, haciendo un total de 12068 monogenoideos, siendo el tratamiento con 30gr de sal el que tuvo una mayor prevalencia (P %) de 88.9%, con una intensidad media (IM) de 123.5 parásitos/pez y abundancia media (AM) de 109.8 parásito/pez (Tabla 4). Se identificaron tres especies de monogenoideos, *Anacanthorus spathulatus*, *Anacanthorus penilabiatus* y *Notozothecium janauachensis*, de las cuales *A. spathulatus* fue el que tuvo una mayor prevalencia P(%) de 87.1% en comparación de las otras dos especies identificadas. (Tabla 5)

Tabla 3. Índices parasitarios registrados por cada tratamiento

TRATAMIENTOS	TOTAL DE PARÁSITOS	P (%)	IM	AM
Control	117	100	29.3	29.3
20 gr sal	82	77.8	11.7	9.1
Control	3039	100	337.7	337.7
30gr sal	988	88.9	123.5	109.8
Control	4844	100	538.2	538.2
0.5ml formol	9	66.7	1.5	1
Control	2987	100	331.9	331.9
0.8ml formol	2	50	1	0.5

Prevalencia (P%); Intensidad media (IM); Abundancia media (AM).

Tabla 4. Índices parasitarios de monogenoideos registrados en *C.*

macropomum

MONOGENEA	Npi	P (%)	IM	AM
<i>Anacanthorus spathulatus</i>	54	87.1	7.9	6.87
<i>Anacanthorus penilabiatus</i>	13	21.0	1.2	0.24
<i>Notozothecium janauachensis</i>	4	6.5	1	0.06

Número de peces infectados (Npi); Prevalencia (P%); Intensidad media (IM); Abundancia media (AM).

6.2. Pruebas *in vitro* del Cloruro de sodio y formalina contra los parásitos

Se observó cada arco branquial mediante un microscopio y se tomó el tiempo en el momento en el que todos los Monogenoideos ya no registraban movimiento. Una vez obtenido los resultados del tiempo de inactivación de los parásitos de cada tratamiento (Tabla 5), se aplicó la prueba estadística ANOVA, presentando una diferencia significativa entre los grupos ($p < 0.05$) (Tabla 6).

Tabla 5. Tiempo de muerte de los parásitos por tratamiento

Agente químico	Dosis	Tiempo (minutos)			Promedio
		pez 1	pez 2	pez 3	
Sal	20gr/L	4.82	4.43	5.93	5.06
	30gr/L	3.02	3.08	3.58	3.23
Formol	0.5ml/L	9.25	13.18	7.89	10.11
	0.8ml/L	8.31	5.64	6.63	6.86

Tabla 6: Análisis estadístico de la prueba *in vitro* de los diferentes tratamientos

TRATAMIENTO	PROMEDIO	F	P
S	TIEMPO		
Control	6h		
20gr SAL	5.08 min	10.2446	0.004091
30gr SAL	3.23min		
0.5 ml FORMOL	10.11min		
0.8 ml FORMOL	6.86min		

Al aplicarse la prueba post hoc de Tukey (Tabla 7), se determinó que el tratamiento con 0.5 deml de formol tuvo una diferencia significativa sobre los otros grupos, el cual indica un mayor tiempo en el que el parásito consigue la muerte.

Tabla 7: Análisis prueba de tukey en los diferentes tratamientos

Grupos	p valor	
T1-T2	0.5263	p>0.05
T1-T3	0.01913	p<0.05
T1-T4	0.5374	p>0.05
T2-T3	0.003191	p<0.05
T2-T4	0.08775	p>0.05
T3-T4	0.1334	p>0.05

T1=20gr sal, T2=30gr sal, T3=0.5ml formol, T4=0.8ml formol

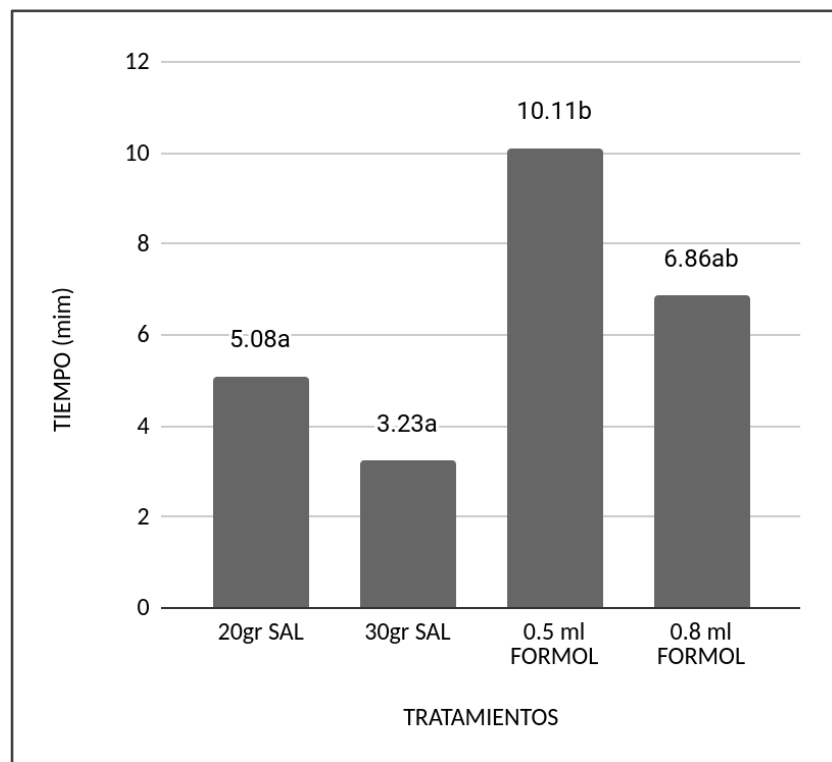


Gráfico 3: Resultado del tiempo de aplicación de los tratamientos hasta la muerte del parásito. Las letras distintas muestran diferencia estadística significativa entre los grupos ($p<0.05$).

6.3. Pruebas *in vivo* del NaCl y formalina contra los parásitos

Se determinó que los tratamientos con formalina 0.5ml y 0.8ml, tuvieron un mayor porcentaje de eficacia 99.81% y 99.85% respectivamente. Asimismo, el ANOVA permitió demostrar que existe una diferencia significativa entre cada uno de los tratamientos y su grupo control, con lo cual podemos afirmar que hubo una reducción de la cantidad de parásitos de los grupos con tratamiento en comparación a los grupos control.

Tabla 8: Análisis estadístico de la prueba *in vivo* de los diferentes tratamientos

TRATAMIENTO	DOSIFICACIÓN	CANTIDAD DE PARÁSITOS	EFICACIA %
NaCl			
control	0	29.25+3.79a	0
T1	20gr	9.11+3.76b	29.91
control	0	337.66+39.30a	0
T2	30gr	123.5+10.86b	63.43
Formalina			
control	0	538.22+49.27a	0
T1	0.5ml	1+0.33b	99.81
control	0	331.89+53.76a	0
T2	0.8ml	0.5+0.29b	99.85
Las letras distintas muestran diferencia estadística significativa entre las muestras (p<0.05)			
20gr sal (p=0.008)			
30gr sal (p=0.0001)			
0.5ml formol (p<0001)			
0.8ml formol (p=0.002)			

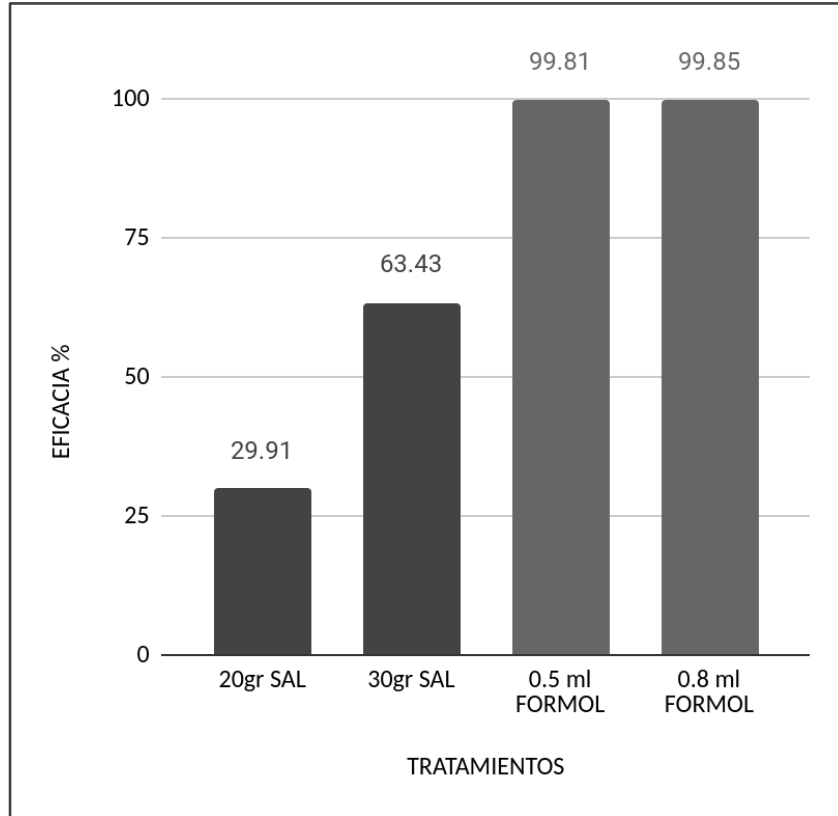


Gráfico 4: Resultados de la eficacia de los diferentes tratamientos, el gráfico muestra una mayor eficacia en el grupo tratado con 0.5ml y 0.8 ml de formol.

6.4. Identificación de monogenoideos

La identificación de los monogenoideos se realizó mediante un microscopio de contraste de fases, permitiendo la observación de las estructuras esclerotizadas presentes en cada especie, las cuales fueron fundamentales para lograr su identificación. Se alcanzó a identificar tres especies de monogenoideos branquiales de *C. macropomum* las cuales se describen a continuación.

6.4.1. *Anacanthorus spathulatus* (Kritsky, Thatcher & Kayton, 1979)

Las estructuras observadas fueron propias de esta parasito. Con cuerpo fusiforme, presenta lóbulos cefálicos completamente desarrollados, cuatro ojos con los dos posteriores más grandes que los anteriores y generalmente más separados, con gránulos accesorios ausentes, boca subterminal, faringe sub-ovada y esofago moderadamente largo. Posee un pedúnculo muy extenso, con un haptor de forma bilobulada con la superficie posterior cóncavo, ganchos ligeramente iguales en forma; cada uno con pulgar truncado levemente deprimido y punta en forma de haz. Gónadas superpuestas ligeramente, testículo sub-ovalado, ovario piriforme, saco prostático alargado y sub-ovalado. El órgano copulador presenta forma de tubo simple con extremos espinosos ligada a la pieza accesoría. Pieza accesoría con extremo proximal en forma de varilla y el extremo distal espatulado. El ligamento copulador es fino y flexible, receptáculo seminal ausente.

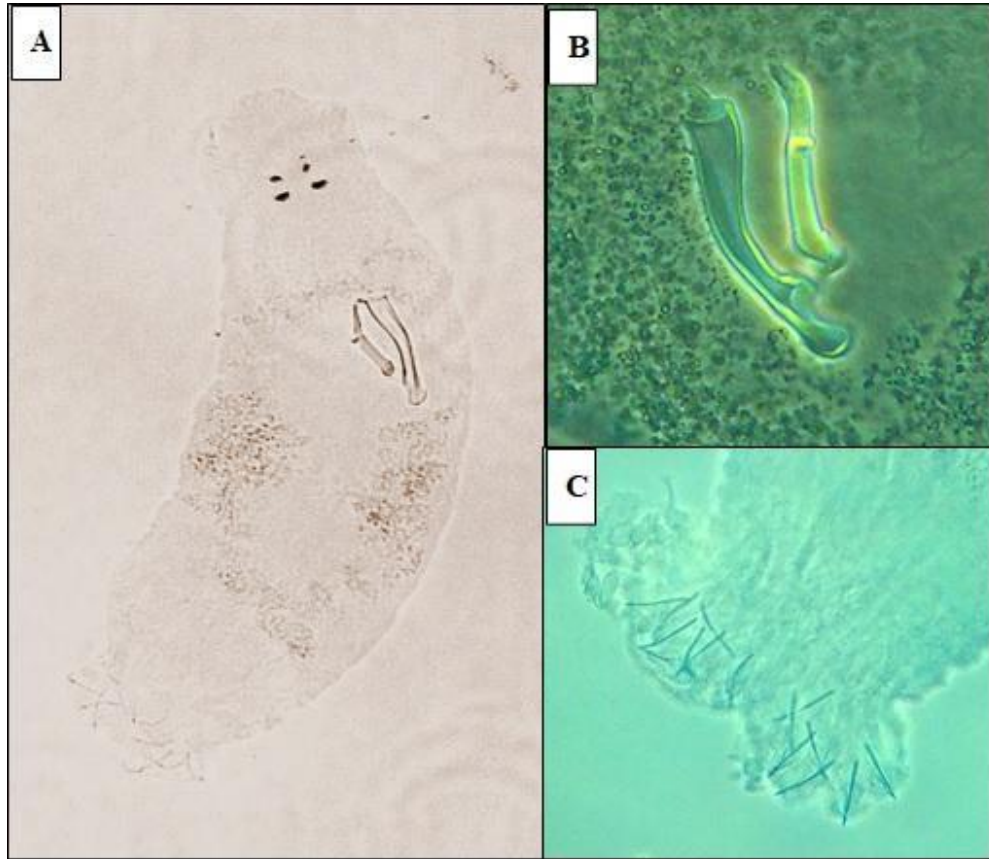


Figura 1. A-C. *Anacanthorus spathulatus*. A. Cuerpo entero B. Complejo copulatorio (vista ventral). C. Haptor.

6.4.2. *Anacanthorus penilabiatus* (Boeger, Husak & Martins, 1995)

Las estructuras observadas fueron propias del parasito. Cuerpo fusiforme. Con órganos cefálicos completamente desarrollados, presenta cuatro ojos, los dos posteriores más grande y el par anterior generalmente están más unidos, gránulos oculares sub-ovalados. Faringe de forma sub-esférica. Pedúnculo extendido. El haptor se encuentra ligeramente bilobulado, presenta la superficie posterior cóncavo. Ganchos presentes iguales en forma, truncado y levemente caído con punta en forma de hoz, gancho con ampliación variable en el extremo proximal. Gónadas ligeramente

superpuestas, testículo sub-ovalado y post-ovárico, ovario piriforme, saco prostático alargado y sub-ovalado. Órgano copulador con base oblicua, aleta longitudinal hacia la mitad. Pieza accesoria en forma de varilla y espatulada en el extremo distal con proyección sub-terminal en punta, extremo proximal levemente extendido unido al ligamento copulador.

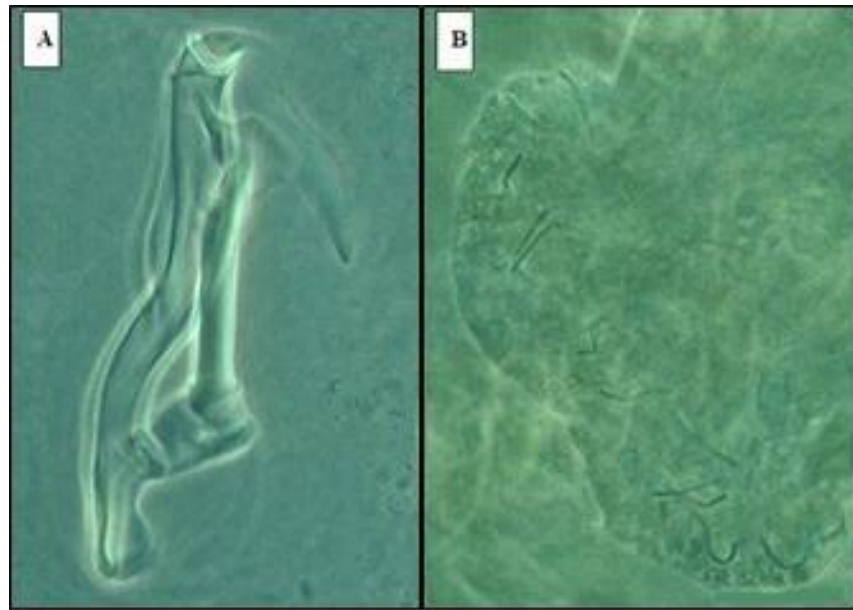


Figura 2. A-B. *Anacanthorus penilabiatus* A. Complejo copulatorio (vista ventral). B. Haptor.

6.4.3. *Notozothecium janauachensis* (Belmont-Jégu, Domingues & Martins 2004)

Las estructuras observadas fueron propias de la especie. Presenta un cuerpo fusiforme, la piel con anulaciones en todo el tronco y el pedúnculo. Lóbulos cefálicos moderadamente desarrollados con cuatro ojos, los dos posteriores un poco más grande y separados que los anteriores, gránulos de los ojos de forma larga, la faringe es redonda y ovalada. Pedúnculo ancho, haptor sub-hexagonal, con el áncora ventral ligeramente extendido y robusto con raíz superficial larga y truncada, con cuerpo parejamente curvado, el áncora dorsal con raíz superficial profunda y ligeramente deprimida, cuerpo delgado y punta corta en la base, con terminaciones ampliadas. La barra dorsal es extendida en forma de U, con extremos expandidos. Ganchos larvarios con forma similar entre sí, cada uno con punta delicada, pulgar sobresaliente, mango expandido el cual es variable en longitud entre pares de ganchos. Órgano copulador masculino representado por un espiral en forma de anillo con base conica, la zona distal con una extensión lateral extensa y puntiaguda, similar a una pluma. Testículo ovado, vesícula seminal sigmoidea, sacos prostáticos grandes y piriformes. Ovario ovalado y elongado. Vagina ligeramente esclerotizada comprendida por un tubo con salida a la superficie dextro dorsal del cuerpo. Receptáculo seminal medioventral y ovalado.

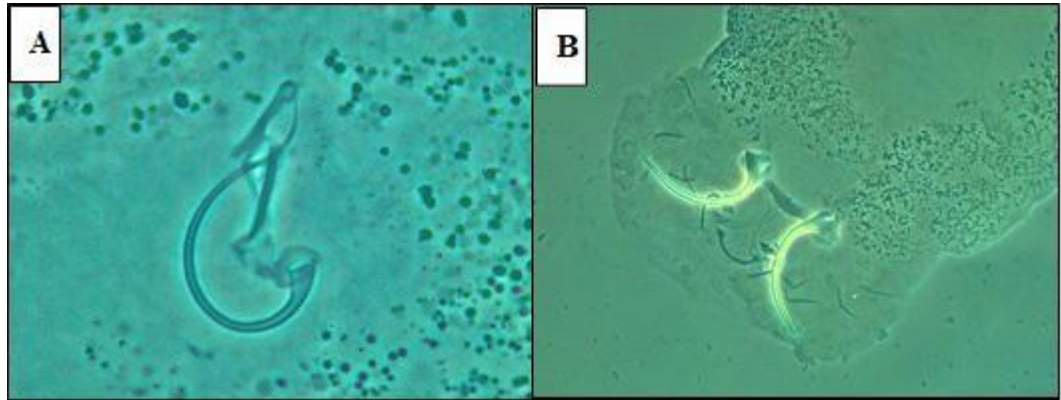


Figura 3. A-B. *Notozothecium janauachensis*. A. Complejo copulatorio, vista ventral. B. Haptor

6.5. Evaluación Histopatológica

El análisis histopatológico realizado a todas las muestras se observó principalmente las siguientes lesiones en un mayor porcentaje, hiperplasia interlamelar en 93.33% presentando en la mayoría de muestras un grado severo de afección, también se observó hiperplasia de las lamelas secundarias en un 80% e infiltración de células eosinofílicas y linfocitarias en 86.6%, así como fusión lamelar en 73.33% y un desprendimiento del epitelio lamelar en en 73.33% (Tabla 6). Las diferentes lesiones presentaron generalmente un grado de afección moderada.

Tabla 9: Lesiones Histopatológicas en branquias de acuerdo al tipo de lesión y grado de afección presentes en *C. macropomum*

TRASTORNOS	TIPO DE LESIÓN	GRADO DE AFECCIÓN				N	%
		Ausente	Leve	Moderado	Severo		
INFLAMATORIOS	Infiltración de células eosinofílicas y linfocitarias	2	4	5	4	13/15	86.66
DE CRECIMIENTO	Hiperplasia del epitelio interlamelar	1	2	3	9	14/15	93.33
	Hiperplasia de las lamelas secundarias.	3	1	7	4	12/15	80
	Fusión de las lamelas secundarias.	4	2	5	4	11/15	73.33
CIRCULATORIO	Congestión en la base de las lamelas	14	0	1	0	1/15	6.66
	Congestión de la vena central	11	0	4	0	4/15	26.66
	Dilatación de la vena central	11	0	4	0	4/15	26.66
	Dilatación del seno venoso	14	0	1	0	1/15	6.66
DEGENERATIVO	Desprendimiento del epitelio lamelar	4	3	5	3	11/15	73.33

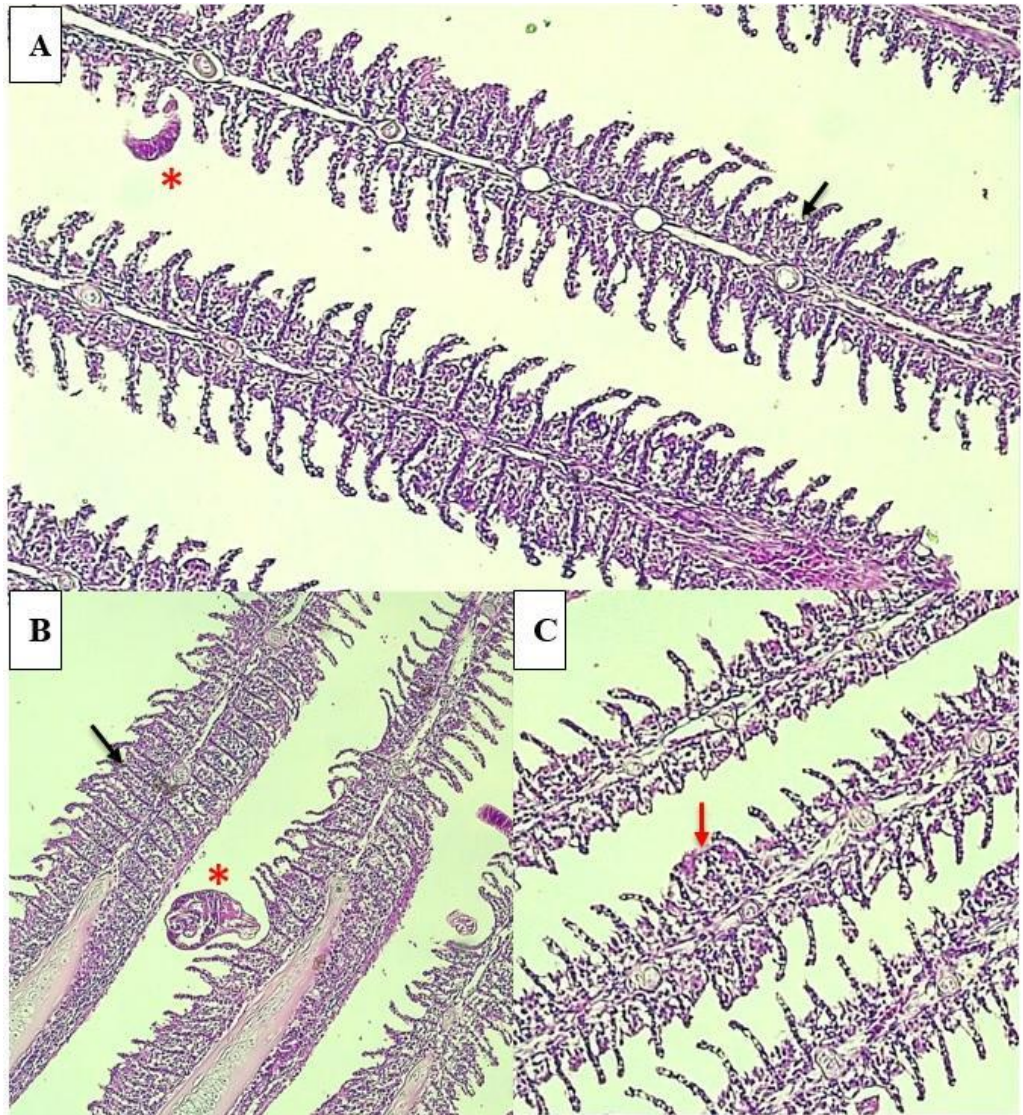


Figura 4. Branquia de *C. macropomum*, A, B y C - monogéneos (asterisco) causando hiperplasia interlamelar generalizada (flecha negra) e hiperplasia de las lamelas secundarias (flecha roja). (10x. Tinción con H&E).

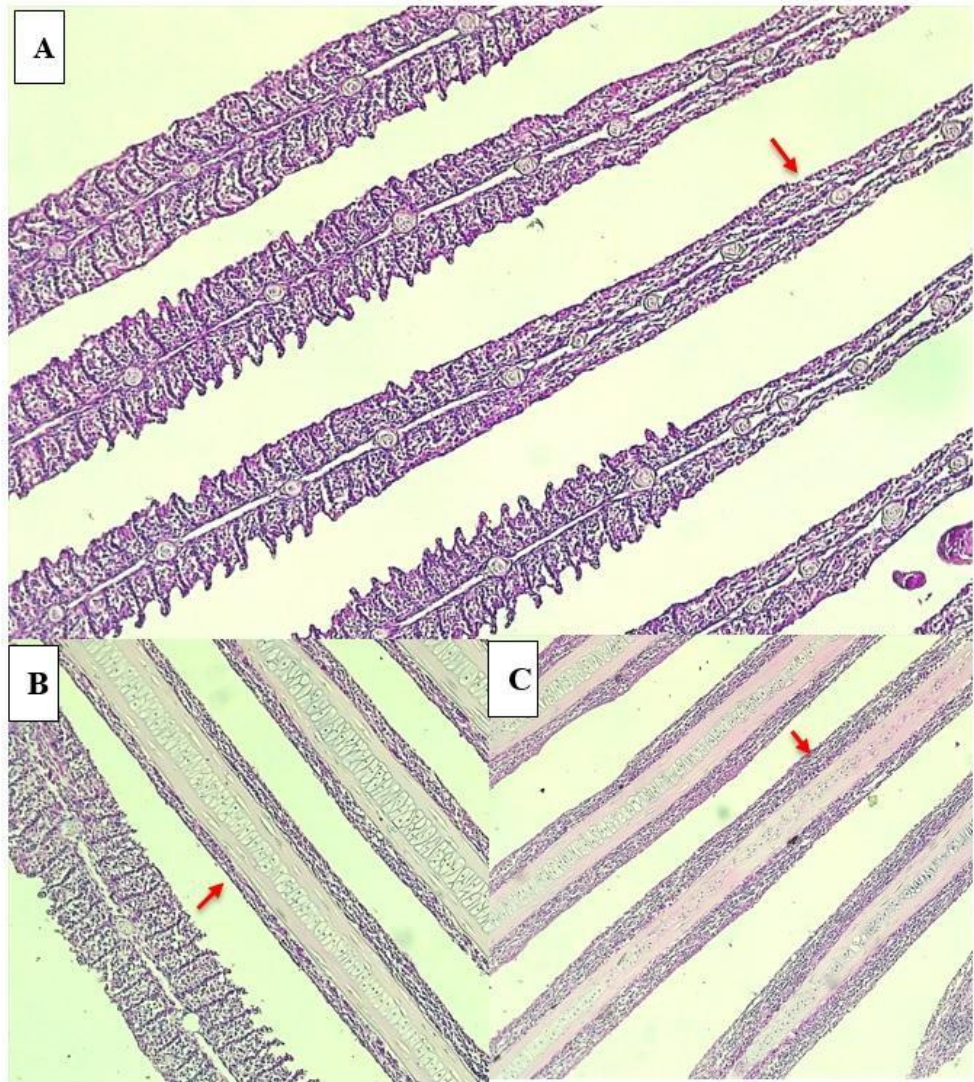


Figura 5. A, B y C - Hiperplasia interlamelar severa y fusión de las lamelas (flecha roja). (10x. Tinción con H&E).

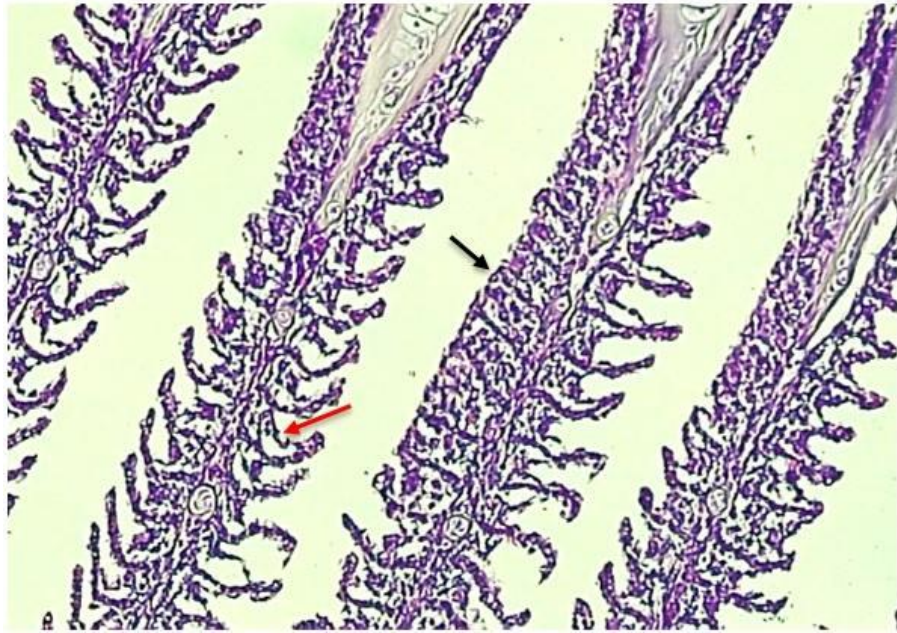


Figura 6. Desprendimiento del epitelio de la lamela secundaria (flecha roja) además de una Hiperplasia interlamelar (flecha negra). (40x. Tinción con H&E).

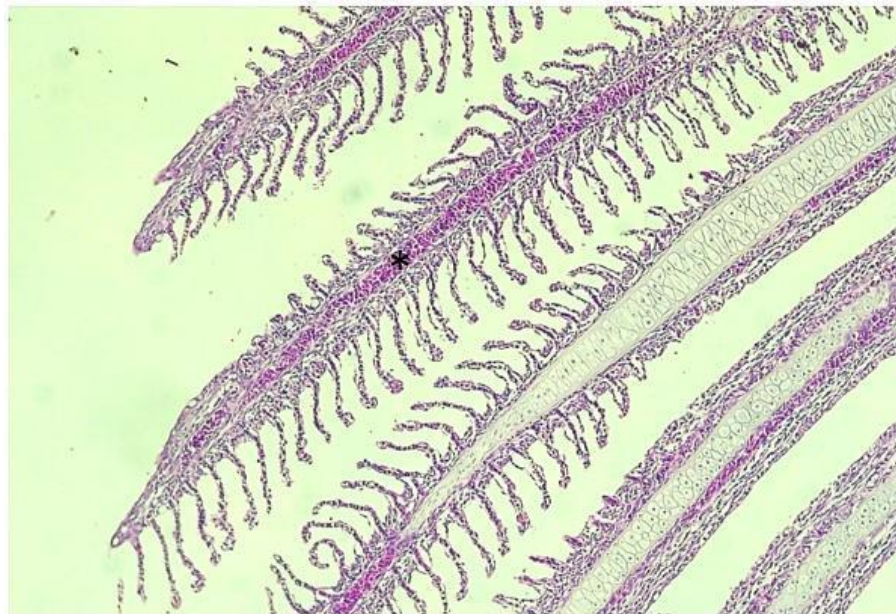


Figura 7. Dilatación y congestión de la vena central (asterisco). (10x. Tinción con H&E).

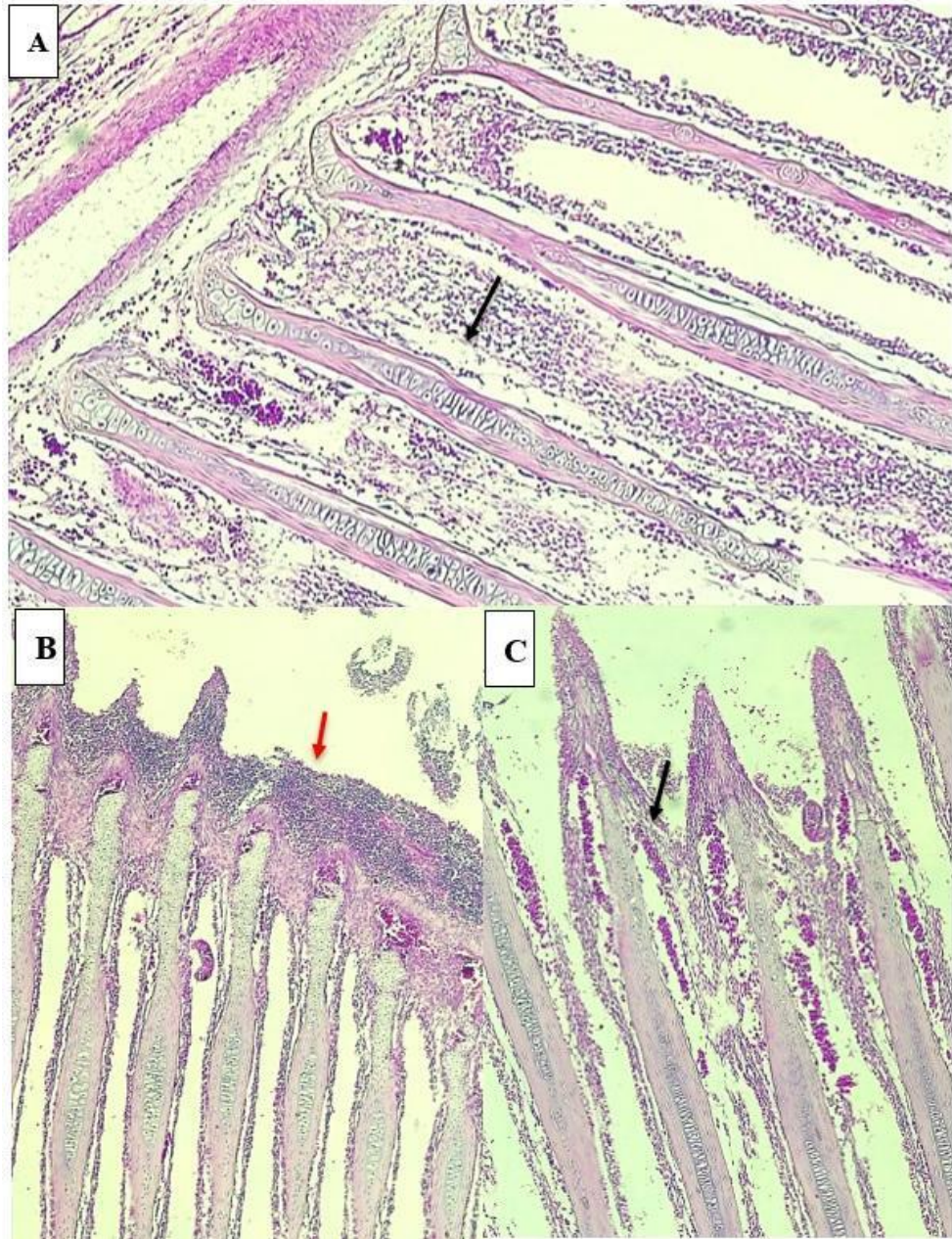


Figura 8. A, B y C - Monogeenos presentes causando una hiperplasia severa (flechas rojas), severa pérdida del epitelio lamelar (flecha negra) con infiltración de células eosinofílicas y linfocitarias. (10x. Tinción con H&E).

VII. DISCUSIÓN

En la Amazonía peruana, *C. macropomum* está determinada como una de las principales especies que sustentan el progreso de la acuicultura. A pesar de ello, este pez amazónico viene constantemente siendo afectada por una variedad de patógenos, entre los cuales podemos encontrar los parásitos monogéneos que pueden ser causales de grandes mortalidades si las condiciones ambientales se tornan desfavorables (Andrade-Porto *et al.*, 2015). Algunos estudios han señalado el uso de compuestos químicos como el cloruro de sodio como una alternativa preventiva contra agentes patógenos infecciosos de los peces (Kubitza, 2016). La sal al igual que la formalina es frecuentemente usada de manera errónea o aplicada muy tarde, y generalmente se utiliza dosificaciones generalmente bajas e ineficientes o por plazos de tiempo muy reducidos. En el Perú son casi inexistentes los estudios relacionados al uso de estos agentes químicos en peces tropicales que sirvan como referencia para tratar las infecciones por estos parásitos.

Los resultados registrados en la presente investigación demostraron que el cloruro de sodio a la dosis de 30 g/L tiene una efectividad *in vitro* contra los monogéneos branquiales de *C. macropomum* a los 3.25 min, siendo esta dosis con el menor tiempo de exposición que logra la mortalidad de los parásitos. Dosis inferiores a los de este estudio fueron utilizados por Forwood *et al.* (2013) quienes evaluaron la eficacia de tratamientos químicos alternativos para *Lepidotrembidyana* infectando a perca plateada, en el cual el cloruro de sodio fue efectivo *in vitro*

contra *L. bidyana* a 10 g/L a 1h, lo que sugiere que la dosis actual recomendada de 15 g/L durante 1h para esta especie es efectiva (Read *et al.* , 2007).

En cuanto a la formalina la dosis de 0.8 ml/L en los ensayos in vitro fue efectiva a los 6.86 min logrando la mortalidad total de los parásitos branquiales para *C. macropomum*. Un tiempo mayor en lograr la mortalidad de monogeenos branquiales fue reportado por Andrade-Porto *et al.* (2017) en un estudio *in vitro* en el que evaluó tratamientos antiparasitarios con formalina contra *Dawestrema cycloancistrum*, monogeneo presente en *A. gigas*, en el cual las concentraciones de 0.66 y 0.88 ml/L de formalina fueron las más efectivas después de 1h de exposición con una mortalidad del 100% de este parásito. Por otro lado Forwood *et al* (2013), determinaron en un estudio, que la formalina a 0.25 ml/L fue efectiva contra *L. bidyana* a los 40 minutos de exposición in vitro y que requiere un tiempo de exposición más largo para ser efectiva a 0.15 y 0.1 ml/L. De igual manera Sitjà *et al* (2006), quienes usaron tratamientos in vitro contra *Sparicotyle chrysophrii* parásito monogeneo de las branquias de dorada obteniendo una efectividad de la formalina a la dosis 0.3 ml/L por 30 min. Estos resultados sugieren que el tiempo de reacción de estos compuestos químicos sobre la mortalidad de los monogeenos puede variar debido a la dosis a utilizar, así como la especie de monogeneo presente en las branquias, ya que unas pueden ser más susceptibles o resistentes que otras.

La sal es aplicada comúnmente como tratamiento para controlar los monogenoideos en peces dulceacuícolas amazónicos, pero se registran pocos estudios que han determinado concentraciones adecuadas y efectivas para su uso

como tratamiento. En la presente investigación se determinó que una dosis a 30 gr/L de sal en baños de 30 min por tres días tiene una efectividad de 63.43%. Este trabajo concuerda con Murrieta et al. (2019) quienes evaluaron la eficacia de la sal a 30 gr/L contra *Dawestrema cycloancistrum* obteniendo resultados eficientes a los 30 min. Vargas et al. (2003), recomienda usar baños terapéuticos con 3% de sal durante 10 min siendo eficaz contra parásitos monogéneos de las especies *Gyrodactylus* pero es menos eficiente contra especies de *Dactylogyrus*. De manera contraria Forwood et al (2013), describe en su estudio que todas las dosis de sal probadas contra *L. bidyana* (5, 10 y 15 g/L) fueron ineficaces.

Al igual que la sal, la formalina se ha utilizado como un agente terapéutico eficaz en la acuicultura y uno de sus usos es comúnmente para tratar ectoparásitos. En el presente estudio, la formalina fue efectiva in vivo en las dos dosis utilizadas, 0.5 ml/L y 0.8 ml/L contra monogéneos presentes en *C. macropomum*, obteniendo una efectividad 99.81% y 99.87%. Estos datos fueron similares a los registrados por Andrade-Porto et al. (2017) con baños terapéuticos de 1 h con 440 y 550 mg/L la formalina mostrando una eficacia del 93,3% y 99,3%, respectivamente, concordando con Pahor-Filho et al. (2012) quien recomienda baños de formaldehído entre 135 y 540 mg/L por 1h para controlar monogéneos en lisa. Dosis menores a los empleados en este estudio fueron usados por Paixao et al. (2013) obteniendo un 77.7% en el control de monogéneos en *Hemigrammus sp.*, con una dosis de 0.025ml/L con 24h de exposición por 3 días. Un baño de 1 h con 250 ppm de formalina redujo la ocurrencia de *Gyrodactylus* en la tilapia del Nilo, pero no la de *Dactylogyrus sp.* (Vargas et al., 2003). Sin embargo, una dosis de 250 mg/L fue ineficaz contra *L. bidyana* monogéneo parásito de la perca

plateada (Forwood et al. 2013). Todas estas investigaciones han demostrado ciertas diferencias en el uso de la formalina para controlar los monogeneos en peces vivos, se podría afirmar que puede ser debido a que algunos parásitos pueden ser más tolerantes a esta sustancia, como también a las etapas de desarrollo del parásito, además de tener en cuenta las limitaciones a los efectos secundarios que pueden causar a los peces.

Se identificó a *A. spathulatus*, de acuerdo a las características descritas por Kritsky et al. (1979). Este parásito fue previamente reportado por varios autores infestando branquias de *C. macropomum* recolectadas de ambientes naturales y cultivo (Santos et al. 2013). La alta prevalencia (87.1%) de este monogeneo registrada en la presente investigación fue similar a lo reportado en Venezuela por Centeno *et al.* (2004) donde señalaron al monogenoideo *A. spathulatus* como la especie que predominó más (96.4%). Esto concuerda con Godoi et al. (2012), quienes reportaron una prevalencia del 96% de *A. spathulatus* parasitando branquias de *C. macropomum* en una piscifactoría en el estado de Rondonia en Brasil. En Perú el primer reporte de *A. spathulatus* parasitando a *C. macropomum* fue realizado por Soberon et al. (2014) indicando una baja prevalencia de 27.8% de este parásito, refiriendo que pudo deberse a un buen control en los estanques estudiados. De caso contrario a lo mostrado por Cayulla *et al.* (2021) indicó una prevalencia de *A. spathulatus* de 64,3 % para *C. macropomum*.

El presente estudio confirma la ocurrencia de este parásito, evidenciando una alta especificidad de *A. spatulatus* parasitando en *C. macropomum*. Así mismo este parásito requiere de mucha atención, ya que se encuentra en la mayoría de los

cultivos de *C. macropomum* indicando siempre elevados niveles parasitarios en comparación con otras especies de monogenoideos (Morais *et al.* 2009).

Anacanthorus penilabiatus fue reportado por primera vez por Borger *et al.* (1995) parasitando *P. mesopotamicus* en el estado de São Paulo. También en Brasil fue reportado *A. penilabiatus* por Lizama *et al.* (2007) y Leão *et al.* (2017) en los estados de São Paulo y Paraná respectivamente. Así como Pamplona *et al.* (2001) y Koh y Cohen (2009) registrando a *A. penilabiatus* infestando las branquias de *C. macropomum* y *P. brachypomus* en el estado de Ceará y Paraná.

A. penilabiatus tuvo una baja prevalencia de 21% en la presente investigación. A diferencia de Cayulla *et al.* (2021) quien reportó una prevalencia de 64.3% de *A. penilabiatus* parasitando a *C. macropomum* en el departamento de Madre de Dios. Siendo similar a lo reportado en Brasil por Cohen y Kohn (2009) quienes analizaron cuatro especies de carácidos amazónicos, encontrando a *A. penilabiatus* parasitando a *P. mesopotamicus* y *P. brachypomus* con una prevalencia de 50% y 83.3% respectivamente a diferencia de *C. macropomum* en el cual no se registró la presencia de este monogeneo. De igual manera Leão *et al.* (2017) reportó una prevalencia de 97.5% en *P. mesopotamicus* en el estado de Paraná. Pamplona *et al.* (2001) reportó a *C. macropomum* como nuevo hospedador para *A. penilabiatus* indicando una prevalencia 84.3 % en el estado de Ceará. A pesar que muchos estudios señalan la especificidad de *A. penilabiatus* con el género *Piaractus*, este parásito muestra una extensa habilidad para parasitar peces taxonómicamente relacionados como *C. macropomum*.

El monogeneo *N. janauachensis* se ha reportado en diferentes estados de Brasil parasitando a *C. macropomum* tanto en ambientes naturales como de cultivo (Belmont-Jegú et al. 2004, Morais et al. 2009, Cohen y Kohn 2009, Ceará y Dias et al. 2015). La prevalencia de *N. janauachensis* registrada en este estudio fue la más baja (6.5%) en comparación con las otras dos especies de monogeneos identificadas. Este resultado fue inferior a la reportado por Cayulla et al (2021) con una prevalencia de 28.6% para *N. janauachensis* en *C. macropomum*. Morais et al. (2009) señaló en su estudio una prevalencia del 10,12% para *N. janauachensis*, este resultado es similar a lo registrado en este estudio. A diferencia de lo reportado por Cohen y Kohn (2009) mostrando una prevalencia de 60% para *C. macropomum*.

Estas variaciones pueden deberse a alteraciones en los sistemas de cultivo así como la susceptibilidad de los hospederos. Una causa principal de los elevados índices parasitarios se debe al ciclo de vida de los monogenoides que es directo y además a una alta densidad en los estanques de cultivo, esto facilitaría la infección por estos parásitos.

Las lesiones branquiales tienen un alto grado de inespecificidad, sin embargo, distintos autores las relacionan con infestaciones parasitarias como los monogeneos, debido al órgano de fijación de estos (Guerra-Santos et al., 2012, Verján et al 2002, Martins y Romero, 1996) así como también se ha relacionado con alteraciones del medio acuático y una mala calidad del agua (Ramos et al 2016, Verján et al 2002).

Vargas et al. 2015 menciona en su investigación que las principales lesiones histopatológicas presentes en *C. macropomum* parasitadas con monogeneos branquiales fueron hiperplasia del epitelio y fusión lamelar. Siendo similar a lo registrado en el presente estudio en donde las lesiones con mayor frecuencia fueron hiperplasia interlamelar y de las lamelas secundarias, así como la fusión lamelar y un desprendimiento del epitelio lamelar, que en su mayoría fueron de un grado moderado de afección.

Ramos et al. (2016) En su investigación señala que se presentaron en las branquias de *C. macropomum*, trastornos del crecimiento en un 100% fue hiperplasia epitelial interlamelar y 45% hiperplasia de los filamentos, así como fusión de las lamelas en un 95%, sin embargo, presento una baja frecuencia de monogenoideos (15% de parásitos), se podría asumir que las lesiones registradas no serían en efecto causa de una infestación parasitaria de lo contrario a un mal manejo de la calidad de agua. Esto puede sustentarse con lo indicado por Verján (2002), en un estudio histopatológico en pacos (*Piaractus brachypomus*) aparentemente sanos, se observó pérdida de estructura lamelar siendo esta la más prevalente así como hiperplasia interlamelar y en el arco y en el filamento se observó infiltración de células inflamatorias; e indicando que estas lesiones histológicas estarían directamente relacionadas con una mala calidad del agua como también se debería a una relación entre factores químicos del agua y la presencia de ciertos parásitos. De igual manera un estudio realizado en *Piaractus mesopotamicus* parasitados por monogeneos por Jeronimo et al. (2013), en el cual la histopatología reveló una hiperplasia severa, fusión de las laminillas

secundarias, así como pérdida del epitelio lamelar y necrosis focal y multifocal en peces altamente parasitados.

En la presente investigación, las lesiones histopatológicas encontradas en las branquias de *C. macropomum* fueron generalmente de grado moderado, esto afecta el equilibrio osmótico y producen alteraciones respiratorias (Thatcher et al., 2006). Dichas funciones son necesarias para un óptimo crecimiento,, además que las lesiones puede servir de entrada para otros patógenos secundarios con bacterias y hongos y causa así una preocupación de interés comercial, ya que puede ocasionar en los peces disminución en el crecimiento y una baja productividad. Los resultados obtenidos del estudio histopatológico nos permiten afirmar que la presencia de parásitos monogenéticos branquiales en gamitana fueron los causantes de la aparición de las lesiones histopatológicas descritas, debido principalmente al efecto mecánico causado por el haptor durante la fijación. Las lesiones que se encontraron en el presente estudio coinciden con las reportadas por otros autores ya mencionados.

VIII. CONCLUSIONES

- En las pruebas *in vitro* se determinó que el tratamiento con 30gr/L de sal consiguió en menor tiempo la muerte del parásito con un promedio de 3.23 min, mientras que el mayor tiempo lo obtuvo el tratamiento con 0.5ml/L con un promedio de 10.11 min.
- Se determinó en las pruebas *in vivo* que los tratamientos con formalina 0.5ml y 0.8ml, obtuvieron mejores resultados con un mayor porcentaje de eficacia 99.81% y 99.85% respectivamente, reduciendo casi en su totalidad la abundancia de parásitos en comparación con los grupos control.
- En el análisis parasitológico se logró identificar en branquias de *C. macropomum* tres especies de monogeneos, *A. spatulatus*, *A. penilabiatus*, *N. janauachensis*, las cuales fueron descritas por varios autores para esta misma especie.
- La especie de monogeneo *A. spatulatus*, fue la que tuvo una mayor prevalencia 87.1% parasitando las branquias de *C. macropomum* en comparación con las otras dos especies encontradas.
- El análisis histopatológico demostró que las lesiones más frecuentes ocasionadas por monogeneos fueron: Hiperplasia interlamelar en 93.33%, Hiperplasia de las lamelas secundarias en un 80%, Infiltración de células eosinofílicas y linfocitarias en 86.6%, así como Fusión lamelar en 73.33%.

IX. RECOMENDACIONES

- Realizar más estudios sobre tratamientos alternativos con productos que no afecten el estado de salud del pez, así como probar más dosis en diferentes tiempos con los productos empleados en este estudio y así afirmar los resultados obtenidos y que sirva como referencia para los productores en poder aplicar un tratamiento adecuado contra estos parásitos y en la misma especie de pez.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alcántara-Bocanegra, F., Verdi-Olivares, L., Murrieta-Morey, G., Rodríguez-Chu, L., Chu-Koo, F., & del Águila-Pizarro, M. (2015). Parásitos de alevinos de gamitana (*Colossoma macropomum*) y paco (*Piaractus brachypomus*) cultivados en el CI Quistococha, Loreto, Perú. *Ciencia Amazónica (Iquitos)*, 5(1), 42-49.

Andrade-Porto, S. M., Cárdenas, M. Q., Martins, M. L., Oliveira, J. K. Q., Pereira, J. N., Araújo, C. S. O., & Malta, J. C. (2015). First record of larvae of *Hysterothylacium* (Nematoda: Anisakidae) with zoonotic potential in the pirarucu *Arapaima gigas* (Osteichthyes: Arapaimidae) from South America. *Brazilian Journal of Biology*, 75(4), 790-795.

Andrade-Porto, S. M., Affonso, E. G., Kochhann, D., Malta, J. C. O., Roque, R., Ono, E. A. & Tavares-Dias, M. (2017). Antiparasitic efficacy and blood effects of formalin on *Arapaima gigas* (Pisces: Arapaimidae). *Aquaculture*, 479, 38-44.

Andrade, J., Tomas, G., Martins, E., CV Gonçalves, Tavares, E., Martins, M., Laterça, M. (2016). Eficacia del extracto de semilla de *Bixa orellana* contra parásitos branquiales monogéneos y aspectos fisiológicos de *Colossoma macropomum* después del tratamiento en baño. *Aquaculture*, 462. 40-46.

Pereira, S., Chagas, E., Maciel, P., Benavides, M., Majolo, C., Boijink, C. D. L., & Martins, V. D. S. (2016). Agentes patogênicos de tambaquis cultivados, com destaque para registros em Rio Preto da Eva, AM. *Embrapa Amazônia Ocidental- Documentos (INFOTECA-E)*.

Aragort, W., Morales, G., León, E., Pino, L. A., Guillén, A., & Silva, M. (2002). Patologías asociadas a monogeneos branquiales en cachama bajo cultivo. *Veterinaria Tropical*, 27(2), 75-85.

Boeger, W. & Kritsky, D. (1988). Neotropical Monogenea. 12. Dactylogyridae from *Serrasalmus nattereri* (Cypriniformes: Serrasalminidae) and aspects of their morphologic variation and distribution in the Brazilian Amazon. *Proc. Helminthol. Soc.* 55(2), p. 188-213.

Boeger, W. & Vianna, R. (2006). Monogenoidea. In: Joachim Adis; Jorge Arias; Guillermo Rueda-Delgado; Karl Matthias Wantzen Organization. Biodiversidad Acuática en Latinoamérica. *Amazon fish parasites*. 1(2), 3; p. 42-116.

Brown, J.A., Moore, W.M., Quabius, E.S. (2001). Physiological effects of saline waters on zander. *J. Fish Biol.* 59, 1544-1555.

Buckel, J., Steinberg, N., Conover, D., (1995). Effects of temperature, salinity, and fish size on growth and consumption of juvenile bluefish. *Journal of Fish Biol.* 47(4), 696–706.

Cayulla-Quispe, D., Mondragón-Martínez, A., Rojas-De-Los-Santos, E., Garcia-Candela, E., Babilonia-Medina, J., & Martínez-Rojas, R. (2021). A New Species of *Mymarothecium tantaliani* n. sp (Monogenea: Dactylogiridae) in the Gills of Gamitana *Colossoma macropomum* (Cuvier) from Madre de Dios, Peru. *Acta parasitológica*. 66(1), 34–38

Carneiro, P.C.F., Urbinati, E.C., (2001). Salt as a stress response mitigator of matrinxã, *Brycon cephalus* (Gunther), during transport. *Aquacult. Res.* 32, 297–304.

Cohen, C. & Kohn, A. (2009). On Dactylogyridae (Monogenea) of four species of characid fishes from Brasil. *Check List.* 5(2): 351 - 356.

Ceccarelli, P. S., Figueira, L. B., Ferraz de Lima, C. L. B., & Oliviera, C. A. (1990). Observações sobre a ocorrência de parasitos no cepta entre 1983 e 1990. *Boletim Técnico do CEPTA.* 43-55.

Campos, L. (2015). El cultivo de la Gamitana en Latinoamérica. *Edit. Gabriel Vargas y Manuel Martín.* Iquitos, Perú. 1.54p.

Cohen, S. C., & Kohn, A. (2005). A new species of *Mymarothecium* and new host and geographical records for *M. viatorum* (Monogenea: Dactylogyridae), parasites of freshwater fishes in Brazil. *Folia parasitologica,* 52(4), 307–310.

Cohen, S. C., Justo, M. C. N., & Kohn, A. (2013). *South American Monogenoidea parasites of fishes, amphibians and reptiles.* Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). 669p

Deacon, N., & Hecht, T. (1999). The effect of reduced salinity on growth, food conversion and protein efficiency ratio in juvenile spotted grunter, *Pomadasys commersonnii* (Lacépède) (Teleostei: Haemulidae). *Aquaculture research,* 30(1), 13-20.

De Carvalho, G., Roubach, R., Araujo-Lima, C., 2002. O sal de cozinha no transporte de peixes. *Revista Panorama da Aquicultura* 72, 50–51.

Dolezelova, P., Macova, S., Plhalova, L., Pistekova, V., Svobodova, Z., Bedanova, I., & Voslarova, E. (2009). Comparison of the sensitivity of different fish species to medical substances. *Neuro endocrinology letters*, 30 (1), 248–252.

Eiras, J., Ranzani-Paiva, M., Ishikawa, C., Alexandrino, A., Eiras, A. 1995. Ectoparasites of semi-intensively farmed tropical freshwater fish *Piaractus mesopotamicus*, *Prochilodus lineatus* and *Colossoma macropomum* in Brazil. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists (United Kingdom)*. 15(5): 148 - 151.

Crespo, J. F., & Crespo, R. F. (2003). Monogenean parasites in Mexican fish: a recapitulation. *Tecnica Pecuaria en México*, 41(2), 175-192.

FONDEPES, 2004. Manual del cultivo de la gamitana. Fondo Nacional de Desarrollo Pesquero – FONDEPES. 96pp.

Godoi, M., Engracia, V., Lizama, M., & Takemoto, R. M. (2012). Parasite-host relationship between the tambaqui (*Colossoma macropomum* Cuvier 1818) and ectoparasites, collected from fish farms in the City of Rolim de Moura, State of Rondônia, Western Amazon, Brazil. *Acta Amazonica*, 42(4), 515-524.

Godoy, M. (2015). Patología en acuicultura. Patología branquial en Salmón del Atlántico (*Salmo salar*), asociada a toxicidad por uso de baños químicos: Patología macroscópica

Goulding, M., & Carvalho, M. L. (1982). Life history and management of the tambaqui (*Colossoma macropomum*), Characidae: an important Amazonian food fish. *Revista Brasileira de Zoologia*, 1(2), 107-133.

Jung, S., Kim, J., Jeon, I., & Lee, Y. (2001). Formaldehyde residues in formalin-treated olive flounder (*Paralichthys olivaceus*), black rockfish (*Sebastes schlegeli*), and seawater. *Aquaculture*, 194(3-4), 253-262.

King, K., & Farrell, P. (2002). Sensitivity of juvenile Atlantic sturgeon to three therapeutic chemicals used in aquaculture. *North American Journal of Aquaculture*, 64(1), 60-65.

Kubitza, F., (2016). La sal común es una herramienta útil en la acuicultura, parte 2. *Global Aquaculture*. 8pp.

Likongwe, J., Stecko, T., Stauffer Jr, J., & Carline, R. (1996). Combined effects of water temperature and salinity on growth and feed utilization of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus). *Aquaculture*, 146(1-2), 37-46.

Martins, M. (2004). Cuidados básicos e alternativas no tratamento de enfermidades de peixes na aquicultura brasileira. *Sanidade de Organismos aquáticos*, 355-368 pp.

Mendoza, R. 2011. Importancia de los productos acuícolas amazónicos en el Perú. Informe del Ministerio de la Producción- Dirección de acuicultura. 151p.

Morais, A., Correa, M., Varella, A., & Malta, J. (2009). A fauna de parasitas de juvenis de tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) (Characidae:

Serrasalminae) criados em tanques-rede em um lago de várzea da Amazônia central. *Bio Geral Exper.* 9, 13-23 pp.

Murrieta Morey, G. (2019). *Parasitología en peces de la Amazonía: fundamentos y técnicas parasitológicas, profilaxis, diagnóstico y tratamiento.* 100pp.

Murrieta, M., Chirinos, R., Zumaeta, C., Rodríguez, C., Mendoza, R., & Pereira, J. N. (2019). Mortality of *Arapaima gigas* (Schinz, 1822) (Arapaimidae) caused by *Dawestrema cycloancistrum* Price & Nowling, 1967 (Monogenoidea) from fish-ponds in the Peruvian Amazon and the use of salt for its treatment. *Neotropical Helminthology*, 13(2), 235-243.

Noga, E. J. (2010). *Fish disease: diagnosis and treatment.* John Wiley & Sons. 2. 495pp.

Onaka, E., Martins, M & Moraes, F. (2003). Eficacia do albendazol e praziquantel no controle de *Anacanthorus penilabiatus* (Monogenea:Dactylogyridae), parasito de Pacu *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthyes:Characidae) i banhos terapêuticos. *B. Inst. Pesca, Sao Paulo.* 29 (2), 101 – 107.

Pahor-Filho, E., Miranda-Filho, K. C., & Júnior, J. P. (2012). Parasitology of juvenile mullet (*Mugil liza*) and effect of formaldehyde on parasites and host. *Aquaculture*, 354, 111-116.

Pamplona-Basilio, M. C., Kohn, A., & Feitosa, V. A. (2001). New host records and description of the egg of *Anacanthorus penilabiatus* (Monogenea, Dactylogyridae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96(5), 667-668.

.Paixão, L., Santo, R., Ramos, F., & Fujimoto, R. (2013). Efeitos do tratamento com formalina e sulfato de cobre sobre os parâmetros hematológicos e parasitos monogenéticos em juvenis de *Hemigrammus sp.* (Osteichthyes: Characidae). *Acta Amazonica*, 43(2), 211-216

Picón-Camacho, S., Marcos-Lopez, M., Bron, J., & Shinn, A. (2012). An assessment of the use of drug and non-drug interventions in the treatment of *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet, 1876, a protozoan parasite of freshwater fish. *Parasitology*, 139(2), 149–190.

Plante, S., Audet, C., Lambert, Y., & de la Noüe, J. (2002). The Effects of Two Rearing Salinities on Survival and Stress of Winter Flounder Broodstock. *Journal of aquatic animal health*, 14(4), 281–287.

Reimschuessel R., Bennett R.O. y M. Lipsky. (1992). Communications. A Classification System for Histological Lesions. *Journal of Aquatic Animal Health*. 4:135-143.

Reimschuessel, R., Giesecker, C., & Poynton, S. (2011). In vitro effect of seven antiparasitics on *Acolpenteron ureteroecetes* (Dactylogyridae) from largemouth bass *Micropterus salmoides* (Centrarchidae). *Diseases of aquatic organisms*, 94(1), 59–72.

Roberts, R., (2001). *Fish Pathology*. W.B. Saunders, Edinburgh, p. 472.

Roberts, R. (2012). (Ed). *Fish Pathology*, Fourth Edition. Blackwell Publishing Ltd.

Rodgers, C. J., & Furones, M. D. (2009). Antimicrobial agents in aquaculture: practice, needs and issues. Série A. Séminaires Méditerranéens; *Options Méditerranéennes*. 86, 41-59.

Santos, F., Tavares-Dias, M., Pinheiro, A., Neves, R., Marinho, B., Dias, R. (2013). Fauna parasitaria de tambaqui *Colossoma macropomum* (Characidae) cultivado en tanque de red en el estado de Amapá, Amazonas oriental. *Acta Amazónica*, 43 (1), 105-111.

Schmahl G. (1991). The chemotherapy of monogeneans which parasitize fish: a review. *Folia parasitológica*. 38(2), 97–106.

Schreier, T., Rach, J., Howe, G., (1996). Efficacy of formalin, hydrogen peroxide, and sodium chloride on fungal-infected *rainbow trout* eggs. *Aquaculture*. 140 (4), 323–331.

Brown, L. (1993). Aquaculture for veterinarians: fish husbandry and medicine. pp 131-152.

Simková, O. (2006). Specificity and specialization of congeneric monogeneans parasitizing cyprinid fish. *Evolution*. 60(5), 1023-1037.

Tavares-Dias, M., Lemos, J., Andrade, S., & Pereira, S. (2006). Ocorrência de ectoparasitos em *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818 (Characidae) cultivados em estação de piscicultura na Amazônia Central. *Revista Aquatic*. 726-731.

Thatcher, V. (2006). Aquatic Biodiversity in Latin America, Amazon fish parasites. Pensoft Publishers. 2(1), 508 p.

THoney, D., & Hargis Jr, W. (1991). Monogenea (Platyhelminthes) as hazards for fish in confinement. *Annual Review of Fish Diseases*. 1, 133-153.

Tsuzuki, M., Ogawa, K., Strüssmann, C., Maita, M., & Takashima, F. (2001). Physiological responses during stress and subsequent recovery at different salinities in adult pejerrey *Odontesthes bonariensis*. *Aquaculture*. 200(3-4), 349-362.

Varella, A., Peiro, N., Malta, N. 2003. Monitoramento da parasitofauna de *Colossoma macropomum* (Curvier, 1818) (Osteichthyes: Charidae) cultivado em tanques rede em um lago de várzea na Amazônia. *Aquabio*. XII Simpósio Brasileiro de Aquicultura. Goiânia, 2003; 2: 95-105.

Vargas, M., Sandoval, N., Casas, E., Pizango, G., & Manchego, A. (2015). Parásitos y lesiones histopatológicas en branquias de gamitanas (*Colossoma macropomum*) juveniles bajo crianza semi-intensiva. *Rev. de Inv. Vet. del Perú*. 26(4), 577-586.

Vargas, L., Povh, J. A., Ribeiro, R. P., Moreira, H. L. M., Loures, B. T. R. R., & Maroneze, M. S. (2003). Efeito do tratamento com cloreto de sódio e formalina na ocorrência de ectoparasitas em alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) revertidos sexualmente. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR*, 6(1).

VALENTIM, D. S. S. (2020). Eficácia atividade antiparasitária de nanoemulsões com óleo essencial e óleo resina contra monogenoidea das brânquias de *Colossoma macropomum* (Serassalmidae).

Velasco-Santamaría, Y., & Cruz-Casallas, P. (2008). Behavioural and gill histopathological effects of acute exposure to sodium chloride in moneta (*Metynnis orinocensis*). *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 25(3), 365-372.

Velasco, Y., Palacios, C., Cruz, P. (2008). Eficiencia anestésica de 2-fenoxietanol, benzocaína, quinaldina y metasulfonato de tricaína en alevinos y juveniles de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*). *Rev MVZ Córdoba*. 13: 1435- 1445.

Xu, D., Rogers, A. (1993). Formaldehyde residue in striped bass muscle. *J. Aquatic Anim. Health*. 5, 306-312.

Sitjà, A., Conde, M., Alvarez, 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, 856–864

Forwood, J. M., Harris, J. O., & Deveney, M. R. (2013). Efficacy of current and alternative bath treatments for *Lepidotrema bidyana* infecting silver perch, *Bidyanus bidyanus*. *Aquaculture*, 416-417, 65–71.

Read, P., Landos, M., Rowland, S.J., Mifsud, C., (2007). Diagnosis, Treatment and Prevention of the Diseases of the Australian Freshwater Fish Silver Perch (*Bidyanus bidyanus*), NSW Dep. Prim. Indust., Australian Government.

XI. ANEXOS

ANEXO 1: FORMULARIO DE NECROPSIA

Muestra N°:		Fecha:
Especie:		Nombre común:
Procedencia:		
Diagnóstico ()		Experimental ()
Peso:	Longitud	Sexo: M () H ()
Órgano examinado	N° de Parásitos	Características
Piel		Normal () Exceso de mucus () Descamación () Hemorragias () Lesiones () Melanosis () Otros:
Ojos		Normal () exoftalmia () ceguera () otros:
Branquias	Arco derecho I (), II (), III (), IV (). Arco izquierdo I (), II (), III (), IV (). TOTAL:	
Corazón		
Estómago		
Intestino		
Ciegos pilóricos		
Riñón		
Hígado		
Vejiga natatoria		

ANEXO 3

PROTOCOLO PARA EL ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO

Introducción

Las muestras se obtendrán del Laboratorio de Parasitología y Sanidad Acuícola del IIAP, para realizar el estudio histopatológico, correspondiente al análisis de los tejidos (etapa analítica). El presente documento indica las etapas del procedimiento de estudio de tejidos para histopatología, que permitirá un adecuado análisis de la muestra.

Procedimiento de obtención de muestras

1. Las muestras para el estudio histológico se colocarán y conservarán en envases que presentes ciertas características:
 - Transparentes.
 - boca amplia y con tapa rosca.
 - se deberá utilizar formalina tamponada al 10%, hasta sobrepasar la muestra.
 - Es necesario recalcar que primero se debe agregar la formalina despues colocar la muestra, así se evitará que se pegue a las paredes del frasco. la persona encargada de manipular las muestras debe usar materiales de seguridad ya sea guantes y mascarillas para prevenir accidentes.
2. Rotulado de la muestra: en la pared del frasco.
 - Nombre común y/o nombre científico
 - Fecha
 - Tejido

- Procedencia
3. Traslado de los recipientes

A todas las muestras se le debe adjuntar su respectiva ficha de análisis histológico con los datos indicados anteriormente. Los envases deben ser envueltos cuidadosamente para evitar derrames.
 4. Criterios de exclusión de muestra
 - Mal rotulado del envase
 - Muestras que no estén fijadas
 - Inadecuado uso del Fijador y/o en cantidades no suficientes

Proceso de recolección y fijación

1. Obtención de muestras

1.1 La recolección de muestras son seguidamente después de la muerte, para ello se usará herramientas afiladas, como bisturís y tijeras.

1.2. Se debe evitar que los tejidos se sequen, ya que se altera el aspecto histológico. En tales casos es recomendable para protección utilizar suero fisiológico o agua destilada.

1.3. Después de la obtención, la muestra, no se debe aplastar, ni doblar ya que así dificulta poder laminar el tejido.

1.4. Los cortes de tejido deben tener un grosor recomendado de 0,5 cm y de una amplitud ideal para su identificación.

1.5. Los cortes de tejido deben presentar una parte aparentemente normal, la que se utilizara para comparar con otra en donde se observa la lesión.

2. Fijación de los tejidos

2.1. Las muestras serán colocadas en un frasco con un líquido fijador, siendo el más común la formalina tamponada al 10%, llenando el envase a un volumen 5 a 10 veces superior a la muestra.

2.2. Se colocará primero la formalina y luego la muestra, evitando que se peguen al envase, impidiendo que se fijen completamente.

2.3. para la elaboración del fijador a usar, se combina 1 parte de formalina comercial al 40%, con 9 partes de agua. También se puede utilizar carbonato de calcio, y así evitar la formación de hematina ácida (pigmento negro), para ciertos tejidos con presencia de gran cantidad de sangre.

3. Proceso de envasado de muestras

3.1. Para la conservación las de muestras se usará envases de abertura ancha, así permitirá la introduccion de los tejidos, y su fácil extracción del envase cuando esté fijada.

3.2. Las muestras de tejidos de un individuo se pueden colocar en el mismo envase, sin necesidad de la identificación de cada muestra.

3.4. Rotular los frascos, con los respectivos datos mencionados anteriormente.

Procedimiento de la técnica del análisis histológico

1. Posterior a la fijación, la muestra debe ser cuidadosamente lavado con agua para eliminar los residuos del fijador.
2. Los tejidos serán deshidratados y puestos en alcoholes con concentración ascendentes para eliminar el agua contenida, para ello se utiliza etanol al 70%, 80%, 96% y 100%.
3. Los tejidos se aclararán utilizando solventes produciendo transparencia como el xilol, toluol, acetona, benceno. El más utilizado en el proceso es el Xilol.
4. Para la adición en parafina, se coloca en una estufa de cultivo unos grados más por encima de su punto de fusión (parafina blanda 44 a 48 C° y parafina dura de 56 a 58 C°). Se introduce la muestra de tejido, se le coloca a la estufa unos minutos para que la parafina se adhiera en la muestra. Después se enfría rápidamente poniendo el recipiente en hielo.
5. seguidamente para la elaboración del taco se cortará un pedazo de parafina que contenga el tejido y se da forma de pirámide truncada, así la muestra quedará sobre la base menor. pegandose sobre un taquito de madera para que se pueda sostener en el micrótom.
6. Para realizar el corte se usará del micrótom, cortando el tejido después de colocarlo en el frio. Estos cortes suelen tener un espesor de 4 a 100 μm o más, dependen de los tejidos a estudiar.

7. Posteriormente los cortes se deben colocar en agua tibia para extenderse y luego se toman con un pincel extendiéndose en el portaobjetos, dejándose secar para luego ser coloreados.
8. Seguidamente, utilizando el xilol se debe extraer toda la parafina de la muestra y volverlo a aclarar.
9. Se debe realizar la hidratación del tejido debido a que la mayoría de los colorantes son acuosos. Se coloca el portaobjeto en etanol de forma decrecientes, soluciones al 100%, 96%, 80%, 70% y agua destilada.
10. Los cortes de las muestras en los portaobjetos son coloreados utilizando hematoxilina – eosina.
11. Posteriormente el preparado se deshidrata, sumergiéndolo en etanol en concentraciones crecientes al 70%, 80%, 96% y 100%.
12. Para aclarar la muestra se utiliza generalmente el xilol, esto permitirá retirar la resina que se utilizará para adherir la laminilla.
13. Para el montaje: se cubrirá el tejido con una lámina cubre objeto y será adherida con resina, así estará listo para observar en el microscopio.

ANEXO 4. Arcos branquiales distribuidos en placas Petri para las pruebas *in vitro*



ANEXO 5: Gamitanas distribuidas en cada unidad experimental para las pruebas *in vivo*



ANEXO 6: Extracción de las branquias de peces después de la aplicación del tratamiento



ANEXO 7: Análisis de las muestras branquiales en el estereoscopio.



**ANEXO 8: Identificación de monogenoideos utilizando el microscopio de
contraste de fases**

