



Respuesta histológica e inmune en el pez *Centropomus viridis* causadas por el parásito *Rhabdosynochus viridisi*

Dania López-Moreno¹ ; Zeinab Yazdi² ; Francisco N. Morales-Serna^{3*} ;
Juan M. Martínez-Brown¹ ; Leonardo Ibarra-Castro⁴ ; Alejandra García-Gasca¹ ;
Selene M. Abad-Rosales¹ ; Rodolfo Lozano-Olvera¹ ; Emma J. Fajer-Ávila¹ ; Esteban Soto² .

¹Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Mazatlán, Sinaloa, México.

²University of California, School of Veterinary Medicine, Department of Medicine and Epidemiology, Davis, CA, USA.

³Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Mazatlán, Sinaloa, México.

⁴University of Florida, Whitney Laboratory for Marine Bioscience, FL, USA.

*Correspondencia: neptali@ola.icmyl.unam.mx

Recibido: Noviembre 2023; Aceptado: Febrero 2024; Publicado: Mayo 2024.

RESUMEN

Objetivo. Analizar los cambios histológicos e inmunológicos en el robalo blanco del Pacífico *Centropomus viridis* infectados por primera vez y re infectados con el monogeneo *Rhabdosynochus viridisi*. **Materiales y métodos.** Se realizaron muestreos en tres tiempos (0, 1 y 2). Las alteraciones histológicas en las branquias se midieron con el grado de severidad y grado de cambio de tejido. Se midió la expresión de *il1B*, *il8*, *il10*, *il12*, *il17*, *igM*, *igT*, *ifn γ* , *tnfa*, *tbet*, *hsp70*, *foxp3a*, *stat4* y *cmip* en branquias y riñón cefálico mediante RT-qPCR. **Resultados.** La prevalencia de infección fue 100% en los peces desafiados. Durante la primera infección, la intensidad promedio fue de 152 parásitos por pez en el Tiempo 1 y 94 en el Tiempo 2. Durante la reinfección, fue de 367 en el Tiempo 1 y 129 en el Tiempo 2. Las branquias infectadas mostraron fusión de lamelas secundarias, hiperplasia, infiltración de células inflamatorias e incremento de células de cloro. Sólo la expresión de *cmip* en branquias en el Tiempo 1 fue significativamente mayor durante la reinfección que durante la primera infección, y la expresión de *il12 β* aumentó más de 100 veces en riñón cefálico en el Tiempo 2 en infecciones primarias. **Conclusiones.** El monogeneo *R. viridisi* puede causar daños histológicos en los peces. Se observó una reducción de la infección del Tiempo 1 al Tiempo 2, lo cual sugiere que los peces pueden combatir a *R. viridisi*; sin embargo, los análisis inmunológicos no proveen evidencia concreta de los posibles mecanismos.

Palabras clave: Acuicultura; Inmunología; Platyhelminthes; Monogenea; Ectoparásito; Centropomidae (Fuente: CAB).

ABSTRACT

Objective. To analyze histological and immunological changes in the Pacific white snook (PWS) *Centropomus viridis* during primary infection and re-infection with the monogenean *Rhabdosynochus viridisi*. **Materials and methods.** Samplings were performed at three timepoints (0,1, and 2). Histological alterations in gills were evaluated by the severity degree and the degree of tissue change. RT-qPCR assays were developed to investigate the expression of *il1B*, *il8*, *il10*, *il12*, *il17*, *igM*, *igT*,

Como citar (Vancouver).

López-Moreno D, Yazdi Z, Morales-Serna FN, Martínez-Brown JM, Ibarra-Castro L, García-Gasca A, et al. Respuesta histológica e inmune en el pez *Centropomus viridis* causadas por el parásito *Rhabdosynochus viridisi*. Rev MVZ Córdoba. 2024; 29(2):e3381. <https://doi.org/10.21897/rmvz.3381>



©El (los) autor (es) 2024. Este artículo se distribuye bajo los términos de la licencia internacional Creative Commons Attribution 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>), que permite a otros distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir de su obra de modo no comercial, siempre y cuando den crédito y licencien sus nuevas creaciones bajo las mismas condiciones.

ifny, *tnfa*, *tbet*, *hsp70*, *foxp3a*, *stat4*, and *cmip* in gills and head kidney. **Results.** The prevalence of infection was 100% in challenged fish. During the primary infection, the mean intensity was 152 parasites per fish at Time 1 and 94 at Time 2, while in the reinfection, it was 367 parasites at Time 1 and 129 at Time 2. Histological analysis of gills showed fusion of the secondary lamellae, hyperplasia, infiltration of mononuclear inflammatory cells, and increase of chloride cells in both primary infections and reinfections. Only the expression of *cmip* in gills at Time 1 was significantly higher in reinfections than in primary infections, and the expression of *il12β* showed a fold-change value >100 in head kidney at Time 2 in primary infections. **Conclusions.** The monogenean *R. viridisi* may cause histological alteration in its fish host. As showed by the decrease of the intensity of infection from Time 1 to Time 2, it seems that the PWS is able to combat *R. viridisi*; however, our immunological analysis did not reveal strong evidence of a possible mechanism.

Keywords: Aquaculture; Immunology; Platyhelminthes; Monogenea; Ectoparasite; Centropomidae (Source: CAB).

INTRODUCCIÓN

Los peces marinos conocidos comúnmente como robalos (*Centropomus*) son bastante valorados para el consumo humano y tienen potencial para la maricultura (1). En el noroeste de México, se han realizado diversos estudios para desarrollar la acuicultura del robalo blanco del Pacífico (PWS, por sus siglas en inglés), *Centropomus viridis*, a escala comercial (2). Sin embargo, las enfermedades infecciosas representan una amenaza importante, llegando a causar pérdidas económicas significativas debido al alimento que los peces desperdician por falta de apetito, costos de los tratamientos contra los patógenos y pérdidas directas asociadas con la muerte de los peces. Particularmente, una de las amenazas para el cultivo de PWS son las infecciones branquiales con el monogeneo *Rhabdosynochus viridisi* (Diplectanidae) (3,4). No obstante, el conocimiento de la patogénesis y la respuesta inmune es desconocido. Con la finalidad de tener un mejor entendimiento de la respuesta del PWS ante la primera infección y reinfección con *R. viridisi*, el objetivo del presente estudio fue analizar los cambios histológicos en las branquias y el nivel de expresión de diferentes genes relacionados con el sistema inmune tanto en las branquias como en el riñón cefálico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Declaración de ética. El experimento se realizó siguiendo las recomendaciones dadas por la Asociación Americana de Medicina Veterinaria para la eutanasia de animales (5), así como los criterios éticos del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD).

Experimento. Un grupo de peces (PWS) juveniles de 11 meses de edad y 61.5 ± 16.1 g se obtuvo de un mismo lote de desove del criadero de peces marinos del CIAD-Mazatlán. Estos peces se dividieron en tres grupos experimentales: control (sin infectar), primera infección y reinfección (Figura 1). Para cada grupo se usaron tres tanques de 400 L, cada tanque con 15 peces y flujo continuo de agua de mar filtrada (temperatura: $25 \pm 0.5^\circ\text{C}$, salinidad 35%, oxígeno disuelto: 5.2 ± 0.1 mg/L). Para infectar los peces, en cada tanque se depositaron ~6.000 huevos de *R. viridisi*, siguiendo los métodos descritos en estudios previos (3,6). Para esto, cinco peces (PWS) silvestres, capturados en aguas costeras de Mazatlán, fueron trasladados a las instalaciones del CIAD. Los huevos de los monogeneos se recolectaron con hilos de algodón y se transfirieron a los tanques de los grupos experimentales. La especie de monogeneo se identificó mediante sus características morfológicas (4).

Los peces para el grupo "reinfeción" se obtuvieron de la siguiente manera. Dos meses antes de iniciar el experimento, 55 peces del criadero fueron depositados en un tanque de 400 L e infectados con *R. viridisi* como se describió previamente. La infección fue confirmada al observar monogeneos en las branquias de cinco peces y también al detectar huevos nuevos en hilos colocados en el tanque. Entonces, los peces fueron tratados con tres baños consecutivos de formalina (200 $\mu\text{L/L}$ por 40 min, con un intervalo de 3 días, a $24 \pm 0.5^\circ\text{C}$) para eliminar a los monogeneos. Después, se dejaron transcurrir 25 días para permitir la recuperación de los peces antes de iniciar la reinfección.

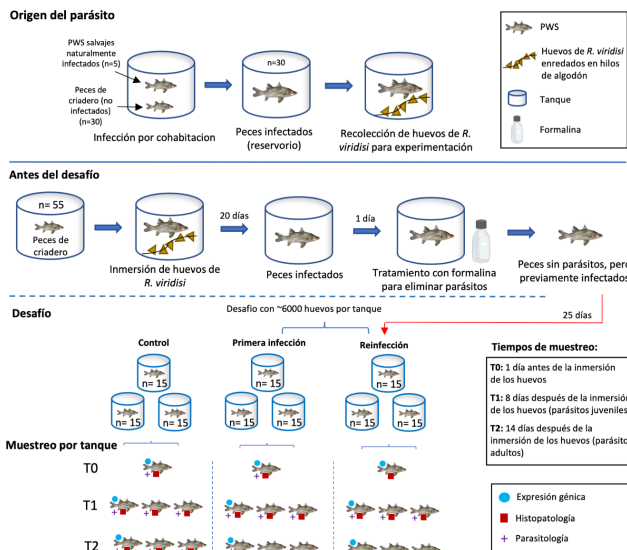


Figura 1. Esquema del diseño experimental implementado para infectar al robalo blanco del Pacífico *Centropomus viridis* (PWS) con el monogeneo *Rhabdosynochus viridis*.

Los muestreos se realizaron en tres tiempos (Figura 1). En el Tiempo 0 (un día antes de introducir los huevos en los tanques) se muestrearon tres peces de cada grupo. En el Tiempo 1 (ocho días después de introducir los huevos), el cual corresponde a la fase temprana de la infección, cuando los monogeneos están en su etapa juvenil, se muestrearon nueve peces por grupo. Finalmente, en el Tiempo 2 (14 días después de introducir los huevos), cuando los monogeneos alcanzaron su etapa adulta, se muestrearon otros nueve peces por grupo. En apego a recomendaciones éticas (5), los peces fueron anestesiados con MS-222 (Sigma-Aldrich, San Louis, MO, USA) a una concentración de 125 mg/L, neutralizado con bicarbonato de sodio (1:1), después fueron sacrificados por punción cerebral. Para los análisis histológicos y moleculares (Figura 2), se tomaron muestras de tejido del arco branquial más externo del lado derecho del pez. El riñón cefálico también fue destinado a análisis moleculares. Las muestras para los análisis moleculares se fijaron en RNAlater y preservaron a -70°C . Las muestras para histología se fijaron en formalina neutra al 10%. Los arcos branquiales restantes se examinaron bajo un estereomicroscopio para la cuantificación de monogeneos y determinar la intensidad promedio de la infección, la cual se comparó entre los grupos experimentales mediante la prueba t-bootstrap en el software QPweb (7). En el Tiempo 0 no se recolectaron muestras de branquias para análisis moleculares.



Figura 2. Esquema del procesamiento de muestras de branquias y riñón cefálico del robalo blanco del Pacífico *Centropomus viridis* infectado con el monogeneo *Rhabdosynochus viridis*.

Histología. Las branquias se procesaron de acuerdo a los métodos convencionales de histología, se tiñeron con Hematoxilina-Eosina/Floxina (HE) y observaron bajo un microscopio. Para cada pez, se calculó la severidad del daño SD (8) y el grado de cambio en el tejido DTC (9), con lo cual se calculó el índice histológico (Hi) con la siguiente ecuación $Hi = SD \times DTC$. Se establecieron cinco categorías para Hi : 0-10=órgano normal; 11-20 órgano ligeramente dañado; 21-50 órgano moderadamente dañado; 51-100 órgano severamente dañado; >100 órgano con daño irreparable. Cada muestra fue examinada por dos investigadores.

Expresión de genes. Con base en un transcriptoma de PWS disponible públicamente (GenBank, PRJNA497139) y usando el software Beacon designer™ (Premier Biosoft) y NCBI/Primer-BLAST, se diseñaron los primers de 14 genes del sistema inmune (*il1B*, *il8*, *il10*, *il12*, *il17*, *igM*, *igT*, *ifny*, *tnfa*, *tbet*, *hsp70*, *foxp3a*, *stat4* y *cmip*) y un gen de referencia (Tabla 1). La eficiencia de los primers se midió usando diluciones seriales 1:10 de ADNc. El ARN total se obtuvo con el kit RNeasy Plus Mini (Qiagen, Redwood City, CA, USA). La concentración y pureza (relación 260/280) del ARN se midió con un espectrofotómetro (ThermoFisher Scientific NanoDrop One/One^c). Se hizo una transcripción inversa de 1 μg del ARN obtenido en reacciones de 20 μg usando el kit QuantiTect Reverse Transcription (Qiagen, Redwood City, CA, USA). Se incluyeron controles sin transcripción inversa para detectar ADN genómico contaminante. Después de la transcripción inversa, las muestras se analizaron mediante qPCR.

Tabla 1. Secuencias de primers de genes del sistema inmune del robalo blanco del Pacífico *Centropomus viridis*.

Gen	Secuencia (5'-3')	Tamaño de amplicones (bp)
<i>ef1ab</i>	F: AGGTCATCATCCTGAACCACC	155
	R: GACGAACTTGGGGTTGCCTAAA	
<i>il1β</i>	F: ACCTGTCATGCCACAAGGAA	178
	R: ATGTACCAGTCAGGGAAGCG	
<i>il8</i>	F: GTCATCGTCACCGCCATAGT	157
	R: TGGCAGGAATCAGTTCCACC	
<i>il10</i>	F: CCAGCATGACTACTCGCTGT	86
	R: AGCACTGGTTGGGGTAGAGA	
<i>il12β</i>	F: ACCCAAGTTCCTGGAGCAGT	130
	R: TGAACCATCGGGTCTTTGT	
<i>igM</i>	F: CGACTTGGACTCTCCAGCAA	127
	R: TGTGCCTTTCCAGTAGTC	
<i>igT</i>	F: CTGGGCAGGTGTTGATTGTCA	176
	R: CATCATCATGCCAAGCGATCC	
<i>ifny</i>	F: ACGTCCGACAGGAATTGAA	88
	R: AATACCCTCGACCCGCTAGT	
<i>tnfa</i>	F: CAGCACAAATCCAAGGCAG	81
	R: CACTCCAGCCCTTTTCCGA	
<i>tbet</i>	F: GGACAACAAGAAGAGGAGAGTG	128
	R: AGTGGGTGTAGTAGCCATAGT	
<i>hsp70</i>	F: AGACATCAGCGACAACAAGAG	145
	R: TCTGGTGATGGAGGTGTAGAA	
<i>foxp3a</i>	F: AGCTCCAGGTTGTGAGAACG	153
	R: AGAGGGTGGCTATTGTGTGC	
<i>stat4</i>	F: TGCTTCGCTTTTGTGAGTTC	144
	R: GCTCGTTGTCACTCCTTTGG	
<i>cmip</i>	F: TGCAAGCACCCGCTTTATTG	233
	R: TGCTGTATCCAGCCTTCGTC	
<i>il17</i>	F: GCTGGCTTTACAGGCTTCCA	155
	R: ATAAGGTTTCCCTGTGCGCT	

La expresión de los genes se midió en relación al gen de referencia *ef1ab* en un equipo QuantStudio 5 Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Cada tubo PCR contenía 5 µL de ADNc, 1x SYBR Green Master Mix (ThermoFisher Scientific) y 0.2 µM de primers (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Las condiciones del RT-qPCR fueron las siguientes: 1 ciclo a 50°C por 2 min, 1 ciclo a 95°C por 10 min y 40 ciclos de amplificación a 95°C por 15 s e hibridación a 60°C por 1 min. La determinación de la curva de disociación para cada gen se realizó a 95°C por 15 s, 60°C por 1 min y 95°C por 15 s. En cada corrida se incluyeron controles negativos (sin muestra). La expresión relativa de los genes fue calculada con el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ y normalizada contra la expresión promedio del gen de referencia (10). Los tejidos de los peces control se usaron para calibrar todos los genes. Los niveles de expresión fueron comparados entre las muestras mediante un ANOVA de dos vías y la prueba a posteriori de Tukey. Para eso los datos se transformaron a log₁₀. Cada grupo

experimental tuvo una n = 3. Se consideraron diferencias significativas cuando p < 0.05. Se usó el software GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

RESULTADOS

Los peces control permanecieron libres de parásitos y sus branquias tuvieron una apariencia normal durante todo el experimento (Figura 3a), aunque en el Tiempo 2 se detectaron pocos casos (<10%) de epitelocistis (Figura 3b). En el Tiempo 0, no se encontraron parásitos en todos los peces, mientras que en el Tiempo 1 y Tiempo 2 la prevalencia de la infección fue 100% en los peces desafiados con el parásito *R. viridisi*.

En los peces infectados por primera vez, la intensidad promedio fue de 152 parásitos por pez en el Tiempo 1 a 94 parásitos por pez en el Tiempo 2, aunque esta diferencia no fue significativa (P > 0.05); en sus branquias hubo fusión de lamelas secundarias, hiperplasia, infiltrado inflamatorio mononuclear (Figura 3c) e incremento de células de cloro, dando como resultado $Hi = 17$ en el Tiempo 1 y $Hi = 30$ en el Tiempo 2. No se observó daño en los sitios donde los monogeneos fueron encontrados (Figura 3d), aunque en algunos casos se observaron los ganchos dentro del filamento branquial (señalado en la Figura 3e). En los peces re infectados, la intensidad promedio fue 367 parásitos por pez en el Tiempo 1 y disminuyó significativamente a 129 parásitos por pez en el Tiempo 2 (p < 0.05); sus branquias tuvieron las mismas alteraciones observadas en los peces infectados por primera vez, pero en mayor severidad (Figura 3f), indicado por $Hi = 24$ en el Tiempo 1 y $Hi = 58$ en el Tiempo 2.

El nivel de expresión de todos los genes no varió significativamente entre los peces control y los peces infectados (Figuras 4 y 5). La expresión de *cmip* fue significativamente más alta en las branquias de los peces re infectados que en las branquias de los peces infectados por primera vez en el Tiempo 1 (p < 0.05). Vale la pena señalar que, aunque no fue un cambio significativo, el nivel de expresión de *il12β* en el riñón cefálico aumentó más de 100 veces en los peces infectados por primera vez en el Tiempo 2, mientras que los otros genes mostraron una magnitud de cambio mucho menor, generalmente < 2.

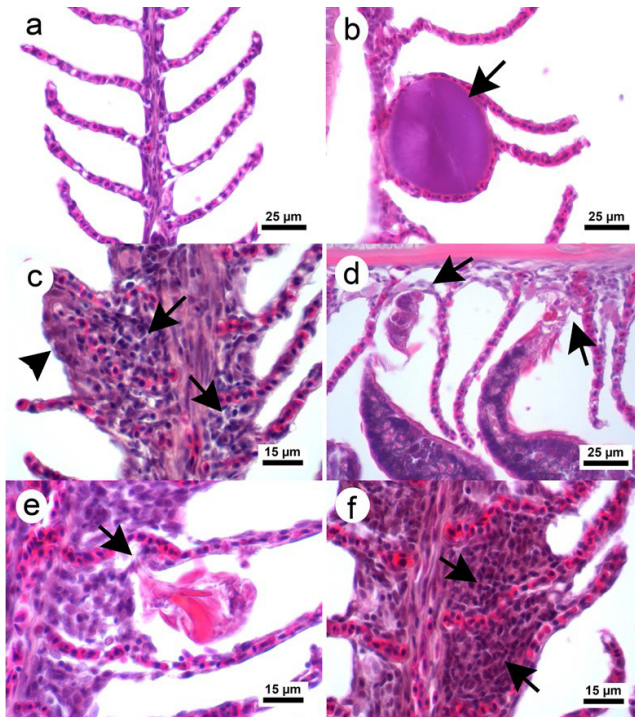


Figura 3. Fotografías de las branquias del robalo blanco del Pacífico *Centropomus viridis* infectado con *Rhabdosynochus viridisi*. a. Apariencia normal en los peces control (no infectados); b. Quiste de epiteliocistis, señalado con una flecha, entre lamelas secundarias; c. Infiltrado inflamatorio mononuclear (flechas) e hiperplasia (cabeza de flecha) en peces infectados por primera vez; d. Monogeneos anclados a la lamela principal (flechas); e. Gancho del monogeneo dentro de la lamela (flecha); f. Infiltrado inflamatorio mononuclear severo en peces reinfectados.

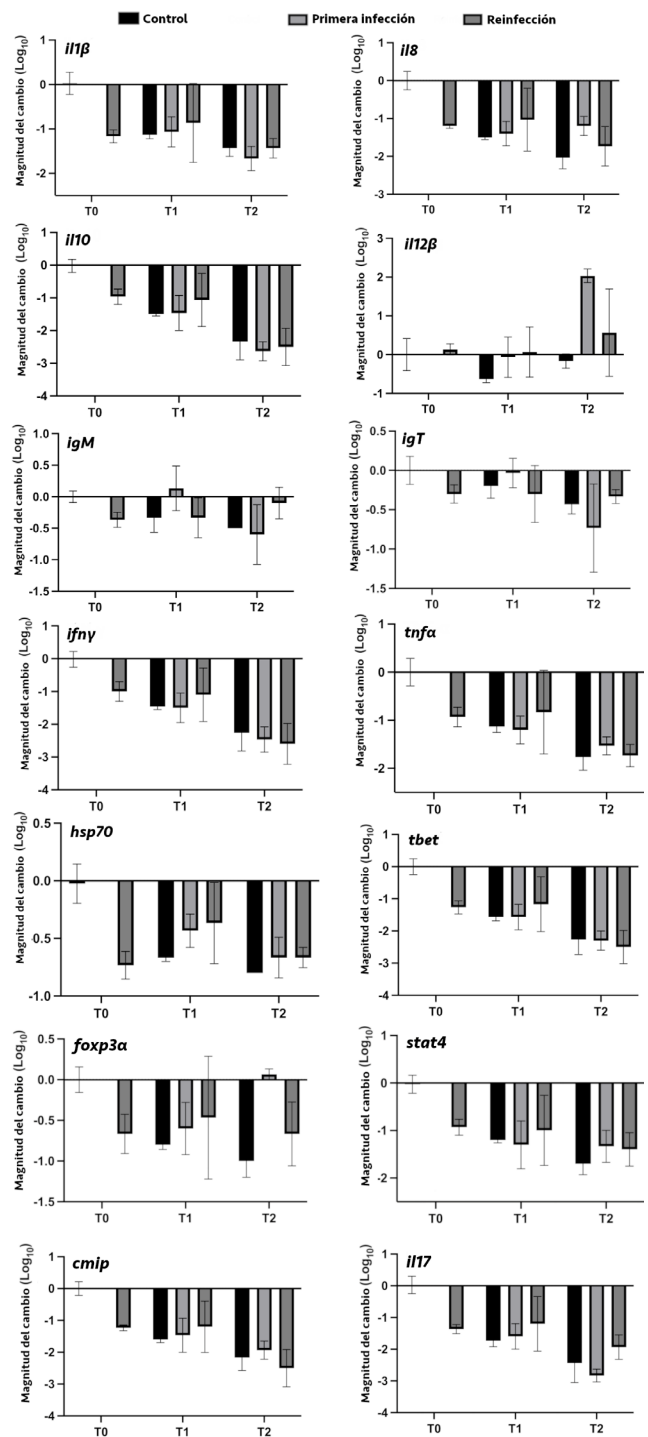


Figura 4. Expresión de genes relacionados al sistema inmune en el riñón cefálico del robalo blanco del Pacífico *Centropomus viridis* infectado por primera vez y reinfectado con el monogeneo *Rhabdosynochus viridisi*. Las mediciones se hicieron en tres tiempos (T0, T1 y T2).

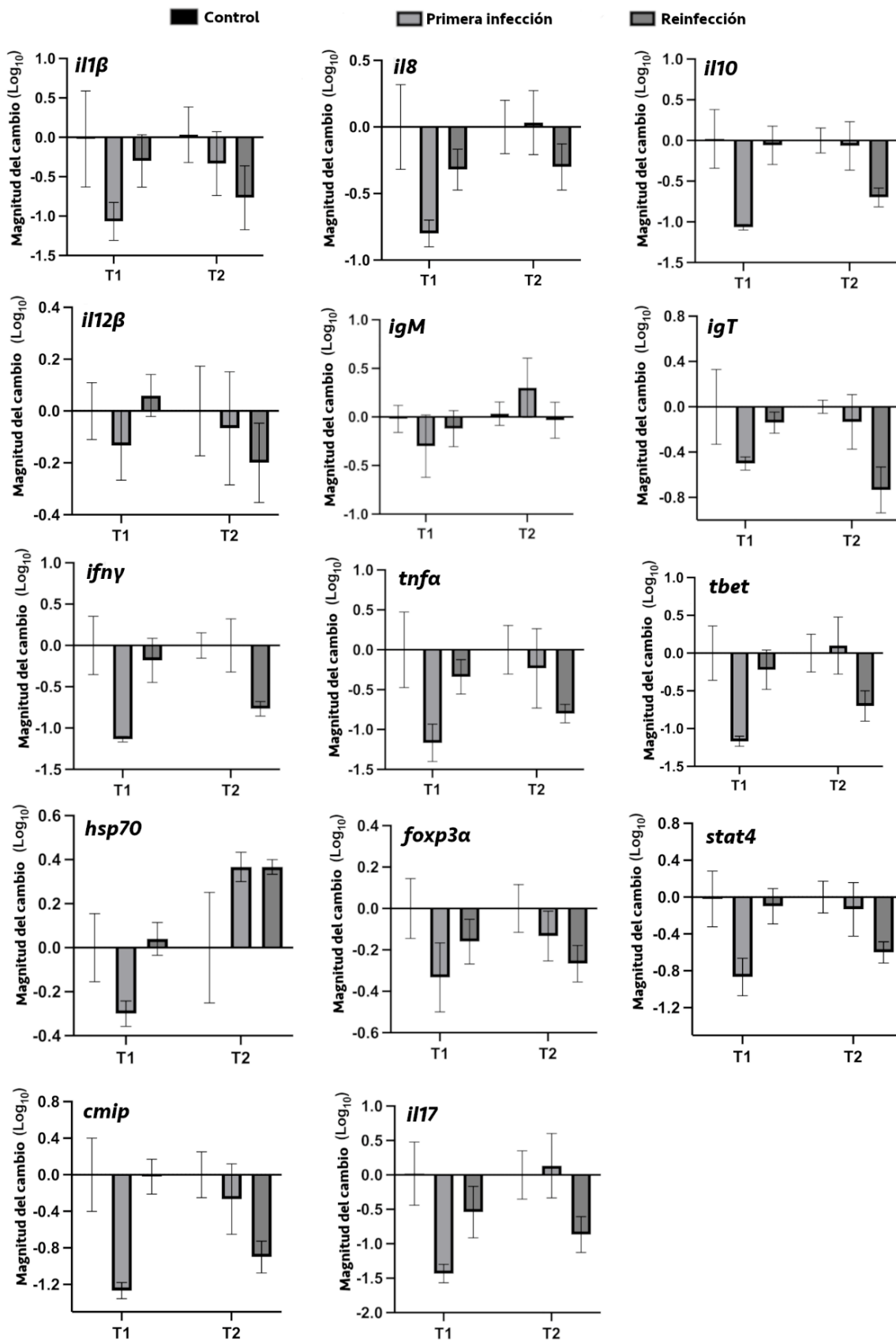


Figura 5. Expresión de genes relacionados al sistema inmune en branquias del robalo blanco del Pacífico *Centropomus viridis* infectado por primera vez y reinfectado con el monogeneo *Rhabdosynochus viridisi*. Las mediciones se hicieron en dos tiempos (T1 y T2).

DISCUSIÓN

Las alteraciones en el tejido de las branquias de los peces (PWS) causadas por el monogeneo *R. viridisi* son parecidas a las causadas por otro monogeneo parecido (*Diplectanum sciaenae*, Diplectanidae) en la acuicultura de la corvina *Argyrosomus regius*, en el Mediterráneo (11). En el presente estudio, el sitio de infección donde se encontraron los monogeneos no mostró alteraciones visibles, posiblemente porque estos parásitos se desplazan a lo largo del filamento branquial, dejando el sitio afectado para llegar a otro sitio no alterado donde la respuesta inmune del pez aún no es tan fuerte para combatir al parásito (12).

La disminución de la carga parasitaria observada en los peces re infectados en el Tiempo 2 sugiere la activación de un mecanismo de defensa que permite la expulsión más rápida de los monogeneos, posiblemente debido a la inmunidad adaptativa (13, 14). Un estudio previo encontró, mediante un análisis *in silico*, que 63% de las proteínas excretoras/secretoras de *R. viridisi* son antígenos potenciales que podrían ser presentados a los receptores de células T y ser reconocidos por los anticuerpos del hospedero (15). Entonces, es posible que los peces reacciones específicamente hacia esos antígenos y entre en función una memoria inmunológica, lo cual es un paso importante hacia la respuesta adaptativa (16).

El presente estudio es el primero en abordar la respuesta inmune del robalo blanco del Pacífico ante infecciones por el monogeneo *R. viridisi*. Esta respuesta se evaluó a nivel local (branquias) y sistémico (riñón cefálico). Sin embargo, teniendo a los peces control como punto de comparación, no se encontraron diferencias significativas en el nivel de expresión de todos los genes en los peces infectados. Una comparación entre peces infectados por primera vez y re infectados reveló una posible activación del sistema inmune adaptativo mediante la regulación de *cmip*, lo cual podría relacionarse con la disminución de la intensidad de la infección en el Tiempo 2. La expresión de *cmip* no ha sido investigada en peces desafiados con parásitos, salvo por un estudio en el pez espinoso *Gasterosteus aculeatus* infectado con el monogeneo *Gyrodactylus*, en el cual no se detectaron diferencias en la expresión de *cmip* (17).

El nivel de expresión alto de *il12 β* en el riñón cefálico en el Tiempo 2 concuerda con los resultados de Pérez-Cordón et al., quienes observaron que, en peces infectados con mixozoos, *il12 β* alcanzó los niveles más altos de expresión comparado con otros 18 genes del grupo de las interleucinas (18). Asimismo, en peces infectados con bacterias, Zhang et al. observaron que *il12 β* se expresa en varios tejidos, pero principalmente en el riñón (19). En otro estudio de peces infectados con monogeneos, Tu et al. observaron que la expresión de *il12 β* en bazo, hígado y riñón cefálico fue inicialmente baja, pero después aumentó significativamente durante la fase de eliminación de la infección (20). Estos resultados sugieren que *il12 β* , la cual es una citocina proinflamatoria conocida por su importancia contra patógenos intracelulares, podría tener una función relevante para eliminar las infecciones por monogeneos.

En conclusión, el monogeneo *R. viridisi* puede causar daños en las branquias de su hospedero, el robalo *C. viridis*. El nivel de infección puede disminuir del Tiempo 1 al Tiempo 2, lo cual sugiere que el pez puede combatir a este parásito; sin embargo, el análisis inmunológico no permitió esclarecer un posible mecanismo.

Declaración de conflicto de interés

Los autores declaran que no tienen conflicto de intereses en relación a esta publicación.

Financiamiento

Este estudio fue financiado por la colaboración entre la Universidad de California y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (UC MEXUS-CONACYT). Además, se recibió apoyo del proyecto CONACYT Ciencia de Frontera FORDECYT-PRONACES No. 1715616.

Agradecimientos

A Rosa M. Medina Guerrero, Rubí Hernández Cornejo y Eunice Barraza Ortega (CIAD-Mazatlán) por su ayuda en el trabajo de laboratorio. A Luis Ochoa Bohorquez por su ayuda en la crianza de peces. Dania López-Moreno recibió una beca para estudios de maestría por parte de CONACYT.

REFERENCIAS

1. Alvarez-Lajonchère L, Tsuzuki MY. A review of methods for *Centropomus* spp. (snooks) aquaculture and recommendations for the establishment of their culture in Latin America. *Aquac Res.* 2008; 39(7):684–700. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.01921.x>
2. Baldini G, Santamaría-Miranda A, Martínez-Brown JM, Ibarra-Castro L. Technical-economic viability of white snook *Centropomus viridis* culture in floating cages in a coastal lagoon in northwestern Mexico. *Aquac Rep.* 2022; 23:101048. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2022.101048>
3. Morales-Serna FN, López-Moreno DG, Medina-Guerrero RM, Abad-Rosales SM, Martínez-Brown JM, Ibarra-Castro L, Fajer-Avila EJ. Toxicity of formalin for juvenile *Centropomus viridis* and in vitro efficacy against the parasite *Rhabdosynochus* sp. (Monogenea: Diplectanidae). *J Appl Ichthyol.* 2020; 36(5):740–744. <https://doi.org/10.1111/jai.14077>
4. Caña-Bozada V, Llera-Herrera R, Fajer-Avila EJ, Morales-Serna FN. Mitochondrial genome of *Rhabdosynochus viridisi* (Monogenea: Diplectanidae), a parasite of Pacific white snook *Centropomus viridis*. *J Helminthol.* 2021; 95:e21:1–5. <https://doi.org/10.1017/S0022149X21000146>
5. AVMA. Guidelines for the euthanasia of animals: 2020 edition. Schaumburg, IL: American Veterinary Medical Association. 2020.
6. Morales-Serna FN, Martínez-Brown JM, Avalos-Soriano A, Sarmiento-Vásquez S, Hernández-Inda ZL, Medina-Guerrero RM, Fajer-Ávila EJ, Ibarra-Castro L. The efficacy of geraniol and β -citronellol against freshwater and marine monogeneans. *J Aquat Anim Health.* 2020; 32(3):127–132. <https://doi.org/10.1002/aah.10109>
7. Reiczigel J, Marozzi M, Fábíán I, Rózsa L. Biostatistics for parasitologists – a primer to quantitative parasitology. *Trends Parasitol.* 2019; 35(4):277–281. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.01.003>
8. Lightner DV. A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA. 1996.
9. Poleksić V, Mitrović-Tutundžić V. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. In: Müller R, Lloyd R, editors. *Sublethal and Chronic Effects of Pollutants on Freshwater Fish.* Oxford: New Books; 1994.
10. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods.* 2001; 25(4):402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
11. Andree KB, Roque A, Duncan N, Gisbert E, Estevez A, Tsertou MI, Katharios P. *Diplectanum sciaenae* (Van Beneden & Hesse, 1863) (Monogenea) infecting meagre, *Argyrosomus regius* (Asso, 1801) broodstock in Catalonia, Spain. A case report. *Vet Parasitol Reg Stud Reports.* 2015; 1–2:75–79. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2016.02.006>
12. Sitjà-Bobadilla A. Living off a fish: a trade-off between parasites and the immune system. *Fish Shellfish Immunol.* 2008; 25(4):358–372. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.03.018>
13. Hirazawa N, Hagiwara H, Takano R, Noguchi M, Narita M. Assessment of acquired protection levels against the parasite *Neobenedenia girellae* (Monogenea) between body surface sites including fins of amberjack *Seriola dumerili* (Carangidae) and the skin in response to the parasite infection. *Aquaculture.* 2011; 310(3–4):252–258. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.10.029>
14. Zhi T, Huang C, Sun R, Zheng Y, Chen J, Xu X, et al. Mucosal immune response of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* during *Gyrodactylus cichlidarum* infection. *Fish Shellfish Immunol.* 2020; 106:21–27. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.07.025>

15. Mirabent-Casals M, Caña-Bozada VH, Morales-Serna FN, García-Gasca A. Predicted secretome of the monogenean parasite *Rhabdosynochus viridisi*: hypothetical molecular mechanisms for host-parasite interactions. *Parasitologia*. 2023; 3:33–45. <https://doi.org/10.3390/parasitologia3010004>
16. Buchmann K. Antiparasitic immune responses. In Buchmann K, Secombes CJ, editors. *Principles of Fish Immunology*. Berlin: Springer. 2022. https://doi.org/10.1007/978-3-030-85420-1_17
17. Robertson S, Bradley JE, MacColl ADC. No evidence of local adaptation of immune responses to *Gyrodactylus* in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). *Fish Shellfish Immunol*. 2017; 60:275–281. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.11.058>
18. Pérez-Cordón G, Estensoro I, Benedito-Palos L, Caldach-Giner JA, Sitjà-Bobadilla A, Pérez-Sánchez J. Interleukin gene expression is strongly modulated at the local level in a fish–parasite model. *Fish Shellfish Immunol*. 2014; 37(2):201–208. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.01.022>
19. Zhang L, Zhang BC, Hu YH. Rock bream (*Oplegnathus fasciatus*) IL-12p40: Identification, expression, and effect on bacterial infection. *Fish Shellfish Immunol*. 2014; 39(2):312–320. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.05.026>
20. Tu X, Qi X, Huang A, Ling F, Wang G. Cytokine gene expression profiles in goldfish (*Carassius auratus*) during *Gyrodactylus kobayashii* infection. *Fish Shellfish Immunol*. 2019; 86:116–124. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.11.035>