

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

EVALUACION DE LA EFICACIA ANTICOCCIDIANA DE LOS
EXTRACTOS DE CURCUMINA Y NARINGENINA ADMINISTRADOS
A BORREGOS INFECTADOS NATURALMENTE CON COCCIDIAS
DEL GENERO *Eimeria* spp

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA

AGUSTIN PEREZ FONSECA

Asesores:

MVZ Yazmín Alcalá Canto

MVZ Aldo Bruno Alberti Navarro

México, D.F.

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedicatoria

**A Isabel, por haber llegado, por haberte quedado y por nunca haberte ido;
por todo tu amor, apoyo, comprensión y consejos**

Te amo.

A mis padres, que tanto han esperado este momento.

Agradecimientos

A mi Honorable jurado:

MVZ Héctor Salvador Sumano López

MVZ Blanca Cervantes Odriozola

MVZ Juan Antonio Figueroa Castillo

MVZ Yazmín Alcalá Canto

MVZ Carlos Gutiérrez Olvera

A la MVZ Yazmín Alcalá Canto, por su amistad, paciencia y consejo para la realización de este trabajo.

Al MVZ Aldo Bruno Alberti Navarro por su apoyo y amistad.

Al proyecto PAPIIT IN215209 “Potencial inmunoestimulante de productos naturales en la coccidiosis en rumiantes”.

A los MVZ Alejandro Besné Mérida, Juan Antonio Figueroa, Alberto Ramírez Guadarrama y Evangelina Romero Callejas, por formarme y compartir conmigo todos sus conocimientos.

A la MVZ Yisef Cortes Martínez por su ayuda en la realización de este trabajo y su incondicional amistad.

A todos los que siempre han estado ahí durante este largo trecho, apoyándome y brindándome su amistad y compañía; no necesito nombrarlos, pues saben quienes son.

CONTENIDO

RESUMEN

INTRODUCCION

JUSTIFICACION

OBJETIVO E HIPOTESIS

MATERIAL Y METODOS

RESULTADOS

DISCUSION

CONCLUSIONES

REFERENCIAS

RESUMEN

PÉREZ FONSECA AGUSTÍN. Evaluación de la eficacia anticoccidiana de los extractos de curcumina y naringenina administrados a borregos infectados naturalmente con coccidias del género *Eimeria* spp. (Bajo la dirección de la MVZ Yazmín Alcalá Canto y el MVZ Aldo Bruno Alberti Navarro)

En este trabajo se evaluaron los efectos anticoccidianos de la curcumina y la naringenina administrados oralmente a ovinos con una infección natural con coccidias del género *Eimeria* spp. Dieciocho ovinos fueron asignados a tres grupos (n=6). El grupo A fungió como testigo no tratado. El grupo B recibió 30 mg/kg de curcumina y el grupo C 4 mg/kg de naringenina. Se obtuvieron muestras fecales de todos los ovinos cada siete días durante tres semanas y se examinaron mediante las técnicas de flotación y McMaster. Los ovinos tratados con curcumina presentaron una reducción significativa en la excreción de ooquistes fecales ($p < 0.01$) a los 14 (82.28%) y 21 (98.14%) días post-tratamiento en relación con el grupo testigo. Del mismo modo, la reducción en la eliminación de ooquistes de *Eimeria* en las heces fue de 98.14% en el grupo que ingirió naringenina a los 21 días post-tratamiento en contraste con los testigos no tratados. Los resultados permiten sugerir el desarrollo de más estudios *in vivo* e *in vitro* para recomendar la inclusión de estos compuestos naturales como parte de la dieta de los ovinos a fin de prevenir o controlar enfermedades intestinales como la coccidiosis.

Introducción

Los agentes causales de la eimeriosis o coccidiosis en rumiantes son organismos que se desarrollan dentro de las células intestinales de los huéspedes. Debido a que el desarrollo intracelular provoca la destrucción de las células en las que se multiplican se les considera parásitos, aunque no lleguen a provocar la enfermedad. La mayoría de las especies que infectan rumiantes no provocan signos, a pesar de que se encuentren en cantidades elevadas cuando se realizan análisis diagnósticos estándar. Consecuentemente, es importante diferenciar las especies patógenas de las de menor importancia clínica (1). Los organismos causales de la coccidiosis en rumiantes se agrupan taxonómicamente dentro del género *Eimeria*, perteneciente a la familia Eimeriidae del phylum Apicomplexa. En general, todas las especies de *Eimeria* que infectan rumiantes completan su desarrollo y reproducción en el tracto digestivo de huéspedes específicos y genéticamente compatibles (2). Las especies de *Eimeria* que comúnmente infectan rumiantes son: *E. bovis*, *E. auburnensis*, *E. alabamensis*, *E. zuernii*, *E. ellipsoidalis* en bovinos; *E. faurei*, *E. intricata*, *E. ahsata*, *E. ovina*, *E. crandallis*, *E. ovinoidalis* en ovinos; así como *E. arloingi*, *E. ninakohlyakimovae* y *E. caprina* en caprinos (3).

Ciclo Biológico

Las especies de *Eimeria* en rumiantes se desarrollan mediante un ciclo biológico directo de 3 estadios. Dentro de las células intestinales del huésped se desarrollan dos fases que se conocen como *esquizogonia* o *merogonia* y *gamogonia* o *gametogonia*. El tercer estadio, la esporogonia se lleva a cabo fuera del cuerpo del

huésped en un ooquiste que protege a los esporozoitos enquistados e infecciosos de las condiciones ambientales letales (4). La merogonia involucra dos o más ciclos en los que los merozoitos se reproducen por fisión múltiple. Después de la maduración de los merontes, la célula parasitada del huésped se rompe y libera los merozoitos que penetran a otras células y el ciclo se repite o progresa hacia gamogonia. La gamogonia es el estadio sexual del desarrollo y la fase terminal en el huésped. El merozoito entra a las células y produce macrogamontes o microgamontes que maduran a macrogametos y microgametos, respectivamente. Se fertiliza el macrogameto y produce un cigoto, alrededor del cual se forma una pared quística y se conoce como ooquiste, el cual se excreta del huésped con la materia fecal. La esporogonia consiste en la maduración del ooquiste al exponerse a temperatura, oxígeno y humedad favorables. El ooquiste esporulado e infeccioso contiene 4 esporoquistes que en el interior presentan cada uno 2 esporozoitos. La infección del huésped comienza cuando las heces que contienen ooquistes infecciosos son ingeridas con agua o alimento contaminados. Se liberan los esporozoitos y se inicia la fase asexual del desarrollo. El ciclo biológico completo dura aproximadamente de 14 a 21 días, dependiendo de la especie de *Eimeria* y del huésped (5).

Patogenia y lesiones

La severidad de la infección por *Eimeria* en rumiantes depende de dos factores importantes: los parásitos como tales y la reacción del huésped hacia ellos. Ambos causan cambios estructurales que reducen la función de los órganos afectados y desencadenan una serie de cambios fisiológicos, tales como hiperplasia, pérdida de la superficie celular, pérdida de células de la cripta intestinal, reducción de la

absorción de nutrientes, ruptura de los vasos sanguíneos, diarrea, deshidratación y en ocasiones la muerte, dependiendo del estado fisiológico e inmunológico del huésped (6, 7).

Signos clínicos

Se ha establecido que *E. ovina* puede ser muy patógena (3), aunque hay especies que se consideran prácticamente inofensivas, entre ellas, *E. parva* (7). Los brotes de coccidiosis generalmente son agudos y se caracterizan por una morbilidad moderada y baja mortalidad. Se observa una diarrea acuosa verde o amarillenta con olor fétido y ocasionalmente con sangre (8). Los animales muestran dolor abdominal, anemia macrocítica hipocrómica, pérdida del apetito, deshidratación, tenesmo, debilidad y pérdida de peso. La depresión, inactividad y recumbencia también son evidentes. La eimeriosis puede presentarse junto con miasis, diarrea bacteriana y septicemia. Los animales recién nacidos son relativamente resistentes a la infección y su susceptibilidad se incrementa a las cuatro semanas de edad por la condición de estrés que desarrollan los animales al ser destetados, pues esto tiene un efecto depresor sobre la respuesta inmune que debe ser considerada en la presentación de enfermedades en el periodo de adaptación (9).

Diagnóstico

Los animales jóvenes que comienzan a mostrar signos como diarrea, anemia, deshidratación, debilidad, anorexia y emaciación deben ser examinados para diagnosticar eimeriosis. El examen microscópico de las heces es el método de diagnóstico más efectivo desde el punto de vista costo-beneficio, así como el más sencillo y directo, aunque también se han desarrollado métodos serológicos analíticos mediante inmunoensayos (3, 10). El análisis fecal habitual involucra la

concentración de los ooquistes de las heces mediante el método de flotación con azúcar o sal, seguido de la identificación de las especies mediante la diferenciación microscópica de los ooquistes concentrados. La cuantificación de la carga parasitaria puede realizarse mediante el conteo de ooquistes en la cámara de McMaster (11, 12). Las descargas diarreicas, generalmente sin sangre, causadas por virus, bacterias u otras etiologías a veces contienen ooquistes en cantidades moderadas o elevadas de especies no patógenas de *Eimeria*. En estas situaciones, la identificación de las coccidias en especímenes fecales es esencial para un diagnóstico exacto del problema clínico que podría no estar relacionado con los protozoarios (13). Los ooquistes son más numerosos durante el periodo temprano de patencia (inicio de excreción de ooquistes) y permanecen elevados durante 3 a 7 días, después de los cuales se completa el ciclo endógeno y las cuentas de ooquistes fecales caen a cero (14). Se sugiere que las heces deben ser colectadas de los animales al inicio de la fase diarreica, en lugar de una semana o dos después del inicio de la fase clínica (8). Si el huésped sobrevive a la infección clínica y comienza a recuperarse, las infecciones subclínicas no comenzarán hasta semanas o meses después. (5). Ocasionalmente, no llegan a encontrarse ooquistes en animales con infecciones patentes. En estos casos el tejido excretado y los fragmentos de fibrina deben examinarse en húmedo a través de microscopía fotónica, o bien, deben revisarse los raspados tisulares de la mucosa intestinal de un animal muerto (5).

Epidemiología

Para que la coccidiosis se presente se requieren, obligadamente, tres factores:

a. Que exista una humedad relativa elevada. Se necesita alrededor de un 75% de humedad relativa microambiental que favorezca la supervivencia y maduración del protozoario. La coccidiosis es más frecuente en la época de lluvias dada la alta humedad prevaleciente.

b. La presencia de fases infectantes del protozoario (ooquistes maduros). El parásito es eliminado al exterior por medio del excremento de los animales, por lo tanto, cuando hay una excesiva acumulación de materia fecal, se favorece la contaminación de alimentos y agua de bebida, con la consecuente presentación de la enfermedad (2).

c. La coccidiosis ocurre en los corderos desde la lactación hasta después del destete (15). La razón de que solo en los animales jóvenes se presente la coccidiosis, obedece a la respuesta inmune ante la presencia del parásito, la cual está más desarrollada en animales mayores. Otras circunstancias asociadas a los tres factores citados son por ejemplo, el encierro nocturno, que es un manejo muy generalizado en México que consiste en un pastoreo diurno y el alojamiento de los animales por la tarde y noche (9), en corrales muy estrechos y carentes de ventilación. El resultado de esto es el hacinamiento de los animales, incremento de la humedad y una mayor cantidad de materia fecal acumulada. Por otro lado, hay mezcla de animales de diversas edades, favoreciendo que los adultos contaminen el ambiente de los más jóvenes.

Tratamiento y control

El tratamiento de casos aislados de coccidiosis plenamente desarrollada es paleativo porque en el momento en que los ooquistes se detectan en las heces no existe ningún fármaco capaz de combatir la población de coccidias que afectan al huésped. El control de la coccidiosis en poblaciones de animales susceptibles es una propuesta muy difícil, por lo que se han depositado grandes esperanzas en los productos administrados con fines profilácticos. El objetivo de la profilaxis anticoccidiana es proporcionar un nivel de protección suficiente al animal expuesto para permitir que desarrolle inmunidad propia sin padecer la enfermedad. Los fármacos reducen la magnitud del contagio y por lo tanto, previenen la coccidiosis; no impiden la infección. Un exceso de contaminación del entorno con ooquistes y lo que es más importante, un exceso de estrés sobre el huésped, son circunstancias que no se pueden combatir ni siquiera con el mejor de los medicamentos (16). Sea cual sea el agente químico escogido, el control eficaz de la coccidiosis requiere que el contacto de los rumiantes con los ooquistes y las condiciones estresantes sean mínimos. Se requiere que exista una disponibilidad adecuada de espacio para los animales, comederos limpios, aire puro en abundancia y suelos secos. No deben mezclarse animales de distinta edad o tamaño en el mismo corral. En los ovinos están aprobados el decoquinato, lasalocid y sulfaquinoxalina, así como el toltrazuril (3).

Etnofarmacología

Se estima que existen alrededor de 250,000 a 500,000 especies de plantas en la Tierra. Un porcentaje relativamente bajo (1-10%) han sido utilizadas como alimento tanto por humanos como por animales. En nuestro país las comunidades

no urbanizadas han utilizado las plantas con propósitos medicinales. Actualmente la etnofarmacología o etnobotánica, disciplina que tiene como objetivo utilizar el conocimiento adquirido por comunidades indígenas o nativas sobre las plantas, ha surgido como una reacción contra las prácticas medicinales invasivas y tóxicas, ya que el uso excesivo de productos químicos puede ser peligroso e inefectivo (17). La medicina está volviéndose altamente receptiva al uso de antimicrobianos y otros productos derivados de plantas, debido a que el uso de antibióticos tradicionales sintéticos se está volviendo poco efectivo en virtud de la presentación de resistencias y el abuso de los mismos. Otro factor que ha influido en el interés hacia el uso de plantas medicinales en los últimos 20 años ha sido la elevada tasa de extinción de especies de plantas, de tal modo que los químicos y microbiólogos que utilizan productos naturales han declarado que las estructuras fitoquímicas potencialmente útiles que podrían ser utilizadas están en riesgo de perderse (18), por lo que el impulso de la etnofarmacología podría ayudar a recuperar plantas nativas con usos potenciales en la medicina. Las plantas tienen una capacidad casi ilimitada de sintetizar sustancias aromáticas, la mayoría de las cuales son fenoles o sus derivados con el oxígeno sustituido. En muchos casos, estas sustancias sirven como mecanismos de defensa de las plantas contra la predación por microorganismos, insectos y herbívoros. Algunos, tales como los terpenoides, les confieren su olor, otros (quinonas y taninos) son responsables del pigmento de las plantas. Muchos compuestos les dan el sabor, por ejemplo, el terpenoide capsaicina de los chiles, y algunas de las hierbas y especias usadas para cocinar proporcionan compuestos medicinales útiles, como los que se describirán a continuación (17).

Flavonoides

Los flavonoides son un grupo grande de compuestos polifenólicos que poseen una estructura común benzo- γ -pirona. Son unos de los compuestos más importantes presentes en los vegetales, especialmente en los del género *Citrus*. Se han identificado más de 8,000 compuestos con una estructura flavonoide (19). Existen cuatro tipos de flavonoides (flavanonas, flavonas, flavonoles y antocianinas) en *Citrus*. En este género, las flavanonas se acumulan en mayor cantidad que las flavonas. La concentración de estos compuestos depende de la edad de la planta y los niveles más elevados se detectan en los tejidos que tienen divisiones celulares marcadas. Gran parte de la actividad de los flavonoides tiene lugar sobre las células endoteliales, por lo que gran parte de la investigación que se ha realizado sobre las flavanonas de *Citrus* ha sido estudiando su actividad sobre la inflamación (20). La evidencia reciente resalta el papel benéfico de una nutrición adecuada en el control de la inflamación, incluyendo sus efectos inhibitorios sobre los mediadores de la inflamación, tales como las citocinas (21). En estudios *in vitro* se ha demostrado la capacidad que tienen los flavonoides para captar los radicales libres y por ende, ayudar en eventos degenerativos que involucran radicales de oxígeno (19). En los últimos años se ha sustentado la idea de que ciertos flavonoides son moduladores de la expresión de genes pro-inflamatorios, favoreciendo la atenuación de la respuesta inflamatoria. Se ha demostrado que los flavonoides inhiben la producción de óxido nítrico en respuesta al estímulo inflamatorio (20). Los mecanismos celulares de los flavonoides que modulan la expresión génica se han estudiado recientemente. Por ejemplo, las cinasas

proteicas activadas por mitógenos (MAPK) son una familia de cinasas que conectan la inflamación con respuestas intracelulares como la expresión génica. Una de estas proteínas, la p38-MAPK regula un gran número de genes de citocinas y proteínas *in vitro*, incluyendo el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), IL-6, IL-10 y la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), una proteína citoplásmica responsable de la formación de óxido nítrico (NO) en los macrófagos. La inhibición de la p38-MAPK resulta en una supresión de los mediadores inflamatorios, por lo que esta cinasa es un blanco para la producción de productos anti-inflamatorios. Los flavonoides han demostrado propiedades anti-inflamatorias potentes al inhibir a la enzima MAPK y por lo tanto, la expresión del TNF- α (20). El inhibidor de MAPK PD98059 comparte una homología estructural con los flavonoides (22). Asimismo, se ha comprobado la actividad de los flavonoides como antiprotozoarios, principalmente contra *Trypanosoma*, (23) *Cryptosporidium parvum*, *Leishmania* y *Plasmodium falciparum* (24). Existe evidencia que indica que los flavonoides suprimen el desarrollo de algunos estadios de vida de los protozoarios al inhibir factores que protegen a los parásitos de los efectos de la respuesta inmune del huésped. Por ejemplo, estimulan la producción de citocinas protectoras para el huésped. Asimismo, se ha demostrado la capacidad de estos compuestos para inducir la apoptosis de los protozoarios parásitos (24).

Existen estudios epidemiológicos que indican que el consumo regular de frutos *Citrus* está asociado con un riesgo reducido de enfermedades cardíacas coronarias, patologías inflamatorias y progresión de tumores. Los flavonoides de *Citrus* inhiben eventos clave en el proceso angiogénico, tales como la proliferación

y migración de células endoteliales (19). Otra actividad de los flavonoides es la de proteger las neuronas contra el daño inducido por neurotoxinas. Existe un amplio rango de flavonoides, entre los que se mencionan la naringenina, hesperedina, catequina, epicatequina, cianidina, wogonina, bacaleina, quercetina, genisteina y pelargonidina (22). La naringenina (4',5,7-trihydroxiflavanona) es una flavanona predominante en *Citrus* y tiene un rango amplio de actividades farmacológicas. Además de su actividad antifibrogénica, se le ha asociado con la supresión de las metástasis en diversos tipos de cáncer (25). La naringenina está presente en las cáscaras de las naranjas y toronjas y tiene un potencial mayor para ingresar a la célula que otros flavonoides, lo que contribuye a su mayor actividad anti-inflamatoria con respecto a los otros compuestos con dosis menores (19, 22). Es importante señalar que la naringenina se ha encontrado en el cerebro después de la ingestión oral, por lo que ejerce potencialmente acciones anti-neuroinflamatorias *in vivo* y combate las enfermedades neurodegenerativas (22). Otra de sus propiedades es la de bloquear la producción de óxido nítrico (26). Esta flavanona también normaliza los factores de coagulación sanguínea tales como el tiempo de protrombina, concentración de fibrinógeno y números de plaquetas provocadas por infecciones (21). La naringenina ejerce su efecto anti-inflamatorio mediante la inhibición de la producción de óxido nítrico y prostaglandina E₂ (27).

Terpenoides

Los terpenos son metabolitos secundarios, altamente ricos en compuestos basados en una estructura isopreno. Los terpenoides se sintetizan a partir de unidades de acetato y comparten sus orígenes con ácidos grasos. La artemisina y

sus derivados se han utilizado contra la malaria y bacterias y virus diversos (17). La curcumina (diferuloilmetano) es un componente de la *Curcuma longa*, una especia. Tradicionalmente, se le conoce por sus efectos antiinflamatorios, pero en las últimas décadas se ha demostrado que es un agente inmunomodulador que interviene en la activación de los linfocitos T, B, macrófagos, neutrófilos, células NK y células dendríticas. La curcumina también puede regular la expresión de varias citocinas, incluyendo TNF, IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12 y las quimiocinas a través de la inactivación del factor nuclear-kappa beta (NF- κ B). A dosis bajas, la curcumina puede aumentar las respuestas humorales. La curcumina se ha usado en la medicina tradicional y se ha demostrado que suprime la transformación celular, proliferación, invasión, angiogénesis y metástasis. Por ello se ha sugerido que tiene un efecto benéfico en artritis, alergias, asma, aterosclerosis y enfermedades cardíacas, Alzheimer, diabetes y cáncer. Probablemente esto se deba a su capacidad para modular el sistema inmune al estimular la producción de citocinas anti o pro-inflamatorias dependiendo de qué tipo de respuesta inmune celular sea protectora para el huésped (28).

Objetivo

Evaluar la eficacia anticoccidiana de la curcumina y la naringenina en ovinos infectados naturalmente con coccidias del género *Eimeria*.

Hipótesis

La curcumina y la naringenina reducen la excreción de ooquistes de *Eimeria* en las heces del huésped ovino.

Justificación

Los animales que están infectados con coccidias pueden no manifestar signos clínicos, es decir, presentar una coccidiosis subclínica. La importancia que tiene esta presentación se basa en que existe una contaminación continua del ambiente del animal y por lo tanto los ovinos más jóvenes pueden presentar retrasos en el crecimiento, en la conversión alimenticia y predisposición a otras infecciones. Asimismo, cuando se manifiestan los signos clínicos, el costo de los tratamientos suele ser considerable. Generalmente se asume que el empleo de plantas medicinales es seguro y eficaz, ya que se ha utilizado durante muchos años. Sin embargo, a pesar del conocido uso de estos productos naturales, se requiere llevar a cabo investigación más exhaustiva para conocer el potencial que tienen sobre enfermedades que poseen un impacto sanitario y económico significativo en ovinos. Adicionalmente, la tendencia a las producciones orgánicas libres de residuos de fármacos de síntesis química en tejidos y fluidos animales, así como la preocupación por el uso de productos biodegradables que no generen resistencias antiparasitarias ha alentado el estudio de compuestos alternativos para el control de enfermedades provocadas por agentes infecciosos. Por lo tanto, se sugiere estudiar el efecto de un terpenoide (curcumina) y una flavanona (naringenina) a fin de conocer si estos fitoquímicos interfieren con el ciclo biológico del parásito.

Material y Métodos

El presente trabajo se llevó a cabo en el Centro de Enseñanza, Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal (CEPIPSA) situado en la Avenida Cruz Blanca No. 486, en San Miguel Topilejo, México, D.F. San Miguel Topilejo es un pueblo que se encuentra entre las colinas de la cordillera del Ajusco, al sur de la Ciudad de México, pertenece a la delegación Tlalpan del Distrito Federal, está ubicado junto a la carretera federal México- Cuernavaca. El Centro cuenta con una superficie total de 33,755 m². Ubicado en el kilómetro 28.5 de la Carretera Federal México – Cuernavaca, a 19° latitud norte y 99° longitud Oeste a una altura de 2760 metros sobre el nivel del mar, el clima de la región es c (w) b (ij) que corresponde a semifrío semihúmedo con lluvias en verano y con una precipitación pluvial de 800 a 1200 milímetros anuales y una temperatura promedio de 19° C (29).

Las técnicas parasitológicas y el procesamiento de los resultados se realizaron en el Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

Extracto de curcumina (*Curcuma longa*)

El extracto de curcumina con una pureza superior al 98% fue adquirido comercialmente (Sigma-Aldrich, Estado de México). El compuesto es un polvo amarillo-anaranjado cristalino soluble en etanol, dimetil sulfóxido y agua, estable a temperatura ambiente. La curcumina se preparó como una solución 100 mM (30) de acuerdo con la siguiente fórmula:

$M = \text{número de moles/V (l)}$, o bien, $M = \text{número de milimoles/V (ml)}$

$M = 100 \text{ milimoles en } 1 \text{ ml}$
número de moles = g/peso molecular
 $0.1 \text{ moles} \times 368.38 = \text{g}$

$\text{g} = 36.84 \text{ g}$ de curcumina para tener 100 milimoles en 1 ml

Extracto de naringenina (*Citrus medica*)

La naringenina con una pureza superior al 95% se adquirió del laboratorio (Sigma-Aldrich, Estado de México) como una solución acuosa.

Animales

Se seleccionaron 18 ovinos razas Pelibuey y Suffolk. Las edades estuvieron dentro de un rango de 7 a 8 meses. Se incluyeron machos y hembras con un peso promedio de 20 kg., de ambos sexos que no habían sido desparasitados ni recibido tratamientos con sulfonamidas los dos meses previos al estudio. Durante el estudio los ovinos se mantuvieron alojados en el CEPIPSA. Los ovinos fueron alimentados con una dieta a base de heno de avena, ensilado de maíz, sales minerales y un concentrado comercial. El agua se proporcionó *ad-libitum*.

Muestras fecales

Una vez formados los lotes se tomaron muestras de heces, en un promedio de 5 a 10 g por animal directamente del recto y se depositaron en bolsas de polietileno. Las muestras se identificaron individualmente y se conservaron en refrigeración hasta su procesamiento en el laboratorio.

Procesamiento de las muestras

Las muestras colectadas fueron procesadas mediante la técnica de flotación y de McMaster (12) para la cuantificación de ooquistes por gramo de heces. Se llevó a cabo la concentración de los ooquistes utilizando el método Ritchie (32). Se realizó

la esporulación de los ooquistes colocando el concentrado obtenido en dicromato de potasio al 2%, finalmente se llevó a cabo la identificación de los ooquistes tomando en consideración su diámetro longitudinal y transverso, forma, coloración, aspecto de su cubierta y presencia de micrópilo, entre otras características (32).

Diseño Experimental

Los 18 ovinos se agruparon en 3 lotes (A, B, C) cada uno con 6 animales considerando como criterio de inclusión por grupo la excreción de ooquistes por gramo de heces para cada grupo. La distribución de los ovinos se indica a continuación:

Grupo A: Testigos sin tratamiento experimental

Grupo B: Animales tratados con 30 mg/kg de curcumina diluida en agua (33).

Grupo C: Animales tratados con 4 mg/kg de naringenina diluida en agua (34).

Los animales fueron tratados con los extractos acuosos *per os* el día 0 y posteriormente se realizó la obtención de muestras fecales y exámenes coprológicos a los 0, 7, 14 y 21 días posteriores a la dosificación.

Análisis de los Resultados

La eficacia se determinó con base en la presencia de ooquistes por gramo de heces presentes en el grupo tratado con respecto al grupo testigo de acuerdo con la fórmula descrita por Holdsworth *et al.* (34).

$$E = \frac{XC - XT}{XC} \times 100$$

E = Porcentaje de efectividad

XC = Promedio de ooquistes por gramo de heces en el grupo testigo

XT = Promedio de ooquistes por gramo de heces en el grupo tratado

Para el estudio estadístico de los resultados de los análisis coprológicos se utilizó un análisis de varianza no paramétrico considerando un nivel de significancia del 1%. Los valores de ooquistes de *Eimeria* se transformaron a su logaritmo para cumplir con los supuestos paramétricos (35) utilizando el programa Microsoft Excel 2007.

Resultados

La especie más prevalente durante el periodo del estudio fue *Eimeria parva* (Figura 1). La cinética de eliminación de ooquistes por gramo de heces (opg) de *Eimeria* en el grupo A se presenta en el Cuadro 1. La excreción de opg aumentó a lo largo del estudio en el grupo testigo, aumentando hasta 1494.27 ± 193.31 . El porcentaje de reducción o efectividad fue de 0% en el grupo testigo desde el inicio hasta el final del estudio. El porcentaje de variación de la media de opg contra el primer muestreo se consideró de 255.86% en este grupo no tratado. Cabe señalar que la media de excreción de opg en el grupo testigo aumentó significativamente ($p < 0.01$) en el periodo de estudio. En contraste, la media de opg eliminados en los grupos tratados con curcumina y naringenina disminuyó significativamente ($p < 0.01$) tres semanas después de la administración de estos compuestos naturales.

La excreción de opg en el grupo tratado con una solución de curcumina se redujo un 9.31% a los 7 días post-ingestión de este extracto. A los 14 y 21 días la efectividad fue de 82.28% y 98.14%, respectivamente. Los Cuadros 2 y 3 muestran la cinética de excreción de opg de *Eimeria* en los grupos tratados con curcumina y naringenina, respectivamente. La eficacia anticoccidiana en los ovinos tratados con el extracto de naringenina varió de 62.98% a 98.14% del día 7 al 21 post-administración.

Existió una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.01$) entre los grupos tratados con curcumina y naringenina a los 7 y 14 días después de iniciado el experimento, ya que la excreción de opg en el grupo que recibió el extracto de

naringenina fue mayor que en los ovinos que consumieron la curcumina en ambos periodos de tiempo. No obstante, a los 21 días post-tratamiento, no se presentó una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos experimentales (Figura 2).

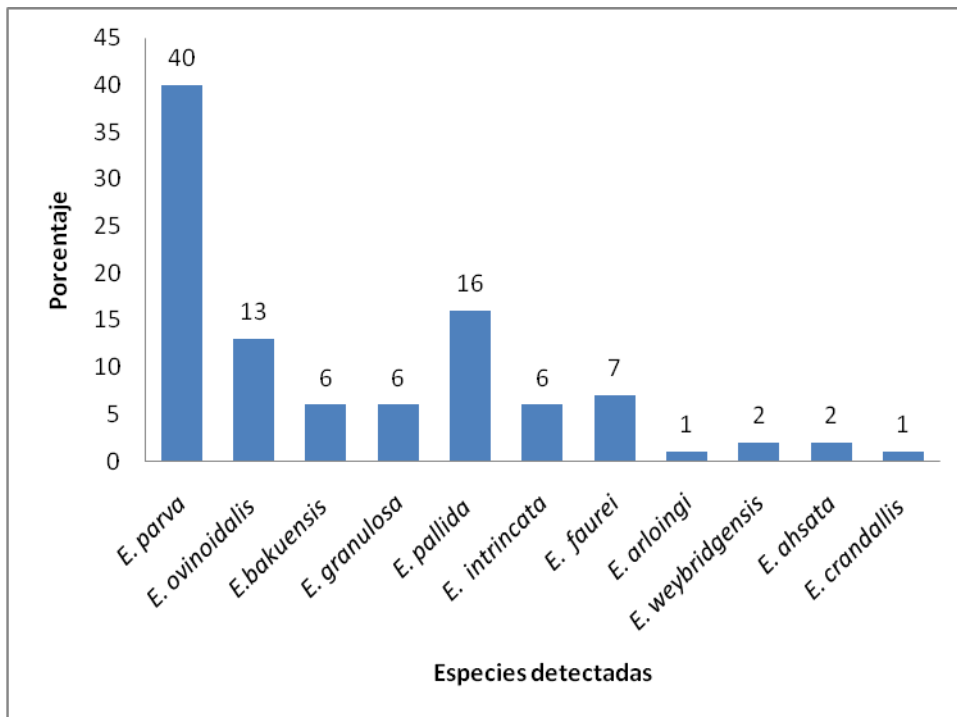


Figura 1. Porcentaje de prevalencia de especies de *Eimeria* determinadas.

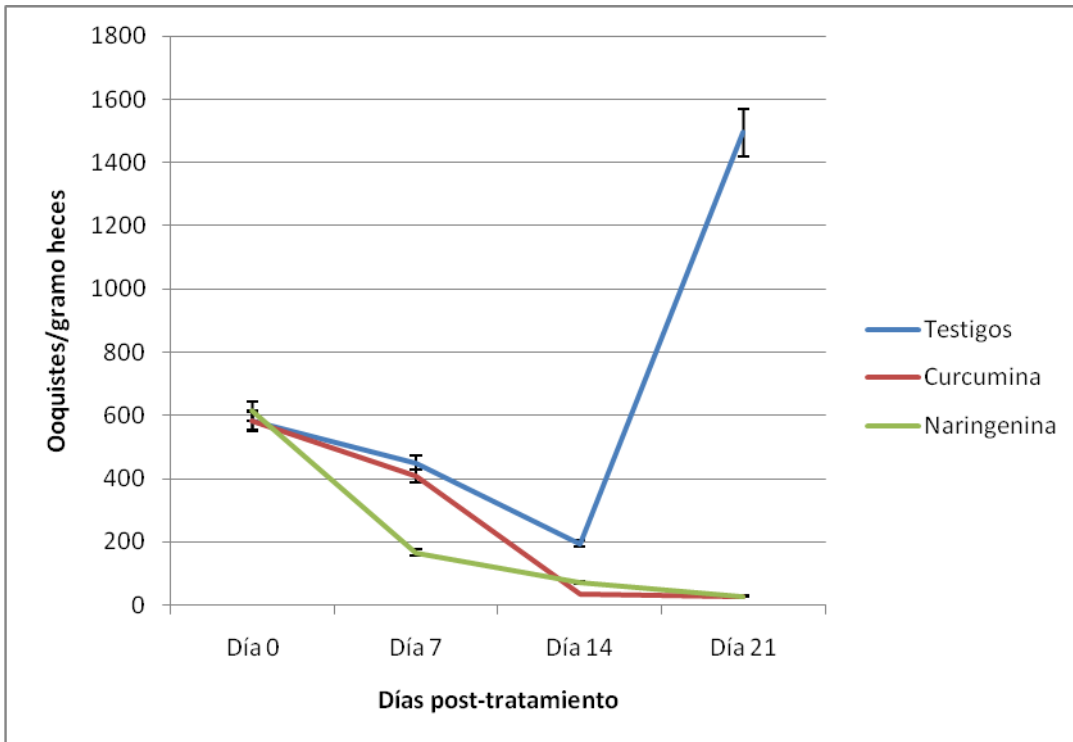


Figura 2. Eficacia anticoccidiana (media \pm desv.est.) del extracto de curcumina administrado a ovinos infectados naturalmente con coccidias del género *Eimeria*. El grupo A no fue tratado, el grupo B recibió 30 mg/kg de curcumina y el grupo C fue dosificado con 4 mg/kg de naringenina.

Cuadro 1. Eliminación de ooquistes de *Eimeria* por gramo de heces en ovinos no tratados.

Ovino	0 días post-tratamiento	7 días post-tratamiento	14 días post-tratamiento	21 días post-tratamiento
1	520	750	0	9550
2	565	350	100	350
3	480	400	450	300
4	600	1800	600	700
5	550	50	450	550
6	420	250	450	950

Cuadro 2. Eliminación de ooquistes de *Eimeria* por gramo de heces en ovinos tratados con 30 mg/kg de curcumina.

Ovino	0 días post-tratamiento	7 días post-tratamiento	14 días post-tratamiento	21 días post-tratamiento
1	480	1000	250	100
2	690	100	0	50
3	510	200	50	50
4	400	750	0	100
5	640	1000	0	50
6	550	0	200	0

Cuadro 3. Eliminación de ooquistes de *Eimeria* por gramo de heces en ovinos tratados con 4 mg/kg de naringenina.

Ovino	0 días post-tratamiento	7 días post-tratamiento	14 días post-tratamiento	21 días post-tratamiento
1	630	150	50	0
2	538	50	0	0
3	490	100	50	50
4	596	450	150	50
5	725	450	200	50
6	570	400	250	100

Discusión

La administración de naringenina a los ovinos infectados provocó una disminución estadísticamente significativa en la eliminación de ooquistes del parásito. Esto puede deberse a los efectos antioxidantes que ejerce esta flavonona, ya que se ha demostrado que las coccidias del género *Eimeria* son capaces de evadir la actividad de la iNOS y por lo tanto protegerse de la actividad oxidativa defensiva del huésped. Los radicales libres producidos por el huésped llegan a acumularse y pueden dañar el tejido intestinal (36). Se cree que la naringenina ejerce un efecto de “recolección” de los radicales superóxido e hidroxilo (19) y por lo tanto tiene una actividad protectora hacia el huésped. De hecho, se ha demostrado que los flavonoides son capaces de participar indirectamente en la reducción del estrés oxidativo en pacientes diabéticos (37), y posiblemente por eso también disminuyen los radicales libres en el caso de coccidiosis.

El uso de productos naturales anti-inflamatorios representa una alternativa no tóxica para modular desórdenes inducidos por organismos intestinales patógenos. La curcumina es un producto que se ha utilizado como anti-inflamatorio (38) desde hace varios siglos. Sin embargo, la falta de información sobre el uso de la curcumina en las patologías intestinales inducidas por protozoarios no había sido documentada. En este estudio se demostró que la curcumina redujo significativamente la producción de ooquistes desde los 7 días post-tratamiento en comparación con el grupo testigo y con el tratado con naringenina. No obstante, a los 21 días post-tratamiento no se presentó una diferencia significativa entre el número de ooquistes por gramo de heces excretados por los ovinos tratados con curcumina o naringenina. Se especula que la curcumina actuó más rápidamente

que la naringenina debido a que se ha demostrado que la curcumina bloquea la activación del NF- κ B y la expresión de genes pro-inflamatorios mediante la inhibición de la I- κ B kinasa. En vista de que la activación del NF- κ B desempeña un papel muy importante en la regulación de la transcripción de genes pro-inflamatorios, al suprimir la misma, la curcumina puede inhibir los pasos tempranos de la inflamación y modular la sobrerregulación de varios genes pro-inflamatorios (39). Es decir, la curcumina actúa tempranamente sobre los mecanismos involucrados en la inflamación, mientras que hasta donde se tiene conocimiento, la naringenina actúa solamente a nivel de la reducción del efecto de moléculas reactivas de oxígeno.

Pese a la diferencia que se presentó en la reducción en la eliminación de ooquistes de *Eimeria* a los 7 y 14 días post-tratamiento, es importante señalar que tres semanas después de la administración de los productos experimentales la eficacia anticoccidiana fue superior al 97% en ambos grupos.

Por otro lado, se demostró que la especie más prevalente en los ovinos muestreados en el CEPIPSA fue *E. parva*. El resultado coincide con los hallazgos de Cortés (40). De acuerdo con los mecanismos que definen la patogenicidad de los parásitos (41), la coexistencia de una especie menos patógena con una más dañina en condiciones en las que el huésped no se encuentra inmunocomprometido, favorece la proliferación de la especie inocua sobre la patógena. Dado que actualmente en el CEPIPSA se llevan a cabo prácticas de manejo, sanidad y bioseguridad que favorecen un estado fisiológico, nutricional e inmunológico adecuado en los ovinos, se especula que la especie menos patógena coexista con el ovino.

Es importante señalar que en algunos de los animales experimentales se presentó un aumento significativo en la excreción de ooquistes de *Eimeria* durante un periodo del estudio. Este aumento en la presencia de ooquistes en heces y en general la diferencia entre los perfiles de excreción que se presentaron en todos los animales tratados a lo largo del estudio son hallazgos que coinciden con resultados publicados previamente por Gregory *et al* (42, 43) y Hindson *et al* (44). Estos autores consideraron que las condiciones relacionadas con la limpieza del alojamiento pueden influir sobre el aumento en la infección de los corderos, sobre todo en el caso de animales que son cambiados a corrales sin limpieza adecuada y por lo tanto, se exponen a heces de adultos con infecciones subclínicas y altas prevalencias. Sin embargo, en el presente estudio, los corrales de los corderos destetados fueron limpiados y desinfectados antes de la introducción de los ovinos. Por lo tanto, se sugiere que los picos mencionados se debieron a susceptibilidades individuales a la infección determinadas por factores genéticos o relacionados con el manejo de los animales. Por consiguiente, se especula que los picos que se presentaron en los ovinos tratados se debieron posiblemente a la exposición con material fecal de los animales testigos y por lo tanto se produjo una reinfección. Por otro lado, debido a que este experimento se realizó bajo un esquema de infección natural, no era posible determinar el estadio del ciclo de vida de las coccidias y posiblemente el tratamiento fue administrado después del día 5 postinfección, es decir, durante el desarrollo de esquizontes de última generación y gamontes. Adicionalmente, los ooquistes recién formados podrían ser impermeables al extracto natural y por lo tanto se detecta un aumento en su excreción en heces. Esta propuesta se refuerza si se considera que la eficacia de

algunos fármacos anticoccidianos como el toltrazuril sobre los esquizontes de última generación y gamontes es pobre debido a que se llegan a encontrar cantidades numerosas de estos estadios los días 6 y 7 después de la infección (45); reforzando la propuesta de la impermeabilidad del ooquiste. Por lo tanto, es razonable sugerir que un tratamiento administrado el día 5 resultará inefectivo para cancelar la infección debido a que llega a alterar el ciclo y provoca persistencia de esquizontes y gamontes. Sin embargo, ni estos esquizontes de generaciones tardías ni los gamontes pueden formar ooquistes y consecuentemente sobreviene una reducción en la excreción de ooquistes después de unos días.

La dieta es uno de los factores esenciales para sostener la vida y promover la salud de tal modo que el desarrollo de productos a partir de la evaluación de compuestos naturales como la naringenina o curcumina podría representar un beneficio potencial para reducir el riesgo de varias condiciones patológicas, incluyendo la coccidiosis ovina. En el presente estudio no se determinó el mecanismo de acción de ambos productos experimentales, sin embargo, se especula que los flavonoides y terpenoides ejercen una influencia sobre la producción de citocinas protectoras del huésped en la coccidiosis ovina. En los rumiantes, el interferón gamma (IFN- γ) y la interleucina-4 (IL-4) son buenos indicadores de una polarización hacia las respuestas Th1 ó Th2, respectivamente y se ha demostrado que en ocasiones son marcadores inmunológicos de estados patológicos o situaciones inmunes. Una respuesta dominada por Th1 se asocia generalmente con una inmunidad protectora contra patógenos intracelulares de

rumiantes, mientras que la respuesta Th2 se considera no protectora y se ha observado en rumiantes con enfermedades clínicas (46). Una de las citocinas que se produce principalmente durante la respuesta inmune celular en la coccidiosis es el interferón gamma (IFN- γ), el cual ha sido implicado en el aumento de la inmunidad primaria contra infecciones causadas por *Eimeria* (47). Los linfocitos T y macrófagos son las fuentes más probables de producción de citocinas en el intestino. Los linfocitos intestinales han sido observados en contacto directo con las células epiteliales parasitadas, promoviendo la hipótesis de que producen citocinas y por lo tanto modulan la respuesta inmune (48). Existe evidencia que indica que los flavonoides y terpenoides inmunomodulan la respuesta del mamífero mediante la activación o inhibición de ciertas citocinas (24); por lo que en el presente trabajo se sugiere que éste fue el mecanismo de acción a través del cual se redujo la eliminación de ooquistes de *Eimeria*. Para poder confirmar esta hipótesis, se recomienda llevar a cabo un estudio de citofluorometría para determinar subpoblaciones de linfocitos T, o bien, un ELISA que permita cuantificar el IFN- γ , así como un estudio de RT-PCR en el que se obtenga la expresión de genes de citocinas representativas de las respuestas Th1 y Th2 en la coccidiosis ovina.

Cabe señalar que se ha demostrado que uno de los sabores preferidos por los ovinos es el de los cítricos (49), por lo que la inclusión de la naringenina en la dieta de los ovinos se sugiere sobre el de la de curcumina, además de que la naringenina puede ser producida a partir de residuos agrícolas (cáscara de toronja) con un costo mucho menor al de la curcumina.

Conclusiones

En el presente estudio se demostró que dos productos naturales, la curcumina y la naringenina, ejercen una eficacia anticoccidiana superior al 97% en ovinos con una infección natural con *Eimeria*. Se sugiere por lo tanto, llevar a cabo más estudios que permitan determinar el mecanismo preciso mediante el cual estos compuestos ejercen su actividad contra este protozooario.

Derivado de este trabajo se sugiere la realización de estudios que incluyan un mayor número de animales experimentales para probar diversos protocolos de dosificación para conocer cuál es la cantidad y frecuencia de administración más apropiada para obtener una eficacia anticoccidiana que proteja a los animales en una segunda exposición. Asimismo, se recomienda llevar a cabo estudios que incluyan infecciones experimentales controlando la cantidad de ooquistes e incluso las especies a inocular para probar el efecto de estos productos naturales en cargas masivas o con especies altamente patógenas.

Referencias

1. Kauffman J. Parasitic infections of domestic animals. A Diagnostic Manual. Birkhäuser Boston, 1996.
2. Taylor MA, Coop RL, Wall RL. Veterinary Parasitology. 3rd. ed. Oxford: Blackwell, 2007
3. Jolley WR, Bardsley KD. Ruminant coccidiosis. Vet Clin North Am Food Anim Pract 2006; 22:613-21.
4. Levine N. Protozoan parasites of domestic animal and of man. 2 nd. Ed. Miniapolis,USA: Burgess publishing Company, 1978.
5. Dougschies A, Najdrowski M. Eimeriosis in cattle: current understanding. Journal of Veterinary Medicine 2005; 52:417–27.
6. Urquhart M, Armour J, Duncan JL, Dunn AM, and Jennings F W. Veterinary Parasitology. Second Edition. Blackwell Publishing. Ames, Iowa, 1996.
7. Mehlhorn H., Piekarski G. Fundamentos de Parasitología: Parásitos del hombre y de los animales domésticos. Acribia S.A. España, 1991
8. Mundt, H.-C., Bangoura, B., Mengel, H., Keidel, J., and Daugschies, A.,: Control of clinical coccidiosis of calves due to *Eimeria bovis* and *Eimeria zuernii* with toltrazuril (Baycox 5%) under field conditions. Parasitol. Res. 2005; 97, S134–S142.
9. Tórtora J. Memorias del Segundo Seminario Sobre Producción Intensiva de Ovinos. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Villahermosa, Tab. 2003
10. Berriatua E, Gibson WC, Morgan KL. Development of DNA probes for the ovine *Eimeria* species *E. crandallis* and *E. ovinoidalis*. Parasitol Res 1995; 81:222-229.

11. Smyth JD. Introduction to animal parasitology. 3ra ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1993
12. Besné MA, Figueroa CJA, Quiroz RH, Ramírez GA, Ramos ME. Manual de Prácticas del laboratorio de Parasitología. México, 2006
13. Reeg KJ, Gauly M, Bauer C. Coccidial infections in housed lambs: oocyst excretion, antibody levels and genetic influences on the infection. *Vet Parasitol* 2005; 127:209–19.
14. da Silva NR, Miller JE. Survey of *Eimeria* spp. oocysts in feces from Louisiana State University ewes. *Vet Parasitol* 1991; 40:147-150.
15. Mehlhorn H y Armstrong PM. Encyclopedic reference of parasitology. Second edition. Springer-Verlag Heidelberg. Düsseldorf, 2004.
<http://parasitology.informatik.uni-wuerzburg.de/login/frame.php>
16. Bowman DD. *Georgis Parasitología para veterinarios*. 8a edición. Saunders. Madrid, 2004.
17. Murphy, C.M. Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev* 1999; 12:564-582.
18. Borris RP. Natural products research: perspectives from a major pharmaceutical company. *J. Ethnopharmacol* 1996; 51:29-38.
19. Benavente-García O, Castillo J: Update on uses and properties of *Citrus* flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. *J. Agric. Food Chem.* 2008; 56:6185-6205.
20. García-Lafuente A, Guillamón E, Villares A, Rostagno MA, Martínez, JA: Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. *Inflamm. Res.* 2009; 58:537-552.

21. Ivanov V, Cha J, Ivanova S, Kalinovsky T, Roomi MW, Rath M, Niedzwiecki A: Essential nutrients suppress inflammation by modulating key inflammatory gene expression. *Int. J. Mol. Med.* 2008; 22:731-741.
22. Vafeiadou K, Vauzour D, Yi Lee H, Rodríguez-Mateos A, Williams RJ, Spencer JPE: The citrus flavanone naringenin inhibits inflammatory signaling in glial cells and protects against neuroinflammatory injury. *Arch. Biochem. Biophys.* 2009; 484:100-109.
23. Tasdemir D, Lack G, Brun R, Ruedi P, Scapozza L, Perozzo R. Inhibition of *Plasmodium falciparum* fatty acid biosynthesis: evaluation of FabG, FabZ, and FabI as drug targets for flavonoids. *J Med Chem* 2006; 49:3345–3353.
24. Mead J.R., McNair, N.: Antiparasitic activity of flavonoids and isoflavones against *Cryptosporidium parvum* and *Encephalitozoon intestinalis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 2006; 259,153-157.
25. Gangjun, D., Lingtao, J., Xiaofen, H., Zihui, S., Hongyan, Z., Liang, W.: Naringenin: A potential immunomodulator for inhibiting lung fibrosis and metastasis. *Cancer Res.* 2009; 69, 3205-3212.
26. Min-Hsiung, P., Ching-Shu, L., Slavik, D., Chi-Tang, H.: Modulation of inflammatory genes by natural dietary bioactive compounds. *J. Agric. Food Chem.* 2009; 57, 4467-4477.
27. Bodet, C., La, V.D., Epifano, F., Grenier, D.: Naringenin has anti-inflammatory properties in macrophage and *ex vivo* human whole-blood models. *J. Periodont. Res.* 2008; 43, 400-407.

28. Jagetia GC and Aggarwal BB. "Spicing Up" of the Immune System by Curcumin. *J Clin Immunol* 2007; 27:19-35.
29. URL: <http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/centros/cepipsa/localizacion.html>
30. Shahiduzzaman M, Dyachenko V, Khalafalla RE, Desouky AY, Dauschies A. Effects of curcumin on *Cryptosporidium parvum* in vitro. *Parasitol Res* 2009; 105: 1155-1161.
31. Velasco PD. Manual de Procedimientos de Laboratorio. Curso Teórico Práctico de técnicas de colecta, conservación y tinción para diagnóstico de protozoarios de importancia médica y veterinaria. 5-7 agosto Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM. 2009.
32. Ramsewak RS, DeWitt DL, Nair MG: Cytotoxicity, antioxidant and anti-inflammatory activities of curcumins I-III from *Curcuma longa*. *Phytomedicine* 2000; 7:303–308.
33. Breinholt VM, Svendsen GW, Dragsted LO, Hossaini A: The citrus-derived flavonoid naringenin exerts uterotrophic effects in female mice at human relevant doses. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2004; 94: 30-36.
34. Holdsworth PA, Conway DP, McKenzie ME, Dayton AD, Chapman HD, Mathis GF, Skinner JT, Mundt HC, Williams RB. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) guidelines for evaluating the efficacy of anticoccidial drugs in chickens and turkeys. *Vet Parasitol* 2004; 121:189-212.
35. Zar, J.H. (Ed.), 1989. Análisis Bioestadístico. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ, 620 pp.

36. Hermosilla, C., Barbisch, B., Heise, A., Kowalik, S. and Zahner, H. Development of *Eimeria bovis in vitro*: suitability of several bovine, human and porcine endothelial cell lines, bovine fetal gastrointestinal, Madin-Darby bovine kidney (MDBK) and African green monkey kidney (VERO) cells. *Parasitology Research*, 2002; 88, 301–307.
37. Bonnefont RD. The role of antioxidant micronutrients in the prevention of diabetic complications. *Treatments in Endocrinology*. 2004; 3:41-52.
38. Ammon HP, Wahl MA: Pharmacology of *Curcuma longa*. *Planta Med* 1991; 57(1):1–7.
39. Salh B, Assi K, Templeman V, Parhar K, Owen D, Gomez-Munoz A, Jacobson K: Curcumin attenuates DNB-induced murine colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 285(1):G235–G243.
40. Cortés MYE. Eficacia del extracto de Té verde en corderos infectados naturalmente con *Eimeria* spp. Tesis de Licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 2010.
41. Poulin R. Evolutionary ecology of parasites. 2a Ed. Oxford, 2006.
42. Gregory MW, Catchpole J, Joyner LP, Parker BN. Observations on the epidemiology of coccidial infections in sheep under varying conditions of intensive husbandry including chemoprophylaxis with monensin. *Parasitology* 1983; 87 (Pt 3):421-427.
43. Gregory MW, Yvoré P. Epidemiology and control of ovine coccidiosis. En: Proceedings of the V International Coccidiosis Conference on Coccidia and

International Coccidiomorphs. 1989; Tour, France. INRA Publisher, 1989:409-418.

44. Hindson JC, Winter AC. Manual of Sheep diseases. Oxford: Blackwell Science, 2002.
45. Reynaud MC, Chauve CM, Gastellu J, Gounel JM. Administration of toltrazuril during experimental coccidiosis in mule ducks: comparison of the efficacy of a single administration at two different endogenous stages. *Vet Parasitol* 1999; 81:265-274.
46. Esteves, I., Vachery, N., Martínez, D., Totte, P., 2004: Analysis of *Ehrlichia ruminantium*-specific T1/T2 responses during vaccination with a protective killed vaccine and challenge of goats. *Parasite Immunol.* 26, 95-103.
47. Rose, M.E., Millard, B.J., Hesketh, P., 1992: Intestinal changes associated with expression of immunity to challenge with *Eimeria vermiformis*. *Parasite Immunol.* 10, 59-69
48. Taubert, A., Hermosilla, C., Sühwold, A., Zahner, H., 2008: Antigen-induced cytokine production in lymphocytes of *Eimeria bovis* primary and challenge infected calves. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 126, 309-320.
49. Ralphs MH, Provenza, FD, Wiemeier RD, Bunderson FB. Effects of energy source and food flavor on conditioned preferences in sheep. *J Anim Sci* 1995; 73:1651-1657.