



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

**VALORACIÓN DE LA EFICACIA
ANTIPARASITARIA DE LA CURCUMINA EN
CONEJOS**

T E S I S

**PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS**

P R E S E N T A:

MARÍA EUGENIA CERVANTES VALENCIA

TUTOR:

Yazmín Alcalá Canto

COMITÉ TUTORAL:

**Carlos Gutiérrez Olvera
María Josefa Bernad Bernad**

DEDICATORIA

A mis padres María Eugenia y Jorge Alberto que me han ayudado e impulsado a ser la persona que soy, y a siempre luchar por lo que quiero y creo.

A mi tutora la Dra. Yazmín Alcalá Canto y al Dr. Carlos Gutiérrez Olvera por creer en mi.

A Fernando y Maribel por todo el apoyo otorgado.

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM, mi alma máter.

A MC. Adriana M. Ducoing Watty por el apoyo otorgado en el análisis estadístico.

A Rocío Rivera, Guillermo Eduardo Rivera y familia por la ayuda otorgada desinteresadamente durante la realización del proyecto.

La realización de este trabajo fue posible gracias a la beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT - 378283) y el financiamiento a través de los proyectos PAPIIT IN215209 e IN216309.

RESUMEN

Se evaluó la eficacia del extracto acuoso de *Curcuma longa* sobre la excreción de ooquistes de *Eimeria* spp. en conejos. Se utilizaron 24 conejos de la raza Nueva Zelanda los cuales se dividieron en 4 grupos con 6 animales cada uno. El grupo 1 fue el grupo control sin tratamiento, al grupo 2 se le administró 10 mg/kg de extracto acuoso de *Curcuma longa*, al grupo 3 se le administró 25 mg/kg y al grupo 4 se le administró 40 mg/kg. Se registró el peso de cada conejo y se obtuvieron muestras de heces los días 0, 7, 14, 21, 28, 35 y 42. Se realizó la técnica de McMaster para la cuantificación de los ooquistes de *Eimeria* spp. El peso no se vio afectado por la aplicación del extracto acuoso de *Curcuma longa*. Se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) a partir de los 28 días entre el grupo control y los grupos que recibieron 25 y 40 mg/kg de extracto acuoso de *Curcuma longa*. A los 42 días se observó diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre el grupo control y los que recibieron 10, 25 y 40 mg/kg de extracto acuoso de *Curcuma longa*.

Palabras clave: extracto acuoso de *Curcuma longa*, coccidiosis conejos, *Eimeria* spp.

ABSTRACT

Was evaluated the efficacy of aqueous extract of *Curcuma longa* on the excretion of oocysts of *Eimeria* spp in rabbits. We used 24 rabbits of New Zealand breed were divided into 4 groups with 6 animals each. Group 1 was the untreated control group, group 2 received 10 mg/kg of aqueous extract of *Curcuma longa*, group 3 was given 25 mg/kg of aqueous extract of *Curcuma longa* and group 4 was given 40 mg/kg of aqueous extract of *Curcuma longa*. We recorded the weight of each rabbit and stool samples were obtained on days 0, 7, 14, 21, 28, 35 and 42. Was performed McMaster technique for the quantification of the oocysts of *Eimeria* spp. The weight was not affected by the application of aqueous extract of *Curcuma longa*. There were statistically significant differences ($p < 0.05$) from the 28 days between the control group and the groups receiving 25 and 40 mg/kg of aqueous extract of *Curcuma longa*. At 42 days was observed a statistically significant difference ($p < 0.05$) between control group and those receiving 10, 25 and 40 mg/kg of aqueous extract of *Curcuma longa*.

Key words: aqueous extract of *Curcuma longa*, rabbit coccidiosis, *Eimeria* spp.

ÍNDICE

| | Página |
|--|--------|
| 1. Introducción..... | 1 |
| 1.1. Antecedentes..... | 1 |
| 1.1.2. <i>Curcuma longa</i> | 1 |
| 1.1.2.1. Farmacocinética de curcumina..... | 2 |
| 1.1.2.2. Efectos farmacológicos de curcumina..... | 4 |
| 1.1.3. Coccidiosis en conejos..... | 7 |
| 1.1.3.1. <i>Eimeria</i> spp..... | 7 |
| 1.1.3.2. Taxonomía..... | 7 |
| 1.1.3.3. Ciclo de vida..... | 12 |
| 1.1.4. Justificación..... | 15 |
| 1.1.5. Hipótesis..... | 15 |
| 2. Objetivos..... | 16 |
| 2.1. Objetivo general..... | 16 |
| 2.2. Objetivos particulares..... | 16 |
| 3. Material y métodos..... | 17 |
| 3.1. Obtención del extracto acuoso de <i>Curcuma longa</i> | 17 |
| 3.2. Modelo animal..... | 17 |
| 3.3. Diseño experimental..... | 18 |
| 3.4. Obtención de muestras..... | 19 |
| 3.5. Análisis de datos..... | 19 |
| 4. Resultados..... | 20 |
| 4.1. Conteo de ooquistes..... | 20 |
| 4.2. Peso de los animales..... | 22 |
| 5. Discusión..... | 23 |
| 6. Conclusión..... | 24 |
| 7. Referencias..... | 25 |
| 8. Anexos..... | 33 |
| 8.1. Anexo 1 – Técnica McMaster..... | 33 |
| 8.2. Anexo 2 – SICUAE..... | 34 |
| 8.3. Anexo 3 – Grupos de conejos..... | 35 |

| | |
|--|----|
| 8.4. Anexo 4 – Análisis de Varianza Multivariado de ooquistes..... | 37 |
| 8.5. Anexo 5 – Prueba de Welch..... | 38 |
| 8.6. Anexo 6 – Prueba de Dunnett T3..... | 39 |
| 8.7. Anexo 7 – Análisis Univariado del peso de los conejos..... | 42 |

ÍNDICE DE CUADROS

| | Página |
|--|--------|
| Cuadro 1. Comparación de distintas especies de coccidias en conejos..... | 10 |
| Cuadro 2. Localización intestinal (con excepción de <i>Eimeria stiedai</i>) y número de generaciones sexuales de coccidiosis en conejos..... | 11 |
| Cuadro 3. Logaritmo promedio del número de ooquistes por gramo de heces encontrados en los cuatro grupos de conejos de la raza Nueva Zelanda a los 28 días de tratamiento..... | 21 |
| Cuadro 4. Logaritmo promedio del número de ooquistes por gramo de heces encontrados en los cuatro grupos de conejos de la raza Nueva Zelanda a los 35 días de tratamiento..... | 21 |
| Cuadro 5. Logaritmo promedio del número de ooquistes por gramo de heces encontrados en los cuatro grupos de conejos de la raza Nueva Zelanda a los 42 días de tratamiento..... | 22 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | Página |
|--|--------|
| Figura 1. Fórmula molecular de curcumina..... | 2 |
| Figura 2. Principales metabolitos de curcumina..... | 4 |
| Figura 3. Morfología de esporozoito de <i>Eimeria</i> spp..... | 8 |
| Figura 4. Esquema del complejo apical en el proceso de endocitosis..... | 8 |
| Figura 5. Morfología de ooquiste esporulados de <i>Eimeria</i> spp..... | 9 |
| Figura 6. Ciclo de vida de <i>Eimeria</i> spp. en conejos (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)..... | 13 |
| Figura 7. Logaritmo promedio del número de ooquistes por gramos de heces (OPG) en los tres grupos de conejos Nueva Zelanda tratados con extracto acuoso de <i>Curcuma longa</i> y en el grupo control, a través del tiempo (42 días de tratamiento)..... | 20 |
| Figura 8. Peso promedio en los cuatro grupos de conejos Nueva Zelanda a lo largo del tiempo (42 días de tratamiento)..... | 22 |

I. INTRODUCCIÓN

Las especies de *Eimeria* son una de las causas principales de morbilidad y letalidad por coccidiosis, es común en conejos silvestres y domésticos (*Oryctolagus cuniculus*). La coccidiosis producida por *Eimeria* spp. afecta principalmente a animales jóvenes; sus manifestaciones clínicas suelen ser disminución en el peso, conversión alimenticia pobre, diarrea y anemia (Bhat *et al.*, 1996). Sin embargo, la mayoría de las parasitosis por coccidias se presenta de manera subclínica, pero la evolución de la enfermedad dependerá de la patogenicidad del parásito y del estado inmunológico del individuo (Gres *et al.*, 2003). Actualmente en el tratamiento de la coccidiosis se utilizan sulfonamidas, ionóforos y quinolonas (Pakandl 2009), los cuales pueden llegar a ser tóxicos para lactantes y hembras gestantes; por otro lado, los parásitos pueden llegar a generar resistencia debido a las malas prácticas en su utilización (Sangster *et al.*, 2009). En virtud de los problemas mencionados, es importante encontrar alternativas para el tratamiento de la coccidiosis, una de las cuales es la utilización de curcumina (*Curcuma longa*). La curcumina es un polvo naranja-amarillo cristalino y su principal componente es el diferuloilmetano, el cual es extraído de la raíz de *Curcuma longa* (Shahiduzzaman *et al.*, 2009). La farmacología y el posible valor anticancerígeno de la curcumina han sido objeto de varios artículos de revisión desde 1991 (Sharma *et al.*, 2005).

1.1 Antecedentes

1.1.2 *Curcuma longa*

La especie *Curcuma longa* Linn., familia de las Zingiberáceas, es originaria de la India y en la actualidad se cultiva en Asia, China, India y países tropicales. Es usada comúnmente como una especia, conservador de alimento y colorante. En la cultura asiática está considerada como una planta mágica dadas sus características organolépticas y sus indudables propiedades terapéuticas y protectoras, sobre todo a nivel hepático y cutáneo (Mesa *et al.*, 2000, Aggarwal *et al.*, 2007). Es comúnmente utilizada en las ceremonias religiosas Hindúes donde se aplican en la frente una mezcla de curcumina con sándalo en polvo.

Fue aislada por primera vez en 1815 y su forma cristalina fue obtenida hasta 1870

(Kunnumakkara *et al.*, 2009). En 1910 se reportó la fórmula molecular de curcumina como $C_{21}H_{20}O_6$, mientras que su estructura química [1,7-bis-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione] fue determinada en 1973 (Chattopadhyay *et al.*, 2004, Jagetia *et al.*, 2007) (figura 1).

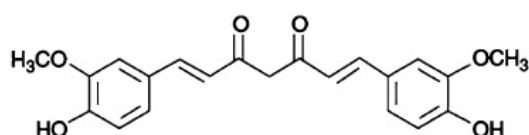


Figura 1. Fórmula molecular de curcumina, tomada de Shankar *et al.*, 2012.

Curcuma longa esta compuesta principalmente por: curcuma, aceites esenciales (tumerones, atlantones y zingibereno) y curcuminoides (77% diferuloilmetano/ curcumina, 18% demetoxicurcumina y 5% bisdemetoxicurcumina) (Sharma *et al.*, 2007, Aggarwal *et al.*, 2007, Kunnumakkara *et al.*, 2009, Shankar *et al.*, 2012). El principal componente de *Curcuma longa* es la curcumina, a la cual se le atribuyen todas las propiedades terapéuticas. Es un polvo naranja-amarillo cristalino el cual es relativamente insoluble en agua y éter dietílico (Chattopadhyay *et al.* 2004, FAO 2006), aunque Araújo *et al.* (2001) y Jagetia *et al.* (2007) publicaron que la curcumina no es soluble en agua a un pH ácido y neutro (FAO 2006); sin embargo, esta se disuelve fácilmente en etanol, acetona y dimetilsulfóxido (Aggarwal *et al.*, 2007).

1.1.2.1 Farmacocinética de curcumina

Los estudios de farmacocinética se han realizado principalmente en roedores (Sharma *et al.*, 2007). Tønnesen y Karlsen, (1985) encontraron que en las condiciones del estómago (pH 1-2) y del intestino delgado (pH 6.5), la curcumina es estable, ya que a un pH entre 1 y 7, su degradación es extremadamente lenta.

La elevada lipofilia de la curcumina permite una rápida absorción gastrointestinal por difusión pasiva, esto ha sido determinado usando curcumina radioactiva en ratas, en donde aproximadamente el 35% de las dosis orales (entre 2.5 y 1000 mg/kg) se excreta por las heces en 48 h, absorbiéndose el 65% de la

curcumina administrada (Ravindranath *et al.*, 1982). Holder *et al.*, (1978) observaron que al administrar curcumina vía oral se absorbe solamente el 60%, y es metabolizada principalmente por el hígado. Mientras que al ser administrada intravenosa, entre el 50% y 60% de la dosis fue excretada por la bilis (Aggarwal *et al.*, 2007). Wahlstrom y Blennow en 1978 detectaron el 75% de la curcumina en heces, mientras que una dosis insignificante fue detectada en la orina (Sharma *et al.*, 2007).

Tras su administración se ha observado que la curcumina se metaboliza rápidamente y posee una eliminación sistémica rápida, lo cual ocasiona una reducción en cuanto a su biodisponibilidad (Aggarwal *et al.*, 2009). La curcumina es metabolizada y excretada principalmente por bilis, heces y orina en menor proporción (Mesa *et al.*, 2000; Johnson-Delaney, 2006).

Los principales metabolitos encontrados de la curcumina fueron glucoronidos: tetrahidrocurcumina, hexahidrocurcumina y hexahidrocurcuminol (figura 2). Esto demuestra que la mayor fracción de la curcumina se reduce de forma endógena, y después es glucuronizado por la UDP-glucuronil transferasa (Holder *et al.*, 1978).

Shoba *et al.*, (1998) encontraron una manera de aumentar la biodisponibilidad de la curcumina en el organismo, el cual es mezclarlo con piperina. Ellos observaron que se elevaba hasta en un 150% la biodisponibilidad, esto se debe a que la piperina inhibe la glucoronidación de la curcumina (Shoba *et al.*, 1998).

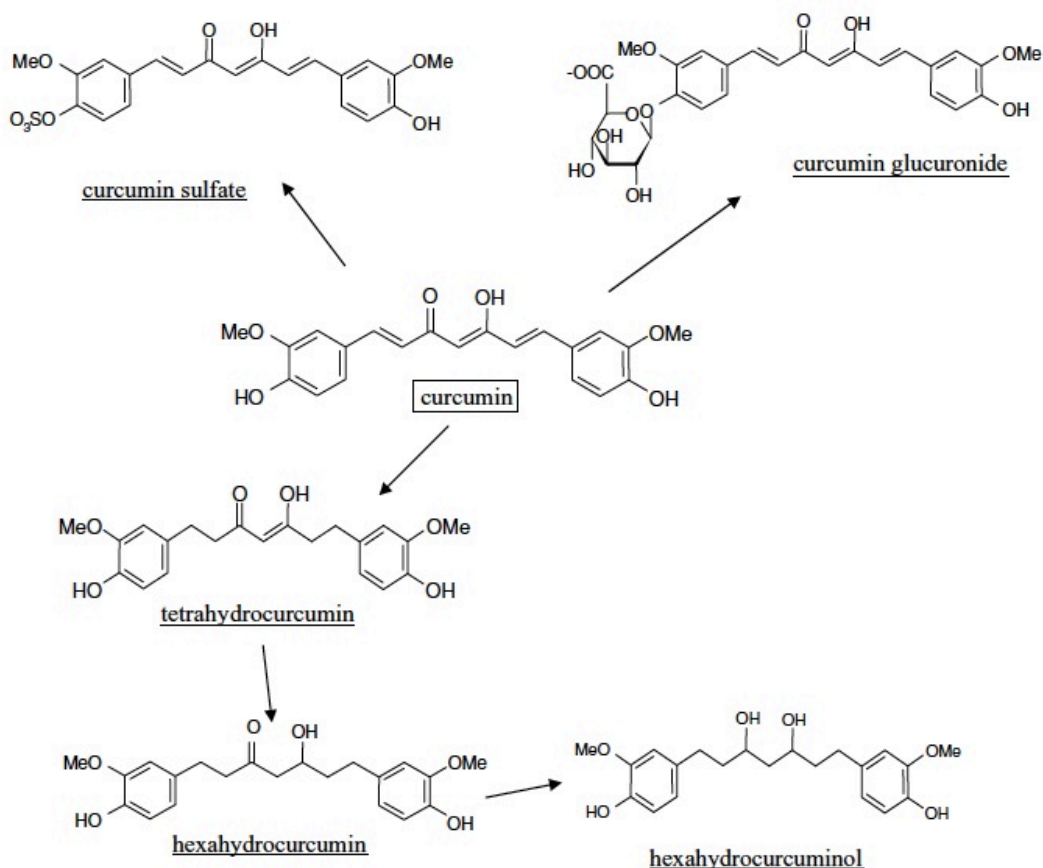


Figura 2. Principales metabolitos de curcumina, imagen tomada de Sharma *et al.*, 2007

1.1.2.2 Efectos farmacológicos de curcumina

La actividad anti-inflamatoria se ha estado estudiando a partir de 1973 (Araujo *et al.*, 2001), donde los investigadores han encontrado que la curcumina inhibe el metabolismo del ácido araquidónico, la ciclo-oxigenasa, la lipo-oxigenasa, las citoquinas (factor de necrosis tumoral e interleucinas) e incrementa la secreción de mucina en modelos de inflamación aguda, subaguda y crónica en ratones y ratas (Lee *et al.*, 2003, Kohli *et al.*, 2005). Debido a esto se sabe que la curcumina posee un potencial terapéutico en diferentes enfermedades, tales como: enfermedad de Alzheimer (Lim *et al.*, 2001), esclerosis múltiple (Natarajan *et al.*, 2002), enfermedad de Parkinson (Zbarsky *et al.*, 2005), epilepsia (Sumanont *et al.*, 2006), neurodegeneración asociada a la edad (Calabrese *et al.*, 2003), esquizofrenia (Bishnoi *et al.*, 2008), encefalitis esponjiforme (enfermedad de Creutzfeld- Jakob) (Hafner-

Bratkovic *et al.*, 2008), dolor neuropático (Sharma *et al.*, 2006) y depresión (Xu *et al.*, 2007). También se ha reportado que la curcumina posee efectos nefroprotectores y hepatoprotectores (Osawa, 2007).

La actividad antibacteriana de curcumina contra las bacterias Gram-positivas se conoce desde 1974 (Mesa *et al.*, 2000). Tönnensen *et al.*, (1987) comprobaron que la curcumina era bastante tóxica para *Salmonella* ya que tiene la capacidad de alterar el ADN.

La actividad inmunomodulatoria de la curcumina se ha probado principalmente en ratas, en donde South *et al.*, (1997) observaron que hay un aumento en las inmunoglobulinas G (IgG) aunque no afecta al tipo ni a la actividad de las células natural killer. Antony *et al.* (1999) observaron un incremento en la actividad fagocítica de los macrófagos en animales tratados. Li X. y Liu X. (2005) informaron que a dosis bajas de curcumina ayuda a aumentar la proliferación de los linfocitos del bazo, mientras que a altas dosis la curcumina deprime la proliferación de dichos linfocitos. En otro estudio, observaron que la curcumina aumentó la proliferación de células CD3⁺T debido al cambio en las células CD4⁺T en la mucosa intestinal. Estos estudios demostraron la capacidad de la curcumina para modular las funciones inmunes en las células T. Forward *et al.*, (2011) demostraron que la curcumina *in vitro* inhibe IL-12 y la producción de la misma.

Varalakshmi *et al.*, (2008) evaluaron los efectos inmunomodulatorios de la curcumina en ratas portadoras de ascitis; estos autores observaron que el tratamiento *in vivo* aumenta la proliferación de células T y antígenos específicos de estas células. También observaron que la curcumina tenía poco efecto sobre la activación de macrófagos y células NK. Por otro lado, el tratamiento no alteró la distribución de subgrupos de linfocitos (L_T y L_B), células NK, células dendríticas y macrófagos .

Karunakaran *et al.*, 2007 observaron que la curcumina tiene efecto anticancerígeno, ya que induce a la citotoxicidad y esta a su vez induce a la apoptosis de la célula cancerígena, al regular los genes de supervivencia tales como NF-κB, *egr-1*, *c-myc*, *Bcl-XL*, *p53* y *Bax* (Karunakaran *et al.*, 2007). La acción de la curcumina va a depender del tipo de célula al cual este actuando, la concentración de curcumina y el

tiempo del tratamiento. Al administrar curcumina oralmente se ha observado la inhibición de crecimiento celular en células cancerígenas de colon (Churchill *et al.*, 2000), piel, estómago, pulmón, duodeno y glándula mamaria en roedores principalmente (Huang *et al.*, 1994. También se ha observado que inhibe la proliferación celular durante la carcinogénesis (Soudamini *et al.*, 1989, Kuttan *et al.*, 2007). Uno de los principales obstáculos para el éxito del tratamiento del cáncer es a la resistencia a múltiples fármacos (RMF), Xul *et al.* (2011) suponen que la utilización de curcumina al inicio de la quimioterapia evita la inducción de la glicoproteína-P (proteína de transmembrana que transporta el medicamento intracelularmente) lo cual pueda resultar en una RMF.

Kiuchi *et al.*, (1993) demostraron que la curcumina tiene efecto antinematódico contra *Toxocara canis*. Magalhães *et al.*, (2009) en estudios realizados *in vitro* demostraron la actividad de la curcumina contra los gusanos adultos de *Schistosoma mansoni*, en dicho estudio observaron que la curcumina dañaba el desarrollo de los huevos, provocaba parálisis y muerte de los gusanos adultos a los 10 días de incubación con curcumina (50 y 100 μ M). Singh *et al.*, (2011) encontraron los mismos resultados al utilizar concentraciones de 10, 20 y 50 mg/kg sobre *Pheretima posthuma* (lombriz de tierra). Recientemente Nayak *et al.*, (2012) demostraron que la curcumina induce apoptosis en *Setaria cervi* (filaria bovina) *in vitro* al promover la fragmentación del ADN en gusanos adultos.

Los efectos antiprotozoarios de la curcumina han sido descritas para *Plasmodium falciparum* (Cui *et al.* 2007), *Leishmania* spp. (Koide *et al.* 2002), *Trypanosoma* spp. (Nose *et al.* 1998, Nagajyothi *et al.*, 2011) y trofozoitos de *Giardia lamblia* (Perez-Arriaga *et al.*, 2006). Se ha encontrado una efectividad mayor al 95% para inhibir el crecimiento de *Cryptosporidium* en cultivos celulares infectados (Shahiduzzaman *et al.* 2009).

1.1.3 Coccidiosis en Conejos

Los conejos son huéspedes de coccidias pertenecientes a los géneros: *Cryptosporidium*, *Besnoitia*, *Sarcocystis*, *Toxoplasma* y *Eimeria* (Pakandl, 2009). Al conejo se le considera un animal muy susceptible a padecer enfermedades de diversas etiologías si no se encuentra en condiciones óptimas, debido a esto, en crías intensivas se llegan a obtener hasta el 20% de pérdidas desde el nacimiento hasta el final de la engorda. Algunos autores reportan a las enfermedades digestivas como las de mayor importancia, ya que son el principal obstáculo para el éxito de toda explotación pecuaria debido a las cuantiosas pérdidas económicas que llegan a ocasionar al productor por conceptos de muerte, trastornos del crecimiento, disminución de peso y gastos en medicamentos (Ming-Hsien *et al.*, 2008, Rosell, 2000).

1.1.3.1 *Eimeria* spp

1.1.3.2 Taxonomía

- Phylum: *Apicomplexa*
- Clase: *Sporozoea*
- Subclase: *Coccidia*
- Familia: *Eimeridae*
- Género: *Eimeria*

Los pertenecientes a la familia *Eimeridae* poseen un complejo apical formado por: anillos preconoidales, anillo polar, microtúbulos, roptrias, micronemas y conoide; los cuales les permite su penetración en la célula (figura 3 y 4).

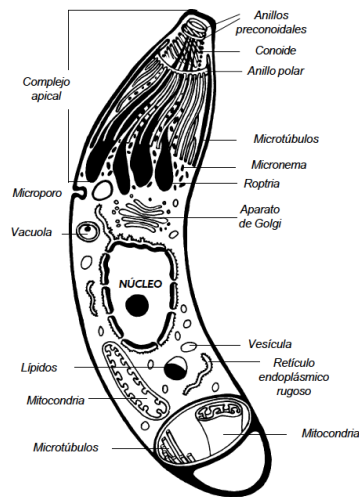


Figura 3. Morfología de esporozoito de *Eimeria* spp. en el cual observamos los componentes del complejo apical del esporozoito (Schmidt *et al.*, 2009).

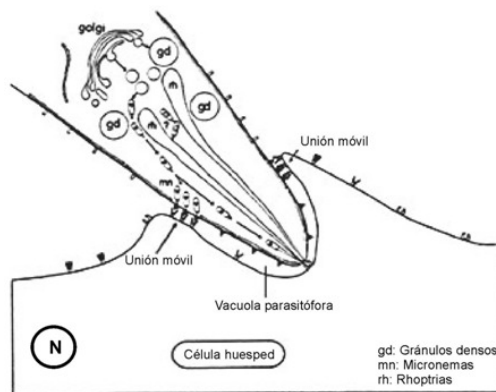


Figura 4. Esquema del complejo apical en el proceso de endocitosis en donde las roptrias y los micronemas son las estructuras liberadas durante la penetración del trofozoitos a la célula huésped (Schmidt *et al.*, 2009).

La locomoción la realizan por medio de flexión, deslizamiento, ondulación en sentido longitudinal y ocasionalmente por medio de flagelos (microgametos). Son parásitos intracelulares obligados que provocan un cuadro clínico al destruir las células en las que se alojan. Poseen ooquistes con 4 esporoquistes con 2 esporozoitos cada uno (Bowman, 2009) (figura 5).

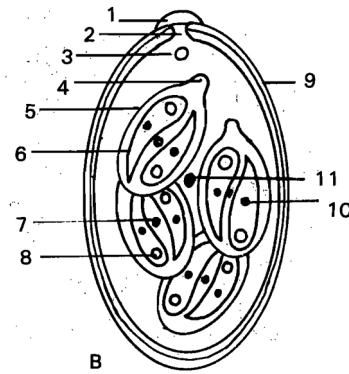


Figura 5. Morfología de ooquiste esporulados de *Eimeria* spp. 1. Tapón de micrópilo, 2. Micrópilo, 3. Gránulo polar, 4. Cuerpo de Stiedae, 5. Esporoquiste, 6. Esporozoito, 7. Cuerpo residual del esporoquiste, 8. Vacuola del esporozoito, 9. Capa externa, 10. Núcleo del esporozoito, 11. Residuo del ooquistes. (Schmidt *et al*, 2009)

Los coccidios provocan una enteritis llamada coccidiosis; estos se transmiten principalmente por contaminación fecal y se reproducen mediante secuencias rígidas de fases sexuales y asexuales de multiplicación y desarrollo, los cuales provocan una alteración del hospedador. Puede ser asintomática, de manifestación moderada o causante de alta mortalidad, dependiendo del tipo de *Eimeria* spp. que este afectando (Rosell, 2000; Baker, 2007).

La unidad funcional del coccidio es el zoito, una célula móvil, con forma de plátano, redondeada del extremo basal y puntiaguda en el extremo apical. Es el que migra por el hospedador e invade sus células, además de ser el que representa el punto de inicio y el punto final del ciclo vital de los coccidios. Los esporozoitos son las formas infectantes que se encuentran en los ooquistes esporulados. Los esporozoitos invaden las células del hospedador en las que forman muchos merozoitos mediante una especie de fisión múltiple interna llamada esquizogonia (o merogonia) en la cual el núcleo se divide varias veces (mitosis); los taquizoitos se dividen rápidamente y los bradizoitos lo hacen de manera lenta (Bowman, 2009).

Se han identificado hasta 11 especies del género de *Eimeria* en los conejos (cuadro 1). Estas especies son monoxenas (tienen un solo hospedador durante el ciclo parasitario) y tienen una elevada especificidad con relación al hospedador. Su

desarrollo es intraepitelial, con lugares de multiplicación y generaciones sexuales según la especie (cuadro 2) (Rosell, 2000; Pakandl, 2009).

Cuadro 1. Comparación de distintas especies de coccidias en conejos (Rosell, 2000).

| Patogenicidad | <i>Eimeria</i> | Signos clínicos |
|--------------------------------------|-----------------------------|---|
| No patógenas | <i>Eimeria coecicola</i> | Ningún signo clínico |
| Poco patógenas | <i>Eimeria perforans</i> | Ligero descenso de la ganancia diaria de peso |
| | <i>Eimeria exigua</i> | No diarrea |
| | <i>Eimeria vej dovskyi</i> | No mortalidad |
| Patógenas | <i>Eimeria media</i> | Caída de la ganancia diaria de peso |
| | <i>Eimeria magna</i> | Diarrea |
| | <i>Eimeria piriformis</i> | Poca mortalidad dependiendo la cantidad de eimerias ingeridas. |
| | <i>Eimeria irresidua</i> | |
| Muy patógenas | <i>Eimeria intestinalis</i> | Grave descenso de la ganancia diaria de peso. Diarrea |
| | <i>Eimeria flavescens</i> | Mortalidad elevada |
| Patogenicidad en función de la dosis | <i>Eimeria stiedai</i> | Lo más frecuente: ligero descenso de la ganancia diaria de peso, sin diarrea ni mortalidad. Pérdida de peso y mortalidad con infecciones masivas |

Cuadro 2. Localización intestinal (con excepción de *Eimeria stiedai*) y número de generaciones sexuales de coccidiosis en conejos (Pakandl, 2009).

| Especie | Segmento intestinal | Localización en la mucosa | Generaciones asexuales |
|------------------------|--|--|------------------------|
| <i>E. coecicola</i> | Apéndice, sacculus rotundus, placas de Peyer. | 1° GA en GALT; 2° -4° GA y gametogonia en las vellosidades epiteliales. | 4 |
| <i>E. exigua</i> | Duodeno-íleon; sucesivamente se mueven de la parte proximal a la distal del intestino delgado. | Parte superior de las vellosidades. | 4 |
| <i>E. flavescens</i> | 1° GA intestino delgado, 2°-5° GA ciego. | 1° GA en criptas; 2°-4° GA en el epitelio superficial; 5° GA y gametogonia en criptas. | 5 |
| <i>E. intestinales</i> | Parte baja del yeyuno e íleon. | 1° y 2° GA en criptas; 3° y 4° GA y gametogonia en criptas y pared de las vellosidades | 3-4 |
| <i>E. irresidua</i> | Yeyuno e íleon | 1° GA en criptas; 2° GA lámina propia; 3°-4° GA y gametocitos en las vellosidades epiteliales. | 4 |
| <i>E. magna</i> | Yeyuno e íleon, en el duodeno en menor grado. | Vellosidades intestinales. | 4 |
| <i>E. media</i> | Duodeno-yeyuno, bajas concentraciones en el íleon. | Vellosidades intestinales. | 3 |
| <i>E. perforans</i> | Máxima concentración de parásitos en el duodeno, también en el yeyuno e íleon. | En criptas y vellosidades. | 2 |
| <i>E. piriformis</i> | Colon | Criptas | 4 |
| <i>E. vejdoskyi</i> | Íleon | 1°-3° GA en criptas, 4° y 5° en vellosidades. | 5 |
| <i>E. stiedai</i> | Hígado | Epitelio de los conductos biliares. | 5-6 |

GA: generación asexual.

GALT: sistema linfóide del intestino = apéndice vermiforme+válvula íleo-cecal+placas de Peyer

1.1.3.3 Ciclo de vida

El ciclo biológico dura de 4 a 14 días (dependiendo de la especie de *Eimeria*) y comprende de 2 partes, una interna (asexual y sexual) y otra externa (esporogónica), la primera comienza después de la ingestión de alimento contaminado con ooquistes, la pared de estos se descompone en el estómago liberan 8 esporozoitos. La presencia de enzimas biliares y pancreáticas en la porción duodenal del intestino las estimula e invaden las células epiteliales causando lesiones en el mismo. Ya dentro de la célula, el esporozoito se transforma en trofozoito y al evolucionar de origen a un merozoito, estos en conjunto rompen la célula e invaden otras más (hasta 6 veces) (Pakandl, 2009). La fase sexuada (gametogonia) es en dónde los merozoitos se diferencian en gametos cuya unión dará origen a un cigoto que una vez que se ha recubierto por la pared externa (que lo hace extremadamente resistente) se transforma en ooquiste y es expulsado con las heces, aquí es donde comienza la parte externa o esporogónica, en cualquiera de las especies del conejo es de aproximadamente 48-72 hrs. en condiciones favorables de temperatura (20 °C), humedad (100%, medio acuoso) y aireación (300-400 mL de oxígeno) esporula y adquiere el estadio infectante. El ooquiste es sumamente resistente al calor, por lo que su destrucción solo es posible aplastando las heces y exponiéndolas al sol a 30 °C- 40 °C, todos los ooquistes mueren en menos de una hora por desecación (Bhat *et al.*, 1996, Gómez, 2002; Allen *et al.*, 2002) (figura 6).

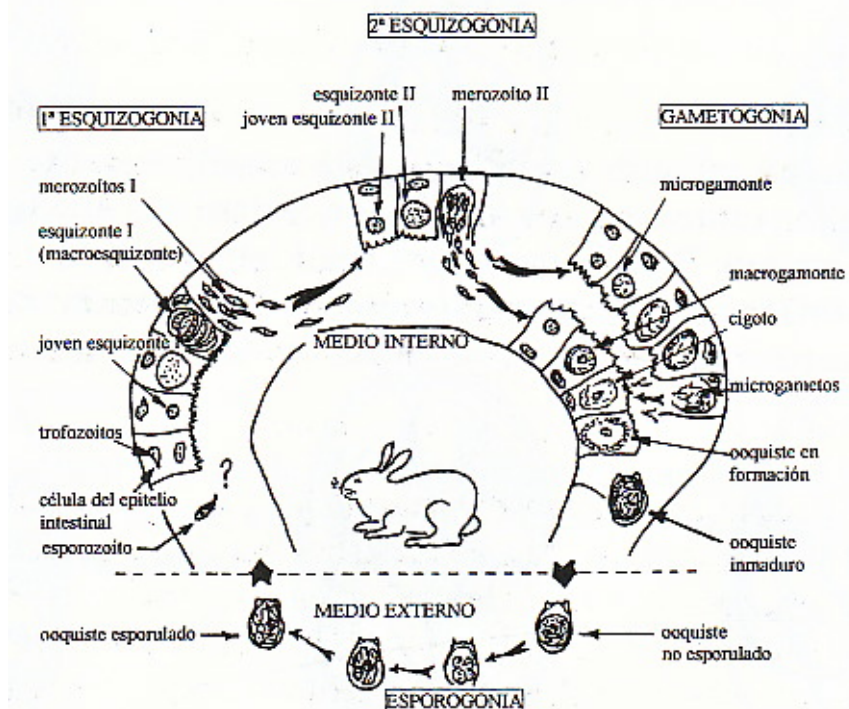


Figura 6. Ciclo de vida de *Eimeria* spp. en conejos (*Oryctolagus cuniculus*). Imagen tomada de Rosell, 2000.

El diagnóstico en el laboratorio se realiza por medio de la técnica de McMaster (ver anexo 1), si se encuentran menos de 1000 OPG (ooquistes por gramo) se puede considerar relativamente satisfactorio, a excepción de que se identifiquen especies muy patógenas (*E. intestinales* y *E. flavescens*) o *E. irresidua*. A partir de 4000-5000 OPG es aconsejable aplicar profilaxis médica; incluso sin mortalidad o diarrea hay disminución de rendimiento y riesgo de complicación infecciosa (Rosell, 2000). En un estudio realizado por Da Costa Freitas *et al.*, (2011) proponen como prueba complementaria el recuento de leucocitos y concentraciones séricas para controlar el nivel de infección de *E. stiedai*, ya que a partir del séptimo día de infección presentaban anemia y leucocitosis con neutrofilia y monocitosis.

Los fármacos más utilizados para tratar estas enfermedades hasta el momento son sintéticos, los principales fármacos utilizados son clasificados en 2 grupos, ionóforos: monensina, lasalocid sódico, salinomina, narasina, maduramicina y semduramicina; y no ionóforos: Robenidina, decoquinato, nicarbacina, diclazurilo y halofuginona. De acuerdo a una investigación realizada por Dorne *et al.*, (2011)

demonstraron que el nivel de residuos de coccidiostatos en los tejidos animales (pollos y conejos) era lo suficientemente baja, por lo tanto no presentaba un riesgo para la salud del consumidor (humano) respetando el periodo de retiro. Hay que considerar que dichos fármacos pueden llegar a ser tóxicos, especialmente para lactantes y hembras gestantes, además se llega a presentar residuos y resistencia (Pakandl, 2009; Sangster *et al.*, 2009; Gerhold *et al.*, 2011).

1.1.4 Justificación

Se propone este estudio a causa de la preocupación actual por el uso indiscriminado de antiparasitarios de origen químico que han propiciado la presencia de cepas resistentes, y que requieren de periodos de retiro en los tejidos y fluidos que se destinan al consumo humano. Al administrar un extracto de *Curcuma longa* oralmente a los conejos infectados de forma natural con coccidias del género *Eimeria*, se podrá conocer la eficacia antiparasitaria de un producto natural. En base a investigaciones realizadas anteriormente, se sabe que el uso de *Curcuma longa* puede disminuir la carga parasitaria de parásitos protozoarios y ser una alternativa para la prevención de estas enfermedades.

1.1.5 Hipótesis

La administración del extracto de curcumina disminuirá la carga de *Eimeria* spp. en conejos Nueva Zelanda blanco.

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Evaluar la eficacia antiparasitaria sobre *Eimeria* spp. de la curcumina a diferentes dosis en conejos Nueva Zelanda blanco.

2.2 Objetivos particulares

Determinar la dosis y tiempo de tratamiento apropiada de curcumina en conejos Nueva Zelanda blanco para reducir la carga de *Eimeria* spp.

Determinar el porcentaje de la reducción de la carga de *Eimeria* spp. en animales tratados y no tratados con curcumina.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Obtención del extracto acuoso de *Curcuma longa*

Se utilizó rizoma de *Curcuma longa* (Joy *et al.*, 1998) proveniente del mercado de Sonora, México, D.F, conocido como “Azafrán de la India”. Los rizomas se clasificaron por tamaño, seleccionando los de mejor desarrollo y uniformidad (se eliminaron los rizomas delgados) y se lavaron para eliminar la tierra. Se realizaron cortes longitudinalmente de los rizomas que se secaron a temperatura ambiente. Posteriormente se maceró. Mezclamos 500 gr en 1 litro de agua bidestilada y se hirvió durante 20 minutos. La mezcla se dejó reposar durante 24 horas. Pasado este tiempo se extrajo el sobrenadante y se introdujo a un rotovapor (marca Buchi) a 60°C al vacío hasta obtener la muestra desecada. El extracto acuoso se almacenó en frascos de vidrio color ámbar en gavetas frescas y oscuras (ASAC Compañía de biotecnología e investigación, S.A.).

3.2 Modelo animal

El diseño experimental fue aprobado por el Subcomité Institucional para el Cuidado de Animales en Experimentación (SICUAE) (ver anexo 2).

Se utilizaron 24 conejos de la raza Nueva Zelanda (blancos) de ocho meses de edad con un peso promedio de 3 Kg, procedentes de la Preparatoria Agrícola, Universidad Autónoma de Chapingo, Chapingo, Estado de México, México. Los conejos se mantuvieron en jaulas individuales de alambre galvanizado de 45 cm de ancho, 30 cm de largo y 30 cm de alto, las jaulas estaban a 60 cm de distancia del suelo (imagen 1). Se les proporcionó agua *ad libitum* y 100g diarios de dieta comercial (PURINA®) la cual contiene 16% proteína, 3% grasa, 17% fibra, 10% cenizas, 12% humedad, 42.5% de elementos libres de nitrógeno, 1% calcio y 0.55% de fósforo (según su análisis garantizado).

Previas a los tratamientos se tomaron muestras de heces de cada animal y se examinaron con la técnica de flotación para cuantificar ooquistes por gramo de heces (OPG) con la técnica de McMaster (Ibarra *et al* 2009) con la finalidad de confirmar la infección natural de *Eimeria* spp. Con base en la cantidad de ooquistes (el conteo de

ooquistes fue de 150 OPG hasta 1100 OPG, se realizó una asignación de los tratamientos controlado para lograr homogeneizar cada grupo experimental de conejos de acuerdo con este parámetro. (ver anexo 3).



Imagen 1. Jaulas de alambre galvanizado.

3.3 Diseño experimental

Se les administró a los conejos de los grupos 2, 3 y 4 (ver anexo 3) vía oral un extracto acuoso de *Curcuma longa* mezclado con avena y saborizante de manzana, esta mezcla se realizó a las 6 horas de la extracción del extracto acuoso de *Curcuma longa*. Cada 100 g de la mezcla contenía 36.84 g de extracto acuoso de *Curcuma longa*.

El tratamiento se administró a los conejos del día 1 al 7, se dejó descansar a los conejos a partir del día 8 al 14 y se volvió a administrar el tratamiento del día 15 al 21.

Se formaron 4 grupos con 6 conejos cada uno. El grupo 1 fue el grupo control sin tratamiento, al grupo 2 se le administró una dosis de 10 mg/Kg de extracto acuoso de *Curcuma longa*, al grupo 3 se le administró una dosis de 25 mg/Kg de extracto acuoso de *Curcuma longa* y al grupo 4 se le administró una dosis de 40 mg/Kg (South *et al.*, 1997) de extracto acuoso de *Curcuma longa*.

3.4 Obtención de muestras

Durante el experimento se registró el peso de cada conejo y se obtuvieron muestras de heces, con la ayuda de una malla mosquitera colocada debajo de cada jaula los días 7, 14, 21, 28, 35 y 42. Se realizó una muestra representativa de un día (de 3 a 5 g de heces) por la mañana. Las muestras se mantuvieron en refrigeración hasta su análisis. Los ooquistes de *Eimeria* spp. se cuantificaron utilizando la técnica de McMaster (ver anexo 1).

3.5 Análisis de datos

El diseño del experimento corresponde a un diseño de un solo factor con cuatro niveles y con observaciones repetidas en el tiempo. Se realizó un análisis de varianza multivariado (MANOVA) para observaciones repetidas (ver anexo 4). Los conteos de ooquistes se transformaron a logaritmo (\log_{10}) para lograr una mejor distribución de los datos y homogeneizar varianzas, previamente al análisis (Hermosilla *et al.*, 2006). En los casos donde se encontró interacción tiempo por tratamiento se hicieron análisis univariados (ANOVA) para cada tiempo, previamente se ajustaron los niveles de significancia por el método de Bonferroni (Maxwell *et al.*, 1990). Si las varianzas eran heterogéneas se utilizó la prueba de Welch (Zar, 1999) y para comparaciones múltiples la prueba de Dunnett T3 (Maxwell *et al.*, 1990; Saez *et al.*, 1994). Para analizar los datos se utilizó el programa JMP 5.0.1 SAS Institute.

IV. RESULTADOS

4.1 Conteo de ooquistes

Del análisis de varianza multivariado resultó significativa la interacción tiempo por tratamiento ($p < 0.001$), lo que significa, que el número de OPG para cada tratamiento no tiene un comportamiento homogéneo a través del tiempo.

Como consecuencia del resultado anterior, se realizaron análisis univariados (ANOVA) y utilizó la prueba de Welch (anexo 5). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.003$) entre los grupos a partir de los 28 días. Para las comparaciones múltiples se utilizó la prueba de Dunnett T3 (anexo 6). A los 28 días se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en el logaritmo promedio del número de ooquistes por gramo de heces en los conejos, entre el grupo control y los grupos que recibieron 25 mg/kg y 40 mg/kg de extracto acuoso de *Curcuma longa*, y también entre estos dos grupos. A los 35 días se observó que hay diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre el grupo control con respecto a los grupos que recibieron 25 mg/kg y 40 mg/kg de extracto acuoso de *C. longa*. A los 42 días se observa que los 3 grupos tratados son significativamente diferentes respecto al grupo control. Las diferencias encontradas entre tratamientos se muestran para cada tiempo en los cuadros 3, 4 y 5, y su representación gráfica en la figura 7.

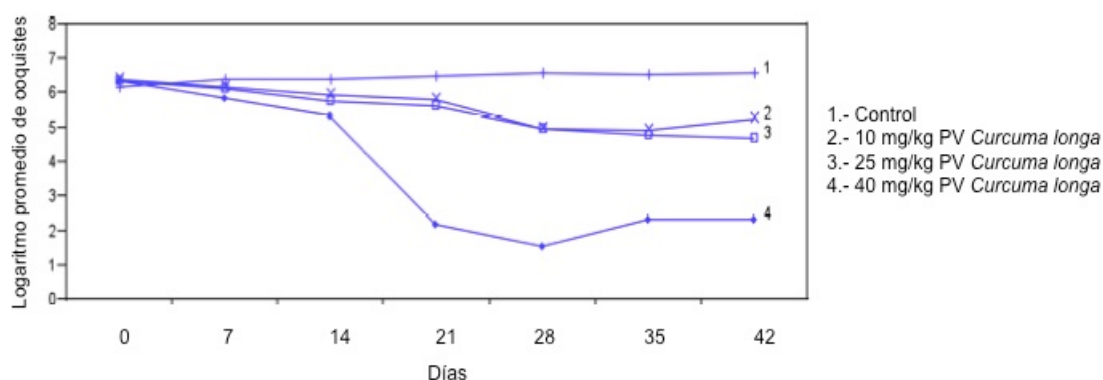


Figura 7. Logaritmo promedio del número de ooquistes por gramos de heces (OPG) en los tres grupos de conejos Nueva Zelanda tratados con extracto acuoso de *Curcuma longa* y en el grupo control, a través del tiempo (42 días de tratamiento).

Cuadro 3. Logaritmo promedio del número de ooquistes por gramo de heces encontrados en los cuatro grupos de conejos de la raza Nueva Zelanda a los 28 días de tratamiento.

| Extracto acuoso de <i>Curcuma longa</i> (mg) | Media | Desviación estándar |
|---|------------------------|--------------------------------|
| 0 | 6.56649 ^a | 0.56297 |
| 10 | 4.99321 ^{abc} | 2.46769 |
| 25 | 4.97650 ^b | 0.94147 |
| 40 | 1.31060 ^c | 2.03039 |

Literales diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (p<0.05)

Cuadro 4. Logaritmo promedio del número de ooquistes por gramo de heces encontrados en los cuatro grupos de conejos de la raza Nueva Zelanda a los 35 días de tratamiento.

| Extracto acuoso de <i>Curcuma longa</i> (mg) | Media | Desviación estándar |
|---|-----------------------|--------------------------------|
| 0 | 6.50397 ^a | 0.59153 |
| 10 | 4.91134 ^{ab} | 2.42689 |
| 25 | 4.80468 ^b | 0.61785 |
| 40 | 2.3591 ^b | 2.15355 |

Literales diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (p<0.05)

Cuadro 5. Logaritmo promedio del número de ooquistes por gramo de heces encontrados en los cuatro grupos de conejos de la raza Nueva Zelanda a los 42 días de tratamiento.

| Extracto acuoso de <i>Curcuma longa</i> (mg) | Media | Desviación estándar |
|--|----------------------|---------------------|
| 0 | 6.55431 ^a | 0.55705 |
| 10 | 5.27210 ^b | 0.74754 |
| 25 | 4.72080 ^b | 0.68276 |
| 40 | 2.3591 ^b | 2.15355 |

Literales diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$)

4.2 Peso de los animales

Aunque se encontró que los pesos promedio cambian a través del tiempo (figura 8) no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el peso promedio entre los tratamientos ($p > 0.05$) (ver anexo 7).

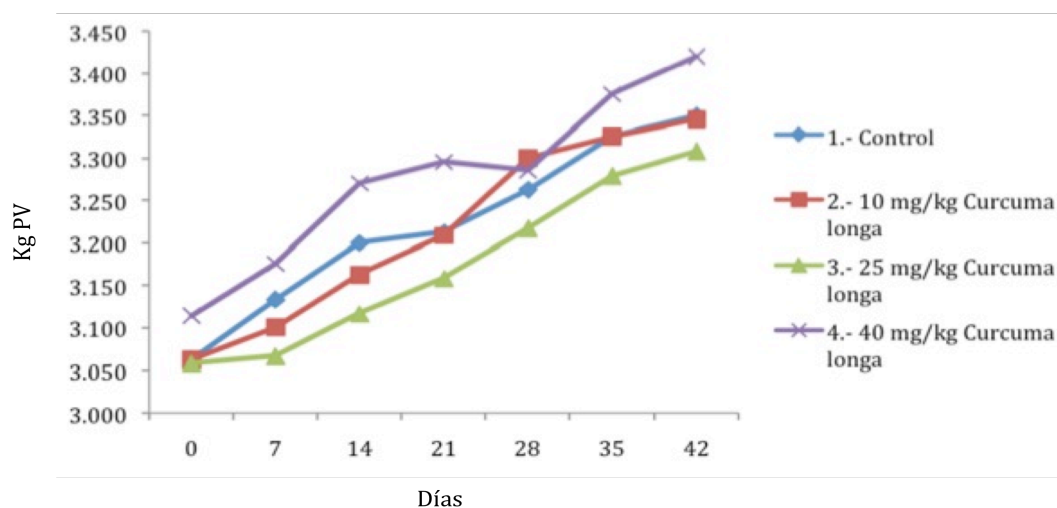


Figura 8. Peso promedio en los cuatro grupos de conejos Nueva Zelanda a lo largo del tiempo (42 días de tratamiento).

V. DISCUSIÓN

Los resultados encontrados indican que el extracto acuoso de *Curcuma longa* a dosis de 25 mg/kg PV y 40 mg/kg disminuyen la carga parasitaria de ooquistes de *Eimeria* spp. comparándolo con el grupo control, a partir de los 28 días en conejos de la raza Nueva Zelanda. Estos resultados son similares a lo encontrado por Pérez (2010), que a una dosis de 30 mg/kg de extracto de curcumina logró disminuir la carga parasitaria de *Eimeria* spp. en borregos. La dosis de 10 mg/kg del extracto acuoso de *Curcuma longa* empieza a disminuir la carga de *Eimeria* spp. con respecto al grupo control hasta los 42 días. La disminución en la carga parasitaria puede deberse a que la curcumina precipita en la superficie del esporozoito especialmente a altas concentraciones, ya que la curcumina afecta la morfología, la viabilidad y capacidad de adhesión del esporozoito a la célula huésped (Chattopadhyay *et al.* 2004); estas alteraciones dependen tanto de la dosis como del tiempo de suministro (Khalafalla *et al.*, 2010). Las mismas alteraciones morfológicas fueron reportadas por Pérez-Arriaga *et al.*, (2006) en trofozoitos de *Giardia lamblia*.

Es importante hacer notar que el peso promedio de los animales no se vio afectado por la administración del extracto acuoso de *Curcuma longa* dado que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas con respecto al peso promedio del grupo control (ver anexo 6). Ramírez-Tortosa *et al.*, (1999) obtuvieron los mismos resultados al administrarles extracto de curcumina a conejos de la raza Nueva Zelanda. Cabe mencionar que en un estudio realizado por Allen *et al.*, (1998), en donde administraron 1% y 5% curcumina a la dieta de aves infectadas con *Eimeria tenella* (altamente patógena) y *Eimeria maxima* (medianamente patógena), solamente observaron ganancias de peso y disminución en la excreción de ooquiste y lesiones intestinales en las aves infectadas con *E. maxima*.

VI. CONCLUSIÓN

Con base en estos resultados podemos concluir que la dosis más eficiente del extracto acuoso de *Curcuma longa* utilizada en este estudio para disminuir la carga parasitaria de *Eimeria* spp. es la de 25 mg/kg, ya que su efecto es continuo a lo largo del tiempo, aunque aún faltan más estudios *in vivo* para saber si el efecto antiparasitario es a esa dosis o a una dosis menor y si puede tener efecto entre los 21 y 28 días.

VII. REFERENCIAS

- Allen PC, Danforth HD, Augustine PC. 1998. Dietary modulation of avian coccidiosis. *Int J Parasitol.* 28: 1131-1140.
- Allen PC, Fetterer RH. 2002. Recent advances in biology and immunobiology of *Eimeria* species and in diagnosis and control of infection with these coccidian parasites of poultry. *Clinical Microbiology Reviews.* 15: 58-65.
- Aggarwal BB, Sundaram C, Malani N, Ichikawa H. Curcumin: The Indian solid gold. In: *The molecular targets and therapeutic uses of curcumin in health and disease. Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2007. DOI: 10.1007/978-0-387-46401-5_20
- Aggarwall BB, Harikumar KB. 2009. Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases. *Int J Biochem Cell Biol.* 41: 40–59. DOI: 10.1016/j.biocel.2008.06.010.
- Antony S, Kuttan R, Kuttan G. 1999. immunomodulatory activity of curcumin. *Immunological investigation.* 28: 291-303.
- Araujo CAC, Leon LL. 2001. Biological activities of *Curcuma longa* L. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 96: 723–728.
- Baker DG. Flynn's. Parasites of laboratory animals. 2nd Edition. Blackwell publishing. 2007.
- Bhat TK, Jithendran KP, Kurade NP. 1996. Rabbit Coccidiosis and its control: A review. *World rabbit sciences.* 4: 37-41.
- Bishnoi M, Chopra K, Kulkarni SK. 2008. Protective effect of Curcumin, the active principal of turmeric (*Curcuma longa*) in haloperidol-induced orofacial dyskinesia and associated behavioural, biochemical and neurochemical changes in rat brain. *Pharmacol Biochem Behav.* 88: 511–522.
- Bowman DD. Georgis' Parasitology for veterinarians. 9th Editions. Elsevier Inc., 2009.
- Calabrese V, Scapagnini G, Colombrita C, Ravagna A, Pennisi G, Giuffrida Stella

AM, Galli F, Butterfield DA. 2003. Redox regulation of heat shock protein expression in aging and neurodegenerative disorders associated with oxidative stress: a nutritional approach. *Amino Acids*. 25: 437–444.

Chattopadhyay I, Biswas K, Bandyopadhyay U, Banerjee RK. 2004. Tumeric and curcumin: biological actions and medicinal applications. *Current science*. 87: 44-53.

Churchill M, Chadburn A, Bilinski RT, Bertagnolli MM. 2000. Inhibition of intestinal tumors by curcumin is associated with changes in the intestinal immune cell profile. *J Surg Res*. 89: 169–175.

Cui L, Miao J, Cui L. 2007. Cytotoxic effect of curcumin on malaria parasite *Plasmodium falciparum*: inhibition of histone acetylation and generation of reactive oxygen species. *Antimicrob Agents Chemother*. 51: 488-494.

Da Costa Freitas FL, Yamamoto BL, da Costa Freitas WL, Fagliari JJ, de Sousa Almeida K, Machado RZ, Machado CR. 2011. Systemic inflammatory response indicators in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) experimentally infected with sporulated oocysts of *Eimeria stiedai* (Apicomplexa: Eimeriidae). *Bras Parasitol Vet*. 20: 121-126.

Dorne JLCM, Fernández-Cruz ML, Bertelsen U, Renshaw DW, Peltonen K, Anadon A, Feil A, Sanders P, Wester P, Fink-Gremmels J. 2011. Risk assessment of coccidostatics during feed cross-contamination: Animal and human health aspects, *Toxicol. Appl. Pharmacol*. DOI: 10.1016/j.taap.2010.12.014

Forward AN, Conrad MD, Coombs PRM., Doucette DC, Furlong JS, Lin TJ, Hoskin WD. 2011. Curcumin blocks interleukin (IL)-2 signaling in T-lymphocytes by inhibiting IL-2 synthesis, CD25 expression, and IL-2 receptor signaling. *Biochemical and biophysical research communications*. 40: 801-806.

Gerhold RW, Fuller AL, Lollis L, Parr C, McDougald LR. 2011. The efficacy of anticoccidial products against *Eimeria* spp. in northern bobwhites. *Avian Dis*. 55: 59-64.

Gómez BM. Parasitosis del aparato digestivo y respiratorio. Coccidiosis. En: Cordero del CM, Rojo VFA, Martínez FAR, Sánchez AMC, Hernández RS,

- Navarrete LCI, *et al.* Parasitología Veterinaria. Madrid: McGraw-Hill Interamericana, 2002: 729-734.
- Gres V, Voza T, Chabaud A, Landau I. 2003. Coccidiosis of the wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) in France. *Parasitology*. 10: 51–57.
- Hafner-Bratkovic I, Gaspersic J, Smid LM, Bresjanac M, Jerala R. 2008. Curcumin binds to the alpha-helical intermediate and to the amyloid form of prion protein - a new mechanism for the inhibition of PrP (Sc) accumulation. *J Neurochem*. 104: 1553–1564.
- Hermosilla C, Zahner H, Taubert A. 2006. *Eimeria bovis* modulates adhesion molecule gene transcription in and PMN adhesion to infected bovine endothelial cells. *Int J Parasitol*. 36: 423-431.
- Holder GM, Plummer JL, Ryan AJ. 1978. The metabolism and excretion of curcumin (1,7-bis (4hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione) in the rat. *Xenobiotica*. 8: 761-768.
- Huang MT, Lou YR, Ma W, Newmark HL, Reuhl RK, Conney AH. 1994. Inhibitory effects of dietary curcumin on forestomach, duodenal, and colon carcinogenesis in mice. *Cancer Res*. 54: 5841–5847.
- Ibarra VF, Vera MY, Alcalá CY. Parasitología Veterinaria. Volumen 1. Protozoarios. Primera Edición. Ed. Acastdel. 2009.
- Jagetia GC, Aggarwal BB. 2007. “Spicing Up” of the immune system by curcumin. *Journal of clinical immunology*. DOI: 10.1007/s10875-006-9066-7.
- Joint FAO/WHO expert committee on food additives. *Compendium of food additive specifications*. Rome: FAO 67th meeting 2006.
- Johnson-Delaney CA. 2006. Anatomy and Physiology of the Rabbit and Rodent Gastrointestinal System. Session #110 Association of Avian Veterinarians. Proceedings. 9-17.
- Joy PP, Thomas J, Mathew S, Skaria BP. 1998. Zingiberaceous medicinal and aromatic plants. *Aromatic and medicinal plants research station*, Odakkali, Asamannoor PO, Kerala, India.

- Karunagaran D, Joseph J, Kumar TRS. Cell growth regulation. In: *The molecular targets and therapeutic uses of curcumin in health and disease*. 2007. 245-268.
- Khalafalla RE, Müller U, Shahiduzzaman M, Viktor D, Desouky AY, Gottfried A, Dauschies A. 2010. Effects of curcumin (diferuloylmethane) on *Eimeria tenella* sporozoites in vitro. *Parasitology Research*. 108: 879-886.
- Kiuchi F, Goto Y, Sugimoto N, Akao N, Kondo K, Tsuda Y. 1993. Nematocidal activity of turmeric: Synergistic action of curcuminoids. *Chem. Pharm Bull*. 41: 1640-1643.
- Kohli K, Ali J, Ansari MJ, Raheman Z. 2005. Curcumin: A natural antiinflammatory agent. *Indian J Pharmacol*. 37: 141-7
- Koide T, Nose M, Ogihara Y, Yabu Y, Ohta N. 2002. Leishmanicidal effect of curcumin in vitro. *Biol Pharm Bull*. 25: 131-133.
- Kunnumakkara AB, Guha S, Aggarwal BB. 2009. Curcumin and colorectal cancer: add spice to your life. *Current colorectal cancer reports*. DOI: 10.1007/s11888-009-0002-0.
- Kuttan G, Hari KKB, Guruvayoorappan C, Kuttan R. Antitumor, anti-invasion, and antimetastatic effects of curcumin. In: *The molecular targets and therapeutic uses of curcumin in health and disease. Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2007. DOI: 10.1007/978-0-387-46401-5_20.
- Li X, Liu X. Effect of curcumin on immune function of mice. 2005. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci*. 25: 137-140.
- Lim GP, Chu T, Yang F, Beech W, Frautschy SA, Cole GM. 2001. The curry spice curcumin reduces oxidative damage and amyloid pathology in an Alzheimer transgenic mouse. *J Neurosci*. 21: 8370–8377.
- Lee CJ, Lee JH, Seok JH, Hur GM, Park YC, Seol IC, Kim YH. 2003. Effects of baicalein, berberine, curcumin and hesperidin on mucin release from airway goblet cells. *Planta Med*. 69: 523-526
- Magalhães LG, Machado CB, Morais ER, Bueno de Carvalho Moreira É, Soares CS, da Silva SH, Da Silva Filho AA, Rodrigues V. 2009. In vitro schistosomicidal activity of curcumin against *Schistosoma mansoni* adult Worms. *Parasitol Res*. 104:1197-1201. DOI. 10.1007/s00436-008-1311-y.

- Maxwell SE, Delaney HH. Designing experiments and analyzing data. Wadsworth. Belmont, California. 1990.
- Mesa MD, Ramírez-Tortosa MC; Aguilera CM, Ramírez-Boscá A, Gil A. 2000. Efectos farmacológicos y nutricionales de los extractos de *Curcuma longa* L. y de los curcuminoides. *Ars Pharma*. 41: 307-321.
- Ming-Hsien LI, Hong-Kean OOI. 2008. Effect of chromium compounds on Sporulation of *Eimeria piriformis* Oocysts. *Exp Anim*. 57: 79-83.
- Nagajyothi F, Zhao D, Weiss LM, Tanowitz HB. 2011. Curcumin treatment provides protection against *Trypanosoma cruzi* infection. *Parasitology Research*. DOI: 10.1007/s00436-011-2790-9
- Natarajan C, Bright JJ. 2002. Curcumin inhibits experimental allergic encephalomyelitis by blocking IL-12 signaling through Janus kinase-STAT pathway in T lymphocytes. *J Immunol*. 168: 6506–6513.
- Nayak A, Gayen P, Saini P, Mukherjee N, Sinha Babu SP. 2012. Molecular evidence of curcumin-induced apoptosis in the filarial worm *Setaria cervi*. *Parasitol Res*. DOI: 10.1007/s00436-012-2948-0.
- Nose M, Koide T, Ogihara Y, Yabu Y, Ohta N. 1998. Trypanocidal effects of curcumin in vitro. *Biol Pharm Bull*. 21: 643-645.
- Osawa T. Nephroprotective and hepatoprotective effects of curcuminoids. In: *The molecular targets and therapeutic uses of curcumin in health and disease. Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2007.
- Pakandl M. Coccidia of rabbit: a review. 2009. *Folia parasitologica*. 56: 153-166.
- Pérez-Arriaga L, Mendoza-Magana, ML, Cortes-Zarate R, Corona-Rivera A, Bobadilla-Morales L, Troyo-Sanroman R, Ramirez-Herrera MA. 2006. Cytotoxic effect of curcumin on *Giardia lamblia* trophozoites. *Acta Tropica*. 98: 152-161.
- Pérez FA. 2010. Evaluación de la eficacia anticoccidiana de los extractos de curcumina y naringenina administrados a borregos infectados naturalmente con coccidias del género *Eimeria* spp. (tesis de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México.

- Ramírez-Tortosa MC, Mesa MD, Aguilera MC, Quiles JL, Baró I, Ramírez-Tortosa CL, Martínez-Victoria E, Gil A. 1999. Oral administration of a turmeric extract inhibits LDL oxidation and has hypocholesterolemic effects in rabbits with experimental atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 147: 371-278.
- Ravindranath V, Chandrasekhara N. 1982. Metabolism of curcumin-studies with (³H)-curcumin. *Toxicology*. 22: 337-344.
- Rosell PJM. Enfermedades del conejo. Tomo II Enfermedades. Ediciones Mundi-Prensa. España, 2000.
- Saez A, Suarez JM, Aliaga F, Bo RM. 1994. La utilización de los procedimientos de comparaciones múltiples en la investigación educativa en España. *Revista de Investigación Educativa* 23: 396-404
- Sangster NC, Maitland GN, Geerts S, Decuypere S, Dujardin JC, Upcroft JA, Upcroft P, Duraisingh M. 2009. Drug resistance assays for parasites. In: Antimicrobial drug resistance. DOI: 10.1007/978-1-60327-595-8_84.
- Schmidt GD, Roberts LS, Janovy J. Foundations of parasitology. 8th ed. Mc Graw-Hill. Higher Education. 2009
- Shahiduzzaman M, Dyachenko V, Khalafalla RE, Desouky AY, Dauschies A. 2009. Effects of curcumin on *Cryptosporidium parvum* in vitro. *Parasitology Reserach*. 105: 1155-1161.
- Sharma RA, Gescher AJ, Steward WP. 2005. Curcumin: The story so far. *European Journal of Cancer*. 41: 1955-1968.
- Sharma S, Kulkarni SK, Agrewala JN, Chopra K. 2006. Curcumin attenuates thermal hyperalgesia in a diabetic mouse model of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol*. 536: 256–261.
- Sharma RA, Steward WP, Gescher AJ. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of curcumin. In: *The molecular targets and therapeutic uses of curcumin in health and disease. Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2007. DOI: 10.1007/978-0-387-46401-5_20.
- Shankar S, Srivastava RK. 2012. Curcumin: Structure, Biology and Clinical Applications. In: *Nutrition, diet and cancer*. 413-457, DOI: 10.1007/978-94-007-2923-0_17.

- Shoba G, Joy D, Josepf T, Majeed M, Rajendran R, Srinivas PS. 1998. Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers. *Planta Med.* 64: 353-356.
- Singh R, Mehta A, Mehta P, Shukla K. 2011. Anthelmintic activity of rhizome extracts of *Curcuma longa* and *Zingiber officinale* (zingiberaceae). *Int J Pharm Pharm Sci.* 3: 236-237.
- Soudamini KK, Kuttan R. 1989. Inhibition of chemical carcinogenesis by curcumin. *J Ethnopharmacol.* 27: 227–233.
- South EH, Exon JH, Hendrix K. 1997. Dietary curcumin enhances antibody responses in rats. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 19: 105-119.
- Sumanont Y, Murakami Y, Tohda M, Vajragupta O, Watanabe H, Matsumoto K. 2006. Prevention of kainic acid-induced changes in nitric oxide level and neuronal cell damage in the rat hippocampus by manganese complexes of curcumin and diacetylcurcumin. *Life Sci.* 78: 1884–1891.
- Tönnesen HH, de Vries H, Karlsen J, van Henegouwen GB. 1987. Studies on curcumin and curcuminoids IX: investigation of the photobiological activity of curcumin using bacterial indicator systems. *J Pharmaceu Sci.* 76: 371-373.
- Urquhart GM, Armour J, Duncan JL, Dunn AM, Jennings FW. Veterinary Parasitology. 2nd Edition. Scotland: Blackwell Publishing.
- Varalakshmi Ch, Ali MA, Pardhasaradhi BVV, Srivastava RM, Sing S, Khar A. 2008. immunomodulatory effects of curcumin: In-vivo. *International immunopharmacology.* 8: 688-700.
- Xu M, Deng B, Chow YL, Zhao ZZ, Hu B. 2007. Effects of curcumin in treatment of experimental pulmonary fibrosis: a comparison with hydrocortisone. *J Ethnopharmacol.* 112: 292–299.
- Xu1 D, Tian W, Shen H. 2011. Curcumin Prevents Induced Drug Resistance: A Novel Function?. *Chin J Cancer Res.* 23: 218-223.
- Zar JH. Biostatistical analysis, fourth edition. Prentice Hall. 1999
- Zbarsky V, Datla KP, Parkar S, Rai DK, Aruoma OI, Dexter DT. 2005.

Neuroprotective properties of the natural phenolic antioxidants curcumin and naringenin but not quercetin and fisetin in a 6-OHDA model of Parkinson's disease. *Free Radic Res.* 39: 1119–1125.

VIII. ANEXOS

Anexo 1. Técnica McMaster

La técnica McMaster consiste en examinar un volumen conocido de una suspensión de heces en una solución salina saturada, el material que se utiliza es un tubo con una capacidad de 30 mL, un gotero y una cámara de McMaster dividida en dos, cada una tiene una cuadrícula de 1 cm² y con una capacidad de 0.15 mL. La técnica es la siguiente:

- Pesar 2 gramos de heces y se colocan el tubo.
- Agregar la solución saturada para flotación y se mezcla el contenido hasta obtener una suspensión homogénea.
- Se agita el tubo y se pone una gasa en la boca del tubo y con el gotero se toma la suspensión y se llenan ambas cámaras rápidamente.
- Contar los ooquistes de cada uno de los cuadros de las cámaras observando la laminilla al microscopio con el objetivo 10x.

Se suman las cuentas de los cuadros, se multiplican por 100 y se divide entre 2 para obtener el número de ooquistes por gramo de heces (OPG).

Anexo 2. SICUAE



FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL



**A QUIEN CORRESPONDA
PRESENTE**

Por medio de la presente me dirijo a usted con la finalidad de informarle que el Subcomité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales en Experimentación (SICUAE), ha revisado el protocolo de investigación de la alumna de maestría María Eugenia Cervantes Valencia, el cual lleva por título:

“Valoración de la eficacia antiparasitaria de la *curcumina* en conejos”

Dicho protocolo de investigación reúne los requisitos que marcan las normas para el cuidado y uso de animales en experimentación, por lo cual, no tuvo objeción en que se realicen los experimentos planteados en el protocolo.

Se extiende la presente para los fines que a la interesada convengan.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Universitaria D.F. a 13 junio del 2011

EL COORDINADOR

DR. CARLOS G. GUTIÉRREZ AGUILAR



Anexo 3. Grupos de conejos

Grupo 1. Control

| No. Animal | OPG |
|-------------------|------------|
| C26 | 300 |
| C18 | 150 |
| C20 | 500 |
| C13 | 650 |
| C9 | 850 |
| C30 | 1000 |

Grupo 2. 10 mg/kg de extracto acuoso de *Curcuma longa*

| No. Animal | OPG |
|-------------------|------------|
| C28 | 250 |
| C8 | 500 |
| C10 | 600 |
| C29 | 700 |
| C25 | 850 |
| C21 | 950 |

Grupo 3. 25 mg/kg de extracto acuoso de *Curcuma longa*

| No. Animal | OPG |
|-------------------|------------|
| C1 | 350 |
| C22 | 350 |
| C11 | 550 |
| C3 | 700 |
| C7 | 800 |
| C24 | 950 |

Grupo 4. 40 mg/kg de extracto acuoso de *Curcuma longa*

| No. Animal | OPG |
|-------------------|------------|
| C16 | 250 |
| C19 | 450 |
| C12 | 600 |
| C5 | 650 |
| C2 | 850 |
| C4 | 1100 |

Anexo 4. Análisis de Varianza Multivariado de ooquistes

| Fuente de Variación | Valor | Grados del numerador | Grados del denominador | F | P>F |
|-----------------------------|--------------|-----------------------------|-------------------------------|----------|---------------|
| Tratamiento | 1.2541929 | 3 | 19 | 7.9432 | .0012 |
| Tiempo | 15.026476 | 6 | 14 | 35.0618 | <0.0001 |
| Tiempo x tratamiento | 0.0114002* | 18 | 40.083 | 8.6043 | <0.0001 |

*Lambda de Wilks

Anexo 5. Prueba de Welch

| Igualdad de medias | | | | |
|---------------------------|------------------------|-----|--------|------|
| Día | Statistic ^a | df1 | df2 | Sig. |
| 0 | .117 | 3 | 10.976 | .949 |
| 7 | .449 | 3 | 10.585 | .723 |
| 14 | 1.778 | 3 | 10.565 | .212 |
| 21 | 5.018 | 3 | 10.445 | .021 |
| 28 | 13.402 | 3 | 9.943 | .001 |
| 35 | 10.418 | 3 | 9.331 | .002 |
| 42 | 11.733 | 3 | 9.703 | .001 |

a. Asymptotically F distributed.

Anexo 6. Prueba de Dunnett T3

| Comparaciones múltiples | | | | | |
|-------------------------|-----------------|-----------------|----------------------------|------------------|---------------|
| Variable dependiente | Tratamiento (I) | Tratamiento (J) | Diferencia de medias (I-J) | Error estándar | Significancia |
| Día 0 | 1 | 2 | -2.037358833598972E-1 | .349627146144925 | .989 |
| | | 3 | -1.757528999978604E-1 | .337108161999872 | .994 |
| | | 4 | -1.982897279880778E-1 | .358416138485969 | .992 |
| | 2 | 1 | .203735883359897 | .349627146144925 | .989 |
| | | 3 | .027982983362037 | .260809435229625 | 1.000 |
| | | 4 | .005446155371819 | .287822474704560 | 1.000 |
| | 3 | 1 | .175752899997860 | .337108161999872 | .994 |
| | | 2 | -2.798298336203686E-2 | .260809435229625 | 1.000 |
| | | 4 | -2.253682799021739E-2 | .272478528531230 | 1.000 |
| | 4 | 1 | .198289727988078 | .358416138485969 | .992 |
| | | 2 | -5.446155371819472E-3 | .287822474704560 | 1.000 |
| | | 3 | .022536827990217 | .272478528531230 | 1.000 |
| Día 7 | 1 | 2 | .241116660114775 | .340976181245309 | .974 |
| | | 3 | .281155677844808 | .272710513700557 | .870 |
| | | 4 | .487414091580934 | .474951159466281 | .871 |
| | 2 | 1 | -2.411166601147752E-1 | .340976181245309 | .974 |
| | | 3 | .040039017730033 | .295239114091203 | 1.000 |
| | | 4 | .246297431466159 | .488235306061433 | .995 |
| | 3 | 1 | -2.811556778448079E-1 | .272710513700557 | .870 |
| | | 2 | -4.003901773003271E-2 | .295239114091203 | 1.000 |
| | | 4 | .206258413736126 | .443260625581711 | .996 |
| | 4 | 1 | -4.874140915809342E-1 | .474951159466281 | .871 |
| | | 2 | -2.462974314661590E-1 | .488235306061433 | .995 |
| | | 3 | -2.062584137361263E-1 | .443260625581711 | .996 |
| Día 14 | 1 | 2 | .472219425698191 | .491020618589761 | .899 |
| | | 3 | .639249419452187 | .326356949105565 | .352 |
| | | 4 | 1.038415577933296E0 | .465079378299709 | .239 |
| | 2 | 1 | -4.722194256981913E-1 | .491020618589761 | .899 |
| | | 3 | .167029993753996 | .448244445148378 | .999 |
| | | 4 | .566196152235104 | .557416408528246 | .878 |
| | 3 | 1 | -6.392494194521872E-1 | .326356949105565 | .352 |
| | | 2 | -1.670299937539958E-1 | .448244445148378 | .999 |

| | | | | | |
|--------|---|---|-----------------------|---------------------|-------|
| | | 4 | .399166158481108 | .419667324014808 | .901 |
| | 4 | 1 | -1.038415577933296E0 | .465079378299709 | .239 |
| | | 2 | -5.661961522351042E-1 | .557416408528246 | .878 |
| | | 3 | -3.991661584811084E-1 | .419667324014808 | .901 |
| Día 21 | 1 | 2 | .705230264904298 | .452085567305210 | .568 |
| | | 3 | .878433893171891 | .314249813705198 | .099 |
| | | 4 | 3.997905985294761E0 | 1.165302821536525E0 | .074 |
| | 2 | 1 | -7.052302649042979E-1 | .452085567305210 | .568 |
| | | 3 | .173203628267594 | .428387510465026 | .998 |
| | | 4 | 3.292675720390463E0 | 1.201121800480558E0 | .148 |
| | 3 | 1 | -8.784338931718914E-1 | .314249813705198 | .099 |
| | | 2 | -1.732036282675935E-1 | .428387510465026 | .998 |
| | | 4 | 3.119472092122870E0 | 1.156315339705279E0 | .171 |
| | 4 | 1 | -3.997905985294761E0 | 1.165302821536525E0 | .074 |
| | | 2 | -3.292675720390463E0 | 1.201121800480558E0 | .148 |
| | | 3 | -3.119472092122870E0 | 1.156315339705279E0 | .171 |
| Día 28 | 1 | 2 | 1.573289713378090E0 | 1.033312657716038E0 | .603 |
| | | 3 | 1.58999581179636E0* | .447827657192375 | .037 |
| | | 4 | 5.255886432303882E0* | .860174439339684 | .005 |
| | 2 | 1 | -1.573289713378090E0 | 1.033312657716038E0 | .603 |
| | | 3 | .016709867801546 | 1.078258008060617E0 | 1.000 |
| | | 4 | 3.682596718925792E0 | 1.304603689820698E0 | .095 |
| | 3 | 1 | -1.58999581179636E0* | .447827657192375 | .037 |
| | | 2 | -1.670986780154582E-2 | 1.078258008060617E0 | 1.000 |
| | | 4 | 3.665886851124247E0* | .913676829871486 | .025 |
| | 4 | 1 | -5.255886432303882E0* | .860174439339684 | .005 |
| | | 2 | -3.682596718925792E0 | 1.304603689820698E0 | .095 |
| | | 3 | -3.665886851124247E0* | .913676829871486 | .025 |
| Día 35 | 1 | 2 | 1.592622172660366E0 | 1.019780046629971E0 | .581 |
| | | 3 | 1.699284904779374E0* | .349200529651042 | .004 |
| | | 4 | 4.144871702063391E0* | .992911290924222 | .047 |
| | 2 | 1 | -1.592622172660366E0 | 1.019780046629971E0 | .581 |
| | | 3 | .106662732119009 | 1.022378123231003E0 | 1.000 |
| | | 4 | 2.552249529403026E0 | 1.381734000666404E0 | .405 |
| | 3 | 1 | -1.699284904779374E0* | .349200529651042 | .004 |
| | | 2 | -1.066627321190090E-1 | 1.022378123231003E0 | 1.000 |

| | | | | | |
|--------|---|---|-----------------------|---------------------|------|
| | | 4 | 2.445586797284017E0 | .995579487033319 | .243 |
| | 4 | 1 | -4.144871702063391E0* | .992911290924222 | .047 |
| | | 2 | -2.552249529403026E0 | 1.381734000666404E0 | .405 |
| | | 3 | -2.445586797284017E0 | .995579487033319 | .243 |
| Día 47 | 1 | 2 | 1.282216121197538E0* | .380594770371295 | .042 |
| | | 3 | 1.833516371398680E0* | .359736649300488 | .003 |
| | | 4 | 4.195222569480034E0* | .989581744728191 | .046 |
| | 2 | 1 | -1.282216121197538E0* | .380594770371295 | .042 |
| | | 3 | .551300250201142 | .413314787810820 | .704 |
| | | 4 | 2.913006448282495E0 | 1.010292376726882E0 | .151 |
| | 3 | 1 | -1.833516371398680E0* | .359736649300488 | .003 |
| | | 2 | -5.513002502011419E-1 | .413314787810820 | .704 |
| | | 4 | 2.361706198081353E0 | 1.002620947361672E0 | .267 |
| | 4 | 1 | -4.195222569480034E0* | .989581744728191 | .046 |
| | | 2 | -2.913006448282495E0 | 1.010292376726882E0 | .151 |
| | | 3 | -2.361706198081353E0 | 1.002620947361672E0 | .267 |

*La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05

Anexo 7. Análisis univariado del peso de los conejos

| Tratamiento | Media de mínimos cuadrados | Error estándar | Media |
|---|-----------------------------------|-----------------------|--------------|
| Control | 3.2208333 | 0.07950734 | 3.22083 |
| 10 mg/kg <i>Curcuma longa</i> | 3.2148810 | 0.07950734 | 3.21488 |
| 25 mg/kg <i>Curcuma longa</i> | 3.1720238 | 0.07950734 | 3.17202 |
| 40 mg/kg <i>Curcuma longa</i> | 3.2762857 | 0.08709592 | 3.27629 |