



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA  
PRODUCCIÓN Y LA SALUD ANIMAL

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

“EFECTO INMUNOMODULADOR DE UN EXTRACTO DE NARINGENINA EN  
OVINOS INFECTADOS CON COCCIDIAS DEL GÉNERO *EIMERIA* SPP”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

AGUSTÍN PÉREZ FONSECA

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Yazmín Alcalá Canto

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM

COMITÉ TUTORAL

Dra. Lilia Gutiérrez Olvera

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM

Dr. Espiridión Ramos Martínez

Departamento de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina, UNAM

MÉXICO, D. F.

Agosto 2015



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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 todo el tiempo, la paciencia, el apoyo, la ayuda, la comprensión, la compañía, el cariño y el amor.

Este nuevo logro también es tuyo.

Te amo.

A mi familia, por el apoyo incondicional.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Yazmín Alcalá Canto por su amistad, asesoría y conocimientos compartidos.

A la Dra. Lilia Gutiérrez Olvera por formar parte de mi comité tutorial y por su valiosa colaboración para la realización del experimento.

Al Dr. Espiridión Ramos Martínez por formar parte de mi comité tutorial y por sus atinados consejos y sabiduría.

A los integrantes de mi jurado: Dra. Irene Cruz, Dra. Gladis Fragoso, Dr. Fausto Rivero y Dr. Iván Flores por sus cuestionamientos que harán de mí y de este trabajo algo mejor y más fuerte.

Al Dr. Juan Antonio Figueroa Castillo por su amistad, los conocimientos y la confianza depositada en mí por tantos años.

A Mateo Salazar Islas por su amistad, apoyo y ayuda durante la realización de este trabajo experimental. Sin él, este trabajo no hubiera podido realizarse adecuadamente.

A la Unidad de Ovinos de la Universidad Autónoma Chapingo y a su encargado Eliseo por permitirnos realizar el trabajo experimental con sus animales y en sus instalaciones.

A todo el personal académico y administrativo verdaderamente valioso y trabajador del Departamento de Parasitología de FMVZ-UNAM, por su sincera amistad y compañerismo, sigan trabajando duro para cambiar ese Departamento.

A todas las personas que estuvieron involucradas directa o indirectamente en mi formación, especialmente al Dr. Alejandro Besné Mérida, gracias a quien logré todo esto.

A todos los amigos y compañeros de FMVZ-UNAM por su amistad incondicional. Muchas gracias Mateo, Víctor, Marcos, Raúl, Demetrio, Ismael, Luis, Alma, Isabel, Víctor Carrera, Rocío, Yara y todos con los que tuve la fortuna de convivir y crecer. A todos se les estima.

Agradecimiento especial a todos aquellos chicos y chicas que me brindaron la oportunidad de enseñarles algo durante mi paso por FMVZ-UNAM; son tantos que no podría nombrarlos aquí, pero sepan que todos y cada uno de ustedes me enseñó más a mí de lo que yo a ustedes y que este trabajo y este arduo camino se realizó sólo para brindarles el mejor conocimiento posible; los recuerdo constantemente a todos.

## RESUMEN

**PÉREZ FONSECA AGUSTÍN.** “Efecto inmunomodulador de un extracto de

naringenina en ovinos infectados con coccidias del género *Eimeria* spp.”

En este trabajo se determinó el efecto inmunomodulador de la naringenina comercial y un extracto etanólico de cáscaras de toronja administrados oralmente a ovinos con una infección natural con coccidias del género *Eimeria* spp. Se incluyeron 24 corderos en el estudio (n=6). Un grupo ingirió naringenina comercial con una pureza superior al 98%, a otro grupo se le administró el extracto etanólico de cáscaras de toronja, mientras que se contó con un grupo tratado con toltrazuril y un testigo sin tratamiento. Se colectaron muestras fecales y de suero de todos los ovinos; se cuantificó la carga parasitaria y se determinó la generación de óxido nítrico y la capacidad antioxidante de los productos experimentales y el toltrazuril. La duración del estudio fue de 90 días. Los ovinos tratados con la naringenina comercial presentaron una reducción significativa en la excreción de ooquistes fecales ( $p < 0.05$ ) a partir de los 7 días después de la ingestión de la misma, en contraste con el grupo testigo y el que ingirió el extracto etanólico de cáscaras de toronja. Los dos grupos experimentales excretaron significativamente menos ooquistes que los animales testigo ( $p < 0.05$ ). El toltrazuril tuvo una eficacia anticoccidiana significativamente mayor que los otros 3 grupos durante todo el estudio. La mayor capacidad antioxidante fue producida por la naringenina comercial, mientras que los tres productos administrados redujeron la generación de óxido nítrico. Bajo las condiciones de este estudio, se concluye que la naringenina comercial y el extracto de cáscaras de toronja disminuyen la generación de especies reactivas de oxígeno y óxido nítrico y la carga parasitaria.

## **Abstract**

**Perez Fonseca Agustin.** “Immunomodulatory effect of a naringenin extract in *Eimeria* spp- infected sheep.”

In this study, the immunomodulatory effect of commercial naringenin and an ethanolic grapefruit extract administered orally to sheep naturally infected with *Eimeria* spp coccidia was evaluated. Twenty four lambs were divided in 4 groups (n=6) in the experiment. The first group ingested commercial naringenin with a purity higher than 98%, an ethanolic grapefruit extract was administered to the second group, while the third group was administered with toltrazuril, and the fourth group was a non-treated control group. Stool and serum samples were collected from all the sheep; parasitic infestation was determined, and nitric oxide generation, as well as antioxidant activity was assessed for both extracts and toltrazuril. The study was carried out for 90 days. Sheep treated with the commercial naringenin showed a significant reduction in fecal oocyst shedding ( $p < 0.05$ ) 7 days after ingestion, in contrast with the untreated group and the group treated with the ethanolic grapefruit extract. Both groups treated with extracts shed significantly less oocysts than the untreated group ( $p < 0.05$ ). Toltrazuril had a significant anticoccidial effect, being higher than the other 3 groups. The highest antioxidant activity was produced by the commercial naringenin, whereas the three administered products reduced nitric oxide production. Considering the conditions of this study, we concluded that commercial naringenin and grapefruit extract diminished the reactive oxygen species and nitric oxide production, as well as the oocyst shedding.

## LISTA DE CUADROS

	<b>Página</b>
<b>Cuadro 1.</b> Diseño experimental.....	19
<b>Cuadros 2-8.</b> Excreción de OPG de <i>Eimeria</i> spp. en ovinos tratados con naringenina comercial o un extracto etanólico de cáscaras de toronja o toltrazuril.....	24
<b>Cuadro 9.</b> Eficacia anticoccidiana de los tratamientos.....	27
<b>Cuadro10.</b> Especies de <i>Eimeria</i> identificadas durante el estudio.....	29
<b>Cuadro 11.</b> Capacidad antioxidante de la naringenina comercial, extracto de cáscaras de toronja y toltrazuril en comparación con los testigos.....	30
<b>Cuadro 12.</b> Determinación de la producción de óxido nítrico en los ovinos infectados con <i>Eimeria</i> spp.y tratados con flavonoides o toltrazuril.....	32
<b>Cuadro 13.</b> Variables farmacocinéticas obtenidas en ovinos dosificados a razón de 4 mg/kg con naringenina o un extracto etanólico de cáscaras de toronja administrados por vía oral (PO).....	33

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1.</b> Ciclo biológico de <i>Eimeria</i> spp.....	2
<b>Figura 2.</b> Molécula de naringenina.....	14
<b>Figura 3.</b> Excreción de OPGH de <i>Eimeria</i> spp. en ovinos tratados con naringenina comercial o un extracto etanólico de cáscaras de toronja o toltrazuril.....	26
<b>Figura 4.</b> Porcentaje de eficacia anti- <i>Eimeria</i> spp. de un extracto comercial de naringenina, uno etanólico preparado a partir de cáscaras de toronja en comparación con la eficacia anticoccidiana del toltrazuril.....	27
<b>Figura 5.</b> Capacidad antioxidante de la naringenina comercial, extracto de cáscaras de toronja y toltrazuril en comparación con los testigos.....	31
<b>Figura 6.</b> Determinación de la producción de óxido nítrico en borregos infectados con <i>Eimeria</i> spp.....	32
<b>Figura 7.</b> Curva comparativa de concentración vs. tiempo para AUC y $C_{max}$ de naringenina o extracto etanólico de cáscaras de toronja.....	34

## ÍNDICE

	<b>Página</b>
Introducción.....	1
Justificación.....	15
Objetivo e Hipótesis.....	16
Material y Métodos.....	17
Resultados.....	24
Discusión.....	35
Conclusión.....	41
Referencias.....	42

## 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. ovinoidealisis* 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 esporozoitos 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).

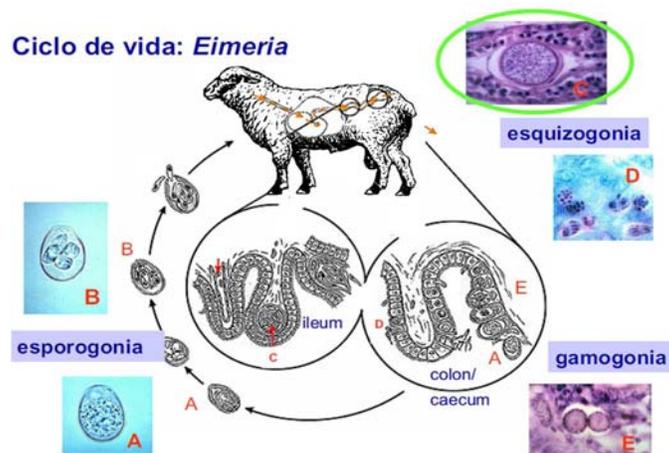


Figura 1. Ciclo biológico de *Eimeria* spp.

## **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).

## Respuesta inmune

El parasitismo intestinal es un factor principal de estrés que conlleva a la mala absorción de nutrientes, producción y desarrollo disminuidos de los animales. A pesar de que después de una exposición natural a *Eimeria* se presenta una inmunidad adquirida, la vacunación contra este protozooario se ha complicado debido al ciclo de vida tan complejo y a la falta del conocimiento total de la respuesta inmune del huésped contra *Eimeria*. Se ha demostrado que la respuesta humoral en la coccidiosis de rumiantes es mínima con respecto a la protección que confiere contra esta enfermedad (3). En contraste, la evidencia demuestra que la inmunidad mediada por células está implicada como el factor principal que confiere resistencia a coccidiosis. La inmunidad celular incluye la activación de linfocitos T, células NK y macrófagos tanto específica de antígeno como no específica (10). La importancia de los linfocitos T en la inmunidad adquirida contra coccidias aviares ha sido bien documentada. Hermosilla *et al.* (11) observaron que durante el primer día de la infección primaria, los macrófagos, granulocitos y linfocitos se infiltran masivamente dentro de la lámina propia intestinal y consecuentemente llegan menos esporozoitos a las criptas del intestino, por lo que se inhibe la formación de los esquizontes o merontes. Los mismos autores especularon que las poblaciones de diferentes leucocitos son atraídas a los sitios de inflamación en donde los macrófagos activados modulan la severidad de la infección y los linfocitos T CD4<sup>+</sup> inducen una respuesta inmune protectora. Una característica particular de *Eimeria bovis* es que es capaz de infectar las células endoteliales bovinas para desarrollar esquizontes o merontes de primera generación a partir de los esporozoitos (11; 12). *E. bovis* invade y activa las

células endoteliales bovinas a través de la sobre regulación de la transcripción de una serie de genes que codifican las enzimas responsables de la síntesis de prostaglandinas y óxido nítrico (12). En la infección de las células endoteliales de venas umbilicales bovinas con *E. bovis* se induce la expresión de la proteína quimioatrayente de monocitos derivada del endotelio-1 (MCP-1), molécula que atrae predominantemente monocitos y linfocitos T y que se considera clave en la transición de la inmunidad innata a la adaptativa (13). Sin embargo, la reacción de las células endoteliales es lenta en comparación con la respuesta a otras coccidias como *Toxoplasma gondii* y *Neospora caninum*, y esto posiblemente se puede interpretar como una estrategia de *E. bovis* para persistir mucho más tiempo en la célula huésped y evitar la inducción de procesos inflamatorios, pues los esporozoitos de *E. bovis* requieren de 6 a 8 veces más tiempo que *T. gondii* y *N. caninum* para completar su replicación (12). Estos mismos autores determinaron una elevada adhesión de polimorfonucleares a las células endoteliales umbilicales bovinas no infectadas con *E. bovis*. Como las células endoteliales reaccionan muy sensiblemente a las alteraciones mecánicas, el proceso del deslizamiento del esporozoito en la superficie de las células del huésped puede activar incluso a las células no infectadas por la gran cantidad de trayectos de proteínas dispuestas sobre las superficies celulares. Los estudios recientes han enfatizado el papel de los macrófagos en las infecciones causadas por *E. bovis*, ya que las actividades oxidativas y fagocíticas de las densidades en aumento de los macrófagos de la mucosa intestinal sustentan su relevancia. La fagocitosis de los esporozoitos influye sobre el desarrollo de la respuesta inmune dominada por los tipos celulares Th1 (14) Asimismo, se tiene conocimiento que las trampas extracelulares de

neutrófilos son un mecanismo efector en la respuesta inmune innata temprana contra *E. bovis* (15).

### **Respuesta inmune adaptativa en la coccidiosis de rumiantes**

La respuesta inmune adaptativa está mediada por células o linfocitos T que pueden dividirse en diferentes subpoblaciones de acuerdo con su expresión de citocinas y funciones inmunoefectoras. Los linfocitos Th1 están involucrados en la inmunidad celular y la respuesta protectora dependiente de fagocitos, mientras que los Th2 desempeñan un papel importante en la producción de anticuerpos y la respuesta protectora independiente de los fagocitos (16). En los rumiantes, el interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) 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 (17). Una de las citocinas que se produce principalmente durante la respuesta inmune celular en la coccidiosis es el interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), el cual ha sido implicado en el aumento de la inmunidad primaria contra infecciones causadas por *Eimeria* (16). Con respecto a estudios realizados en aves, se ha observado que el IFN- $\gamma$  recombinante administrado a aves infectadas con *Eimeria tenella* es capaz de inhibir el desarrollo celular del protozoario y reduce la pérdida de peso de las aves infectadas (18). 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 (16). Sin embargo, los modelos aviares y murinos son de valor limitado para el estudio de la coccidiosis en rumiantes, ya que la mayoría de las especies de *Eimeria* que los afectan se desarrollan de manera diferente a las de los roedores y aves, principalmente con respecto a las células del huésped, formación de macromerontes y duración de la replicación. Todo esto influye sobre la respuesta inmune (19). Con respecto a los estudios en rumiantes, la mayoría de los estudios se han realizado en una coccidia que afecta específicamente a los bovinos, *Eimeria bovis*. Las células endoteliales infectadas con *E. bovis* activan a los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> de manera dependiente del antígeno (12). Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> se encuentran involucrados en la respuesta contra eimeriosis bovina. Los linfocitos sanguíneos periféricos son activados a los 12 días post-infección con *E. bovis*, lo que sugiere un estímulo antigénico fuerte por parte de los merozoitos de primer estadio. Esto es comprensible, dado que este estadio de vida es muy proliferativo y produce los macroesquizontes que liberan hasta 120,000 merozoitos diarios durante los días 15 y 16 post-infección (10). Es importante señalar que el nivel y duración de la excreción de ooquistes se encuentra bajo el control de los linfocitos T, particularmente los CD<sup>+</sup> (16). Los linfocitos T activados por un antígeno específico se acumulan en los órganos linfáticos de los animales infectados. La respuesta al antígeno de *E. bovis* es mayor en las células aisladas de los linfonodos asociados al tejido intestinal que en aquellas no relacionadas con este órgano. Esto sugiere que existe una acumulación local de linfocitos T específicos contra *E. bovis* y resalta la importancia de los esquizontes de primer estadio en la respuesta inmune

a *E. bovis* (10). Los cambios en las proporciones de los diferentes tipos de células T sugieren una expansión de las células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> durante la prepatencia. Subsecuentemente, existe una disminución de las mismas, pero ésta es más notable y fuerte en el caso de las células CD8<sup>+</sup>. Esta observación puede sugerir la participación de las células CD4<sup>+</sup> en la resolución de una infección primaria, mientras que las CD8<sup>+</sup> median la inmunidad al desafío subsecuente (16). Las células CD4<sup>+</sup> acumuladas en los linfonodos intestinales de los becerros infectados con *E. bovis* expresan niveles altos de mRNA de IL-2. Estos datos sugieren una preponderancia de las células Th1 activas en los tejidos de los animales infectados en comparación con los linfocitos Th2. La infección primaria se acompaña por un incremento en los niveles de expresión de IFN- $\gamma$  e IL-2, alcanzando un pico durante la prepatencia (8-12 días post-infección) y disminuyendo subsecuentemente. Los niveles de IL-2 se encuentran elevados en los linfonodos del intestino después de la infección primaria (10). Por otro lado, la transcripción del gen IL-4 se induce predominantemente durante la patencia. Tanto CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> son fuentes de IFN- $\gamma$ , mientras que la transcripción de IL-2 e IL-4 aumenta en las células CD4<sup>+</sup> principalmente. En contraste, el desafío no influye sobre la transcripción de genes de IFN- $\gamma$  ni IL-2, sino que aumenta la de IL-4 (19). El IFN- $\gamma$  inhibe la replicación intracelular de *Eimeria* spp. *in vitro* (18) y parece desempeñar un papel crucial en la abrogación de las infecciones primarias.

### **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, 20). 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 (21, 22). 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 (23). 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 (24). 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 (25). 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 confinamiento 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 (26). 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).

## **Flavonoides**

Los flavonoides son un grupo de compuestos polifenólicos. Estos compuestos poseen gran importancia en los vegetales. Se han identificado más de 8,000

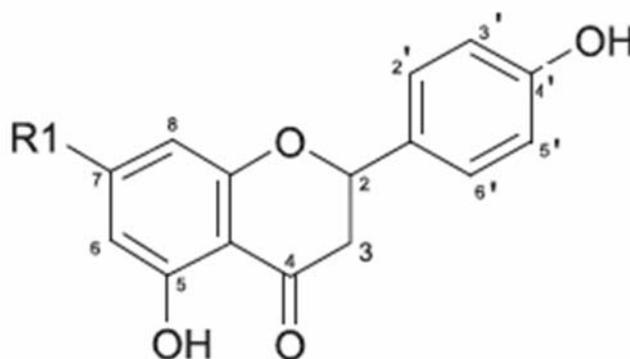
compuestos de tipo flavonoide (27). Estos compuestos han demostrado tener diversas actividades farmacológicas como: inhibición enzimática, anti inflamatorios y anti oxidantes (28). Gran parte de la actividad de los flavonoides tiene lugar sobre las células endoteliales, por lo que gran parte de la investigación que se ha realizado sobre las flavanonas de *Citrus* ha sido estudiando su actividad sobre la inflamación (29). 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 (27). 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 (29). 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- $\alpha$ ), 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- $\alpha$  (29). El

inhibidor de MAPK PD98059 comparte una homología estructural con los flavonoides (30). Asimismo, se ha comprobado la actividad de los flavonoides como antiprotozoarios, principalmente contra *Trypanosoma*, *Leishmania* (31) *Cryptosporidium parvum*, y *Plasmodium falciparum* (32, 33). 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 (32).

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 (27). 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 (30). La naringenina (4',5,7-trihidroxiflavanona) 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 (34). 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 (27, 30). 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 (30). Otra de sus propiedades es la de bloquear la producción de óxido nítrico (35). 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 (36). La naringenina ejerce parte de su efecto anti-inflamatorio mediante la inhibición de la producción de óxido nítrico y prostaglandina E<sub>2</sub> (37).

La naringenina tiene la habilidad de activar a los leucocitos polimorfonucleares (PMN) para inducir actividad citotóxica (28).



**Figura 2.** Molécula de naringenina.

## **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 una flavanona (naringenina) a fin de conocer si este compuesto interfiere con la interacción entre el parásito y el huésped.

## **Objetivo**

Determinar si la administración de naringenina ejerce efecto sobre la concentración sanguínea de especies reactivas de oxígeno y óxido nítrico en ovinos infectados naturalmente con coccidias del género *Eimeria* spp.

## **Hipótesis**

Los extractos de cáscara de toronja y naringenina modulan la producción de óxido nítrico y las especies reactivas de oxígeno en ovinos infectados naturalmente con coccidias del género *Eimeria* spp.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

El presente trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Ovinos de la Universidad Autónoma Chapingo, ubicada en la Carretera México-Texcoco kilómetro 38.5, Texcoco, 56230, Estado de México.

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.

### **Naringenina comercial**

La naringenina con una pureza superior al 98% se obtuvo comercialmente (Sigma-Aldrich T66001).

### **Extracto de cáscara de toronja**

El extracto de cáscara de toronja se obtuvo utilizando el método propuesto por Escobar, 2010 (38). Se trabajó con cáscaras de toronja (*Citrus x paradisi*), las cuales fueron cortadas en pedazos de 0.5 cm por 0.5 cm e introducidas en matraces para posteriormente agregar el disolvente, que en este caso es etanol al 96%. Los extractos alcohólicos se evaporaron en un rotavapor.

### **Muestras sanguíneas para estudios de farmacocinética**

Se recolectaron 5 ml de sangre de los animales a los que se les administraron 4 mg/kg de la naringenina comercial o de un extracto etanólico de cáscaras de toronja en los siguientes intervalos de tiempo: 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 48, 72 y 96 horas después de la administración de los dos extractos. Las muestras fueron colocadas con una inclinación de 45 grados y se dejaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Posteriormente centrifugadas durante 15 minutos a

3500 rpm. El suero fue obtenido y depositado en viales identificados y congelados a  $-20^{\circ}$  C hasta que fueron procesados 8 días después.

### **Determinación de las variables farmacocinéticas de la naringenina y el extracto etanólico de cáscaras de toronja**

La fase analítica se realizó en el Departamento de Fisiología y Farmacología de la FMVZ de la UNAM. Para realizar las diluciones de la curva estándar de naringenina, se pesaron 20 g de estándar de naringenina (98% de pureza), se colocaron en un matraz y se aforó a 100 ml con agua desionizada (para su disolución fue necesario agregar 0.5 ml de una solución de 0.1 N de NaOH, previo a la adición del agua desionizada). Posteriormente, se procedió a obtener la curva estándar de la naringenina por medio del programa Origin Lab Pro 8<sup>®</sup>. Posteriormente los datos obtenidos por tiempo de sangrado por grupo se evaluó la diferencia entre medias y análisis de varianza, con los cuales se realizaron las gráficas de concentración contra tiempo, a partir de las cuales se obtuvieron los valores farmacocinéticos del extracto etanólico de cáscaras de toronja y la naringenina comercial.

Los valores farmacocinéticos a determinar fueron:

- Área bajo la curva (AUC),
- Concentración máxima ( $C_{m\acute{a}x}$ )
- Tiempo máximo ( $T_{m\acute{a}x}$ ) (horas),
- Tiempo medio de eliminación ( $T^{1/2}_{elim}$ )

## Animales

Se seleccionaron 24 ovinos criollos. Las edades estuvieron dentro de un rango de 2 a 3 meses. Se incluyeron machos y hembras con un peso promedio de 18 Kg, de ambos sexos que no habían sido desparasitados ni recibido tratamientos con antibióticos los dos meses previos al estudio. Durante el estudio los ovinos se mantuvieron alojados en la unidad de ovinos de la Universidad Autónoma Chapingo. Los ovinos fueron alimentados con una dieta a base de heno de avena, sales minerales y un concentrado comercial. El agua se proporcionó *ad-libitum*.

En un arreglo completamente al azar, se utilizaron cuatro grupos de seis ovinos criollos cada uno, de 3 meses de edad con un peso promedio de 18 kg que no habían recibido tratamientos anticoccidianos ni antibióticos en los 2 meses previos al estudio. Los ovinos recibieron una alimentación a base de heno de avena, ensilado de maíz, sales minerales y concentrado comercial (Purina, México); así como agua *ad libitum*. El diseño experimental se realizó como se indica en el siguiente cuadro:

**Cuadro 1.** Diseño experimental

Grupo (n=6)	Tratamiento	Día del estudio
1	4 mg/kg naringenina comercial	Diariamente por 60 días
2	4 mg/kg extracto etanólico de cáscaras de toronja	Diariamente por 60 días
3	20 mg/kg toltrazuril comercial	0 y 15
4	Testigo (agua)	Diariamente por 60 días

### **Muestras fecales**

Se tomaron un promedio de 3 a 5 g de muestras de heces 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 (22). Se realizaron muestreos de materia fecal los días 0, 3, 7, 15, 30, 45, 60 y 90.

### **Muestras sanguíneas para pruebas de estrés oxidativo**

Se tomaron muestras de sangre de la vena yugular, de 3-5 ml por animal en tubos al vacío de la marca Vacutainer® con EDTA como agente anticoagulante. Los tubos se transportaron en refrigeración al Laboratorio de Parasitología de la F.M.V.Z.-U.N.A.M para obtener el suero sanguíneo, el cual se conservó en congelación hasta su procesamiento en el laboratorio. Se realizaron muestreos de sangre para obtención de suero los días 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56 y 90 para la determinación de la capacidad antioxidante y generación de óxido nítrico de los extractos.

### **Procesamiento de las muestras fecales**

Se tomaron muestras de materia fecal directamente del recto de cada ovino al inicio del experimento. Esta fecha fue denominada día 0, en el cual se administraron los productos experimentales y el fármaco comercial de referencia. Una vez que se confirmó que los animales estaban infectados con coccidias del género *Eimeria* spp, se colectaron las muestras a los 3, 7, 15, 30, 45, 60 y 90 días. Las muestras se transportaron en bolsas de plástico dentro de hieleras en refrigeración a 4 °C al Laboratorio de Investigación del Departamento de Parasitología de la FMVZ de la UNAM. Las muestras se mantuvieron en

refrigeración por un periodo menor a 3 días para evitar la desecación de las heces.

Las muestras se examinaron utilizando la técnica de McMaster (22).

### **Esporulación de ooquistes**

La esporulación se llevó a cabo de acuerdo con el método descrito por Williams (39). Los ooquistes que se aislaron del material fecal se suspendieron en 300 ml de una solución de dicromato de potasio al 2.5% y se distribuyeron en varios tubos de centrífuga. Los tubos se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 min y el sobrenadante se descartó. El sedimento se lavó con la solución de dicromato de potasio y se colocó en una caja Petri para incubarse a 28°C bajo una oxigenación constante. Las tasas de esporulación se determinaron al contar 100 ooquistes que tuvieran los 4 esporoquistes claramente divididos. Se realizaron cinco réplicas y se contaron a las 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96 y 108 horas (40). Posteriormente, la esporulación se verificó diariamente durante dos semanas. Se determinaron las especies de conformidad con las claves taxonómicas (41) cada 15 días hasta el día 60 y posteriormente al día 90.

### **Determinación de la capacidad antioxidante de la naringenina y del extracto de cáscaras de toronja**

El experimento se llevó a cabo de acuerdo con la metodología desarrollada por Re et al. (42) y descrita por Kuskoski et al. (43), quienes demostraron que el radical ABTS+ se obtiene tras la reacción de ABTS (7 mM) con persulfato potásico (2.45 mM, concentración final) incubados a temperatura ambiente ( $\pm 25$  °C) en la oscuridad durante 16 h.

En este estudio, se añadieron 20  $\mu$ l de una dilución del suero a 980  $\mu$ l de una dilución del radical ABTS+. La absorbancia se midió de forma continua

transcurridos 7 minutos. El antioxidante sintético de referencia, Trolox, se utilizó en las mismas condiciones. Los resultados se expresaron en TEAC (actividad antioxidante equivalente a Trolox).

### **Determinación de óxido nítrico**

La medición de los nitritos totales ( $\text{NO}_2^-$ ) se basó en la reacción de Griess. Esta prueba se fundamenta en la detección colorimétrica de los metabolitos del óxido nítrico ( $\text{NO}_2$  y  $\text{NO}_3$ ), que constituyen un marcador de la cantidad de óxido nítrico presente en la sangre y se pueden determinar con facilidad por su reacción con el reactivo de Griess (1% Sulfanilamida/0.1% Nafiletileno diamina dihidroclorido/2.5%  $\text{H}_2\text{PO}_4$ ). El  $\text{NO}_3$  se mide después de la conversión enzimática de éste a  $\text{NO}_2$ , por acción de la nitrato reductasa. Para ello, se colocaron las muestras, por triplicado, y se diluyeron 1:4 en  $\text{H}_2\text{O}$  bidestilada, luego se incubaron durante 20 minutos a  $37^\circ\text{C}$  con  $5\mu\text{M}$  de FAD (Dinucleótido de Adenina y Flavina),  $50\mu\text{M}$  de NADPH (dinucleótido de Adenina y Nicotilamida Fosfato) y 200 U/L de nitrato reductasa. Posteriormente, se agregó 0.001 g/ml de Lactato Deshidrogenasa y 10 mM de Piruvato de sodio y se incubaron durante 5 minutos. Esta técnica se realizó en placas ELISA de 96 pozos y fondo plano (Becton Dickinson), en las que se incluyeron un blanco y un estándar de nitrito de sodio (500 mM) en solución amortiguadora de fosfatos de  $\text{pH}=7.4$ . A cada pozo se le agregaron  $50\mu\text{l}$  del sobrenadante de la muestra y  $150\mu\text{l}$  de reactivo de Griess. Posteriormente, la placa se incubó en la oscuridad durante 10

minutos, y posteriormente, se midió su absorbancia a una densidad óptica de 595 nm en un lector de placas. Las densidades ópticas se evaluaron automáticamente por el lector de ELISA, según la curva de calibración preparada para este experimento. Los resultados de las concentraciones séricas de óxido nítrico fueron expresados en su media  $\pm$  desviación estándar ( $\bar{x} \pm d.e.$ )

### **Análisis de resultados**

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó una prueba no paramétrica U de Mann-Whitney usando el paquete SPSS versión 17.0 para Windows (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA). Para todas las pruebas el nivel de significancia fue ajustado a  $P < 0.05$ .

## RESULTADOS

### Eficacia anti-*Eimeria* spp.

En los Cuadros 2 al 8 y la Figura 3 se observa que existió una diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) entre la excreción de ooquistes de *Eimeria* de los testigos con respecto a los grupos que ingirieron la naringenina comercial y el extracto de cáscaras de toronja a partir del día siete. Por otro lado, la diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) entre la carga parasitaria de los animales tratados con el extracto comercial y el elaborado en el laboratorio, se presentó a partir del día 30. El día 90 del estudio, los ovinos tratados con el extracto comercial y el no comercial tuvieron la misma carga parasitaria que los testigos. En contraste, los animales tratados con toltrazuril tuvieron una carga parasitaria significativamente menor a la de los ovinos de los otros grupos desde el día 3 hasta el 90.

**Cuadros 2-8.** Excreción de OPG de *Eimeria* spp. en ovinos tratados con naringenina comercial o un extracto etanólico de cáscaras de toronja o toltrazuril.

Tratamiento	Día	Media $\pm$ Desv. Est.
Testigos (agua)	0	2333.33 $\pm$ 1837.57 <sup>a</sup>
4 mg/kg naringenina comercial	0	2408.33 $\pm$ 1265.21 <sup>a</sup>
4 mg/kg extracto etanólico de cáscaras de toronja	0	2475.00 $\pm$ 1426.40 <sup>a</sup>
20 mg/kg toltrazuril comercial	0	2425.00 $\pm$ 1494.91 <sup>a</sup>

Literales distintas en la misma columna indican diferencia significativa (U de Mann Whitney  $P < 0.05$ )

Tratamiento	Día	Media ± Desv. Est.
Testigos (agua)	3	2425.00±1722.10 <sup>a</sup>
4 mg/kg naringenina comercial	3	1991.67±1879.51 <sup>a</sup>
4 mg/kg extracto etanólico de cáscaras de toronja	3	2325.00±1562.29 <sup>a</sup>
20 mg/kg toltrazuril comercial	3	760.67±250.82 <sup>b</sup>

Literales distintas en la misma columna indican diferencia significativa (U de Mann Whitney P<0.05)

Tratamiento	Día	Media ± Desv. Est.
Testigos (agua)	15	4541.67±2207.45 <sup>a</sup>
4 mg/kg naringenina comercial	15	3000.00±651.42 <sup>b</sup>
4 mg/kg extracto etanólico de cáscaras de toronja	15	3908.33±643.90 <sup>b</sup>
20 mg/kg toltrazuril comercial	15	83.33±12.55 <sup>c</sup>

Literales distintas en la misma columna indican diferencia significativa (U de Mann Whitney P<0.05)

Tratamiento	Día	Media ± Desv. Est.
Testigos (agua)	30	4250.00±2410.22 <sup>a</sup>
4 mg/kg naringenina comercial	30	1750.00±162.81 <sup>b</sup>
4 mg/kg extracto etanólico de cáscaras de toronja	30	3400.00±372.95 <sup>c</sup>
20 mg/kg toltrazuril comercial	30	16.67±6.82 <sup>d</sup>

Literales distintas en la misma columna indican diferencia significativa (U de Mann Whitney P<0.05)

Tratamiento	Día	Media ± Desv. Est.
Testigos (agua)	45	5691.67±3523.19 <sup>a</sup>
4 mg/kg naringenina comercial	45	1406.00±300.53 <sup>b</sup>
4 mg/kg extracto etanólico de cáscaras de toronja	45	3083.33±233.15 <sup>c</sup>
20 mg/kg toltrazuril comercial	45	16.67±3.88 <sup>d</sup>

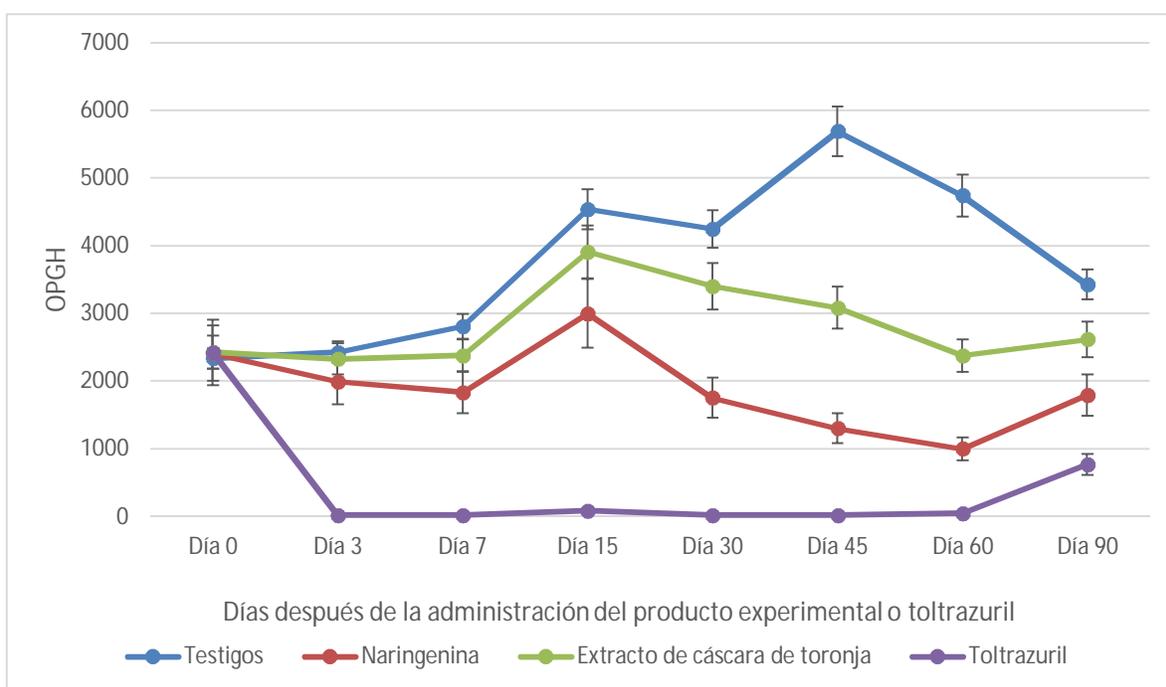
Literales distintas en la misma columna indican diferencia significativa (U de Mann Whitney P<0.05)

Tratamiento	Día	Media ± Desv. Est.
Testigos (agua)	60	4741.67±3344.70 <sup>a</sup>
4 mg/kg naringenina comercial	60	1000.00±344.96 <sup>b</sup>
4 mg/kg extracto etanólico de cáscaras de toronja	60	2375.00±172.30 <sup>c</sup>
20 mg/kg toltrazuril comercial	60	41.67±12.64 <sup>d</sup>

Literales distintas en la misma columna indican diferencia significativa (U de Mann Whitney P<0.05)

Tratamiento	Día	Media ± Desv. Est.
Testigos (agua)	90	3025.00±2208.65 <sup>a</sup>
4 mg/kg naringenina comercial	90	2791.67±1854.92 <sup>a</sup>
4 mg/kg extracto etanólico de cáscaras de toronja	90	2916.67±1684.83 <sup>a</sup>
20 mg/kg toltrazuril comercial	90	766.67±137.28 <sup>b</sup>

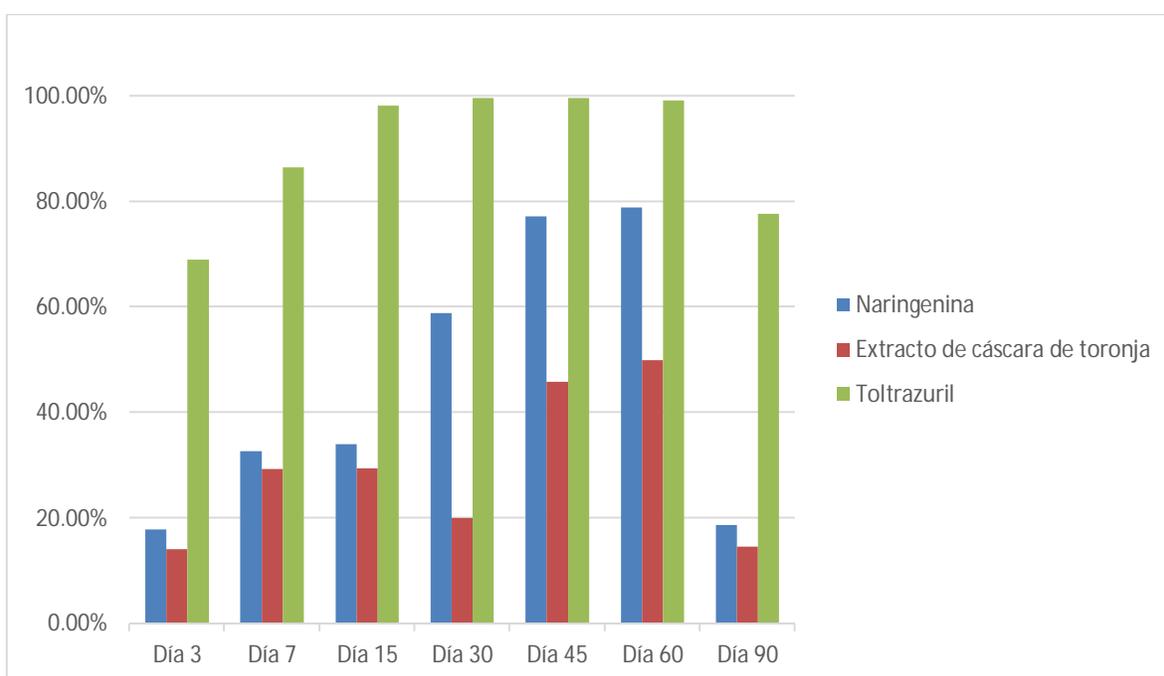
Literales distintas en la misma columna indican diferencia significativa (U de Mann Whitney P<0.05)



**Figura 3.** Excreción de OPGH de *Eimeria* spp. en ovinos tratados con naringenina comercial o un extracto etanólico de cáscaras de toronja o toltrazuril.

Como se ilustra en la Figura 4 y el Cuadro 9, se observó una diferencia significativa en la eficacia de la naringenina y el extracto de cáscaras de toronja

del día 30 al 60. Asimismo, se presentó una mayor eficacia anticoccidiana en los animales tratados con toltrazuril hasta el día 90 en relación con los que ingirieron los extractos de naringenina y cáscaras de toronja. La eficacia anticoccidiana de la naringenina fue de 78.91% a los dos meses post-ingestión. Por otro lado, el extracto etanólico de cáscaras de toronja tuvo una eficacia máxima de 49.91% el día 60.



**Figura 4.** Porcentaje de eficacia anti-*Eimeria* spp. de un extracto comercial de naringenina, uno etanólico preparado a partir de cáscaras de toronja en comparación con la eficacia anticoccidiana del toltrazuril.

### Cuadro 9. Eficacia anticoccidiana de los tratamientos

Días	3 (%)	7 (%)	15 (%)	30 (%)	45 (%)	60 (%)	90 (%)
<i>Naringenina</i>	17.87 <sup>a</sup>	32.72 <sup>a</sup>	33.94 <sup>a</sup>	58.82 <sup>a</sup>	77.16 <sup>a</sup>	78.91 <sup>a</sup>	18.69 <sup>a</sup>
<i>Extracto de cáscara de toronja</i>	14.12 <sup>a</sup>	29.33 <sup>a</sup>	29.47 <sup>a</sup>	20.00 <sup>b</sup>	45.83 <sup>b</sup>	49.91 <sup>b</sup>	14.60 <sup>a</sup>
<i>Toltrazuril</i>	69.00 <sup>b</sup>	87.00 <sup>b</sup>	98.17 <sup>b</sup>	99.61 <sup>c</sup>	99.61 <sup>c</sup>	99.12 <sup>c</sup>	77.62 <sup>b</sup>

Literales distintas en la misma columna indican diferencia significativa (P<0.05)

Las especies identificadas en este estudio fueron: *Eimeria bakuensis*, *E. ovinoidalis*, *E. crandallis*, *E. pallida*, *E. granulosa*, *E. parva*, *E. weybridgensis*, *E. marisca*, *E. faurei* y *E. intricata*. Se identificaron dos de las especies más patógenas (*E. ovinoidalis* y *E. bakuensis*) y dos de las que se consideran poco patógenas (*E. parva* y *E. pallida*) en ovinos (Cuadro 10).

**Cuadro10.** Especies de *Eimeria* identificadas durante el estudio.

Día 0				
	<i>Eimeria ovinoidealís</i>	<i>Eimeria bakuensis</i>	<i>Eimeria parva</i>	<i>Eimeria pallida</i>
Naringenina	33	40	35	23
Cáscaras de toronja	18	32	28	26
Toltrazuril	22	15	17	22
Testigos	27	13	20	29
Día 15				
	<i>Eimeria ovinoidealís</i>	<i>Eimeria bakuensis</i>	<i>Eimeria parva</i>	<i>Eimeria pallida</i>
Naringenina	28	24	28	22
Cáscaras de toronja	27	27	25	25
Toltrazuril	16	12	23	27
Testigos	29	37	24	26
Día 30				
	<i>Eimeria ovinoidealís</i>	<i>Eimeria bakuensis</i>	<i>Eimeria parva</i>	<i>Eimeria pallida</i>
Naringenina	27	25	23	28
Cáscaras de toronja	30	28	31	24
Toltrazuril	17	17	22	26
Testigos	26	30	24	20
Día 45				
	<i>Eimeria ovinoidealís</i>	<i>Eimeria bakuensis</i>	<i>Eimeria parva</i>	<i>Eimeria pallida</i>
Naringenina	25	25	21	26
Cáscaras de toronja	27	27	26	23
Toltrazuril	20	19	27	25
Testigos	28	29	26	26
Día 60				
	<i>Eimeria ovinoidealís</i>	<i>Eimeria bakuensis</i>	<i>Eimeria parva</i>	<i>Eimeria pallida</i>
Naringenina	26	27	24	29
Cáscaras de toronja	24	27	28	27
Toltrazuril	24	16	26	21
Testigos	25	30	22	23
Día 90				
	<i>Eimeria ovinoidealís</i>	<i>Eimeria bakuensis</i>	<i>Eimeria parva</i>	<i>Eimeria pallida</i>
Naringenina	24	23	22	24
Cáscaras de toronja	23	26	20	26
Toltrazuril	20	24	29	23
Testigos	40	27	29	27

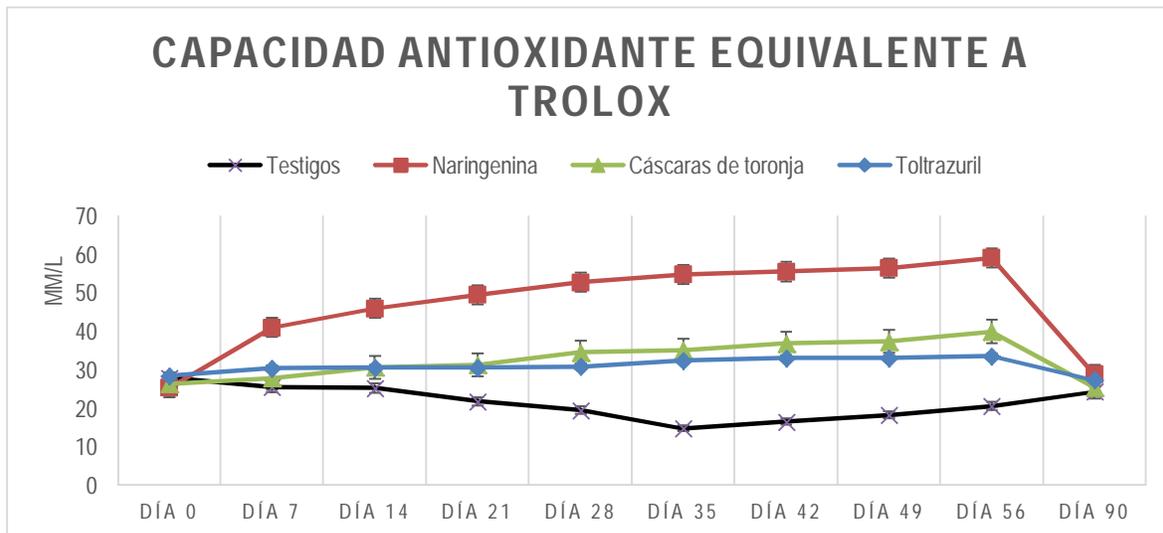
## Determinación de la capacidad antioxidante de la naringenina comercial y el extracto de cáscaras de toronja

El Cuadro 11 y la Figura 5 muestran los valores relacionados con la capacidad antioxidante del suero de animales que recibieron la naringenina comercial, el extracto etanólico de cáscaras de toronja, la formulación comercial de toltrazuril y los testigos. El análisis de los resultados indicó que existió una mayor ( $P < 0.05$ ) capacidad antioxidante en el suero de los ovinos complementados con la naringenina comercial en comparación con los que recibieron el extracto etanólico de cáscaras de toronja. Este último compuesto tuvo la misma capacidad antioxidante que el toltrazuril. Los testigos mostraron una capacidad antioxidante significativamente ( $P > 0.05$ ) menor hasta el día 60. El día 90 la capacidad antioxidante fue similar ( $P > 0.05$ ) en los cuatro grupos de animales.

**Cuadro 11.** Capacidad antioxidante de la naringenina comercial, extracto de cáscaras de toronja y toltrazuril en comparación con los testigos.

ABTS	Media $\pm$ Desv. Est.			
	Testigos	Naringenina	Cáscaras de toronja	Toltrazuril
Día 0	27.87 $\pm$ 2.19 <sup>a</sup>	25.26 $\pm$ 2.29 <sup>a</sup>	26.27 $\pm$ 1.27 <sup>a</sup>	28.38 $\pm$ 0.95 <sup>a</sup>
Día 7	25.42 $\pm$ 0.89 <sup>a</sup>	40.94 $\pm$ 2.00 <sup>b</sup>	27.8 $\pm$ 1.45 <sup>a</sup>	30.31 $\pm$ 2.77 <sup>a</sup>
Día 14	25.2 $\pm$ 2.76 <sup>a</sup>	45.9 $\pm$ 2.16 <sup>b</sup>	30.54 $\pm$ 1.34 <sup>c</sup>	30.52 $\pm$ 2.90 <sup>c</sup>
Día 21	21.75 $\pm$ 3.25 <sup>a</sup>	49.43 $\pm$ 1.30 <sup>b</sup>	31.21 $\pm$ 0.99 <sup>c</sup>	30.52 $\pm$ 2.16 <sup>c</sup>
Día 28	19.4 $\pm$ 0.96 <sup>a</sup>	52.63 $\pm$ 1.19 <sup>b</sup>	34.46 $\pm$ 2.57 <sup>c</sup>	30.76 $\pm$ 1.54 <sup>c</sup>
Día 35	14.71 $\pm$ 1.38 <sup>a</sup>	54.7 $\pm$ 3.24 <sup>b</sup>	35.02 $\pm$ 1.31 <sup>c</sup>	32.28 $\pm$ 1.07 <sup>c</sup>
Día 42	16.46 $\pm$ 1.121 <sup>a</sup>	55.43 $\pm$ 2.59 <sup>b</sup>	36.74 $\pm$ 1.00 <sup>c</sup>	32.99 $\pm$ 2.03 <sup>c</sup>
Día 49	18.18 $\pm$ 2.41 <sup>a</sup>	56.37 $\pm$ 1.28 <sup>b</sup>	37.28 $\pm$ 2.17 <sup>c</sup>	33.01 $\pm$ 1.93 <sup>c</sup>
Día 56	20.52 $\pm$ 2.87 <sup>a</sup>	58.98 $\pm$ 3.36 <sup>b</sup>	39.87 $\pm$ 1.47 <sup>c</sup>	33.47 $\pm$ 0.94 <sup>c</sup>
Día 90	24.32 $\pm$ 1.55 <sup>a</sup>	28.76 $\pm$ 2.86 <sup>a</sup>	25.41 $\pm$ 1.15 <sup>a</sup>	27.3 $\pm$ 1.02 <sup>a</sup>

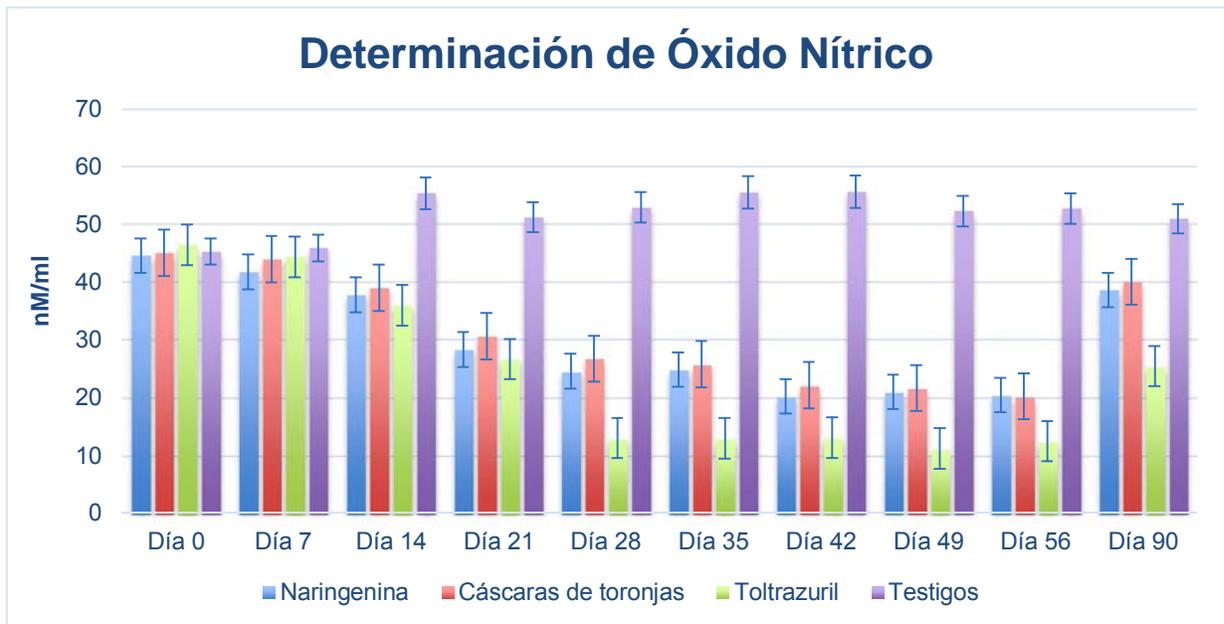
Literales distintas en la misma fila indican diferencia significativa ( $P < 0.05$ )



**Figura 5.** Capacidad antioxidante de la naringenina comercial, extracto de cáscaras de toronja y toltrazuril en comparación con los testigos.

### Medición de óxido nítrico

La producción de óxido nítrico (NO) fue significativamente mayor en el grupo testigo con respecto a los otros tres grupos de animales (Figura 6 y Cuadro 12). En los ovinos tratados con toltrazuril disminuyó significativamente la generación de óxido nítrico a partir del día 28 y hasta el día 56 en relación con los ovinos complementados con la naringenina o el extracto elaborado a partir de las cáscaras de toronja, mientras que los valores de óxido nítrico aumentaron significativamente 90 días después de la administración de los extractos y toltrazuril.



**Figura 6.** Determinación de la producción de óxido nítrico en borregos infectados con *Eimeria* spp.

**Cuadro 12.** Determinación de la producción de óxido nítrico en los ovinos infectados con *Eimeria* spp. y tratados con flavonoides o toltrazuril

	media ± desv. est.			
	Naringenina	Extracto de cáscaras	Toltrazuril	Testigos
<b>Día 0</b>	44.58±1.15 <sup>a</sup>	45.06±1.27 <sup>a</sup>	46.48±0.71 <sup>a</sup>	45.26±0.47 <sup>a</sup>
<b>Día 7</b>	41.76±1.32 <sup>a</sup>	43.98±1.51 <sup>b</sup>	44.36±0.62 <sup>b</sup>	45.9±1.65 <sup>c</sup>
<b>Día 14</b>	37.82±0.34 <sup>a</sup>	39.02±1.32 <sup>b</sup>	35.98±1.12 <sup>b</sup>	55.41±0.52 <sup>c</sup>
<b>Día 21</b>	28.3±1.30 <sup>a</sup>	30.65±1.39 <sup>b</sup>	26.66±0.96 <sup>b</sup>	51.24±0.60 <sup>c</sup>
<b>Día 28</b>	24.58±0.69 <sup>a</sup>	26.71±1.53 <sup>b</sup>	12.99±1.67 <sup>c</sup>	52.94±1.04 <sup>d</sup>
<b>Día 35</b>	24.87±0.44 <sup>a</sup>	25.8±0.97 <sup>b</sup>	12.95±1.12 <sup>c</sup>	55.57±0.80 <sup>d</sup>
<b>Día 42</b>	20.25±0.51 <sup>a</sup>	22.15±1.10 <sup>b</sup>	13.07±0.61 <sup>c</sup>	55.67±1.49 <sup>d</sup>
<b>Día 49</b>	20.97±1.16 <sup>a</sup>	21.67±0.72 <sup>b</sup>	11.19±1.14 <sup>c</sup>	52.29±0.67 <sup>d</sup>
<b>Día 56</b>	20.47±1.06 <sup>a</sup>	20.22±0.81 <sup>b</sup>	12.44±1.64 <sup>c</sup>	52.76±1.80 <sup>d</sup>
<b>Día 90</b>	38.65±±0.78 <sup>a</sup>	40.05±0.73 <sup>a</sup>	25.44±1.39 <sup>b</sup>	50.97±1.02 <sup>c</sup>

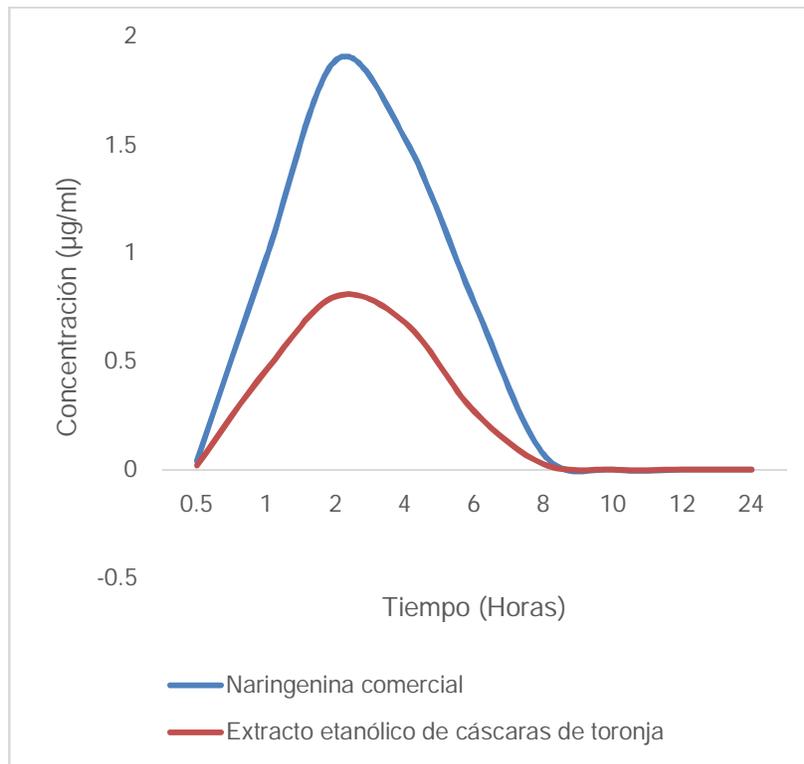
Literales distintas en la misma fila indican diferencia significativa (P<0.05)

**Variables farmacocinéticas de los dos grupos de animales dosificados con naringenina comercial o extracto etanólico de cáscaras de toronja**

En el cuadro 13 se muestran los promedios  $\pm$  1 Error Típico de las variables farmacocinéticas de los dos grupos evaluados. En la figura 7 se presenta la curva de concentración contra tiempo de los dos grupos analizados. No se observó diferencia significativa entre el  $T_{m\acute{a}x}$  de la naringenina comercial en comparación con el extracto obtenido en el laboratorio, ya que el tiempo requerido para alcanzar la concentración máxima en la sangre después de la administración de la naringenina comercial por una vía extravascular fue de  $2.1663 \pm 0.601$ , mientras que para el extracto etanólico de cáscaras de toronja fue de  $2.5150 \pm 0.417$ . Sin embargo, la  $C_{m\acute{a}x}$  fue significativamente diferente para ambos compuestos, pues la naringenina tuvo un nivel máximo plasmático de  $1.944 \pm 0.408$  y la  $C_{m\acute{a}x}$  para el extracto de cáscara de toronja fue de  $0.8054 \pm 0.118$ .

**Cuadro 13.** Variables farmacocinéticas obtenidas en ovinos dosificados a razón de 4 mg/kg con naringenina o un extracto etanólico de cáscaras de toronja administrados por vía oral (PO).

VARIABLE	Naringenina comercial		Extracto etanólico de cáscaras de toronja	
	PROMEDIO	ERROR	PROMEDIO	ERROR
AUC	10.4521	$\pm 0.425$	6.1742	$\pm 0.488$
$C_{m\acute{a}x}$	1.9400	$\pm 0.408$	0.8054	$\pm 0.118$
$T_{m\acute{a}x}$	2.1663	$\pm 0.601$	2.5150	$\pm 0.417$
$T_{1/2 \text{ elim}}$	2.5478	$\pm 0.240$	3.6217	$\pm 0.302$



**Figura 7.** Curva comparativa de concentración vs. tiempo para AUC y  $C_{m\acute{a}x}$  de naringenina o extracto etanólico de cáscaras de toronja.

## DISCUSIÓN

En el presente estudio se determinó el efecto inmunomodulador de la naringenina comercial y de un extracto etanólico de cáscaras de toronja administrados oralmente a ovinos con una infección natural con coccidias del género *Eimeria* spp. con el objetivo de obtener información que permitiera recomendar el uso de extractos de cítricos como una alternativa para el control de la coccidiosis en corderos. El análisis de los resultados obtenidos demostró que los ovinos tratados con la naringenina comercial presentaron una reducción significativa en la excreción de ooquistes fecales ( $p < 0.05$ ) a partir de los 7 días después de la ingestión de la misma, en contraste con el grupo testigo y el que ingirió el extracto etanólico de cáscaras de toronja. No obstante, ambos grupos excretaron significativamente menos ooquistes que los animales testigo ( $p < 0.05$ ). Previamente se demostró que la naringenina posee actividad contra *Cryptosporidium parvum* (33) y *Plasmodium* spp. de una manera tiempo y concentración-dependiente (44, 45, 46). En estos casos, el efecto de la naringenina sobre el parásito fue tóxico, al afectar su supervivencia y crecimiento *in vitro*. Asimismo, en estudios de la eficacia anticoccidiana en aves infectadas con *Eimeria* spp. a las que se les administraron los siguientes extractos de plantas con activos antioxidantes: *Tulbaghia violacea* (35 g/kg), *Vitis vinifera* (75 mg/kg) y *Artemisia afra* (150 mg/kg) se observó un aumento en la conversión alimenticia similar a la que se obtiene con el estándar dorado que en ese estudio fue el anticoccidiano comercial (47). En ese experimento se demostró que la naringenina posee propiedades antioxidantes que interfieren directamente con los radicales

libres y por consiguiente restauran el equilibrio de los oxidantes/antioxidantes para atenuar las lesiones causadas por *Eimeria* spp. Entre los factores nutricionales, las dietas ricas en antioxidantes han demostrado ser relevantes para el crecimiento y mantenimiento de la salud productiva y reproductiva de los animales. Los antioxidantes son moléculas que reducen el estrés oxidativo provocado por los niveles elevados de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y radicales libres que inician reacciones en cadena en la célula, las cuales resultan en la muerte o daño de la misma. Los radicales libres reaccionan con los ácidos grasos poliinsaturados que inician un proceso conocido como peroxidación lipídica. En los sistemas vivos, la peroxidación lipídica cambia la actividad enzimática y estructura de los aminoácidos y por consiguiente provoca toxicidad celular (48)

Con respecto a los resultados relacionados con la capacidad antioxidante de la naringenina en el presente estudio, se observó que el extracto comercial de naringenina posee significativamente mayor capacidad antioxidante que el extracto etanólico de cáscaras de toronja y que el toltrazuril. La actividad antioxidante de la naringenina coincide con estudios previamente documentados (49, 50, 51, 52), los cuales señalan que la naringenina es rica en grupos OH que proporcionan átomos de hidrógeno a los radicales libres para bloquear la reacción en cadena de oxidación. Asimismo, se ha afirmado que la naringenina debe sus características antioxidantes a la presencia de anillos fenólicos que actúan como trampas de electrones al “recoger” los peroxiradicales y aniones superóxido (53, 54). El uso de antioxidantes como alternativas anticoccidianas se vislumbra como una propuesta viable para el control de esta parasitosis. Actualmente, el uso de

extractos de plantas con potencial antioxidante ha ganado importancia particular en vista de la restricción en el uso de compuestos sintéticos contra las infecciones por coccidias, a causa de la emergencia de la resistencia farmacológica y los residuos de medicamentos (55). Por consiguiente, el uso de antioxidantes naturales podría subsanar las dificultades relacionadas con el uso de fármacos sintéticos, ya que no solamente son productos naturales, sino que también poseen nuevas moléculas contra las que no se han seleccionado genes de resistencia todavía. El uso de antioxidantes naturales también podría satisfacer el interés creciente de los consumidores sobre la seguridad de los productos alimenticios de origen animal.

En el presente estudio, los ovinos que ingirieron la naringenina comercial como el extracto etanólico de cáscaras de toronjas excretaron menos ooquistes de *Eimeria* spp. con respecto al grupo testigo. En este trabajo no se obtuvo evidencia sobre el mecanismo anticoccidiano observado después de la administración de la naringenina. Sin embargo, un estudio en el cual se administró el flavonoide antioxidante xantohumol a aves con coccidiosis (56) demostró la actividad del polifenol contra diferentes especies de *Eimeria* en aves al reducir las lesiones intestinales y la excreción de ooquistes de este protozooario en relación con los testigos. La reducción en la invasión del intestino y eliminación de ooquistes en heces se asoció con el daño a la porción anterior de los esquizontes. Asimismo, estudios previos (57) han documentado que los efectos favorables que ejercen los polifenoles en los animales parasitados son provocados por la disminución del estrés oxidativo generado como mecanismo de defensa del huésped (58). Otra

planta con flavonoides, *Ageratum conyzoides*, mostró una reducción significativa en el estrés oxidativo causado por *E. tenella* en aves que la ingirieron a razón de 500-1000 mg/kg. Los parámetros productivos de las aves, tales como conversión alimenticia y ganancia de peso aumentaron; mientras que las lesiones intestinales provocadas por *Eimeria* disminuyeron (59).

Con respecto a las especies de *Eimeria* spp. patógenas y de baja patogenicidad que fueron identificadas y cuantificadas, no se observó diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) en el porcentaje de estas especies de *Eimeria* en los cuatro grupos de animales, excepto el día 90, en el cual el porcentaje de *E. ovinoidalis* fue significativamente ( $P < 0.05$ ) mayor en los testigos con respecto a los otros tres grupos. La explicación de este resultado no fue determinada, no obstante, se especula que el tejido intestinal de los ovinos que no recibieron los extractos de cítricos o el toltrazuril presentó mayor daño y por consiguiente el tejido epitelial fue más susceptible a las acciones patógenas de esa especie.

Otro de los mecanismos benéficos que se han observado después de la administración de naringenina es su efecto sobre la inducción de óxido nítrico (NO). En el presente estudio tanto la naringenina como el extracto etanólico de cáscaras de toronjas redujeron la producción de óxido nítrico en los ovinos infectados con *Eimeria* spp. Hasta donde se tiene conocimiento, éste es el primer estudio que demuestra la actividad de la naringenina sobre la generación de NO. El mecanismo preciso mediante el cual la naringenina disminuyó la producción de NO no fue investigado en este trabajo. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que la actividad reguladora de la naringenina sea una consecuencia directa de

reducir la carga parasitaria, lo cual finalmente resulta en la inducción de menos mediadores inflamatorios. Es decir, los macrófagos en reposo carecen de iNOS para iniciar la síntesis de NO. La expresión de iNOS puede ser iniciada por varios estímulos, entre los cuales se incluyen los patógenos o moléculas asociadas a patógenos (60). A pesar de su función para eliminar al agente infeccioso, la producción excesiva de NO también puede ser detrimental para el huésped (61). Se ha demostrado que la incubación de macrófagos aviares con lisados crudos del merozoito de *E. tenella* producen altos niveles de NO aparentemente regulados por la expresión de iNOS, lo que se asocia con una inflamación intensa, daño a las células epiteliales del intestino y un aumento en la invasión por *E. tenella* (62). El blanco principal del estrés nitrosativo es la depleción del glutatión reducido (GSH) mediante su nitrosilación, lo cual exacerba el estrés oxidativo y provoca que las células sean más susceptibles a patologías (63). A pesar de que no se tiene conocimiento de estudios previos en los que se demostró la actividad de la naringenina sobre la generación de NO en coccidiosis de rumiantes, se cuenta con suficientes aseveraciones publicadas que sustentan su efectividad para reducir los niveles de NO (61, 64, 65, 66).

La eficacia anticoccidiana producida tanto por el extracto de naringenina como por el de cáscaras de toronja no puede considerarse elevada ni viable desde el punto de vista comercial, ya que fue inferior al 90%. Una posible causa de esta eficacia baja puede deberse al comportamiento farmacocinético de los extractos. En el experimento respectivo, se demostró que después de la administración oral, los extractos comercial y de cáscaras de toronjas alcanzaron una concentración pico

en el plasma dentro de las primeras 2.5 a 3 horas, declinando posteriormente en un lapso de 8 horas post-administración. Este resultado es similar al de Ma et al.(67), quienes observaron concentraciones plasmáticas dentro de los primeros 15 minutos después de la administración de 30, 90 ó 270 mg/kg de un extracto de naringenina comercial igual al utilizado en el presente trabajo a ratas Wistar por vía oral. La  $C_{m\acute{a}x}$  fue alcanzada a las 0.5, 2 y 2 horas respectivamente. En ese estudio se demostró que existe una relación dosis-dependiente después de la administración de las tres dosis en ratas. En el presente trabajo no se utilizaron diferentes dosis. Con respecto a la  $C_{m\acute{a}x}$  que se alcanzó con la naringenina en esta tesis (1.9400 con el extracto comercial y 0.8054 con el etanólico de cáscaras de toronjas), este último resultado es similar al de este autor (67, 68) quienes lograron tener una concentración máxima de naringenina en el plasma de ratones de 776.06 ng/ml con un extracto comercial. La diferencia en los resultados del presente trabajo con los del autor referido podría explicarse a causa del modelo animal utilizado, ya que el metabolismo gastrointestinal es diferente en las especies rumiantes (69).

En vista de lo anteriormente señalado, se sugiere que en futuros estudios se administre la naringenina o el extracto etanólico de cáscaras de toronja con mayor periodicidad a fin de mantener las concentraciones plasmáticas durante un mayor tiempo y permitir un incremento en la exposición de los parásitos a estos flavonoides.

## CONCLUSIÓN

Los hallazgos del presente estudio son los primeros que demuestran que la naringenina y el extracto etanólico de cáscaras de toronja son inmunomoduladores de respuestas de estrés oxidativo y nitrosativo inducidas por *Eimeria* en ovinos con una infección natural. La reducción de los mediadores inflamatorios, tanto especies reactivas de oxígeno como óxido nítrico, ejerció un efecto favorable al disminuir la excreción de ooquistes del parásito. Se sugiere realizar estudios futuros para dilucidar el mecanismo de acción o vías de señalización a través de las cuales se llevó a cabo este efecto in vitro e in vivo utilizando el modelo animal correspondiente al huésped natural de esta infección, o bien, sus células. De este modo será posible explorar la relevancia de la naringenina para controlar las respuestas inflamatorias severas que son inducidas por *Eimeria*.

## 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: 613-621.
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: 417–427.
6. Urquhart M, Armour J, Duncan JL, Dunn AM, and Jennings F W. Vet. Parasitol. 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 Dauschies, 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. Hermosilla, C., Bürger, H-J., Zahner, H.: T cell responses in calves to a primary *Eimeria bovis* infection: phenotypical and functional changes. Vet. Parasitol. 1999, 84: 49-64.

11. Hermosilla, C., Zahner, H., Taubert, A.: *Eimeria bovis* modulates adhesion molecule gene transcription in and PMN adhesion to infected bovine endothelial cells. *Int. J. Parasitol.* 2006, 36: 423-431.
12. Taubert, A., Zahner, H., Hermosilla, C.: Dynamics of transcription of immunomodulatory genes in endothelial cells infected with different coccidian parasites. *Vet. Parasitol.* 2006, 142: 214-222.
13. Locati, M., Otero, K., Schioppa, T., Signorelli, P., Perrier, P., Baviera, S., Sozzani, S., Mantovani, A.: The chemokine system: tuning and shaping by regulation of receptor expression and coupling in polarized responses. *Allergy* 2002, 57: 972-982.
14. Taubert, A., Behrendt, J.H., Sühwold, A., Zahner, H., Hermosilla, C.: Monocyte- and macrophage-mediated immune reactions against *Eimeria bovis*. *Vet. Parasitol.* 2009, 164: 141-153.
15. Behrendt, J.H., Ruiz, A., Zahner, H., Taubert, A., Hermosilla, C.: Neutrophil extracellular trap formation as innate immune reactions against the apicomplexan parasite *Eimeria bovis*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2009, doi:10.1016/j.vetimm\_2009.06.012
16. Rose, M.E., Millard, B.J., Hesketh, P.: Intestinal changes associated with expression of immunity to challenge with *Eimeria vermiformis*. *Parasite Immunol.* 1992, 10: 59-69.
17. Esteves, I., Vachery, N., Martínez, D., Totte, P.: Analysis of *Ehrlichia ruminantium*-specific T1/T2 responses during vaccination with a protective killed vaccine and challenge of goats. *Parasite Immunol.* 2004, 26: 95-103

18. Rose, M.E., Smith, A.L., Wakelin, D.: Gamma interferon-mediated inhibition of *Eimeria vermiformis* growth in cultured fibroblasts and epithelial cells. *Infect. Immun.* 1991, 59: 580-586.
19. Taubert, A., Hermosilla C., Sühwold, A., Zahner H.: Antigen-induced cytokine production in lymphocytes of *Eimeria bovis* primary and challenge infected calves. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2008, 126: 309-320
20. 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.
21. Smyth JD. Introduction to animal parasitology. 3ra ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1993
22. Besné MA, Figueroa CJA, Quiroz RH, Ramírez GA, Ramos ME.: Manual de Prácticas del laboratorio de Parasitología. México, 2006
23. Reeg KJ, Gaulty M, Bauer C.: Coccidial infections in housed lambs: oocyst excretion, antibody levels and genetic influences on the infection. *Vet Parasitol* 2005, 127:209–19.
24. da Silva NR, Miller JE.: Survey of *Eimeria* spp. oocysts in feces from Louisiana State University ewes. *Vet Parasitol* 1991; 40:147-150.
25. 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>
26. Bowman DD.: Georgis Parasitología para veterinarios. 8a edición. Saunders. Madrid, 2004.

27. 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.
28. Ishii K., Furuta T.: Determination of naringin and naringenin in human plasma by high-performance liquid chromatography. *Journal of chromatography B*, 683 1996; 225-229.
29. 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.
30. 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.
31. dos Santos S, Reimao J, Tempone A, Sartorelli P, Cunha R, Romoff P, Ferreira M, Fávero O, Lago J.: *In vitro* antileishmanial and antitrypanosomal activities of flavanones from *Baccharis retusa* DC (Asteraceae). *Experimental Parasitology* 2012, 130: 141-145.
32. 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.
33. Mead J.R., McNair, N.: Antiparasitic activity of flavonoids and isoflavones against *Cryptosporidium parvum* and *Encephalitozoon intestinalis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 2006, 259:153-157.

34. 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.
35. 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.
36. 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.
37. 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.
38. Escobar BM.: Extracción de compuestos fenólicos de las cáscaras de cítricos producidos en México” Tesis de Maestría, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, I.P.N., 2010
39. Williams R.: The mode of action of anticoccidial quinolones ( 6-Decyloxy-4-hydroxyquinoline-3-carboxylates) in chickens *Inter. Jour. Parasitol* 1997, 27: 101-111.
40. Waldenstedt L, Elwinger K, Lundén A, Thebo P, Uggla A.: Sporulation of *Eimeria maxima* oocysts in litter with different moisture contents. *Poult Sci* 2001, 80: 1412-1415.
41. Rodríguez VR, Cob GL. (2005). Técnicas Diagnósticas en Parasitología Veterinaria. Editorial: Universidad Autónoma de Yucatán.

42. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans G.: Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.*, 1999, 26 (9/10): 1231-1237,
43. Kuskoski EM, Asuero AG, Tron Coso AM, Garcia-Parill AM, Fett R.: Actividad antioxidante de pigmentos antocianicos. *Rev. Bras. Ciênc. Tecnol. Alim.*, 2004, 24, (4): 691-693,
44. Gboeloh, L.B., Okon, O.E., Udoh, S.E.: Antiplasmodial Effect of *Anthocleista vogelii* on Albino Mice Experimentally Infected with *Plasmodium berghei berghei* (NK 65). *J Parasitol Res* 2014, 731906.
45. Inbaneson, S.J., Ravikumar, S., Suganthi, P.: In vitro antiplasmodial effect of ethanolic extracts of coastal medicinal plants along Palk Strait against *Plasmodium falciparum*. *Asian Pac J Trop Biomed* 2012, 2: 364-367.
46. Rodrigues, T., Ressurreição, A.S., da Cruz, F.P., Albuquerque, I.S., Gut, J., Carrasco, M.P., Gonçalves, D., Guedes, R.C., dos Santos, D.J., Mota, M.M., Rosenthal, P.J., Moreira, R., Prudêncio, M., Lopes, F.: Flavones as isosteres of 4(1H)-quinolones: discovery of ligand efficient and dual stage antimalarial lead compounds. *Eur J Med Chem* 2013, 69: 872-880.
47. Naidoo, V., McGaw, L.J., Bisschop, S.P., Duncan, N., Eloff, J.N.: The value of plant extracts with antioxidant activity in attenuating coccidiosis in broiler chickens. *Vet Parasitol* 2008, 153: 214-219.
48. Faine, L.A., Rudnicki, M., César, F.A., Heras, B.L., Boscá, L., Souza, E.S., Hernandez, M.Z., Galdino, S.L., Lima, M.C., Pitta, I.R., Abdalla, D.S.: Anti-

- inflammatory and antioxidant properties of a new arylidene-thiazolidinedione in macrophages. *Curr Med Chem* 2011, 18: 3351-3360.
49. Alam, M.A., Subhan, N., Rahman, M.M., Uddin, S.J., Reza, H.M., Sarker, S.D.: Effect of citrus flavonoids, naringin and naringenin, on metabolic syndrome and their mechanisms of action. *Adv Nutr* 2014, 5: 404-417.
50. Fouad, A.A., Albuali, W.H., Zahran, A., Gomaa, W.: Protective effect of naringenin against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Environ Toxicol Pharmacol* 2014, 38: 420-429.
51. Im, S.J., Kim, J.H., Kim, M.Y.: Evaluation of bioactive components and antioxidant and anticancer properties of citrus wastes generated during bioethanol production. *Nat Prod Commun* 2014, 9: 483-486.
52. Sachdeva, S., Flora, S.J.: Efficacy of some antioxidants supplementation in reducing oxidative stress post sodium tungstate exposure in male wistar rats. *J Trace Elem Med Biol* 2014, 28: 233-239.
53. Jeon, J.H., Lee, H.S.: Biofunctional Constituent Isolated from *Citrullus colocynthis* Fruits and Structure-Activity Relationships of Its Analogues Show Acaricidal and Insecticidal Efficacy. *J Agric Food Chem* 2014, 62: 8663-8667.
54. Jeon, S.M., Kim, H.K., Kim, H.J., Do, G.M., Jeong, T.S., Park, Y.B., Choi, M.S.: Hypocholesterolemic and antioxidative effects of naringenin and its two metabolites in high-cholesterol fed rats. *Transl Res* 2007, 149: 15-21.
55. Haggag, E.G., Kamal, A.M., Abdelhady, M.I., El-Sayed, M.M., El-Wakil, E.A., Abd-El-Hamed, S.S.: Antioxidant and cytotoxic activity of polyphenolic

- compounds isolated from the leaves of *Leucenia leucocephala*. *Pharm Biol* 2011, 49: 1103-1113.
56. Allen, P.C.: Anticoccidial effects of xanthohumol. *Avian Dis* 2007, 51: 21-26.
57. Landi-Librandi, A.P., Caleiro Seixas Azzolini, A.E., de Oliveira, C.A., Lucisano-Valim, Y.M.: Inhibitory activity of liposomal flavonoids during oxidative metabolism of human neutrophils upon stimulation with immune complexes and phorbol ester. *Drug Deliv* 2012, 19: 177-187.
58. Erlund, I., Meririnne, E., Alfthan, G., Aro, A.: Plasma kinetics and urinary excretion of the flavanones naringenin and hesperetin in humans after ingestion of orange juice and grapefruit juice. *J Nutr* 2001, 131: 235-241.
59. Nweze, N.E., Obiwulu, I.S.: Anticoccidial effects of *Ageratum conyzoides*. *J Ethnopharmacol* 2009, 122: 6-9.
60. Henard, C.A., Carlsen, E.D., Hay, C., Kima, P.E., Soong, L.: *Leishmania amazonensis* amastigotes highly express a trypanothione peroxidase isoform that increases parasite resistance to macrophage antimicrobial defenses and Fosters parasite virulence. *PLoS Negl Trop Dis* 2014, 8: e3000.
61. Jayaraman, J., Jesudoss, V.A., Menon, V.P., Namasivayam, N.: Anti-inflammatory role of naringenin in rats with ethanol induced liver injury. *Toxicol Mech Methods* 2012, 22: 568-576.
62. Chow, Y.P., Wan, K.L., Blake, D.P., Tomley, F., Nathan, S.: Immunogenic *Eimeria tenella* glycosylphosphatidylinositol-anchored surface antigens (SAGs) induce inflammatory responses in avian macrophages. *PLoS One* 2011, 6: e25233.

63. Kannappan, S., Palanisamy, N., Anuradha, C.V.: Suppression of hepatic oxidative events and regulation of eNOS expression in the liver by naringenin in fructose-administered rats. *Eur J Pharmacol* 2010, 645: 177-184.
64. Amira, S., Rotondo, A., Mulè, F.: Relaxant effects of flavonoids on the mouse isolated stomach: structure-activity relationships. *Eur J Pharmacol* 2008, 599: 126-130.
65. Chao, C.L., Weng, C.S., Chang, N.C., Lin, J.S., Kao, S.T., Ho, F.M.: Naringenin more effectively inhibits inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression in macrophages than in microglia. *Nutr Res* 2010, 30: 858-864.
66. Vafeiadou, K., Vauzour, D., Lee, H.Y., Rodriguez-Mateos, A., Williams, R.J., Spencer, J.P.: The citrus flavanone naringenin inhibits inflammatory signalling in glial cells and protects against neuroinflammatory injury. *Arch Biochem Biophys* 2009, 484: 100-109.
67. Ma, Y., Li, P., Chen, D., Fang, T., Li, H., Su, W.: LC/MS/MS quantitation assay for pharmacokinetics of naringenin and double peaks phenomenon in rats plasma. *Int J Pharm* 2006, 307: 292-299.
68. Sun, H., Dong, T., Zhang, A., Yang, J., Yan, G., Sakurai, T., Wu, X., Han, Y., Wang, X.: Pharmacokinetics of hesperetin and naringenin in the Zhi Zhu Wan, a traditional Chinese medicinal formulae, and its pharmacodynamics study. *Phytother Res* 2013, 27: 1345-1351.
69. Koritz, G.D.: Influence of ruminant gastrointestinal physiology on the pharmacokinetics of drugs in dosage forms administered orally, In:

Veterinary Pharmacology and Toxicology. Springer Netherlands, 1983, 151-163.