



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA**

**EVALUACIÓN DE LA EFICACIA ANTICOCCIDIANA DEL
EXTRACTO DE NARINGENINA ADMINISTRADA A
GAZAPOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE CON
COCCIDIAS DEL GÉNERO *Eimeria* spp.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICA VETERINARIA Y ZOOTECNISTA

P R E S E N T A:

CARINA CASTILLO COQUIS

DIRECTOR DE TESIS:

MVZ.YAZMÍN ALCALÁ CANTO.



MÉXICO, D.F.

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 Dios nuestro Señor por permitirme seguir caminando en este sendero llamado vida.

A mis padres Xavier Castillo y Alicia Coquis, a mi abuela Juana María Pineda y a mi hermano Damián Coquis por el gran apoyo que me brindaron, por que han dedicado parte de su vida hacer de mi alguien de bien, por su confianza y por todos sus sacrificios MUCHAS GRACIAS.

A nuestra máxima casa de estudios, Universidad Nacional Autónoma de México, por permitirme ser parte de ella.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por brindarme sus valiosos conocimientos a través de cada uno de sus profesores y por mostrarme el verdadero significado de la vocación de un Médico Veterinario Zootecnista y el compromiso que este título envuelve.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Yazmín Alcalá Canto por su valioso apoyo para la realización de este trabajo. Muchas gracias.

A mis amigas y amigos por sus consejos y apoyo en estas duras horas de trabajo.

Mi más grande agradecimiento a mis hermosos conejos por que fueron partícipes de este gran proyecto. Gracias también a mi linda Donna, mi bóxer hermosa, mascota y compañera en esta gran aventura.

CONTENIDO

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	3
OBJETIVO.....	20
HIPÓTESIS.....	21
JUSTIFICACIÓN.....	22
MATERIAL Y MÉTODOS.....	24
RESULTADOS.....	30
DISCUSIÓN.....	35
CONCLUSIÓN.....	38
REFERENCIAS.....	39

RESUMEN

CASTILLO COQUIS CARINA. Evaluación de la eficacia anticoccidiana del extracto de naringenina administrada a gazapos infectados experimentalmente con coccidias del género *Eimeria spp* (Bajo la dirección de la MVZ YAZMÍN ALCALÁ CANTO).

El presente trabajo evalúa los efectos anticoccidianos del extracto de naringenina, administrado vía oral a gazapos con una infección experimental con coccidias del género *Eimeria spp*. Se emplearon 24 gazapos de 21 días de edad destetados. Se formaron cuatro grupos de seis animales cada uno (n=6). El grupo 1 fungió como testigo no tratado. Al grupo 2 se le administraron 25 mg/kg PV de extracto comercial de naringenina. El grupo 3 recibió 50 mg/kg PV de extracto comercial de naringenina. Al grupo 4 se le administraron 100 mg/kg PV de extracto comercial de naringenina. El día cero se colectaron y se analizaron las muestras fecales de cada individuo con el objetivo de conocer la carga inicial parasitaria de *Eimeria spp*. Se colectaron muestras fecales de todas las charolas de las jaulas donde se alojaron los gazapos cada siete días, en un intervalo de periodos de 7, 14, 21, 28, 35 y 42 días. Las muestras reunidas se llevaron al laboratorio para ser analizadas por las técnicas coproparasitoscópicas de flotación y McMaster. Los gazapos tratados con el extracto de naringenina presentaron una reducción en la eliminación de ooquistes de *Eimeria spp* en las heces con respecto al grupo testigo. La reducción en la eliminación de ooquistes de *Eimeria spp* en las heces fue del 98% a los 28 días post-tratamiento con 100 mg/kg de naringenina en

comparación con los animales no tratados. De acuerdo los resultados obtenidos de este trabajo, se puede concluir, que éste extracto de origen natural de naringenina puede formar parte de la dieta de los conejos y/o gazapos, y con ello prevenir o controlar la coccidiosis intestinal.

INTRODUCCIÓN

La cunicultura representa una alternativa alimenticia para las ciudades con poblaciones en crecimiento. El alto grado de proteína que proporcionan los productos derivados de este mamífero, permite ser una fuente idónea en la dieta de la población. El conejo como otros animales herbívoros, tiene la facultad de utilizar las fibras vegetales y residuos de cosecha y de cocina, transformándolos en productos valiosos como la carne.¹

El conejo es un animal muy susceptible a padecer enfermedades de diversas etiologías si no se encuentra en condiciones óptimas higiénico-ambientales-alimenticias, debido a esto, en explotaciones intensivas se llega a presentar hasta un 20 % de las pérdidas desde el nacimiento hasta el final de la engorda. Algunos autores señalan a las enfermedades digestivas como las de mayor importancia, debido a las cuantiosas pérdidas económicas que llegan a ocasionar al productor por conceptos de muerte, trastornos del crecimiento, disminución de peso y gastos de medicamentos.²

Por lo tanto, uno de los problemas que más inquietan a la cunicultura mexicana es el control de los parásitos gastrointestinales; el presente trabajo expone una alternativa para proporcionar el uso de un desparasitante de origen natural que será benéfico para evitar de forma orgánica y segura estas parasitosis frecuentes en conejos; de esta manera se podrá brindar al consumidor un producto libre de residuos de medicamentos, que implique un menor riesgo para la salud del consumidor.¹

Dentro de los parásitos intestinales que afectan al conejo se pueden encontrar trematodos, cestodos, nematodos y protozoarios.³

Coccidiosis.

Los protozoarios reagrupan gran número de familias entre ellas la *Eimeriidae*, que se caracteriza por un desarrollo independiente de los gametos macho y hembra. *Eimeria* es un protozoario de ciclo directo con desarrollo intraepitelial.^{2,3}

Las coccidias son agentes patógenos que provocan diarrea. La Eimeriosis o Coccidiosis es una enfermedad parasitaria altamente específica para el huésped; en este caso, afecta principalmente a los intestinos del conejo (coccidiosis intestinal), y al hígado (coccidiosis hepática); dependiendo de diversas circunstancias ambientales y de la susceptibilidad del animal afectado, la coccidiosis puede tener diversas presentaciones: ser asintomática, de manifestación moderada o causante de alta mortalidad.^{3,4}

Las pérdidas ocasionadas por esta enfermedad se deben estimar no sólo por la morbilidad y el descenso en la producción de los animales parasitados, incluso en su forma subclínica; sino también por la mortalidad que provoca y, en último término, por el decomiso de los hígados en canales de conejos afectados por la coccidiosis hepática, cuyas lesiones los hacen poco apropiados para el consumo humano.^{2,3}

La coccidiosis del conejo está producida por protozoarios esporozoarios, es decir, parásitos que carecen de cilios y flagelos y que tienen a la vez una reproducción sexual y asexual que involucra la formación de una fase quística externa al huésped conocido como ooquiste u oocisto. ⁵

Las coccidias del conejo forman parte del género *Eimeria*, es decir, que comprenden cuatro esporocistos con dos esporozoitos. Las Eimerias son parásitos de ciclo directo y tienen una especificidad muy activa frente a su huésped. Por esto, el conejo no puede verse afectado por Eimerias que afecten a otros huéspedes. Existen varias especies con localización y patogenicidad variables, se han reportado por lo menos 12 especies parásitas del conejo y 1 especie apatógena. Solamente una especie de las parasitas se localiza en el hígado, y las otras 12 en intestino delgado e intestino grueso. ^{3,4,5}

CUADRO 1
Eimerias causales de la coccidiosis en conejos.⁴

Especie	de Patogenicidad	Localización
<i>Eimeria</i>		
<i>E. coecicola</i>	Apatógena	Intestino Delgado
<i>E. exigua</i>	Leve	Íleon
<i>E. flavescens</i>	Alta	Ciego y colon
<i>E. intestinalis</i>	Alta	Íleon y yeyuno
<i>E. irresidua</i>	Alta	Íleon y yeyuno
<i>E. magna</i>	Alta	Íleon y yeyuno
<i>E. matsubayashii</i>	Leve	Intestino delgado y ciego
<i>E. media</i>	Alta	Yeyuno
<i>E. nagpurensis</i>	Leve	Intestino delgado
<i>E. neoleleporis</i>	Alta	Intestino delgado y ciego
<i>E. perforans</i>	Leve	Duodeno
<i>E. piriformis</i>	Moderada	Colon
<i>E. stiedae</i>	Alta	Hígado

Morfología.

Las formas más comunes de los ooquistes son las esféricas, sub esféricas, ovoides o elipsoidales y varían de tamaño, generalmente miden entre 13 y 37 micras, según la especie. La pared del ooquiste está compuesta por dos capas y generalmente es clara y transparente con un contenido doble bien definido; sin embargo en algunas especies puede ser de color amarillento, e incluso verde.

Otros individuos poseen estriaciones o puntuaciones. Ciertas especies presentan un micrópilo en un extremo que frecuentemente es puntiagudo. Este micrópilo puede estar recubierto por un casquete y en ocasiones, suele proyectarse de la pared quística hacia el exterior una estructura llamada casquete polar.^{5,6}

Cuadro 2
Características morfológicas de *Eimeria* spp en conejos. ^{5,7}

Especie de <i>Eimeria</i>	Tamaño medio del ooquiste esporulado (micras)	Forma	Aspecto del ooquiste esporulado
<i>E. coecicola</i>	25 X 21	Ovoide	Amarillo pálido, pared lisa y micrópilo
<i>E. exigua</i>	14 X 13	Subesférico	Verdoso con micrópilo
<i>E. flavescens</i>	30 X 18	Ovoide	Liso con micrópilo pequeño
<i>E. intestinalis</i>	27 X 18	Elipsoide	Amarillo claro con micrópilo pequeño
<i>E. irresidua</i>	38 X 26	Ovoide	Liso, amarillo pálido y micrópilo muy visible
<i>E. magna</i>	35 X 24	Ovoide - elipsoide	Amarillo oscuro con micrópilo prominente
<i>E. matsubayashii</i>	27 X 18	Ovoide	Pared lisa, blanquecino y micrópilo
<i>E. media</i>	31 X 18	Elipsoide	Pared lisa, rosado pálido y micrópilo definido
<i>E. nagpurensis</i>	23 X 13	De Barril	Pared fina, incoloro y sin micrópilo
<i>E. neoleleporis</i>	39 X 20	Elipsoide alargado	Pared lisa, amarillento y micrópilo visible
<i>E. perforans</i>	21 X 15	Elipsoide	Pared lisa ligeramente rosada, no se aprecia el micrópilo
<i>E. piriformis</i>	29 X 18	Elipsoide con polos agudos	Pared lisa, amarillento micrópilo destacado
<i>E. stiedae</i>	37 X 20	Elipsoide	Liso amarillo-naranjado o salmón micrópilo visible.

La coccidiosis tiene una transmisión oral-fecal, es decir, el animal adquiere la infección al ingerir los ooquistes esporulados. El tiempo de esporulación depende de la especie de *Eimeria* y de las condiciones ambientales favorables para que este proceso se lleve a cabo.⁶

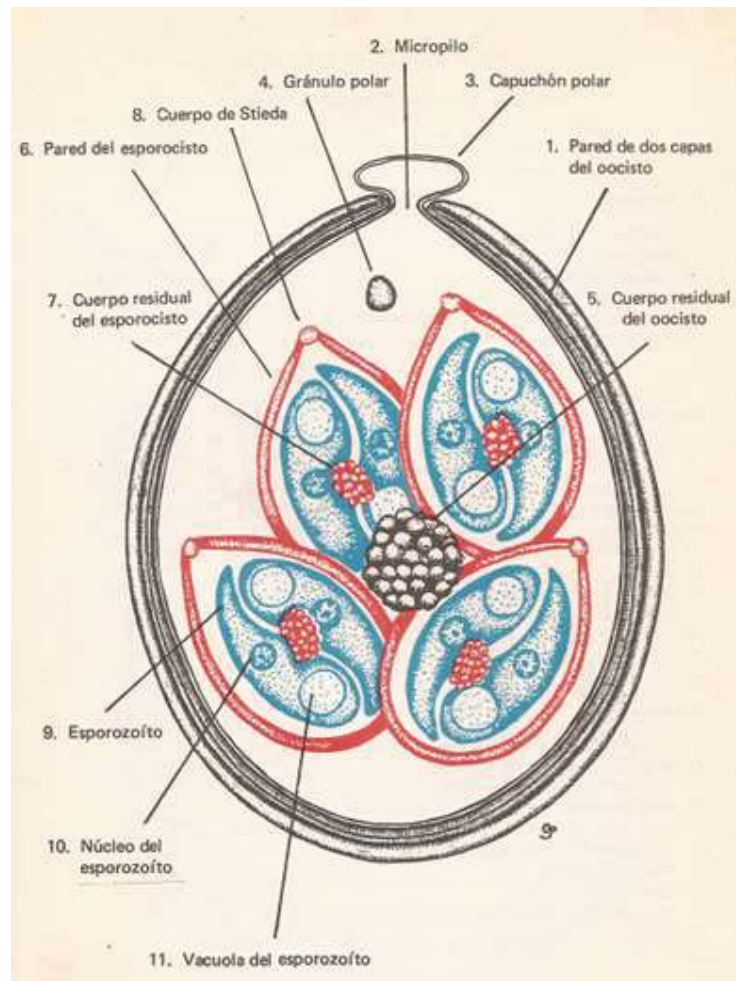


Figura 1. Morfología de *Eimeria* spp.⁸

Ciclo biológico.

El ciclo biológico de las coccidias dura de 4 a 14 días dependiendo de la especie de *Eimeria* y consta de 2 fases, una interna o endógena en la que el parásito se reproduce asexual y sexualmente y otra externa con una reproducción asexual o esporogónica. Se inicia el ciclo con la excreción de los ooquistes junto con las heces del conejo; la fase de ooquiste de un coccidio es una forma de latencia para propagación de la especie y como tal enormemente resistente a la destrucción por los elementos físicos y químicos, siendo la desinfección por vía química ineficaz, únicamente el calor seco con temperatura mayor a 40 °C y un ambiente seco permiten destruir los ooquistes.^{9,10,11,12}

La fase endógena comienza después de la ingestión de alimento contaminado con ooquistes esporulados, la pared se desintegra en el estómago del huésped liberando 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. Dentro de la célula, el esporozoíto se transforma en trofozoito y al evolucionar da origen a un merozoito, éstos en conjunto rompen la célula e invaden otras más (hasta 5 veces). Durante la fase sexual los merozoitos se diferencian en macrogametos y microgametos, cuya unión dará origen a un cigoto que una vez que se ha recubierto por la pared externa se transforma en un ooquiste que es excretado con las heces, dando lugar a la fase externa o esporogónica, en cualquiera de las especies que afectan al conejo es de aproximadamente 48-72 horas en condiciones

favorables de temperatura (20 °C), humedad 100% (medio acuoso) y oxigenación (300-400 mL de oxígeno) esporula y se desarrolla el estadio infectante. ^{10,13,14} .

Para que el ooquiste se pueda propagar y hacerse infectante, es preciso que el esporoblasto se transforme y esporule para dar lugar a 4 esporocistos, cada uno a su vez contiene 2 esporozoítos. Dicha transformación se verifica fuera del organismo siendo necesario para esta la coincidencia de tres factores: humedad, calor y oxígeno, en un periodo aproximadamente de 24 horas en el ambiente. Cuando un ooquiste infectante o esporulado es ingerido, al alcanzar el intestino del conejo por digestión de las membranas libera los esporocistos y posteriormente los esporozoítos, siendo estos los que, definitivamente desencadenan el procesos infeccioso parasitario. ^{9, 12,13}

En la coccidiosis hepática el ciclo biológico se caracteriza por que el desenquistamiento tiene lugar en el intestino delgado, penetrando los esporozoítos en la mucosa intestinal, desde donde pasan a través del sistema portahepático al hígado penetrando en las células epiteliales de los conductos biliares. La fase del desarrollo es en esta localización a los cinco o seis días post infección. No se sabe con exactitud el número de generaciones asexuadas que tienen lugar. Los ooquistes se eliminan con las heces de los conejos.⁵

Si las heces se retiran de las jaulas todos los días, se reduce el riesgo de una reinfección, lo que permite controlar gradualmente la enfermedad en la explotación. Por otra parte se ha comprobado que la ingestión de un sólo ooquiste puede dar lugar a 26 millones de coccidias, de manera que la posibilidad de controlar totalmente la enfermedad sólo es a base de medidas de bioseguridad y control quimioterapéutico preventivo o durante un brote. ⁴

Patogenia y lesiones.

Las manifestaciones patológicas de las coccidiosis del conejo dependen de la extensión e intensidad de las lesiones que produzcan los esquizontes al parasitar a nuevas células provocando su destrucción. Cuanta mayor cantidad de ooquistes esporulados penetren por vía oral, mayores y más rápidos serán los efectos patológicos e inversamente, cuanta menor protección tengan las células susceptibles de ser parasitadas, más grave será la coccidiosis. La gravedad de la enfermedad también depende de la edad de los animales afectados, siendo más susceptibles los gazapos. En la coccidiosis intestinal no existen lesiones patognomónicas. En la coccidiosis hepática existe hepatomegalia con nódulos blanco amarillentos (causados por la reproducción esquizogonia, que da origen a los merozoitos) los cuales al ser seccionados expulsan un líquido cremoso amarillo verdoso. La ruptura de los conductos biliares se considera un signo patognomónico. ^{6,10,13}

Diagnóstico.

El diagnóstico de la coccidiosis se puede hacer en el laboratorio mediante estudios coprológicos y además pueden examinarse los órganos a la necropsia. Es recomendable cuantificar la carga parasitaria e identificar la o las especies presentes mediante el uso de claves taxonómicas para poder conocer el grado de patogenicidad de la infección. ^{3,6,13}

Para los estudios coproparasitoscópicos, es preferible examinar las heces durante varios días. El diagnóstico definitivo debe obtenerse por un estudio histopatológico. En la coccidiosis hepática el diagnóstico se puede basar en la observación de las lesiones a la necropsia. ^{3,6,13}

Tratamiento y Control.

Para el tratamiento de esta enfermedad, pueden emplearse fármacos con actividad anticoccidiana; los cuales se administran en el alimento o el agua de bebida. ^{6,13,14,15}

Los medicamentos anticoccidianos han sido empleados en el tratamiento de animales enfermos o como preventivos o profilácticos. Sin embargo, la

aparición de residuos por el mal uso y abusos de estos, han llevado a estos fármacos a que su uso sea restringido, debido a su potencial para producir efectos adversos en el ser humano.^{14,15,16}

Los medicamentos más empleados son los nitrofuranos y las sulfamidas. Cabe mencionar que las sulfonamidas son más eficaces terapéuticamente, sin embargo, han caído en desuso en vista de su toxicidad especialmente para los conejos lactantes y las hembras gestantes. Los tratamientos a base de nitrofuranos administrados por vía oral han disminuido en animales que están destinados al consumo humano, debido a su toxicidad.^{6,15,16}

La coccidiosis se puede controlar aplicando medidas de bioseguridad como limpieza frecuente en la granja, continua eliminación de excretas, el evitar la humedad en las camas, uso de jaulas con piso de rejilla, utilización de comederos y bebederos elevados en los que no ingresen los ooquistes y control de las situaciones estresantes en los animales. Cabe señalar que a la fecha no se ha producido comercialmente una vacuna contra la coccidiosis en conejos.^{2,6,13}

Alternativas naturales para el control de la coccidiosis en conejos.

Ante el panorama antes descrito, la comunidad científica ha emprendido una búsqueda intensa de nuevas agentes anticoccidianos, cuyo origen sea a partir de productos naturales. Se ha reportado el uso de algunos suplementos de origen natural que actúan estimulando los mecanismos específicos de defensa del huésped para poder reducir o eventualmente prevenir eficazmente esta parasitosis.^{15,16}

Etnofarmacología

Se estima que existen alrededor de 250,000 a 500,000 especies de plantas en la Tierra. Un porcentaje relativamente bajo (1-10%) han sido utilizadas como alimento tanto por humanos como por animales. Actualmente la etnofarmacología o etnobotánica, disciplina que tiene como objetivo utilizar el conocimiento adquirido por comunidades indígenas o nativas sobre las plantas, ha surgido como una alternativa contra las prácticas medicinales invasivas y tóxicas, ya que el uso excesivo de productos químicos puede ser peligroso y no efectivo.¹⁴

La ciencia está volviéndose altamente receptiva al uso de antimicrobianos, antiparasitarios y otros productos derivados de plantas, debido a que el uso de tratamientos tradicionales sintéticos está siendo poco efectivo en virtud de la presentación de resistencias ocasionadas muchas veces por el mal uso y abuso de los mismos.¹⁴

Algunos extractos naturales que podemos citar son los obtenidos de las plantas *Artemisia annua* y *Sophora flavescens aiton*; ambas se han empleado como aditivos en la ración de animales en Asia, observándose una eficaz actividad anticoccidiana, reducción en las lesiones intestinales, manteniendo la ganancia de peso de los animales y reduciendo la producción de ooquistes.¹⁵

Otro extracto natural que ha merecido especial atención debido a sus saludables beneficios brindados desde tiempos ancestrales es el té verde, una bebida popular procedente de la planta llamada *Camelia sinensis*.^{15,30} Esta planta contiene múltiples compuestos fenólicos, denominados catequinas, que son conocidos por sus propiedades antitumorales, antiinflamatoria, antioxidante, antiproliferativa, antibacteriana, antiviral y antiparasitaria.^{15,17}

Todas las propiedades curativas que podemos encontrar en las diversas plantas, son atribuibles a las sustancias de las cuales se componen, o que son capaces de sintetizar; algunas de ellas son sustancias aromáticas, la mayoría de las cuales son fenoles o sus derivados con el oxígeno sustituido. En muchos

casos, estas sustancias sirven como mecanismos de defensa de las plantas contra la depredación por microorganismos, insectos y herbívoros. Algunos, tales como los terpenoides, les confieren su olor, otros como las quinonas y taninos son responsables del pigmento de las plantas y otras intervienen en rutas metabólicas como los flavonoides. ^{15,17}

Los flavonoides denotan a un grupo muy amplio de compuestos polifenólicos que poseen una estructura común benzo- γ -pirona. Los cuales se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal, y se encuentran en forma universal en las plantas vasculares en forma de glicósidos. Son unos de los compuestos más importantes presentes en los vegetales, especialmente en los del género *Citrus*. Se han identificado más de 8,000 compuestos con una estructura flavonoide. ¹⁷

Existen cuatro tipos de flavonoides (flavanonas, flavonas, flavonoles y antocianinas) en *Citrus*. En este género, las flavanonas se acumulan en mayor cantidad que las flavonas. La concentración de estos compuestos depende de la edad de la planta y los niveles más elevados se detectan en los tejidos que tienen divisiones celulares marcadas. Gran parte de la actividad de los flavonoides tiene lugar sobre las células endoteliales, por lo que gran parte de la investigación que se ha realizado sobre las flavanonas de *Citrus* ha sido estudiando su actividad sobre la inflamación. ¹⁷

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.^{17,18}

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. Asimismo, se ha comprobado la actividad de los flavonoides como antiprotozoarios, principalmente contra *Trypanosoma spp*, *Cryptosporidium parvum*, *Plasmodium falciparum*.^{19,20}

Existen estudios epidemiológicos que indican que el consumo regular de frutos *Citrus* está asociado con una reducción en el riesgo de padecer 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.²¹

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.²¹

Extracto de naringenina.

La naringenina (4',5,7-trihidroxiflavanona) es una flavanona que se obtiene a partir de la naringina natural, es obtenida mediante el proceso de hidrólisis ácida. Es un compuesto incoloro o ligeramente amarillo. Se obtiene de la corteza de los frutos cítricos; tiene un rango amplio de actividades farmacológicas y nutricionales. Recientes estudios sugieren que la naringenina podría tener un efecto beneficioso en casos de pacientes con fibrosis pulmonar; además su actividad antifibrogénica, se le ha asociado con la supresión de las metástasis en diversos tipos de cáncer. ^{19,20,21}

La naringenina está presente en las cáscaras de las naranjas y toronjas principalmente 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. ^{21,22}

Es importante señalar que la naringenina se ha encontrado en el cerebro después de la ingestión oral, por lo que ejerce potencialmente acciones anti-neuroinflamatorias *in vivo* y combate las enfermedades neurodegenerativas. ²¹ Otra de sus propiedades es ejerce su efecto anti-inflamatorio mediante la inhibición de la producción de óxido nítrico y prostaglandina E₂. ^{22,23}

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. ¹⁸

OBJETIVO

Evaluar la eficacia anticoccidiana del extracto de naringenina en gazapos infectados experimentalmente con coccidias del género *Eimeria* spp, para su tratamiento.

HIPÓTESIS

Es posible tratar la coccidiosis de los gazapos con productos de origen natural. La actividad de la naringenina interfiere con el ciclo biológico de *Eimeria* spp y por consiguiente reduce la excreción de ooquistes en las heces de los gazapos y adultos.

JUSTIFICACIÓN

Los animales que están infectados con coccidiosis pueden no manifestar signos clínicos, desarrollándose de manera crónica lo que hace que los animales toleren la enfermedad y se presente una coccidiosis subclínica. Esta parasitosis tiende a una infección masiva en conejos adultos y generalmente se manifiesta en forma aguda, principalmente en gazapos que aunado a la situación de estrés pos-destete, son más susceptibles a infectarse. La importancia que tiene esta parasitosis se basa en que existe una contaminación continua del ambiente del animal y por lo tanto los gazapos pueden presentar retrasos en el crecimiento, en la conversión alimenticia y presentar predisposición a otras infecciones.

Asimismo, cuando se manifiestan los signos clínicos, el costo de los tratamientos suele ser considerable para la producción de conejo. Proporcionar una alternativa para la reducción de estos costos es posible mediante la utilización de extractos de origen vegetal, como antiparasitarios. Generalmente se asume que el empleo de plantas medicinales es seguro y eficaz, ya que se ha utilizado durante muchos años por diversas culturas. 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 conejos. Adicionalmente, la tendencia a consumir alimentos naturales que no dañen la salud humana ha llevado a producir alimentos orgánicos 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 la flavanona naringenina a fin de conocer si este producto interfiere con el ciclo biológico de *Eimeria* spp.

MATERIAL Y MÉTODOS

El presente trabajo se llevó a cabo en su parte de campo en una producción Cunicola particular situado en la Delegación Iztacalco, (la Delegación se localizada en el Distrito Federal, limita al norte con la delegación Venustiano Carranza y Cuauhtémoc, al poniente con Benito Juárez, al sur con Iztapalapa y al oriente con el municipio de Nezahualcóyotl en el Estado de México). La producción se ubica en la zona centro-oriente de la delegación. La zona comprende un clima semi-seco templado con lluvias en verano, con un promedio de lluvia anual no mayor a los 600 mm. Es una zona completamente urbanizada. La producción cuenta con instalaciones tecnificadas, en el cual cada hembra y macho están en una jaula individual en una distribución en Flat-deck. En ésta producción se lleva un control de las montas, nacimientos, partos, engordas y se programan todas las actividades a realizar (diarias y/o por ciclo). El lugar cuenta con los servicios de agua potable, drenaje e instalación eléctrica. No se localizan otras producciones cercanas ni depredadores. Las razas de conejos con los que se trabaja son Nueva Zelanda variedad blanco, Chinchilla y algunos conejos criollos. El equipo empleado lo comprenden jaulas tipo americano de varilla de acero galvanizado con bebederos de botella invertida, internos de lámina galvanizada con capacidad de 2 L y comederos internos de lámina galvanizada tipo tolva con capacidad aproximada de 2 Kg; cada jaula posee charolas colectoras de excretas. El equipo accesorio de la producción lo conforman nidales, báscula, cepo para manejo, etc. La limpieza se realiza de manera diaria.

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

Extracto de naringenina (*Citrus medica*)

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

Animales

Se utilizaron 24 gazapos de 21 días de edad destetados (destete temprano) de la raza Nueva Zelanda variedad blanco, con un peso promedio de 380 gramos. Se incluyeron hembras y machos. Los gazapos estuvieron alojados en grupos de 6 animales, en jaulas tipo americano (60 cm de ancho X 90 cm de largo X 40 cm alto) con charola colectora de heces. Los animales fueron identificados y distribuidos al azar en las jaulas, (unidades experimentales). Previo al experimento se confirmó mediante un análisis coprológico que los 24 gazapos no estuvieran parasitados, para poder ser infectados experimentalmente con ooquistes de *Eimeria* spp. Los ooquistes de *Eimeria* spp que se emplearon para la infección experimental se obtuvieron de muestras fecales colectadas de conejos infectados naturalmente; las muestras después de ser reunidas se homogenizaron, se incubaron en solución de Dicromato de Potasio al 2% en un periodo de 12 días/ 27°C/ oxigenación diaria. Esporulados los ooquistes se lavaron con solución salina amortiguada por fosfatos (PBS) y se inocularon vía

oral a una dosis 7.5×10^6 ooquistes esporulados de *Eimeria spp* a los 24 gazapos de 21 días de edad destetados. Al sexto día post-inoculación se colectaron las muestras fecales y mediante técnicas coproparasitoscópicas se confirmó que los gazapos estuvieran infectados con *Eimeria spp*. Los animales presentaron cargas parasitarias superiores a 300 ooquistes por gramo de heces (opg) con una consistencia fecal semisólida.

Durante el estudio los gazapos se mantuvieron bajo supervisión constante. Se proporcionó agua *ad libitum*. Como alimento se proporcionó Nutro Line alimento balanceado para conejos libre de coccidiostatos; el análisis garantizado es:

Proteína:	18.00	% Min.
Grasa:	2.00	% Min.
Fibra:	12.00	% Max.
Cenizas:	9.00	%. Max.
Humedad:	13.00	% Max.
E.L.N.	46.00 %	

Diseño experimental

Se formaron aleatoriamente cuatro grupos experimentales con 6 animales cada uno:

GRUPO 1: Testigo no tratado.

GRUPO 2: Tratado con 25 mg/kg PV²⁴ de extracto comercial de naringenina.

GRUPO 3: Tratado con 50 mg/kg PV de extracto comercial de naringenina.

GRUPO 4: Tratado con 100 mg/kg PV de extracto comercial de naringenina.

A los gazapos se les administró el extracto acuoso de naringenina por vía oral utilizando una jeringa sin aguja diariamente durante 42 días.

Se realizó la obtención de muestras fecales y exámenes coprológicos a los 0, 7, 14, 21, 28, 35 y 42 días posteriores a la dosificación.

Muestras fecales

Una vez formados los lotes se tomaron muestras de heces individuales recién depuestas en las charolas recolectoras de las jaulas y se depositaron en bolsas de polietileno. Las muestras se identificaron por grupos (1,2,3,4) y se conservaron en refrigeración hasta su procesamiento en el laboratorio.

Procesamiento de las muestras

Las muestras colectadas fueron procesadas mediante la técnica de flotación y de McMaster²⁵ para la cuantificación de ooquistes por gramo de heces. Para la identificación de especies se realizó la esporulación de los ooquistes colocando el concentrado obtenido en dicromato de potasio al 2%, cultivados en un periodo de 12 días/27°C/oxigenación diaria.^{25,26}

Finalmente se llevó a cabo la identificación de ooquistes tomando en consideración su diámetro longitudinal y ancho, forma, coloración, aspecto de su cubierta y presencia de micrópilo, entre otras características.

Análisis de los Resultados

La eficacia se determinó con base en la presencia de ooquistes por gramo de heces presentes en el grupo tratado con respecto al grupo testigo de acuerdo con la fórmula descrita por Holdsworth *et al.*²⁷

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

XC

E = Porcentaje de efectividad

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

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

Análisis de datos

El diseño del experimento corresponde a un diseño de un solo factor con cuatro niveles completamente aleatorizado y con observaciones repetidas en el tiempo. Se realizó un análisis de varianza multivariado (MANOVA) para observaciones repetidas. El conteo de ooquistes se transformó a logaritmo natural (es el logaritmo base 10 que se emplea para distribuir de manera normal, en este caso la carga parasitaria); previamente al análisis.

RESULTADOS

Con la finalidad de conocer si la naringenina ejerce una actividad anticoccidiana, se efectuó la evaluación parasitológica en cuatro grupos de gazapos infectados naturalmente con coccidias del género *Eimeria spp.* Se verificó que los animales cumplían los criterios para ser incluidos en el estudio al no haber recibido tratamientos antiparasitarios previos al experimento. Asimismo, se eligieron los gazapos que después de ser infectados experimentalmente resultaron positivos a coccidiosis y tuvieron una eliminación igual o mayor a 300 ooquistes por gramo (opg) de heces.

Las especies de *Eimeria* identificadas a través de la inducción de su esporulación con dicromato de potasio al 2% en condiciones de laboratorio se muestran en el Cuadro 3.

Cuadro 3
Porcentaje de especies de *Eimeria* identificado.

Especie de <i>Eimeria</i>	Porcentaje(%)
<i>E. perforans</i>	28
<i>E. coecicola</i>	26
<i>E. magna</i>	19
<i>E. intestinalis</i>	16
<i>E. irresidua</i>	11

Cuantificación de ooquistes

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

Como consecuencia del resultado anterior, se realizaron análisis univariados (ANOVA) de un sólo factor con cuatro niveles para cada tiempo. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en el logaritmo promedio del número de OPG (ooquistes por gramo) entre tratamientos a partir del día 21. Del día 21 al día 35 se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en el logaritmo promedio del número de OPG (ooquistes por gramo) en los gazapos, entre el grupo control y los gazapos tratados con 25 mg/kg PV de extracto comercial de naringenina con los grupos que recibieron 50 mg/kg y 100 mg/kg de PV de extracto comercial de naringenina. A los 42 días se observó que los tres grupos tratados son significativamente diferentes respecto al grupo control. Las diferencias encontradas entre tratamientos se muestran para cada tiempo en los cuadros 2, 3, 4 y 5 y en la Figura 2. La Figura 3 muestra los porcentajes de eficacia anticoccidiana por dosis probada. La mayor eficacia (97.92%) se presentó con la dosis de 100 mg/kg a los 28 días después de la administración.

Cuadro 4

Media \pm Error estándar de eliminación de ooquistes de *Eimeria* spp. del día 21 al día 35 post-tratamiento

	Día 21	Día 28	Día 35	Día 42
Testigos	6.65 \pm 0.21 ^A	6.49 \pm 0.20 ^A	6.26 \pm 0.25 ^A	6.29 \pm 0.21 ^A
25 mg/kg	6.56 \pm 0.26 ^A	6.21 \pm 0.40 ^A	5.54 \pm 0.25 ^A	4.30 \pm 0.24 ^A
50 mg/kg	4.95 \pm 0.22 ^B	4.25 \pm 0.23 ^B	4.18 \pm 0.24 ^B	3.91 \pm 0.23 ^B
100 mg/kg	4.14 \pm 0.47 ^B	3.92 \pm 0.35 ^B	3.64 \pm 0.36 ^B	3.54 \pm 0.35 ^B

Literales diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (p<0.05)

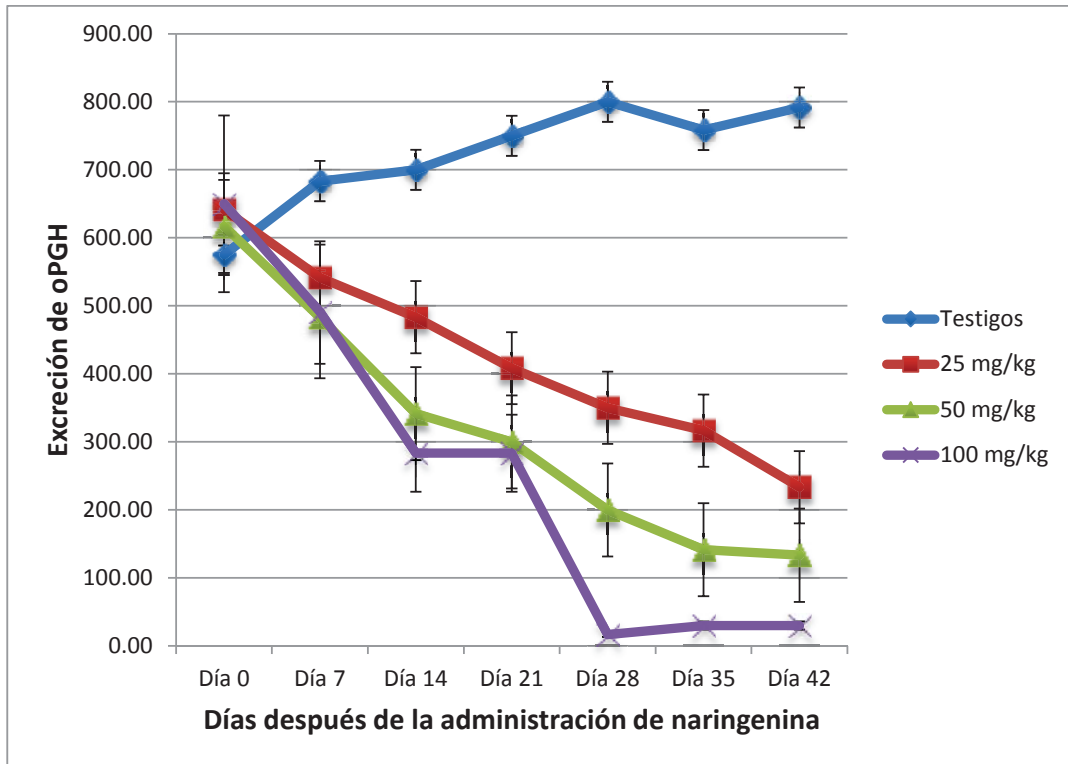


Figura 2. Disminución en la excreción de ooquistes por gramo de heces de *Eimeria spp.* después de la administración de tres dosis de naringenina.

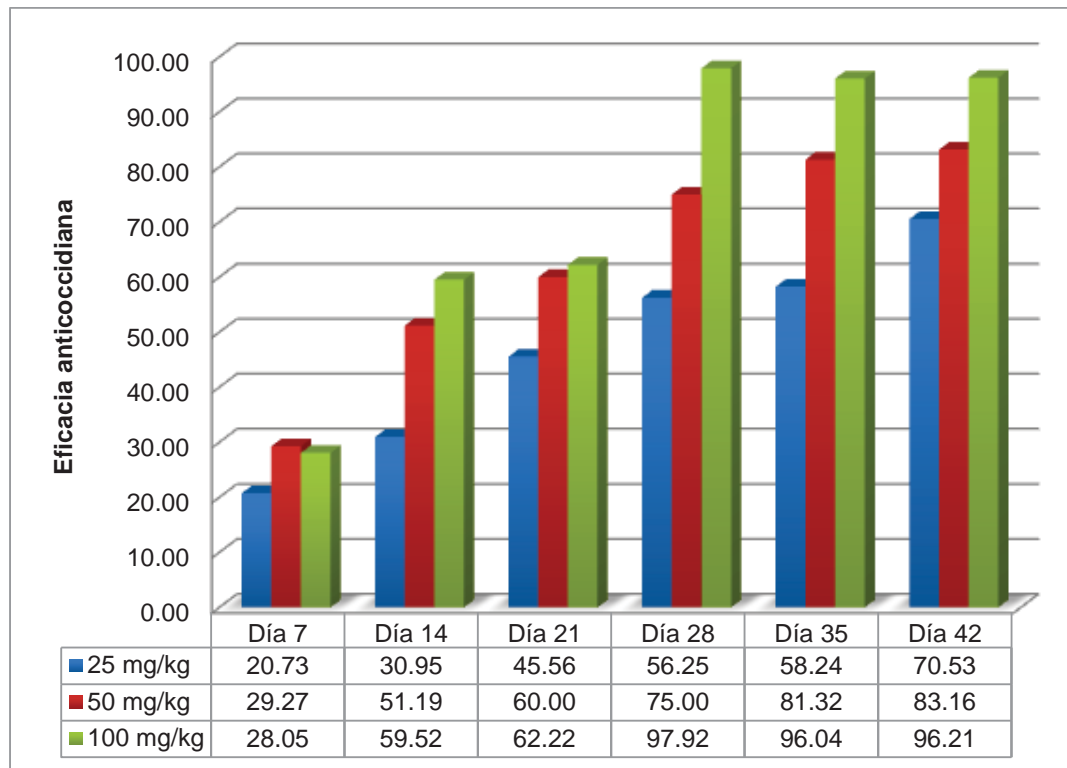


Figura 3. Eficacia anticoccidiana de la naringenina aplicada a los gazapos.

DISCUSIÓN

La coccidiosis, enfermedad infecciosa parasitaria; emplea para su control y tratamiento en conejos principalmente productos comerciales conocidos como coccidicidas o coccidiostatos.²⁶ Los cuales generalmente en la cunicultura del país se adicionan al alimento o al agua de bebida. Esta práctica de manejo puede ser muy útil siempre y cuando el lugar de alojamiento del animal no permita el desarrollo de las fases evolutivas del parásito, ya que de lo contrario se provocaría una resistencia por parte del parásito al producto empleado.^{28, 29}

Por otro lado la actual demanda de productos de origen animal libres de residuos dañinos para la salud pública, exige una creciente producción pecuaria de tipo orgánico; es decir, la producción de conejos para engorda donde se respeten las características etológicas y fisiológicas de este y se evite administrar a estos algún tipo de producto químico.^{28,29} Asimismo, los residuos farmacológicos en los productos alimenticios pueden ser potencialmente tóxicos para los consumidores.¹⁵

De acuerdo a la creciente demanda de activos con potencial antiparasitarios derivados de extractos de plantas; en el presente estudio se determinó el efecto antiparasitario de un extracto comercial de naringenina administrado oralmente a gazapos con una infección experimental con coccidias del género *Eimeria spp*; con el objeto de conocer su eficacia para permitir recomendar su inclusión en el alimento de los conejos, como una alternativa para el control de la coccidiosis.

En base al análisis de los resultados obtenidos se demostró que los gazapos de los grupos 2, 3, 4; tratados con un extracto comercial de naringenina presentaron una reducción significativa en la excreción de ooquistes fecales ($p < 0.05$) a partir de los 21 días post- tratamiento, en contraste con el grupo testigo. Se observó que los gazapos del grupo 3 tratados con una dosis de 100 mg/kg PV de extracto comercial de naringenina presentaron una mayor reducción en la eliminación de ooquistes a partir del día 21 post-tratamiento, con respecto al grupo testigo y a los grupos 2 y 4. Lo cual nos indica que el extracto de naringenina tiene un efecto tóxico sobre el parásito, al afectar su supervivencia y crecimiento.

Por el momento, no se cuenta con estudios científicos realizados que den información confiable de la eficacia anticoccidiana en conejos de este extracto de naringenina, bajo las condiciones del presente estudio. Sin embargo se piensa que las propiedades antioxidantes del extracto de naringenina interfieren directamente con los radicales libres y por consiguiente restauran el equilibrio de los oxidantes/antioxidantes para atenuar las lesiones causadas por *Eimeria* spp.^{30,31}

La actividad antioxidante de la naringenina coincide con estudios previamente documentados, los cuales señalan que la naringenina es rica en grupos hidroxilo (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. El uso de antioxidantes como alternativas anticoccidianas se vislumbra como una propuesta viable para el control de esta parasitosis.^{31,32,33}

Conclusión

El extracto de naringenina a una dosis de 100 mg/Kg ejerce una eficacia superior al 97% para el control y/o prevención de la coccidiosis provocada por *Eimeria* spp en gazapos. Este extracto de origen natural puede formar parte de la dieta de los conejos y/o gazapos, y con ello prevenir o controlar la coccidiosis intestinal.

Bibliografía

1. Scheelje, R.; Niehaus, R.; Wenner, H.K.: Conejos para carne. Vol. 3. Ed. Acribia. Zaragoza, España. 2002. pp: 12-25.
2. Rosell, P.J.M.: Enfermedades del conejo. Tomo II Enfermedades. Ediciones Mundi-Prensa. España; 2000. pp: 219-234.
3. Levas, F.; Coudert, P.; Rochambeau, H.; Thèbault, R.G.: El Conejo, Cría y Patología. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma; 1997. pp: 112-121.
4. Cordero, C.M.; Rojo, V.F.: Parasitología Veterinaria. Mc Graw-Hill-Interamericana. España; 1999. pp: 729-734.
5. Soulsby, E.J.L.; Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos. Nueva Editorial Interamericana. México; 2006. pp: 667-672.
6. Martínez, C.M.A.: Cunicultura. FMVZ. UNAM. México, D.F.; 2004. pp: 184-188.
7. López, F.R.: 1998. Ficha de Patología N.2 Coccidiosis". Boletín de cunicultura 73: pp 37-40
8. Price J,C, Reed J.E.: Parasitología Práctica. México, 1983; p. 75.
9. Allen, P.C; Fetterer, R.H.: 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: pp 58-65.

10. Bhat, T.K.; Jithendran, K.P.; Kurade, N.P.: 1996 Rabbit Coccidiosis and its control. World rabbit sciences. 4: pp 37-41.
11. Roca, F. LL. 1980. Tratado de Cunicultura 3. Barcelona. Real Escuela Oficial y Superior de Barcelona. 2001. pp 305-314.
12. Davies, S.F.M.; Joyner, L.P.; Kendall, S.B.: Coccidiosis. Oliver and Boyd. Inglaterra; 1963. pp 5-12.
13. Quiroz, R.H.: Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos. Limusa México; 2005. Pp
14. Murphy, C.M: 1999. Plant products as antimicrobial agents. Clinic Microbiology. 12: pp 564-582.
15. Sumano, L.H; Ocampo, C.L.: Farmacología veterinaria. Mc Graw Hill. México; 2006. pp: 148, 294-296.
16. Pascual, B. G. 2013. Respuesta inmune protectora contra la coccidiosis. Vet. Arg.- Vol XXX- N° 299- Marzo
17. Benavente, G.O.; Castillo, J. 2008. Update on uses and properties of *Citrus* flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. Food Chem. 56: pp 6185-6205
18. García-Lafuente, A.; Guillamón, E.; Villares, A.; Rostagno, MA.; Martínez, J.A. 2009. Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. Clinic Microbiology 58: pp 37- 52
19. 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. 22:731-741, 2008.

20. Mead J.R.; McNair, N.; 2006: Antiparasitic activity of flavonoids and isoflavones against *Cryptosporidium parvum* and *Encephalitozoon intestinalis*. FEMS Microbiol. Lett. 259: pp 153-157.
21. Gangjun, D.m; Lingtao, J.; Xiaofen, H.; Zihui, S.;Hongyan, Z.; Liang, W. 2009: Naringenin: A potential immunomodulator for inhibiting lung fibrosis and metastasis. Cancer Res. 69, 3205-3212.
22. Vafeiadou, K; Vauzour, D.; Yi Lee, H.; Rodríguez, A.; Williams, R.J.; Spencer. 2009: The citrus flavanone naringenin inhibits inflammatory signaling in glial cells and protects against neuroinflammatory injury. Arch. Biochem. Biophys. 484: pp 100-109
23. Min-Hsiung, P.; Ching-Shu, L.; Slavik, D.; Chi-Tang, H. 2009: Modulation of inflammatory genes by natural dietary bioactive compounds. Clinic Microbiology 57, 4467-4477.
24. Fouad, A.A., Albuali, W.H., Zahran, A., Gomaa, W., 2014. Protective effect of naringenin against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. Environ Toxicol Pharmacol 38: pp 420-429.
25. Besné MA, Figueroa CJA, Quiroz RH, Ramírez GA, Ramos ME. Manual de Prácticas del laboratorio de Parasitología. México, 2006.
26. Pakandl,M. 2009. Coccidia of rabbit: a review. Institute of Parasitology, Biology Center ACSR. Czech Republic 1098: pp 56-79
27. Holdsworth PA, Conway DP, McKenzie ME, Dayton AD, Chapman HD, Mathis GF, Skinner JT, Mundt HC, Williams RB. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) guidelines for evaluating the efficacy of anticoccidial drugs in chickens and turkeys. Vet Parasitol 2004;121:189-212.

28. Mora, VD; Vargas, CR. 2008. Evaluación de la producción alternativa de conejos *Oryctolagus cuniculus* Proyecto 091. Vicerrectoría de Investigación. Sistema de proyectos específicos. Universidad de Costa Rica. San José. Costa Rica. p. 1-2.
29. Miller, C.M., Waghorn, T.S., Leathwick, D.M., Candy, P.M., Oliver, A.M., Watson, T.G., 2012. The production cost of anthelmintic resistance in lambs. *Vet. Parasitology* 186: pp 376-381.
30. Im, S.J., Kim, J.H., Kim, M.Y., 2014. Evaluation of bioactive components and antioxidant and anticancer properties of citrus wastes generated during bioethanol production. *Nat Prod Commun* 9: pp 483-486.
31. Sachdeva, S., Flora, S.J., 2014. Efficacy of some antioxidants supplementation in reducing oxidative stress post sodium tungstate exposure in male wistar rats. *J Trace Elem Med Biol* 28, 233-239.
32. Jeon, J.H., Lee, H.S., 2014. Biofunctional Constituent Isolated from *Citrullus colocynthis* Fruits and Structure-Activity Relationships of Its Analogues Show Acaricidal and Insecticidal Efficacy. *J Agric Food Chem* 62, 8663-8667.
33. Jeon, S.M., Kim, H.K., Kim, H.J., Do, G.M., Jeong, T.S., Park, Y.B., Choi, M.S., 2007. Hypocholesterolemic and antioxidative effects of naringenin and its two metabolites in high-cholesterol fed rats. *Transl Res* 149, 15-21.