



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la
Producción y de la Salud Animal

EVALUACIÓN ETNOFARMACOLÓGICA DE LA CURCUMINA
(*Curcuma longa*) EN OVINOS ESTABULADOS INFECTADOS
CON *Eimeria* spp.

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS
DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

PRESENTA:

MARÍA EUGENIA CERVANTES VALENCIA

T.P.- YAZMÍN ALCALÁ CANTO
(Programa en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal)

C.T.- HÉCTOR SALVADOR SUMANO LÓPEZ
(Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia- UNAM)

C. T.- ABDELFAH ZEIDAN MOHAMED SALEM
(Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia- UAEM)

La realización de este trabajo fue posible gracias a la beca 378283 otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) .

RESUMEN

La coccidiosis ovina es una enfermedad parasitaria causada por protozoarios del género *Eimeria*, la cual puede influir negativamente en la salud y en el rendimiento productivo de los borregos con una mortalidad de hasta el 20%. Esta enfermedad se caracteriza por una alta producción de citocinas proinflamatorias y estrés oxidativo, los cuales pueden dañar el tejido intestinal. En la actualidad, para el tratamiento de la coccidiosis se usan medicamentos. Sin embargo, la resistencia a los compuestos anticoccidiales y la preocupación por los residuos de medicamentos en la leche y en la carne ha llevado a la evaluación de alternativas para prevenir y controlar esta enfermedad. Con base en resultados preliminares, se evaluó en este estudio el uso de *Curcuma longa* en la suplementación de dieta. Veinte corderos criollos infectados naturalmente con *Eimeria* spp., de 28 días de edad, con un peso promedio de 12 kg se divididos en cinco grupos. Tres grupos se trataron por vía oral durante 14 días con 50 mg/kg PV, 100 mg/kg PV o 200 mg/kg PV de *C. longa*. Un grupo tratado con placebo y un grupo control no tratado. Las muestras de heces se obtuvieron cada tercer día para determinar la eficacia anticoccidial. Además, los animales se pesaron el día cero y 42. Para evaluar la actividad inmunomodulatoria de la curcumina se midieron citocinas por ELISA, una proinflamatoria (INF- γ) y una inmunorreguladora (IL-10). La peroxidación de lípidos y la generación de nitritos se determinó por medio del ensayo de malondialdehído en suero y la reacción de Griess, respectivamente. La actividad anticoccidial de la *C. longa* aumentó con el tiempo en los tres grupos tratados y alcanzó una eficacia del 100% en el día 42. Los animales tratados con 200 mg/kg de *C. longa* ganaron el doble del peso diario en comparación con los grupos no tratados. Los niveles de IL-10 fueron más altos en los animales tratados, mientras que la peroxidación lipídica y la generación de nitritos fueron significativamente más bajos. Los resultados mostraron que la administración de la curcumina puede reducir la producción de ooquiste, la pérdida de peso, la inflamación y los efectos relacionados con el estrés oxidativo causado por infecciones por *Eimeria* spp. en corderos.

Palabras clave: *Curcuma longa*, *Eimeria*, Citocinas, Estrés oxidativo, Coccidiosis ovina.

ABSTRACT

Ovine coccidiosis caused by *Eimeria* spp. can negatively impact health and overall productive performance in sheep with mortalities up to 20% in lambs. It is characterized by high production of pro-inflammatory cytokines and oxidative stress that can damage intestinal tissue. Currently, only drugs are used for the treatment of ovine coccidiosis. Nevertheless, anticoccidial resistance and the concern of drug residues in edible tissues and milk have prompted the evaluation of alternatives to prevent and control this disease. Based on preliminary findings, the use of *Curcuma longa* dietary supplementation was evaluated in this trial. Twenty crossbred lambs naturally infected with *Eimeria* spp., aged 28-days-old with an average weight of 12 kg, were divided in five groups. Three groups were treated orally for 14 days with 50 mg/kg, 100 mg/kg, or 200 mg/kg of *C. longa*. A placebo-treated group and untreated controls were included in this trial, too. Stool samples were obtained every other day to determine anticoccidial efficacy. Also, animals were weighed on day 0 and 42. To evaluate the immunomodulatory activity of curcumin, a proinflammatory (IFN- γ) and an immunoregulatory (IL-10) cytokine were measured by ELISA. Lipid peroxidation and nitrite generation were determined by means of the serum malondialdehyde test and the Griess reaction, respectively. *C. longa* anticoccidial activity increased over time in treated groups and reached a 100% efficacy on day 42. Animals treated with 200 mg/kg of this plant gained twice the daily weight recorded for untreated groups. IL-10 levels were higher in supplemented animals, whereas lipid peroxidation and generation of nitrites were significantly lower. Results showed that curcumin administration may reduce oocyst output, weight-loss, inflammation and oxidative stress-related effects caused by *Eimeria* spp. infection in lambs.

Key words: *Curcuma longa*, *Eimeria*, Cytokines, Oxidative stress, Sheep coccidiosis

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1. PROTOZOARIOS.....	4
2.2. PHYLUM APICOMPLEXA.....	4
2.3. FAMILIA EIMERIIDAE	5
2.4. GÉNERO <i>EIMERIA</i>	5
2.5. CICLO BIOLÓGICO DE <i>EIMERIA</i> SPP.....	8
2.5.1. <i>Esporogonia</i>	8
2.5.2. <i>Esquizogonia</i>	9
2.5.3. <i>Gametogonia</i>	9
2.6. COCCIDIOSIS EN BORREGOS	11
2.6.1. <i>Respuesta inmune</i>	14
2.6.2. <i>Tratamiento</i>	14
2.7. <i>CURCUMA LONGA</i> LINN.....	16
2.7.1. <i>Química</i>	16
2.7.2. <i>Biodisponibilidad</i>	19
2.7.3. <i>Farmacodinamia</i>	20
2.7.4. <i>Propiedades antioxidantes y antiinflamatorias</i>	21
2.7.5. <i>Propiedades inmunomodulatorias</i>	22
2.7.6. <i>Toxicidad</i>	23
3. HIPÓTESIS	24
4. OBJETIVO GENERAL.....	25
4.1. OBJETIVOS PARTICULARES.....	25
5. JUSTIFICACIÓN	26
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	27
6.1. ELABORACIÓN DE GALLETAS Y DETERMINACIÓN DE CURCUMINOIDES	27
6.1.1. <i>Elaboración de galletas de cúrcuma</i>	27
6.1.2. <i>Cuantificación de curcuminoides totales en diversas muestras de polvo de Curcuma longa por el método espectrofotométrico UV</i>	28
6.1.3. <i>Cuantificación de curcuminoides en las galletas (dosis de 50, 100 y 200 mg por unidad) por el método espectrofotométrico UV</i>	28
6.1.4. <i>Estabilidad de los curcuminoides en la galleta por Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (HPLC)</i>	28
6.1.5. <i>Identificación de curcuminoides, curcumina y demetoxicurcumina en los diferentes polvos de C. longa por HPLC</i>	29
6.1.6. <i>Identificación de curcuminoides, curcumina y demetoxicurcumina en las galletas (dosis de 50, 100 y 200 mg por unidad) por HPLC</i>	29
6.2. ESTUDIO <i>IN VIVO</i>	30
6.2.1. <i>Modelo animal</i>	30
6.2.2. <i>Diseño experimental</i>	31
6.2.3. <i>Obtención de muestras de heces</i>	32
6.2.4. <i>Procesamiento para la identificación de especies de Eimeria</i>	32
6.2.5. <i>Toma de muestras de sangre para la determinación de IFN-g, IL-10, nitritos y peroxidación lipídica</i>	32
6.2.6. <i>Determinación de los niveles de IFN-g</i>	33
6.2.7. <i>Determinación de los niveles de IL-10</i>	33
6.2.8. <i>Determinación de peroxidación lipídica</i>	33
6.2.9. <i>Determinación de nitritos en el suero</i>	34
6.2.10. <i>Análisis de datos</i>	34

6.3.	ESTUDIOS IN VITRO	35
6.3.1.	<i>Parásitos</i>	35
6.3.2.	<i>Cultivo celular</i>	35
6.3.3.	<i>Curcuma longa (producto comercial) y curcumina (Sigma-Aldrich®)</i>	35
6.3.4.	<i>Ensayos de viabilidad de los esporozoitos de E. bovis</i>	37
6.3.4.1.	<i>Ensayo de viabilidad de los esporozoitos de E. bovis y Curcuma longa</i>	37
6.3.4.2.	<i>Ensayo de viabilidad de los esporozoitos de E. bovis y curcumina (Sigma-Aldrich®)</i>	38
6.3.5.	<i>Tasa de infección de esporozoitos de E. bovis y curcumina (Sigma-Aldrich®)</i>	38
6.3.6.	<i>Desarrollo de esporozoitos de E. bovis tratados con curcumina (Sigma-Aldrich®)</i> 39	
6.3.7.	<i>Análisis de datos</i>	39
7.	RESULTADOS	40
7.1.	DETERMINACIÓN DE CURCUMINOIDES.....	40
7.1.1.	<i>Cuantificación de curcuminoides totales en diversas muestras de polvo de Curcuma longa por el método de espectrofotometría UV.</i>	40
7.1.2.	<i>Cuantificación de curcuminoides totales en las galletas de Curcuma longa por el método de espectrofotometría UV.</i>	41
7.1.3.	<i>Estabilidad de los curcuminoides en las galletas de polvo de C. longa (50, 100 y 200 mg) por medio de HPLC</i>	41
7.1.4.	<i>Identificación de curcuminoides, curcumina y demetoxicurcumina en las muestras de polvo de C. longa por HPLC.</i>	43
7.1.5.	<i>Identificación de curcuminoides, curcumina y demetoxicurcumina en las galletas elaboradas con polvo de C. longa (dosis de 50, 100 y 200 mg por unidad) y en la galleta placebo por HPLC.</i>	45
7.2.	ESTUDIO <i>IN VIVO</i>	46
7.3.	ESTUDIOS <i>IN VITRO</i>	57
7.3.1.	<i>Efecto del polvo de Curcuma longa (producto comercial) y la curcumina (Sigma-Aldrich®) sobre los esporozoitos de E. bovis.</i>	57
7.3.2.	<i>Efecto de la Curcuma longa sobre la viabilidad de los esporozoitos de E. bovis.</i>	57
7.3.3.	<i>Ensayo de viabilidad de los esporozoitos de E. bovis y curcumina (Sigma-Aldrich®)</i> 60	
7.3.4.	<i>Tasa de infección de esporozoitos de E. bovis tratados con curcumina (Sigma-Aldrich®)</i>	62
7.3.1.	<i>Desarrollo de esporozoitos de E. bovis tratados con curcumina (Sigma-Aldrich®)</i> 64	
8.	DISCUSIÓN GENERAL	69
9.	CONCLUSIONES GENERALES	73
10.	REFERENCIAS	74
ANEXOS		87
ANEXO 1.	SOLICITUD DE APOYO PARA TRAMITAR PATENTE DE LA GALLETA UTILIZADA EN EL EXPERIMENTO <i>IN VIVO</i>	88
ANEXO 2.	PROBIT VIABILIDAD DE LOS ESPOROZOITOS DE <i>E. BOVIS</i> INCUBADOS CON POLVO DE <i>C. LONGA</i> DURANTE 24 H.	89
ANEXO 3.	PROBIT VIABILIDAD DE LOS ESPOROZOITOS DE <i>E. BOVIS</i> INCUBADOS CON POLVO DE <i>C. LONGA</i> DURANTE 4 H.	93
ANEXO 4.	PROBIT VIABILIDAD DE LOS ESPOROZOITOS DE <i>E. BOVIS</i> INCUBADOS CON CURCUMINA (SIGMA-ALDRICH®) DURANTE 60 MIN.	96
ANEXO 5.	PROBIT VIABILIDAD DE LOS ESPOROZOITOS DE <i>E. BOVIS</i> INCUBADOS CON CURCUMINA (SIGMA-ALDRICH®) DURANTE 4 H.	100

ANEXO 6. TASA DE INFECCIÓN DE LOS ESPOROZOITOS DE *E. BOVIS* INCUBADOS CON CURCUMINA (SIGMA-ALDRICH®) 24 HPI.....104

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Localización de las especies de <i>Eimeria</i> en ovinos (Hendrix & Robinson 2012; Chatier & Paraud 2012)	13
Cuadro 2. Excreción de ooquistes por gramo de heces (OPG), porcentaje de especies de <i>Eimeria</i> patógenas (<i>E. ovinoidalis</i> y <i>E. crandalis</i>), tratamiento al que pertenecen y peso en los 20 corderos utilizados en el experimento.	31
Cuadro 3. Cuantificación del total de curcuminoides por el método de espectrofotometría UV en las diversas muestras de polvo de <i>C. longa</i> (modificado de Velázquez García 2016)	40
Cuadro 4. Cuantificación de curcuminoides totales en las galletas elaboradas con polvo de <i>C. longa</i> (dosis 50, 100 y 200 mg por unidad) y en la galleta placebo por el método espectrofotométrico UV (modificado de Velázquez García 2016).....	41
Cuadro 5. Cuantificación de los curcuminoides totales durante los días 1, 20, 40 y 90 de estudio de las tres diferentes dosis de polvo de <i>C. longa</i> (50, 100 y 200 mg por unidad) utilizadas en las galletas (modificado de Velázquez García 2016).....	42
Cuadro 6. Cuantificación de curcuminoides totales en los diferentes polvos de <i>C. longa</i> por medio de HPLC (modificado de Velázquez García 2016)	44
Cuadro 7. Cuantificación de curcumina y demetoxicurcumina en los diferentes polvos de <i>C. longa</i> por medio de HPLC (modificado de Velázquez García 2016).....	44
Cuadro 8. Cuantificación de curcuminoides totales en las galletas elaboradas con polvo de <i>C. longa</i> (dosis 50, 100 y 200 mg por unidad) y en la galleta placebo por medio de HPLC (modificado de Velázquez García 2016).....	45
Cuadro 9. Cuantificación de curcumina y demetoxicurcumina en las galletas elaboradas con polvo de <i>C. longa</i> (dosis 50, 100 y 200 mg por unidad) y en la galleta placebo por medio de HPLC (modificado de Velázquez García)	45
Cuadro 10. Porcentaje de mortalidad de los esporozoitos de <i>E. bovis</i> incubados durante 24 h con diferentes dosis de <i>C. longa</i>	58
Cuadro 11. Porcentaje de mortalidad de los esporozoitos de <i>E. bovis</i> incubados durante 4 h con dos diferentes dosis de <i>C. longa</i>	59
Cuadro 12. Porcentaje de mortalidad de los esporozoitos de <i>E. bovis</i> incubados durante 60 min con diferentes dosis de curcumina (Sigma-Aldrich ®) y grupo control.	60
Cuadro 13. Porcentaje de mortalidad de los esporozoitos de <i>E. bovis</i> incubados durante 4 h con diferentes dosis de curcumina (Sigma-Aldrich ®), DMSO y grupo control.	61
Cuadro 14. Medias marginales (24 hpi) de las células infectadas con esporozoitos de <i>E. bovis</i> incubados con cuatro diferentes dosis de curcumina (1 mM, 2 mM, 4 mM y 8 mM) y los grupos controles.....	63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación taxonómica del Phylum Apicomplexa de importancia veterinaria. Modificado de Beck et al., 2009 y Roberts & Janovy, 2009	5
Figura 2. Morfología del esporozoito del <i>Eimeria</i> spp. (Roberts & Janovy 2009).....	6
Figura 3. Esquema del complejo apical en el proceso de endocitosis en donde las roptrias y los micronemas son las estructuras liberadas durante la penetración del trofozoito a la célula huésped (Roberts & Janovy 2009).	6
Figura 4. Morfología del ooquiste no esporulado de <i>Eimeria</i> spp. Foto tomada por María Eugenia Cervantes Valencia.	7
Figura 5. Morfología del ooquiste esporulado de <i>Eimeria</i> spp. sin tapón de micrópilo. Foto tomada por María Eugenia Cervantes Valencia.	7
Figura 6. Morfología del ooquiste esporulado de <i>Eimeria</i> spp. con tapón de micrópilo. Foto tomada por María Eugenia Cervantes Valencia.	8
Figura 7. Ciclo biológico de <i>Eimeria</i> spp. (imagen tomada de internet y modificada). ..	11
Figura 8. <i>Curcuma longa</i> Linn. (Siviero et al. 2015).....	17
Figura 9. Sesquiterpenos de la <i>Curcuma longa</i> (Esatbeyoglu et al. 2012)	18
Figura 10. Estructura química de los principales curcuminoides (Basnet & Skalko-Basnet 2011).....	18
Figura 11. Estructura química de algunos metabolitos importantes de la curcumina (Basnet & Skalko-Basnet 2011).....	20
Figura 12. Esquema de esporozoito teñidos con Trypan blue	37
Figura 13. Respuestas transformadas por PROBIT. Esporozoitos de <i>E. bovis</i> incubados durante 24 h con polvo de <i>C. longa</i>	58
Figura 14. Respuestas transformadas por PROBIT. Esporozoitos de <i>E. bovis</i> incubados durante 4 h con polvo de <i>C. longa</i>	59
Figura 15. Respuestas transformadas por PROBIT. Esporozoitos de <i>E. bovis</i> incubados durante 4 hrs con curcumina (Sigma-Aldrich ®).....	62
Figura 16. Tasa de infección (24 hpi) de los esporozoitos de <i>E. bovis</i> en cultivo celular BUVEC (dos diferentes aislados celulares), los esporozoitos de <i>E. bovis</i> se encuentran situados cerca del núcleo de la célula huésped (flecha azul). (A) Grupo control, (B) DMSO, (C) 1 mM curcumina, (D) 2 mM curcumina, (E) 4 mM curcumina y (F) 8 mM curcumina. La escala que se encuentra en la esquina inferior derecha de cada foto corresponde a 20 mm (400x).....	65
Figura 17. Células BUVEC infectadas con <i>E. bovis</i> 12 dpi. (A) Grupo control, (B) DMSO, (C) 1 mM curcumina, (D) 2 mM curcumina, (E) 4 mM curcumina y (F) 8 mM curcumina. La escala que se encuentra en la esquina inferior derecha de cada foto corresponde a 20 mm (400x).	66
Figura 18. Células BUVEC infectadas con <i>E. bovis</i> 14 dpi., se observa alargamiento de la célula huésped y el núcleo tiene apariencia de “huevo frito” (flecha azul) (A) Grupo control, (B) DMSO, (C) 1 mM curcumina, (D) 2 mM curcumina, (E) 4 mM curcumina y (F) 8 mM curcumina. La escala que se encuentra en la esquina inferior derecha de cada foto corresponde a 20 mm (400x).....	67
Figura 19. Células BUVEC infectadas con <i>E. bovis</i> 19 dpi. Macromerontes I y liberación de merozoitos I. (A) Grupo control, (B) DMSO, (C) 1 mM curcumina, (D) 2 mM curcumina, (E) 4 mM curcumina y (F) 8 mM curcumina. La escala que se encuentra en la esquina inferior derecha de cada foto corresponde a 20 mm (400x).	68

LISTA DE GRÁFICAS

- Gráfica 1. Estabilidad de los curcuminoides totales (mg) en las galletas de 50,100 y 200 mg de polvo de *C. longa* durante los días 1, 20, 40 y 90 de almacenamientos en refrigeración y protegidos de la luz (modificado de Velázquez García 2016)43
- Gráfica 2. Porcentaje de la mortalidad de los esporozoitos de *E. bovis* tratados con tres diferentes dosis de curcumina (0.5 mM, 1 mM y 2 mM) y el grupo control incubados durante 60 minutos. Se presentan las medias y su DE (desviación estándar).61
- Gráfica 3. Porcentaje de la tasa de infección de los esporozoitos de *E. bovis* tratados con curcumina y los grupos controles, a las 24 hpi63

ABREVIATURAS

BDMC	Bidemetoxicurcumina
BSA	Albúmina de suero bovino
BUVEC	Célula endoteliales de la vena umbilical bovina
COX-2	Ciclooxigenasa-2
DL	Dosis letal
DMC	Didemetoxicurcumina
DMSO	Demetoxidsulfóxido
ECGM	Medio de crecimiento celular endotelial
ELISA	Ensayo por inmunoadsorción
FAO	Organización de las Naciones unidas para la Alimentación y la Agricultura
FMVZ	Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
g	Gramos
h	Horas
hpi	Horas post infección
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia
HRP	Peroxidasa de rábano
IgG	Inmunoglobulina G
IL-10	Interleucina 10
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
INF-g	Interferón gama
iNOS	Sintasa de óxido nítrico inducible
kg	Kilogramo
LOX-5	Lipooxigenasas-5
MCP	Proteína quimiotáctica de monocitos
MDA	Malondialdehído
mg	Miligramo
mL	Mililitros

mM	Milimolar
NF-κB	Factor nuclear-κB
NF-κB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NK	Célula Asesina natural (natural killer)
nm	Nanómetros- longitud de onda mínima
OPG	Ooquistes por gramo
PBS	Tapón fosfato salino
PMN	Polimorfonucleares
ROS	Especies reactivas al oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
SHP	Proteína tirosina fosfatasa
Src-2	Receptor de esteroides coactivador-2
TBA	Ácido tiobarbitúrico
THC	Tetrahidrocurcumina
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbencidina
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
mM	Micromolar
WHO	Organización Mundial de la Salud

1. INTRODUCCIÓN

La coccidiosis ovina es una enfermedad parasitaria causada por protozoarios del género *Eimeria*, que afecta principalmente el intestino delgado y grueso. Los animales se infectan por vía oral y pueden ser afectados por diferentes especies al mismo tiempo. Hasta el momento se conocen 11 especies de *Eimeria*, siendo *Eimeria crandalis* y *Eimeria ovinoidalis* las más patógenas (Andrews, 2013; Chartier and Paraud, 2012). Esta enfermedad tiene un impacto económico y de salud, sobre todo en animales adultos, ya que desarrollan una enfermedad subclínica. En un estudio realizado en la Universidad Autónoma de Yucatán sobre la frecuencia de parásitos gastrointestinales en animales domésticos, demostraron que el 91.17% de las muestras de los ovinos resultaron positivas a coccidias (Rodríguez-Vivas et al., 2001). La mortalidad en los corderos puede llegar hasta en un 20%, principalmente porque aún no han adquirido una inmunidad específica (Catchpole et al., 1993; Kommuru et al., 2014; Veira, 2002). Hasta el momento, no hay vacunas capaces de prevenir la coccidiosis en borregos. Sin embargo, en recientes años, en varios estudios ha demostrado que los bovinos desarrolla una respuesta inmune contra *Eimeria*. Ya que el parásito es capaz de inducir una respuesta inmune asociada a la inducción de respuesta inmune innata y adaptativa. Los macrófagos y los neutrófilos polimorfonucleares (PMN) son los principales contribuyentes de la generación de citocinas que se observa en la coccidiosis en bovinos (Hermosilla et al., 2006). En estudios previos se ha demostrado que estas células son la principal fuente de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Taubert et al., 2009), incluyendo peroxinitrito, ácido hipocloroso y radicales hidroxilo (Sild et al., 2011). A su vez, hay evidencia que sugiere que las ROS contribuyen a varias vías de señalización y puede producir respuestas desreguladas por la vía proinflamatoria causando eventualmente daños en los tejidos (Aline and Bout, 2002; Chow et al., 2011; Simons et al., 2012). También se conoce que los neutrófilos y los leucocitos desencadenan un aumento en la producción de ROS en la mucosa intestinal, causando modificación de proteínas y la inducción de citocinas proinflamatorias (Catanzaro et al., 2015). En cuanto a la coccidiosis se ha demostrado que los PMN aumentan la expresión de la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS) tras exponerlos con los esporozoitos de

Eimeria bovis (Behrendt et al., 2008). Se ha demostrado que la exposición a infecciones con *E. bovis*, generan una infiltración de células TCD4⁺ y TCD8⁺ en tejido intestinal (Sühwold et al., 2010). Las citocinas como la interleucina-2 (IL-2) e Interferón- γ (IFN- γ) se incrementan durante el periodo de prepatencia en las infecciones primarias causadas por *E. bovis*; mientras que la interleucina-4 (IL-4) es dominante en el periodo de patencia (Taubert et al., 2008). Por otro lado, la interleucina-10 (IL-10) muestra una función inmunorreguladora y previene el daño tisular inducida por la infección con agentes patógenos que son controlados por linfocitos TCD4⁺ bajo situaciones de altos inóculos en ciertas deficiencias inmunorreguladoras (Barbosa et al., 2015; Jankovic et al., 2010; Magombedze et al., 2015). Varios fármacos están autorizados para el control de la coccidiosis ovina, tales como decoquinato, diclazuril y toltrazuril, sin embargo, existe una creciente preocupación en su uso debido a problemas de residuos y a que los periodos de retiro se deben de cumplir antes de sacar al mercado la leche y la carne (Andrews, 2013). Esto ha impulsado el estudio de métodos alternativos para controlar a este parásito sin perder de vista la potencial toxicidad de los residuos de los fármacos en los tejidos de los animales y el impacto ambiental. Algunos de los productos naturales que han presentado resultados prometedores que tienen efecto contra coccidias son por ejemplo, clinoptilolita (Alcala-Canto et al., 2011), plantas que contienen taninos condensados (Burke et al., 2013) y el rizoma seco de *Curcuma longa* (Cervantes-Valencia et al., 2015; Kommuru et al., 2014; Saratsis et al., 2012). En las últimas décadas se han realizado varios estudios que detallan los efectos antiparasitarios de la curcumina, sobre todo en *Plasmodium falciparum* (Reddy et al., 2005), *Cryptosporidium parvum* (Shahiduzzaman et al., 2009), *Giardia lamblia* (Said et al., 2012), *Trypanosoma* spp. (Nagajyothi et al., 2012) y *Eimeria tenella*. En este último parásito, la curcumina induce apoptosis por la presencia de precipitaciones en la superficie del esporozoito afectando su morfología, viabilidad y habilidad de adhesión (Chattopadhyay et al., 2004). La severidad de estas alteraciones depende tanto de la dosis como del tiempo de la administración de curcumina que es el principal curcuminoide del rizoma de *Curcuma longa* (Khalafalla et al., 2011). A pesar de lo anterior, la información sobre el tiempo de dosificación y la forma de administración de curcumina a partir de *Curcuma longa* en corderos no se conoce. Por otro lado, bajo ciertas circunstancias, una inflamación grave del tejido intestinal en corderos infectados

con *Eimeria* spp. puede ocurrir cuando hay una alta ingestión de ooquistes y por consiguiente una respuesta inmune disfuncional. Por tal motivo, se llevó a cabo una prueba de campo con corderos infectados naturalmente con *Eimeria* spp. Se utilizó una preparación de *C. longa* en polvo para evaluar la actividad anticoccidial e inmunomoduladora, midiendo la eliminación de ooquistes, peroxidación de lípidos, generación de nitritos, así como una citocina proinflamatoria (INF- γ) y una citocina inmunorreguladora que impide la excesiva inflamación (IL-10).

2. ANTECEDENTES

2.1. Protozoarios

Los protozoarios son organismos eucarióticos, ya que almacenan su información genética en los cromosomas, los cuales están contenidos en una envoltura nuclear. Esto los diferencia de las bacterias quienes tienen el cromosoma en el citoplasma (Taylor et al., 2007).

En general, los protozoarios poseen un núcleo, retículo endoplásmico, mitocondria, aparato de Golgi y lisosomas. Se alimentan principalmente por pinocitosis (captación de material del espacio extracelular por invaginación de la membrana) o fagocitosis (rodear con la membrana citoplasmática partículas sólidas e introducirlas al interior de la célula) y los productos metabólicos son excretados por difusión a través de la membrana celular.

2.2. Phylum apicomplexa

Es el más diverso y complicado phylum que parasita a los animales domésticos. A los protozoarios los podemos encontrar en el epitelio intestinal, células sanguíneas y dentro del sistema retículo-endotelial. Su ciclo de vida es complejo y está íntimamente integrado a la fisiología del huésped. La clasificación taxonómica del phylum Apicomplexa de importancia veterinaria se presenta en el Figura 1.

El ciclo de vida se divide en tres fases: Esporogonia, esquizogonia y gametogonia.

Los parásitos pertenecientes al phylum Apicomplexa poseen una locomoción interna, la cual es imposible ver a simple vista ya que sus organelos se encuentran en el llamado complejo apical, el cual es una característica que define al phylum y está formado por: anillos precoinoidales, anillo polar, microtúbulos, roptrias y conoide con los cuales se realiza la penetración a la célula (Figuras 2 y 3). El movimiento es a través de ondulaciones en sentido longitudinal y ocasionalmente por medio de flagelos (microgameto).

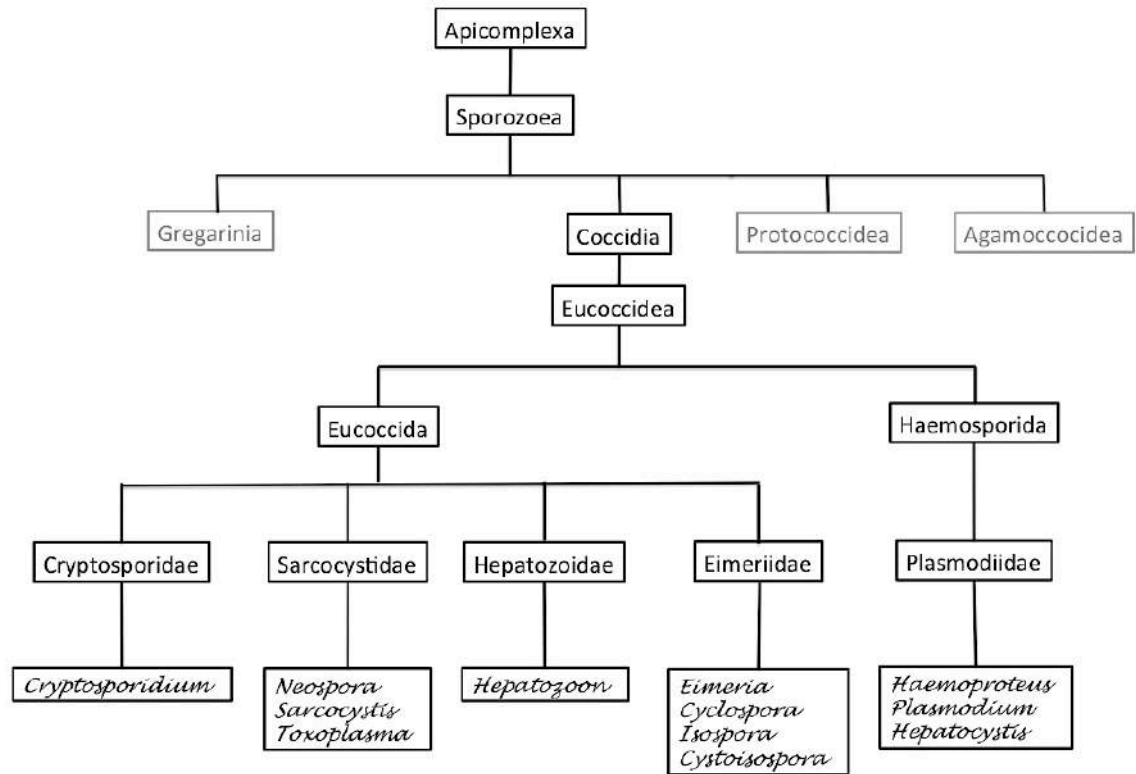


Figura 1. Clasificación taxonómica del Phylum Apicomplexa de importancia veterinaria. Modificado de Beck et al., 2009 y Roberts & Janovy, 2009

2.3. Familia Eimeriidae

La forman 16 géneros y cerca de 1,340 especies, los más importantes en Medicina Veterinaria son *Eimeria* e *Isospora* y las infecciones con estos géneros se refieren a menudo como coccidiosis (Taylor et al., 2007).

2.4. Género *Eimeria*

Este género está compuesto de aproximadamente 1,700 especies, afectando principalmente a mamíferos domésticos y aves. Todos los géneros de *Eimeria* son específicos de especie (Müller and Hemphill, 2013).

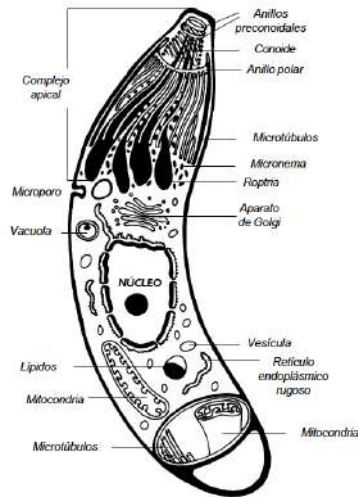


Figura 2. Morfología del esporozoito del *Eimeria* spp. (Roberts & Janovy 2009).

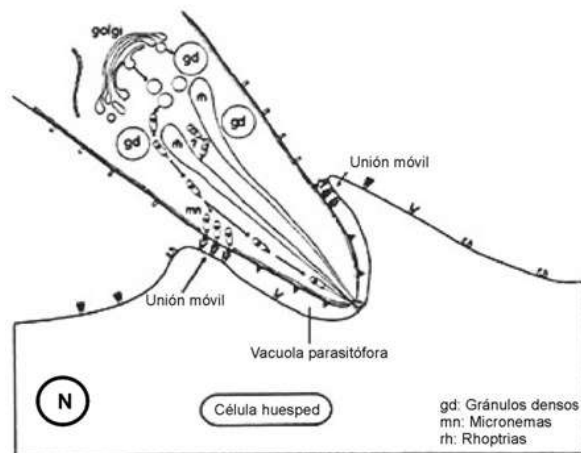


Figura 3. Esquema del complejo apical en el proceso de endocitosis en donde las rhoptrias y los micronemas son las estructuras liberadas durante la penetración del trofozoito a la célula huésped (Roberts & Janovy 2009).

La unidad funcional del coccidio es el zoito, el cual es una célula móvil que tiene forma de coma, banana o boomerang. El zoito es el comienzo y el final del ciclo vital de los coccidios. Los esporozoitos son las formas infectantes que se encuentran en los ooquistes esporulados y son el resultado de la segmentación del protoplasma (Bowman, 2014). El protoplasma (esporonte) está envuelto por una pared resistente y es eliminado en las heces. (Figura 4).

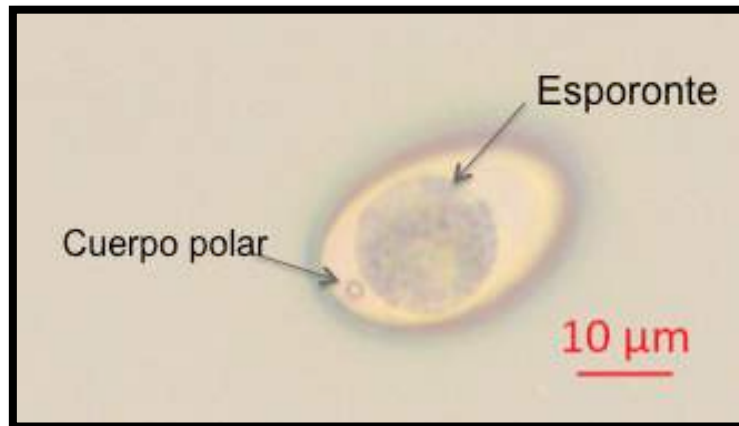


Figura 4. Morfología del ooquiste no esporulado de *Eimeria* spp. Foto tomada por María Eugenia Cervantes Valencia.

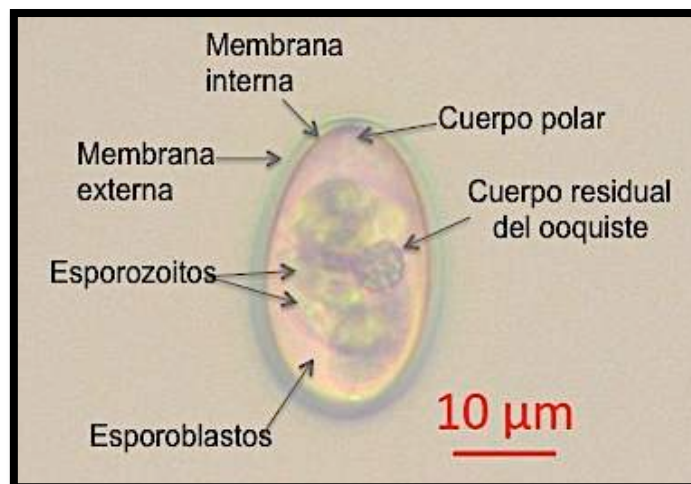


Figura 5. Morfología del ooquiste esporulado de *Eimeria* spp. sin tapón de micrópilo. Foto tomada por María Eugenia Cervantes Valencia.



Figura 6. Morfología del ooquiste esporulado de *Eimeria* spp. con tapón de micrópilo.
Foto tomada por María Eugenia Cervantes Valencia.

2.5. Ciclo biológico de *Eimeria* spp.

El ciclo biológico de *Eimeria* spp. inicia cuando los animales ingieren los ooquistes esporulados que se encuentran contaminando el alimento o el agua, una vez ingeridos, estos se reproducen rápidamente. Los ooquistes esporulados viajan por todo el tracto digestivo y en el intestino son liberados los esporozoitos (desenquistamiento), principalmente en el yeyuno e íleon, donde los esporozoitos migran hacia el lumen intestinal para hacer contacto. El ciclo biológico de *Eimeria* está dividido en dos etapas: 1.- fase endógena, la cual está dividida en sexual (gametogonia) y asexual (esquizogonia o merogonia) y se desarrolla en el intestino delgado y grueso; y 2.- fase exógena (esporogonia), la cual se lleva a cabo en el medio ambiente.

2.5.1. Esporogonia

La esporulación del ooquiste se lleva a cabo bajo condiciones de oxigenación, humedad (100%) y temperatura óptima de 27°C. Los ooquistes esporulados poseen cuatro esporoquistes (también llamados esporoblastos) con dos esporozoitos cada uno dentro, las cuales se presentan en las Figuras 5 y 6 (Bowman, 2014), y esta es la etapa infectante. Estos protozoarios son heterótrofos y requieren de energía en forma de moléculas complejas de carbono y nitrógeno en forma de mezcla de aminoácidos preformados (Hendrix and Robinson, 2012; Taylor et al., 2007).

2.5.2. Esquizogonia

Para que se lleve a cabo la fase del desenquistamiento es necesaria la presencia de dióxido de carbono (CO₂), el cual provoca un adelgazamiento de la membrana del ooquiste, por lo tanto, altera la permeabilidad permitiendo la acción de tripsina y sales biliares provocando la liberación de los esporozoitos en el tracto gastrointestinal (Belli et al., 2006; Nyberg et al., 1968), en donde el siguiente paso es penetrar a la célula. Para poder llevar a cabo, el esporozoito necesita reconocer el lugar, hacer contacto y finalmente penetrar la célula a través de deslizamientos circulatorios, los cuales son producidos por la proteínas de superficie que se encuentran en la porción apical del esporozoito. Una vez que el esporozoito se une a la célula, la invasión continúa con la invaginación y sellado de la membrana celular del huésped formando la membrana de la vacuola parasitófora. El tiempo que tarda el zoito en penetrar la célula va de 5 a 10 segundos (Dubremetz et al., 1998). La función principal de la vacuola es proteger al parásito contra la lisis de la célula huésped; posee poros por donde provee canales nutricionales que permiten transferencia pasiva de moléculas al parásito (Entzeroth et al., 1998; Oakes et al., 2013). Es aquí donde el esporozoito se transforma en trofozoíto (Augustine, 2001) por medio de divisiones nucleares múltiples, las cuales comienzan con una fisión binaria (división del ADN) seguida de la división del citoplasma, lo cual da lugar a dos células hijas (Roberts and Janovy, 2009) y se generan los esquizontes, los cuales son estructuras que constan de un gran número de organismos nucleados alargados conocidos como merozoitos. Esta etapa solo ocurre en el intestino delgado del animal. Cuando la división se completa y el esquizonte madura, los merozoitos salen e invaden células vecinas (de 1° y 2° generación).

2.5.3. Gametogonia

La segunda generación de esquizontes son liberados y penetran a las células epiteliales del intestino grueso para desarrollar la gametogonia. En esta etapa se producen los gamontes, los cuales pueden ser de dos tipos: a) Macrogametos (femeninos), que maduran para formar un único gameto el cual ocupará toda la célula huésped, destaca la presencia de los cuerpos formadores de la pared del ooquiste. b) Microgameto

(masculino), estos sufren múltiples divisiones mitóticas para dar lugar a múltiples microgametos, solo esta fase posee órgano de locomoción- flagelo. Hay una etapa entre la segunda generación de merontes y el gamonte, en la que el parásito está envuelto en el núcleo de las células epiteliales del intestino delgado y grueso del huésped y hay una sincronización de la división de la célula huésped y el parásito (Gregory and Catchpole, 1990; Gregory et al., 1987). Cuando los microgametos maduran, abandonan la célula huésped y se desplazan (con ayuda de su flagelo) hasta las células donde se encuentran los macrogametos y se lleva a cabo la fertilización dando lugar a la formación del cigoto (ooquiste), los cuales serán liberados con las heces (Chartier and Paraud, 2012; Malo, 2013; Taylor et al., 2007). La pared final del ooquiste es una bicapa electrodensa formada por una capa externa (predominantemente lipídica) y por una capa interna (glucoproteica). Esta bicapa le confiere una excelente resistencia al ooquiste inmaduro y así puede sobrevivir en el medio ambiente (Belli et al., 2006), pueden sobrevivir en el medio ambiente durante meses, incluso años, sin embargo la desecación extrema y la exposición directa del sol limita la sobrevivencia del ooquiste. Temperaturas por debajo de los -30°C o por encima de los 63°C son letales. El potencial proliferativo en el huésped es muy alto, ya que según un cálculo teórico, cada ooquiste ingerido podría dar origen a 30 millones de ooquistes excretados (Chartier and Paraud, 2012). La representación gráfica del ciclo biológico de *Eimeria* spp. se presentan en la Figura 7.

Ciclo biológico

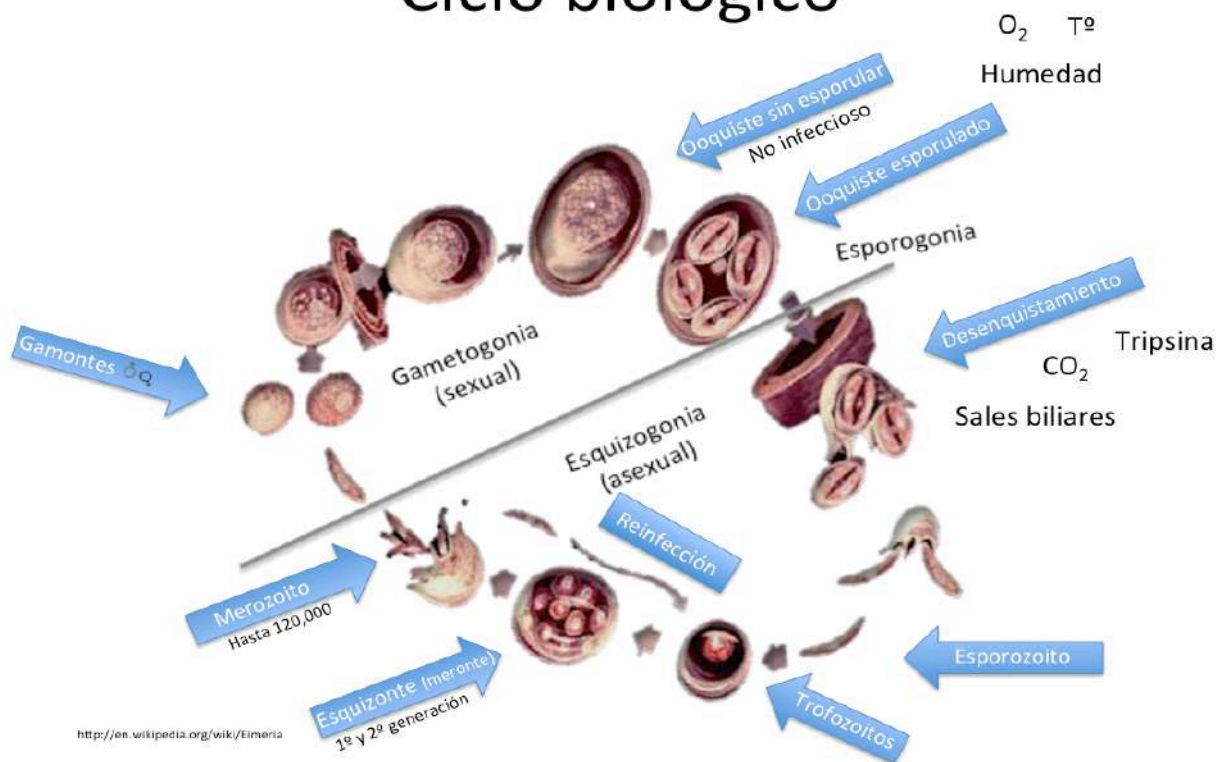


Figura 7. Ciclo biológico de *Eimeria* spp. (imagen tomada y modificada de internet)

2.6. Coccidiosis en borregos

La coccidiosis (*Eimeriosis sensu stricto*) en borregos es una enfermedad autolimitante (que comienza y termina en un tiempo programado) la cual afecta principalmente a corderos recién destetados de 3-8 semanas de edad. El estrés que sufren los animales al ser destetados, cambio de alimento, confinamiento, malas condiciones de higiene en el corral, así como estrés por altas/bajas temperaturas, llevan al animal a una depresión de su sistema inmune, induciéndolo a una coccidiosis. La infección ocurre por la ingesta de ooquistes esporulados (Müller and Hemphill, 2013), las manifestaciones clínicas más comunes en los animales son: inapetencia, debilidad, pérdida de peso, diarrea, depresión y anemia (Iqbal et al., 2012). Estas manifestaciones clínicas se deben a que destruyen las células epiteliales intestinales provocando una enfermedad entérica (Bowman, 2014; Harper and Penzhorn, 1999). En un examen patológico se observa inflamación crónica

y engrosamiento del intestino grueso, hemorragias en la superficie de la mucosa, puntos blancos en el intestino delgado (nido de esquizontes) y atrofia de las vellosidades (Andrews, 2013). Esta enfermedad tiene impacto sanitario y económico ya que se desarrolla una enfermedad clínica o subclínica, aunque esta última suele ser más esporádica pero también provoca pérdidas económicas. La mortalidad puede llegar hasta el 20% en corderos, ya que ellos no han adquirido una inmunidad específica (Gjerde and Helle, 1991; Kommuru et al., 2014; Veira, 2002).

Hay dos condiciones que conducen a una coccidiosis clínica: 1) una masiva ingestión de ooquistes esporulados, debido a una alta contaminación del medio ambiente y 2) una multiplicación asexual significativa en el hospedador relacionado con una baja resistencia del animal (Chartier and Paraud, 2012).

Se conocen 11 especies de *Eimeria* que afectan exclusivamente el intestino de los ovinos (Chartier and Paraud, 2012) (cuadro 1); sin embargo, *E. ovinoidalis* seguida por *E. crandalis* representan las especies más patógenas; ya que causan diarrea, reducción en la ganancia de peso y una condición de pobre salud en general. En contraste, hay especies como *E. pallida* cuya patogenicidad se considera leve o insignificante. Recientemente se ha reportado otro género de *Eimeria* que afecta el abomaso del animal *E. gilruthi* (Hermosilla et al., 2016; Maratea and Miller, 2007) provocando principalmente anorexia y pérdida de peso. El efecto patogénico de *Eimeria* se debe a la destrucción de las células epiteliales del intestino y un masivo cambio en la microflora digestiva ya que se aumenta el número de bacterias Gram negativas, principalmente *Escherichia coli* (Mohammed et al., 2000).

Cuadro 1. Localización de las especies de *Eimeria* en ovinos (Hendrix & Robinson 2012; Chatier & Paraud 2012)

	Especie	Sitio de predilección	Periodo prepatente (días)
Patógenas	<i>Eimeria ovinoidalis</i>	Intestino delgado e intestino grueso	12-15
	<i>Eimeria crandalis</i>	Intestino delgado e intestino grueso	15-20
Poco patógenas	<i>Eimeria bakuensis</i>	Intestino delgado	18-29
	<i>Eimeria faurei</i>	Intestino delgado e intestino grueso	13-15
	<i>Eimeria granulosa</i>	ND	ND
	<i>Eimeria intricata</i>	Intestino delgado e intestino grueso	23-27
	<i>Eimeria marsica</i>	ND	14-16
	<i>Eimeria pallida</i>	ND	ND
	<i>Eimeria parva</i>	Intestino delgado e intestino grueso	12-14
	<i>Eimeria weybridgensis</i>	Intestino delgado	23-33
	<i>Eimeria ahsata</i>	Intestino delgado	18-30
	<i>Eimeria gilruthi</i>	Abomaso	ND

*ND, no disponible

2.6.1. Respuesta inmune

La respuesta inmune en la eimeriosis se ha estudiado ampliamente en aves, roedores, y bovinos. Los estudios sugieren que las respuestas a las infecciones primarias están controladas predominantemente por linfocitos T CD4⁺ con reacciones asociadas a una respuesta Th1, las cuales se consideran clave para el control de la infección primaria. El IFN- γ inhibe la replicación intracelular de *Eimeria* spp. in vitro y desempeña un papel crucial en la abrogación de la infección primaria (Lillehoj, 1998; Yun et al., 2000). Se ha demostrado que la exposición a infecciones con *E. bovis*, generan una infiltración de células TCD4⁺ y TCD8⁺ en tejido intestinal (Sühwold et al., 2010). Las citocinas como la IL-2 e INF- γ incrementan durante el periodo de prepatencia en las infecciones primarias causadas por *E. bovis*; mientras que la IL-4 es dominante en el periodo de patencia (Taubert et al., 2008). Por otro lado, la IL-10 tiene una función inmunorreguladora y previene el daño tisular inducida por la infección con agentes patógenos que son controlados por linfocitos TCD4⁺ bajo situaciones de altos inóculos en ciertas deficiencias inmunorreguladoras (Barbosa et al., 2015; Jankovic et al., 2010; Magombedze et al., 2015).

La exposición natural al parásito asegura un contacto continuo el cual permitirá el desarrollo de la inmunidad, pero el grado de inmunidad dependerá de exposiciones previas al parásito.

2.6.2. Tratamiento

La quimioterapia es el principal método de control contra *Eimeria*, en la actualidad hay un amplio número de fármacos que se pueden utilizar, los cuales, pueden ser agregados en el alimento, en el agua de bebida o en las sales minerales, dependiendo de la presentación; su uso puede ser continuo o por un periodo determinado. Los fármacos que se usan con mayor frecuencia son: sulfonamidas, amprolium y ionóforos (monensina, lasolacid), los cuales actúan en el último estadio del ciclo de vida; las quinolonas (decoquinato) interrumpe el desarrollo de la coccidia desde el comienzo del ciclo de vida al actuar sobre las primeras etapas para retrasar el desarrollo antes de que pueda causar daño en las células intestinales (este periodo representa el 71% del ciclo de vida de la *Eimeria* en el huésped); y las triazinonas simétricas (toltrazuril y diclazuril), las actúan sobre todo el ciclo de vida de las coccidias (de Andrade et al.,

2012; Taylor et al., 2003). El decoquinato, diclazuril y toltrazuril son los fármacos autorizados para el control de la coccidiosis ovina; sin embargo, existe una creciente preocupación en su uso debido a problemas de residuos de las drogas y los periodos de tiempo de retiro que deben tomarse en cuenta antes de que la leche o la carne salgan al mercado (Andrews, 2013). El principal problema al cual se enfrentan los productores, es la resistencia que se tiene con ciertos fármacos, la cual se ha descrito principalmente en aves de producción (Sangster, 2001). Aún cuando la resistencia de los organismos a agentes tóxicos es un mecanismo de supervivencia fundamental para la adaptación y evolución en la vida (Orozco et al., 2009).

Otro método de control para la coccidiosis son las vacunas, las cuales han sido ampliamente usadas en las aves de producción desde hace 20 años. Se ha demostrado que son un método práctico, principalmente porque es viable vacunar pollos recién nacidos mediante aspersión dentro de cuartos cerrados, estas vacunas tienen un número conocido de ooquistes y de especies de *Eimeria*. La mayoría de las vacunas disponibles están compuestas por ooquistes vivos, atenuados o no atenuados. Las vacunas que contienen todas las especies de *Eimeria* se utilizan principalmente para inmunizar a las gallinas de postura, mientras que las que contienen algunas especies como *E. acervulina*, *E. maxima* y *E. tenella*, son usadas para aves productoras de carne (Chapman et al., 2013). Recientemente se ha investigado sobre el uso de vacunas vivas atenuadas con ooquistes esporulados de *E. ninakohlyakimovae* en cabras, en el cual, los animales presentaron suficiente inmunogenicidad en términos de protección inmunológica pero no se compara con la inmunogenicidad de una infección natural (Ruiz et al., 2014). Estos problemas han impulsado el estudio de métodos alternativos para el control de *Eimeria* spp. Algunos de los productos alternativos que han mostrado resultados prometedores contra coccidias del género de *Eimeria* son: clinoptilolita (Alcala-Canto et al., 2011), plantas que contienen taninos condensados (Burke et al., 2013); y el polvo de *Curcuma longa* (Kommuru et al., 2014; Saratsis et al., 2012).

2.7. *Curcuma longa* Linn

Curcuma longa Linn, quien pertenece a la familia Zingiberaceae, es una especie nativa del sureste de Asia cultivada principalmente en Bengala, China, Taiwán, Sri Lanka y Java. En los sistemas de medicina tradicional como Ayurveda, Yunani (Unani), Siddha y China, se considera un importante agente terapéutico dadas sus características organolépticas y sus indudables propiedades protectoras, sobre todo a nivel hepático y cutáneo. *C. longa* es comúnmente conocida como azafrán de la India, cúrcuma (español), turmeric (inglés) y kurkuma (alemán). Su rizoma es usado seco como una especia, conservador de alimento y colorante. El aceite esencial es utilizado en la industria de la perfumería (Mesa et al. 2000; Bhowmik et al. 2009; Trujillo et al. 2014; Charles 2013).

El componente más abundante en el rizoma de la planta *C. longa* es la curcumina, la cual está catalogada como un polifenol. Fue aislado por primera vez en 1815 y su forma cristalina fue obtenida hasta 1870 (Kunnumakkara et al., 2009). En 1910 se describió la fórmula molecular de curcumina como $C_{21}H_{20}O_6$, mientras que su estructura química [1,7-bis-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione] fue determinada en 1973 (Chattopadhyay et al., 2004; Jagetia and Aggarwal, 2007).

2.7.1. Química

El rizoma de *C. longa* contiene de 11-13% humedad, de 60-70% de carbohidratos (principalmente almidón), de 6-9% proteínas, de 3-7% aceites esenciales, de 2-7% fibra, de 3-7% minerales y de 2-10% pigmentos conocidos como curcuminoides los cuales le confieren una coloración amarillo-naranja y son unos de los ingredientes activos responsables de su actividad biológica (Figura 8). El porcentaje de estos valores dependen de las condiciones geográficas donde fue cultivada (Esatbeyoglu et al., 2012). En los aceites esenciales se encuentra una amplia variedad de compuestos sesquiterpenos característicos de la especie como son: ar-turmerona, los isómeros α -tumerona (atlantona) y β -tumerona (curlona), ar-curcumeno, zingibereno, α -felandrene y sabinena (Charles, 2013; Sharma et al., 2007) los cuales se muestran en la Figura 9. La ar-turmerona es la sustancia responsable de la actividad alelopática de la curcumina (Saiz De Cos and Pérez-Urria Carril, 2014). La curcumina contiene tres análogos

importantes : curcumina (Curcumina I \approx 70%), químicamente un diferuloilmetano [1,7-bis (4-hidroxi-3-methoxi-fenil)-hepta-1,6-diene-3,5-dione], mezclado con dos derivados, demetoxicurcumin (Curcumina II-DMC \approx 17%) [4-hidroxycinnamoyl-(4-hidroxi-3-methoxycinnamoil) metano], y bis-demetoxicurcumin (Curcumina III-BDMC \approx 3%) [bis-(4-hydroxy cinnamoyl) metano]. En 1993 Kiuchi et al. aislaron y caracterizaron la ciclocurcumina (Curcumina IV), el cual es un curcuminoide no muy conocido (Anand et al., 2008; Shahiduzzaman et al., 2009; Siviero et al., 2015; Trujillo et al., 2013). Los grupos funcionales asociados a la estructura química de la curcumina que incluyen bis- α,β -insaturados β -dicetona, dos grupos metoxi, dos grupos hidroxi fenólicos (hidrofóbico) y dos enlaces dobles conjugados son los que podrían desempeñar un papel esencial en actividades antiinflamatorias (Anand et al., 2008). La molécula de la curcumina puede adoptar muchas conformaciones diferentes para maximizar los contactos hidrofóbicos con la proteína a la que se quiere unir (Gupta et al., 2011). Los análogos naturales de la curcumina y sus metabolitos importantes se presentan en la Figura 10.



Figura 8. *Curcuma longa* Linn. (Siviero et al. 2015)

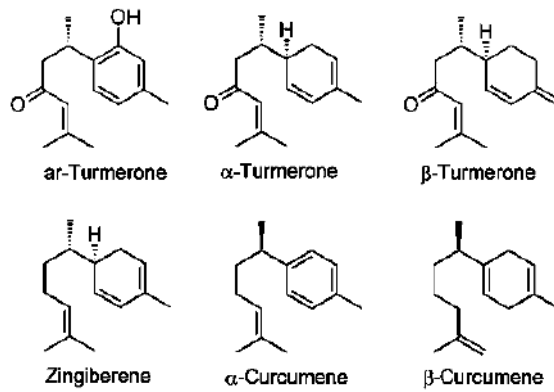


Figura 9. Sesquiterpenos de la *Curcuma longa* (Esatbeyoglu et al. 2012)

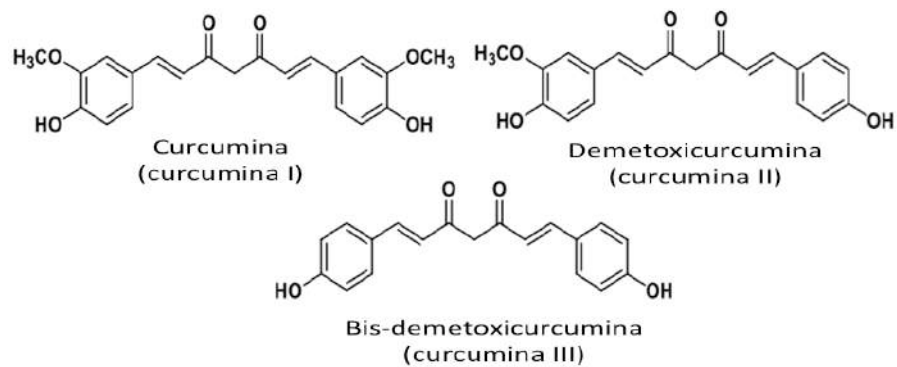


Figura 10. Estructura química de los principales curcuminoides (Basnet & Skalko-Basnet 2011)

La curcumina no es soluble en agua, solamente es soluble en etanol, dimetilsulfóxido (DMSO) y aceite. Tiene una absorción máxima de 420 nm. La curcumina tiene las propiedades de un indicador ácido-base. A pH <1, la curcumina está en el estado protonado (donador de átomos de H) y presenta un color rojo; mientras que a un pH 1-7 es de color amarillo y se encuentra en estado neutro. A un pH >7, la curcumina se encuentra en estado deprotonado (donador de electrones), y presenta nuevamente un color rojo (Aggarwal et al., 2007; Esatbeyoglu et al., 2012; Siviero et al., 2015).

2.7.2. Biodisponibilidad

La biodisponibilidad de la curcumina es baja ya que entre el 40-65% es absorbida en el tracto gastrointestinal y se metaboliza a través de la bilis-metabolismo enterohepático (Esatbeyoglu et al., 2012), mientras que aproximadamente el 35% es excretada sin cambios. La curcumina es eliminada dentro de las primeras 24 horas después de su administración (Holder et al., 1978). En un estudio realizado en ratones, después de administrarles intraperitonealmente 0.1 g/kg de curcumina observaron que 2.25 µg/g de curcumina aparece en plasma en los primeros 15 minutos (Cheng et al., 2001). Los niveles en suero alcanzan su máximo en 1 o 2 horas después de la ingesta oral y disminuyen gradualmente dentro de las siguientes 12 horas. Una hora después de la administración, los niveles de curcumina en el intestino, bazo, hígado y riñones fueron de 177, 26, 27 y 7.5 µg/g respectivamente (Lin, 2007).

En ensayos clínicos (Fase I) con 25 pacientes que tenían diferentes lesiones precancerosas demostraron que a dosis diarias orales de 4, 6 y 8 g de curcumina durante tres meses las concentraciones séricas fueron de 0.51 ± 0.11 , 0.63 ± 0.06 y 1.77 ± 1.87 µM, respectivamente. Estos datos indican que la curcumina tiene una pobre absorción y que su biodisponibilidad sistémica está limitada (Cheng et al., 2001). La concentración sérica de la curcumina solo puede ser detectable en humanos, después de una ingestión a concentraciones de 4 g en adelante (Sharma et al., 2004).

En las condiciones del estómago (pH 1-2) y del intestino delgado (pH 6.5), la curcumina es estable, ya que a un pH entre 1 y 6, su degradación es extremadamente lenta. Su elevada lipofilia permite una rápida absorción gastrointestinal por difusión pasiva. Tras su administración, es metabolizada y excretada principalmente por bilis, heces y orina (Mesa *et al.*, 2000). Los metabolitos de curcumina que han sido descritos son: dihidrocurcumina (DHC), tetrahydrocurcumina (THC) el cual es uno de los principales metabolitos de la curcumina, hexahydrocurcumina (HHC), octahydrocurcumina (OHC), glucorónido curcumina y sulfato de curcumina (Figura 11). Esto demuestra que la mayor fracción de la curcumina se reduce de forma endógena, y después es glucoronizada por la UDP-glucoronil transferasa (Holder et al., 1978). Se ha demostrado que los metabolitos mencionados poseen efectos farmacológicos (Anand et al., 2008).

Se han propuesto diferentes estrategias para aumentar la absorción de la curcumina como son: mezclarlo con piperina, el cual eleva hasta en un 150% la biodisponibilidad, esto se debe a que la piperina inhibe la glucoronidación de la curcumina (Shoba et al., 1998). Otros métodos probados han sido las nanopartículas, las emulsiones y los liposomas (Anand et al., 2008; Douglass and Clouatre, 2015; Zhongfa et al., 2012). La solubilidad de la curcumina también puede ser aumentada por la formación de complejos con metales iones como, Zn^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} y Se^{2+} , así como albúmina de suero (Basnet and Skalko-Basnet, 2011).

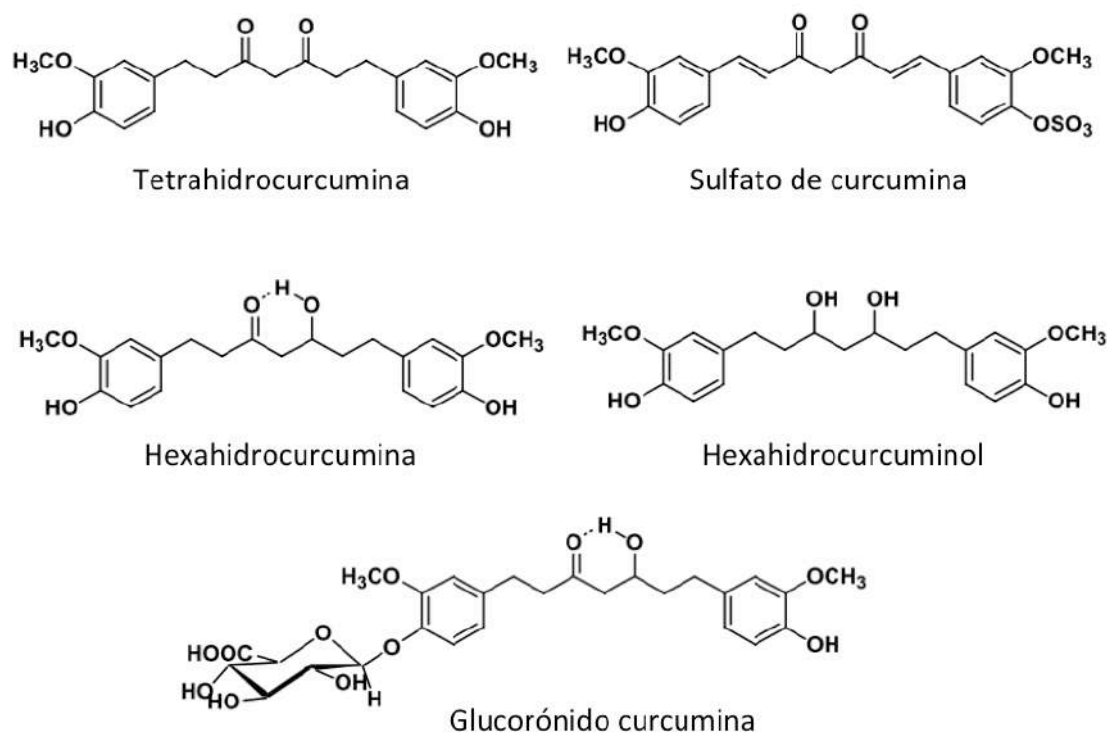


Figura 11. Estructura química de algunos metabolitos importantes de la curcumina (Basnet & Skalko-Basnet 2011)

2.7.3. Farmacodinamia

La curcumina es altamente pleiotrópica (fenómeno por el cual un solo gen es responsable de efectos fenotípicos o caracteres distintos y no relacionados) capaz de interactuar con un gran número de dianas moleculares así como proteínas, enzimas,

ADN, ARN y como moléculas portadoras (Anand et al., 2008; He et al., 2015). La THC muestra una mayor potencial antioxidante de la curcumina, el cual se considera uno de los factores responsables de la actividad antioxidante en experimentos *in vivo*. La administración oral de THC previene cambios en los niveles de ácidos grasos, glucosa e insulina en ratones diabéticos (Anand et al., 2008).

Sus principales efectos farmacológicos son: actividad antibacteriana *in vitro* contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Tyagi et al., 2015), antiinflamatorio (Kohli et al., 2005), propiedades antioxidantes (Subramanian et al., 1994), efecto fungicida *Sporothrix schenckii* (Huang et al., 2016), efectos antihelmínticos contra: *Toxocara canis* (Kiuchi et al., 1993), *Schistosoma mansoni* (Allam, 2009; Magalhães et al., 2009; Morais et al., 2013), *Pheretina posthuma* (Singh et al., 2011), *Setaria cervi* (Nayak et al., 2012), *Raillietina cesticillus* (El-Bahy and Bazh, 2015) en estudios *in vitro* e *in vivo*, *Ascaridia galli* (Alrubaie, 2015) en estudios *in vivo* e *in vitro*, *Anisakis simplex* (Valero et al., 2015), L3 *Haemonchus* (Nasai et al., 2016) y protoescolices de *Echinococcus* (Almalki et al., 2016). Los efectos antiprotozoarios de la curcumina han sido descritos para *Plasmodium falciparum* (Cui et al., 2007), *Plasmodium berghei* (Padín-Irizarry et al., 2016), *Leishmania* spp. (Koide et al., 2002), *Trypanosoma cruzi* (Nagajyothi et al., 2012; Vathsala et al., 2012), *Trypanosoma evansi* (Gressler et al., 2015), trofozoitos de *Giardia lamblia* (Shahiduzzaman et al. 2009), *Cryptosporidium parvum* en ooquistes y esporozoitos (Shahiduzzaman et al., 2009) y esporozoitos de *Eimeria tenella* (Khalafalla et al., 2011).

2.7.4. Propiedades antioxidantes y antiinflamatorias

Su actividad antiinflamatoria se debe a que tiene la capacidad de unirse directamente a moléculas proinflamatorias. La curcumina modula la respuesta antiinflamatoria al disminuir la expresión de ciclooxigenasa-2 (COX-2) e inhibe la expresión de enzimas proinflamatorias como lipooxigenasa-5 (LOX-5) e iNOS. Además, inhibiendo la producción de citocinas inflamatorias como factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) e INF- γ , este último se debe a que suprime la cascada de señalización de las Janus quinasas (JAK)-STAT a través del efecto sobre la homología Src 2 que contiene el dominio de la proteína tirosina fosfatasa (SHP)-2, IL-1, IL-2, IL-6, IL-8 e IL-12, proteína quimiotáctica de monocitos (MCP) y proteína inhibitoria de la migración. La

curcumina suprime la activación del factor nuclear- κ B (NF- κ B), quien está involucrada en la regulación de la inflamación, proliferación celular, transformación y tumorigenesis. La mezcla de curcuminoides (curcumina, DMC, BDMC) actúa mejor en la supresión de la activación de inducida por TNF- κ B (Gupta et al., 2011; Jurenka, 2009; Sandur et al., 2007)

Se ha demostrado que los curcuminoides son secuestradores de radicales libres y de ROS como radicales hidroxilo, radicales superóxido, radicales peroxil y peroxinitrito, cuya producción está implicada en la inducción de estrés oxidativo. También lo tienen como un agente reductor e inhibidor del daño al ADN, especialmente en la presencia de Cu o Fe. Ya que la curcumina es capaz de unirse al Fe, Mn y Cu modulando las propiedades antioxidantes. La curcumina (curcumina I) es más eficiente que DMC y BDMC en secuestrar radicales libres (Anand et al., 2008; Gupta et al., 2011; Noorafshan and Ashkani-Esfahani, 2013). Se ha demostrado que la actividad de los curcuminoides es más fuerte si se dan mezclados que por separado, esto se debe a que hay una acción sinérgica entre ellos (Kiuchi et al., 1993).

Estudios *in vitro* e *in vivo*, especialmente en ensayos clínicos en humanos, indican que la curcumina puede ser un agente terapéutico potencial en muchas enfermedades por ejemplo, enfermedad crónica inflamatoria del intestino, artritis, pancreatitis, uveítis anterior crónica y cáncer (Jurenka, 2009).

2.7.5. Propiedades inmunomodulatorias

Su actividad inmunomodulatoria *in vivo* se ha probado principalmente en ratas, en donde aumenta las IgG aunque no afecta al tipo ni a la actividad de las células NK (South et al., 1997). Antony et al. (1999), observaron un incremento en la actividad fagocítica de los macrófagos en animales tratados. La curcumina a dosis bajas ayuda a aumentar la proliferación de los linfocitos del bazo, mientras que a dosis altas deprime la proliferación de linfocitos del bazo (Li and Liu, 2005). En otro estudio, el tratamiento con curcumina aumentó la proliferación en la mucosa intestinal de células TCD3⁺ debido al cambio en las células TCD4⁺. Forward et al. (2011) demostraron que la curcumina *in vitro* inhibe IL-12 y la producción de la misma.

En estudios *in vivo* recientes observaron aumento en la proliferación de células T y antígenos específicos de células T. Ellos vieron que tenía poco efecto con respecto a la activación de macrófagos y NK. Además la curcumina no alteró la distribución de subgrupos de linfocitos T, B, NK, células dendríticas y macrófagos, no se observó ningún efecto sobre citocinas circulantes (Varalakshmi et al., 2008).

2.7.6. Toxicidad

En estudios preclínicos de seguridad sistemáticos dirigidos por el instituto de Cáncer (NCI) de EEUU, demostraron que no hay efectos adversos en ratas, perros o monos a una dosis de hasta 3.5 g/kg administrados durante 3 meses (Sharma et al., 2007). El uso de la curcumina fue aprobada por la Administración de Drogas y Alimentos (FDA) y el comité mixto FAO/WHO (Boskou et al., 2010).

En todos los experimentos *in vitro* e *in vivo* que se han realizado, se ha demostrado que los efectos farmacológicos, antiinflamatorios, antioxidantes e inmunomoduladores que tiene la curcumina son dosis-tiempo dependiente.

3. HIPÓTESIS

La severidad del cuadro clínico de la coccidiosis ovina provocado por *Eimeria* spp. está relacionada con la magnitud de la modulación de la respuesta inmune a causa de estos parásitos, la administración del polvo de *C. longa* ejerce efecto inmunomodulatorio, antioxidante, antiinflamatorio y disminuye la eliminación de ooquistes de *Eimeria* spp. en corderos infectados naturalmente.

4. OBJETIVO GENERAL

Determinar dosis y forma de administración del polvo de *C. longa*, así como el efecto a nivel inmunológico que tiene en corderos infectados naturalmente con *Eimeria* spp.

4.1. Objetivos particulares

- Determinar dosis, tiempo y forma de administración del polvo de *Curcuma longa* en corderos cruce Suffolk infectados naturalmente con *Eimeria* spp.
- Evaluar el efecto del polvo de *Curcuma longa* en animales infectados naturalmente con *Eimeria* spp.
- Evaluar el efecto inmunomodulatorio, antioxidante y antiinflamatorio del polvo de *Curcuma longa* en corderos infectados naturalmente con *Eimeria* spp.
- Evaluar el efecto *in vitro* de la curcumina en esporozoitos de *Eimeria* spp.

5. JUSTIFICACIÓN

El uso de coccidicidas y coccidiostatos en la producción ovina han sido una estrategia comúnmente usada para controlar la coccidiosis, teniendo efecto sobre el estadio temprano del desarrollo del parásito, incluyendo esporozoitos, merontes y merozoitos. Estos fármacos son administrados principalmente como aditivos en el alimento o mezclados con el agua de bebida. Sin embargo, el uso inadecuado (subdosificación o sobredosificación) y el tiempo de retiro que tienen algunos fármacos, el cual muchas veces no es respetado, han provocado que se presenten casos de resistencia, residuos en los productos y subproductos animales. Ante el auge de las producciones orgánicas y la prohibición desde el 2006 en la Unión Europea de los anticoccidianos de origen químico como aditivos en el alimento, se busca una nueva alternativa para la Eimeriosis ovina. La evidencia reciente sugiere un papel importante por parte de la curcumina (principal curcuminoide presente en el rizoma de *C. longa*) para controlar la infección de *Eimeria* spp. Sin embargo, a la fecha no se ha determinado la dosis, tiempo y forma de administración en corderos infectados naturalmente con *Eimeria* spp. En la actualidad solo se han realizados estudios *in vitro* de la forma de actuar de la curcumina en los esporozoitos de *E. tenella*, mientras que los estudios *in vivo* han sido realizados principalmente en aves y conejos, demostrando efectos positivos sobre la disminución en la eliminación de ooquiste de *Eimeria* spp. Por lo tanto, en este estudio se avalúa por primera vez el efecto de la cúrcuma en ovinos infectados naturalmente con *Eimeria* spp. y el efecto *in vitro* de la curcumina (Sigma-Aldrich®, C1386, >65% pureza) sobre el esporozoito de una coccidia de rumiante mediante cultivo celular. Así mismo, se generó evidencia original sobre la actividad antioxidante del polvo del *C. longa* que fue administrada a los corderos.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Elaboración de galletas y determinación de curcuminoides

Uno de los objetivos particulares fue la determinación de curcuminoides en los diferentes polvos de *C. longa* encontrados en la Ciudad de México y en las galletas elaboradas con el polvo de *C. longa* que se administraron a los corderos. Esta determinación se llevó a cabo en el Departamento de Farmacia de la Facultad de Química (FQ) de la UNAM gracias a la colaboración del Dr. Fausto Rivero Cruz y la Dra. Blanca Rivero Cruz. Con estos resultados, se realizó una tesis de licenciatura, con la cual se graduó la alumna Ofelia Velázquez García.

La materia prima, la elaboración de las galletas e idea se llevó a cabo en la FMVZ-UNAM, en la FQ solamente se realizó la cuantificación de los curcuminoides.

Los resultados correspondientes a los análisis fueron tomados de la siguiente tesis: “Cuantificación de curcuminas con actividad antiparasitaria en insumos de uso veterinario”, cuya autora es Ofelia Velázquez García. La tesis puede ser consultada en www.dgbiblio.unam.mx

Los ingredientes y el procedimiento para la elaboración de la galleta se publicarán una vez que la Coordinación de Innovación y Desarrollo de la UNAM nos instruya que ya es posible difundirla dado que se está tramitando la patente (Anexo 1).

6.1.1. Elaboración de galletas de cúrcuma

Para reducir costos en la producción de las galletas de cúrcuma, se utilizó un polvo comercial de *C. longa* (Shan Khalis Turmeric Power), el cual se compró en un local comercial que importa especias (Ultra Chem, Estado de México).

Con el fin de facilitar la ingesta de *C. longa* por los animales, se hicieron galletas. Cada galleta contenía harina de trigo, agua, destilado de caña de azúcar y esencia artificial de piña. Para cada galleta, el polvo de *C. longa* fue incorporado de acuerdo a la dosis usada para cada animal para cada grupo. El destilado de caña de azúcar y saborizante artificial de piña se mezclaron con el polvo de *C. longa* para facilitar su homogenización y para mejorar la palatabilidad. Como placebo se hicieron galletas sin *C. longa*.

6.1.2. Cuantificación de curcuminoides totales en diversas muestras de polvo de *Curcuma longa* por el método espectrofotométrico UV

La literatura reporta que dependiendo el origen del rizoma de *C. longa* depende la concentración de curcuminoides. Con el fin de saber las concentraciones totales de diferentes muestras, se realizó la cuantificación de curcuminoides de 6 diferentes muestras de polvo de *C. longa*.

Para cada muestra, se realizó una extracción con etanol (Velázquez García, 2016). Los resultados se expresan como curcuminoides totales a partir de la curva estándar preparada bajo las mismas condiciones de análisis.

6.1.3. Cuantificación de curcuminoides en las galletas (dosis de 50, 100 y 200 mg por unidad) por el método espectrofotométrico UV

La cuantificación total de curcuminoides del polvo de *C. longa* se determinó cuantitativamente utilizando un método espectrofotométrico UV validado en un estudio previo (Sharma et al., 2012). Se preparó una solución estándar de 1 µg/ml (10 mg del estándar de referencia en 10 mL de metanol) para los espectros UV. La longitud de onda de absorbancia máxima fue determinada mediante espectrofotometría a 421 nm. Como estándar se utilizó uno que contenía 94% de curcuminoides \geq 80% curcumina (C7727 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU). Posteriormente, se prepararon diferentes concentraciones de curcumina para evaluar linealidad, rango y precisión del método. La validación de este método se llevó a cabo de acuerdo con International Conference on Harmonization (2005). El coeficiente de variación fue <2.0% y el coeficiente de correlación linear fue de 0.9982, lo que sugiere un buen ajuste del modelo (Velázquez García, 2016).

6.1.4. Estabilidad de los curcuminoides en la galleta por Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (HPLC)

La estabilidad de la galleta se evaluó mediante el análisis del efecto de la temperatura y el tiempo de almacenaje, para garantizar que en el transcurso del tiempo los curcuminoides se mantienen estables en las condiciones de almacenamiento. El análisis se realizó después de 1, 20, 40 y 90 días de almacenamiento en refrigeración a 2 - 4 °C y

protegidos de la luz. Se analizaron dos réplicas de cada dosis, los resultados se compararon con la respuesta generada por una solución de curcuminoides preparada el día del análisis (Velázquez García, 2016). Este análisis se realizó mediante HPLC.

6.1.5. Identificación de curcuminoides, curcumina y demetoxicurcumina en los diferentes polvos de *C. longa* por HPLC

Con el fin de saber la cantidad de curcuminoides, curcumina y demetoxicurcumina, se realizó la cuantificación de diversos polvos de *C. longa* por HPLC (Velázquez García, 2016).

6.1.6. Identificación de curcuminoides, curcumina y demetoxicurcumina en las galletas (dosis de 50, 100 y 200 mg por unidad) por HPLC.

Con el fin de saber la cantidad de curcuminoides, curcumina y demetoxicurcumina, se realizó la cuantificación en las galletas en sus tres diferentes dosis (50, 100 y 200 mg) por HPLC (Velázquez García, 2016).

6.2. Estudio *in vivo*

6.2.1. Modelo animal

Se utilizaron 20 corderos cruza Suffolk con un promedio de 28 días de edad y un peso promedio de 12 kg. Antes de comenzar el experimento (día 0), se tomaron muestras de materia fecal directamente del recto usando una bolsa de polietileno, y se realizaron las técnicas de flotación para confirmar la presencia de ooquistes de *Eimeria* spp., la cuantificación de la carga parasitaria se llevó a cabo utilizando la técnica de McMaster (Gordon and Whitlock, 1939). El conteo de ooquistes se realizó por triplicado y fue expresado como ooquistes por gramo de heces (OPG). Con base en los resultados obtenidos, los animales se clasificaron de menor a mayor OPG y asignados al azar a uno de los cinco grupos (n=4) mediante el bloque basado en el recuento de OPG determinado en el día cero (0) antes del tratamiento (Kommuru, *et al.*, 2014). Un grupo se mantuvo como el control no tratado (T01), animales con placebo (T02); animales que se les administró una dosis de 50 mg/kg de polvo de *C. longa* (T03); animales que se les administró una dosis de 100 mg/kg de polvo de *C. longa* (T04) y animales que se les administró una dosis de 200 mg/kg de polvo de *C. longa* (T05). La excreción de ooquistes por gramo de heces (OPG) de cada animal, el tratamiento al que pertenecen y los pesos se presentan en el Cuadro 2. Los criterios para seleccionar estas dosis se basó en un estudio previo (datos no publicados). Durante 14 días consecutivos, los animales recibieron el placebo o las galletas preparadas con polvo de *C. longa* dependiendo al grupo que pertenecían. Las galletas se mantuvieron en refrigeración y protegidas de la luz.

Cuadro 2. Excreción de ooquistes por gramo de heces (OPG), porcentaje de especies de *Eimeria* patógenas (*E. ovinoidalis* y *E. crandalis*), tratamiento al que pertenecen y peso en los 20 corderos utilizados en el experimento.

ID Animal	OPG	Patógenas %	Tratamiento	Bloque	Pesos kg
13151	250	52	4	4	13.8
13140	500	52	3	3	13.6
13143	450	50	5	4	11.2
13159	1550	72	3	1	10.8
13150	1450	76	5	1	12.1
13147	350	66	1	4	13.8
13156	300	62	2	4	12.1
13158	1550	52	4	1	10.8
13148	4450	46	2	1	10.5
13139	1450	66	2	2	11.7
13145	7900	68	1	1	10.3
13142	450	42	2	3	13.3
13034	1300	86	5	2	12.2
13135	1050	46	1	2	12.6
13132	800	56	5	3	12.7
13157	500	66	1	3	13
13044	1450	20	3	2	12.1
13137	450	52	4	3	12.4
10	300	62	3	4	14.1
13102	850	62	4	2	13.8

6.2.2. Diseño experimental

Corresponde a un diseño de un solo factor con cinco niveles aleatorizados en bloques completos con diez observaciones repetidas en el tiempo y cuatro repeticiones por tratamiento.

Factor *C. longa*:

Control sin placebo (1)

Control con placebo (2)

50 mg/kg de polvo de *C. longa* (3)

100 mg/kg de polvo de *C. longa* (4)

200 mg/kg de polvo de *C. longa* (5)

Bloques: se formaron con cuatro animales que tuvieran un número similar de OPG al inicio del estudio (día 0).

6.2.3. Obtención de muestras de heces

Para evaluar la eficacia de cada tratamiento (T03, T04 y T05), se tomaron muestras de heces los días 3, 7, 10, 14, 18, 21, 28, 35 y 42.

La reducción del porcentaje del conteo de OPG se calculó de la siguiente manera:

$$\left[(P \text{ OPG } T02 \text{ día}^n - P \text{ OPG } Tx^i \text{ día}^n) \div P \text{ OPG } T02 \text{ día}^n \right] \times 100$$

Donde P= media aritmética, OPG=ooquistes por gramo, T02= grupo placebo, n=día de la toma de muestra, Tx= grupo tratado, i=dosis utilizada del polvo de *C. longa*

6.2.4. Procesamiento para la identificación de especies de *Eimeria*

Las especies de *Eimeria* se identificaron por morfología después de esporular los ooquistes (da Silva and Miller, 1991). Las muestras de heces se recolectaron los días 0, 14, 21, 28, 35 y 42. Se incubaron en dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) al 2.5% a $27^\circ \pm 2^\circ C$ durante 5 días bajo condiciones de oxigenación constante. Los ooquistes esporulados se concentraron con solución saturada de cloruro de sodio. Se midieron 100 ooquistes esporulados por cada muestra, los cuales se tomaron al azar. Para medir los ooquistes se utilizó un ocular micrométrico (Leica Microsystems, ASPELAB, México).

6.2.5. Toma de muestras de sangre para la determinación de IFN- γ , IL-10, nitritos y peroxidación lipídica

La sangre se recolectó de la vena yugular (10 mL/animal) durante la mañana con la ayuda de un tubo Vacutainer® conteniendo o no EDTA. Las muestras se centrifugaron a temperatura laboratorio por 10 min a 800 g. Cuando no se utilizó EDTA, el suero se dividió en alícuotas en tubos eppendorf y se guardaron en congelación a $-20^\circ C$ hasta su uso y los análisis de citocinas se realizaron por triplicado.

6.2.6. Determinación de los niveles de IFN- γ

Los niveles de IF- γ se analizaron utilizando un kit de ELISA (Bovigam, Zoetis, USA) con el suero obtenido de la muestra de sangre los días 0, 7, 14, 30 y 42 usando el método colorimétrico (Plain et al., 2012). Se utilizaron placas con 96 pozos (Corning Costar COR3596, USA) y se llenaron con 100 μ l de anticuerpos anti-sheep IFN- γ en PBS (2 μ g/ml) y se incubaron toda la noche a 4 °C. Las placas fueron lavadas 5 veces usando una solución de lavado (PBS CON 0.05% Tween 20). Se descongelaron las muestras y se llevaron a temperatura ambiente. El anticuerpo se bloqueó con PBS-1% BSA durante 1 hora. Los estándares de IFN- γ (Abd Serotec, EEUU) y las muestras se agregaron dentro de las placas durante una hora a temperatura laboratorio y después se lavaron 4 veces con la solución de lavado. Después, un anticuerpo biotinilado anti-sheep IFN- γ (Abd Serotec) en PBS (0.5 μ l) se agregó y las placas se incubaron por una hora. Este paso fue seguido por la adición de 10 μ l de peroxidasa de rábano (HRP-Abd Serotec). Después de la incubación a temperatura laboratorio, las placas se lavaron con amortiguador. Después, 100 μ l de solución sustrato de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) fue agregada en cada pozo por 30 min; y se agregaron 50 μ l de H₂SO₄ 4M fue agregado para parar la reacción. Los niveles de IFN- γ se midieron colorimétricamente a 450 nm en un lector de ELISA y cuantificados por interpolación de una curva estándar.

6.2.7. Determinación de los niveles de IL-10

Los niveles de IL-10 fueron analizados directamente del suero obtenido los días 0, 7, 15, 30 y 42, y determinados por método colorimétrico descrito previamente (Kwong et al., 2002). Se utilizó un estuche comercial, de acuerdo a las instrucciones del proveedor (Sheep Interleukin 10 Receptor Alpha ELISA kit; MyBioSource, San Diego, CA, EEUU). La intensidad de color se midió espectrofotométricamente a 450 nm.

6.2.8. Determinación de peroxidación lipídica

El malondialdehído (MDA) es un producto de la degradación del metabolismo de los radicales libres del oxígeno, que se cuantifica con frecuencia como un índice de la peroxidación lipídica. El MDA se midió en espectrofotométricamente en la sangre, basado en la reacción de MDA con el ácido tiobarbitúrico (TBA, Sigma-Aldrich,

México) adaptado para un lector de placas de microtitulación (Ramos et al., 2010). Se añadió una solución de TBA a 0.1 mL a cada muestra. Esta mezcla se calentó a 100°C durante una hora y después se enfrió. Después de agitarlo vigorosamente, las muestras se centrifugaron a 12,000 rpm por 15 min a 4°C. La absorbancia fue medida espectrofotométricamente a 532 nm. Cada muestra se midió por triplicado.

6.2.9. Determinación de nitritos en el suero

Los niveles de nitritos se midieron usando la reacción de Griess (Kosior-Kerzecka et al., 2008). La absorbancia se midió a 550 nm usando un espectrofotómetro UV/vis (Jenway 6305 UV/vis, Princeton, NJ, USA). La concentración relativa de nitritos se calculó con la curva estándar de nitrito de sodio. Todas las medidas se tomaron por triplicado y se calcularon los valores medios.

6.2.10. Análisis de datos

Antes de analizar los datos estadísticamente, el conteo de ooquistes se convirtieron a logaritmo natural ($\log [OPG+1]$) para obtener una distribución normal. Todos los valores se calcularon a partir de, al menos, tres experimentos independientes. El modelo estadístico fue de un solo diseño factorial, con cinco niveles asignados al azar en bloques completos con observaciones repetidas a través del tiempo. Un análisis de varianza multivariado se realizó para observaciones repetidas ($p < 0.0001$). En aquellos casos en los que la interacción tiempo-tratamiento fue significativa, se realizó para cada tiempo, un análisis univariado de un solo factor de diseño aleatorio en bloques completos, mediante el ajuste de Bonferroni. Para comparaciones múltiples, se utilizó una prueba de Tukey. Si las varianzas eran heterogéneas, se utilizó una prueba de Welch, y para comparaciones múltiples, se realizó la prueba Dunnett (Cardoso and Veitía, 2008).

6.3. Estudios *in vitro*

Todos los estudios *in vitro* fueron realizados en el Instituto de Parasitología, Centro de Investigación biomédica de Seltersberg (Biomedizinisches Forschungszentrum Seltersberg) Universidad de Justus-Liebig, Giessen, Alemania. Con la colaboración de la Prof. Dra. Anja Taubert, Prof. Dr. Carlos Hermosilla y la Dra. Liliana Silva.

6.3.1. Parásitos

La cepa de *E. bovis* utilizada en el presente estudio se mantuvo por pasajes en terneros machos Holstein Friesian libres de parásitos (Hamid et al., 2015). Los esporozoitos fueron desenquistados de los ooquistes esporulados de acuerdo a la técnica descrita por Hermosilla et al. (2002), y posteriormente se suspendieron en medio ECGM modificado (ECGM Medio de Crecimiento Celular Endotelial (30%) + Medium 199 (70%) + 1% PS + 10% suero fetal bovino).

6.3.2. Cultivo celular

Las células endoteliales de la vena umbilical bovina (BUVEC) se aislaron de acuerdo a Taubert et al. (2006) y cultivadas en medio ECGM modificado. Para determinar la influencia de los tratamientos en la tasa de infección, las BUVEC fueron cultivadas en placas de cultivo celular de 12 pozos y se incubaron a 37°C y 5% CO₂, cambiando el medio de cultivo a cada 2 días hasta que las células estuvieran confluentes.

6.3.3. *Curcuma longa* (producto comercial) y curcumina (Sigma-Aldrich®)

Para los estudios *in vitro* se utilizó polvo de *Curcuma longa* (producto comercial) y curcumina (Sigma-Aldrich, C1386, ≥65% pureza).

Para los ensayos con el polvo de *C. longa* se utilizaron las mismas dosis que en los estudios *in vivo* (50 mg, 100 mg, 200 mg), ajustando la dosis de la siguiente manera:

Volumen ruminal en borregos = 13% de su peso corporal

Los borregos de los experimentos *in vivo* tenían un peso promedio de 12 kg, así que 12 kg x 0.13 = 1.56 L = 1560 ml de volumen ruminal promedio

Dando como ejemplo la menor dosis: 12 kg x 50 mg *C. longa* = 600 mg, se determinó la cantidad necesaria para preparar 50 ml de medio de tratamiento:

$$m = \frac{50 \text{ ml} \times 600 \text{ mg}}{1560 \text{ mL}} \cong 20 \text{ mg del polvo } C. \text{ longa (0.02 g)}$$

Las distintas cantidades de polvo de *C. longa* se mezclaron con 2% de etanol en medio de cultivo.

Los tratamientos de *C. longa* se prepararon como se indica:

Control = 1 mL etanol + 49 ml de medio ECGM modificado

50 mg/kg PV = 0.02 g *C. longa* + 1 mL etanol + 49 mL de medio ECGM modificado

100 mg/kg PV = 0.04 g *C. longa* + 1 mL etanol + 49 mL de medio ECGM modificado

200 mg/kg PV = 0.08 g *C. longa* + 1 mL etanol + 49 mL de medio ECGM modificado

Para los ensayos con el polvo de curcumina (Sigma-Aldrich, C1386, $\geq 65\%$ pureza) las dosis consideradas fueron las siguientes:

0.5 μM

1 μM

2 μM

4 μM

8 μM

Se preparó una solución stock de 20 mM de la siguiente manera:

11 mg de curcumina (C1386) + 1500 μl DMSO

Los tratamientos de curcumina se prepararon como se indica:

Control (T01) = 5 mL medio ECGM modificado

DMSO (T02) = 5 mL medio ECGM modificado + 2 μl DMSO

8 μM (T03) = 10 mL medio ECGM modificado + 4 μl solución stock curcumina (20 mM)

4 μM (T04) = 5 mL medio ECGM modificado + 5 ml de 8 μM curcumina

2 μM (T05) = 5 mL medio ECGM modificado + 5 ml de 4 μM curcumina

1 μM (T06) = 5 mL medio ECGM modificado + 5 ml de 2 μM curcumina

0.5 μM (T06) = 5 mL medio ECGM modificado + 5 ml de 1 μM curcumina

(se eliminaron 5 ml)

6.3.4. Ensayos de viabilidad de los esporozoitos de *E. bovis*

Este ensayo tiene como objetivo determinar si el polvo de *C. longa* y si la curcumina (Sigma-Aldrich®) son capaces de producir daños en los esporozoitos de *E. bovis* los cuales conduzcan a la muerte de los mismos.

6.3.4.1. Ensayo de viabilidad de los esporozoitos de *E. bovis* y *Curcuma longa*

Se utilizaron 3×10^6 de esporozoitos recién desenquistados por tratamiento (0.02 g, 0.04 g y 0.08 g; medio ECGM modificado y etanol se consideró como control negativo). Los esporozoitos se incubarán a 37°C y 5% de CO₂ durante 4 y 24 h, en dos experimentos independientes. Después de la incubación, los esporozoitos se centrifugaron a 1708 rpm durante 12 minutos. La viabilidad de los esporozoitos se verificó mediante el método de tinción de Trypan blue (Sigma). Para lo anterior se realizó una dilución de 1:10 (90 µl muestra de esporozoitos + 10 µl Trypan blue). Los parásitos que no estaban teñidos se consideraron viables y los que estaban teñidos se consideraron muertos (Figura 12).

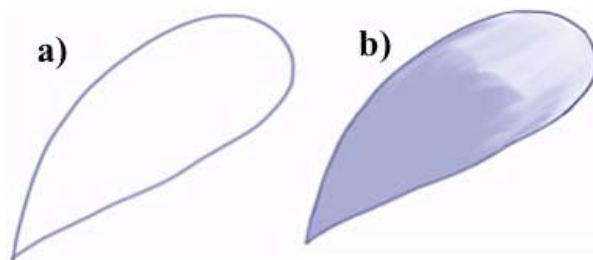


Figura 12. Esquema de esporozoito teñidos con Trypan blue
a) Esporozoito/taquizoito vivo **b)** esporozoito/taquizoito muerto

El porcentaje de esporozoitos muertos se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ muertos} = \frac{\text{muertos}}{\text{total (vivos + muertos)}} \times 100$$

6.3.4.2. Ensayo de viabilidad de los esporozoitos de *E. bovis* y curcumina (Sigma-Aldrich®)

Se utilizaron 3×10^6 de esporozoitos recién desenquistados por tratamiento (DMSO, 8 μM , 4 μM , 2 μM , 1 μM y 0.5 μM), los esporozoitos se incubaron con medio ECGM modificado se consideró como control negativo. Los esporozoitos se resuspendieron en los distintos tratamientos y se incubó a 37°C y 5% de CO₂ durante 60 minutos y 4 h, en dos experimentos independientes. Después de la incubación, los esporozoitos se centrifugaron a 1708 rpm durante 12 minutos. La viabilidad de los esporozoitos se verificó mediante el método de tinción de Trypan blue (Sigma), se realizó una dilución 1:10 (90 μl muestra + 10 μl Trypan blue). Los parásitos que no estaban teñidos se consideraron viables y los que estaban teñidos se consideraron muertos.

6.3.5. Tasa de infección de esporozoitos de *E. bovis* y curcumina (Sigma-Aldrich®)

Este ensayo tiene como objetivo determinar si hay un efecto remanente de la curcumina sobre los esporozoitos de *E. bovis*, el cual resulte en una menor capacidad para infectar células del hospedador comparado con parásitos no tratados (control negativo). Se utilizaron dos diferentes aislados de células BUVEC por tratamiento, incluyendo el grupo control y DMSO, y por parásito.

Después de que los parásitos fueron incubados tal como se describió para el ensayo de viabilidad, estos se centrifugaron a 1200 rpm por 12 min y se eliminó el sobrenadante, y los parásitos fueron lavados en medio ECGM modificado dos veces para eliminar cualquier residuo de curcumina. Se infectó cada pozo con 78,000 esporozoitos de *E. bovis*, y se incubaron durante 24 h a 37°C y 5% de CO₂. A las 24 horas pos infección (hpi), fueran contadas las células infectadas y las células totales de 4 campos visuales (400x) por tratamiento en un microscopio invertido (IX81, Olympus®). Para determinar la tasa de infección de cada parásito se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Tasa de infección} = \frac{\text{número de células infectadas}}{\text{número total de células}} \times 100 \%$$

6.3.6. Desarrollo de esporozoitos de *E. bovis* tratados con curcumina (Sigma-Aldrich®)

Este ensayo tiene como objetivo observar si hay efecto de la curcumina sobre el desarrollo de los característicos macromerontes de la primera merogonia de *E. bovis*. Después de determinar la tasa de infección de las BUVEC a las 24 h pos infección, las placas de cultivo celular fueron mantenidas a 37°C y 5% CO₂ hasta el día 19 pos infección, cambiando el medio de cultivo a cada 48h. El desarrollo de los macromerontes y la liberación de los esporozoitos fueron verificadas a cada 2 o 3 días y documentadas con fotos y videos.

6.3.7. Análisis de datos

Los valores de DL₅₀, DL₉₀ y DL₉₉ (concentración que inhibe el 50%, 90% y 99% de supervivencia) se realizaron mediante una regresión PROBIT (prueba estadística para determinar las DL del tratamiento sobre los esporozoitos) para los ensayos de viabilidad de los eporozoitos de *E. bovis* (*C. longa* y curcumina Sigma-Aldrich ®).

Para el análisis de tasa de infección (la respuesta analizada fue el número de células infectadas por grupo de célula) la prueba estadística se realizó con un Modelo Lineal General con un factor fijo (dosis: 0, 1 µM, 2 µM, 4 µM y 8 µM) y uno aleatorio (célula: 1, 2 y ensayo:1, 2) mediante el método de mínimos cuadrados. Posteriormente se hizo una prueba de Dunnett para la diferencia entre medias de dosis contra el grupo testigo.

El nivel de significancia para rechazar la hipótesis nula de no diferencia fue de $P < 0.05$. Los análisis estadísticos se realizaron usando el software SPSS (IBM SPSS® Statistics) versión 21.

7. RESULTADOS

7.1. Determinación de curcuminoides

7.1.1. Cuantificación de curcuminoides totales en diversas muestras de polvo de *Curcuma longa* por el método de espectrofotometría UV.

En la literatura se ha descrito que el polvo de *C. longa* posee de 2-10% de curcuminoides, esto depende de la zona geográfica y el tipo de suelo donde se cultiva. Las muestras analizadas provenían principalmente del continente asiático. En promedio, los seis diferentes polvos tienen 2.4% de curcuminoides totales.

En el Cuadro 3 se resume la absorbancia y porcentaje total de curcuminoides encontrados en los diferentes polvos de *C. longa* por el método espectrofotométrico UV. El porcentaje de curcuminoides encontrados se expresan como curcuminoides totales a partir de la curva estándar preparada bajo las mismas condiciones de análisis.

Cuadro 3. Cuantificación del total de curcuminoides por el método de espectrofotometría UV en las diversas muestras de polvo de *C. longa* (modificado de Velázquez García 2016)

Muestra	Absorbancia	Masa muestras (mg)	% curcuminoides	% curcuminoides encontrados en 10 mg de muestra
Shan Khalis	0.405	10.4	2.33	2.24
Muestra 1	0.473	10.3	2.72	2.64
Muestra 2	0.453	11.1	2.43	2.18
Muestra 3	0.536	11.9	2.65	2.22
Muestra 4	0.402	10.2	2.36	2.31
Muestra 5	0.351	10.2	2.08	2.03

7.1.2. Cuantificación de curcuminoides totales en las galletas de *Curcuma longa* por el método de espectrofotometría UV.

Era necesario determinar el porcentaje de curcuminoides en las tres diferentes dosis (50, 100 y 200 mg), para saber si era proporcional la dosis utilizada y para verificar el correcto proceso de manufactura de las galletas. En el Cuadro 4 se resumen los miligramos y el porcentaje de curcuminoides totales encontrados en las galletas placebo (sin *C. longa*), 50 mg, 100 mg y 200 mg de polvo de *C. longa* por el método espectrofotométrico UV. En los resultados podemos observar que la concentración de curcuminoides es proporcional en las tres dosis utilizadas, mientras que en la galleta placebo no se encontraron curcuminoides. Esto también nos indica que el proceso de manufactura de la galleta se realizó correctamente.

Cuadro 4. Cuantificación de curcuminoides totales en las galletas elaboradas con polvo de *C. longa* (dosis 50, 100 y 200 mg por unidad) y en la galleta placebo por el método espectrofotométrico UV (modificado de Velázquez García 2016)

Galleta	Peso (mg)	mg de curcuminoides / galleta	% curcuminoides
Placebo	2128.6	0	0
50 mg	2135.1	1.52	0.07
100 mg	2163.6	2.70	0.13
200 mg	2210.1	5.33	0.24

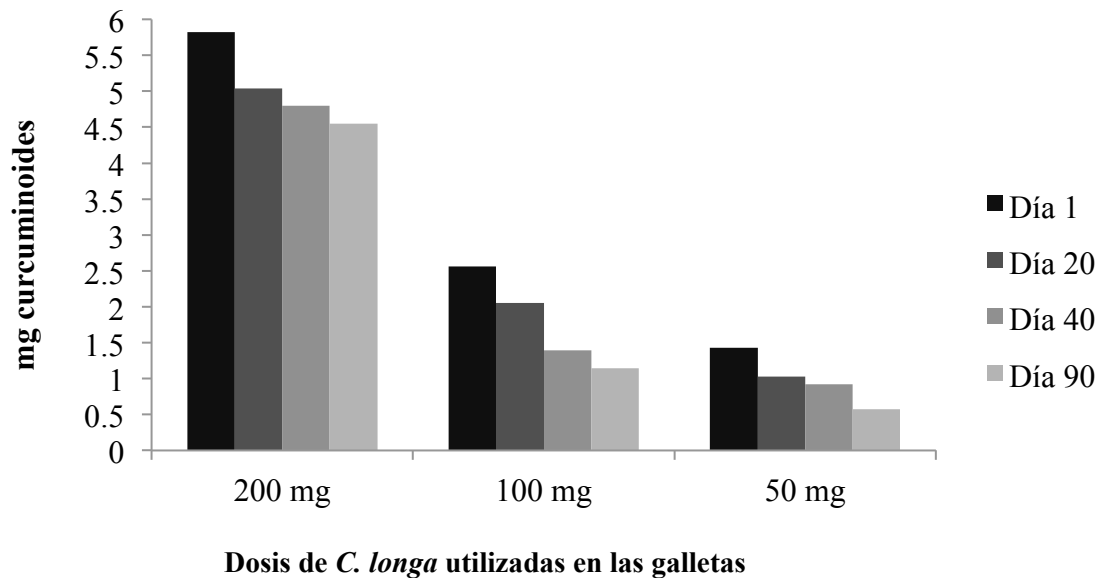
7.1.3. Estabilidad de los curcuminoides en las galletas de polvo de *C. longa* (50, 100 y 200 mg) por medio de HPLC

El estudio de estabilidad de los curcuminoides en las galletas y de importante utilidad para garantizar que en el transcurso del tiempo (90 días de estudio), la curcumina se mantiene estable en las condiciones de almacenamiento recomendadas (en refrigeración y protegidas de la luz). En el Cuadro 5 y la Gráfica 1, se resumen los miligramos y el porcentaje de curcuminoides durante los días 1, 20, 40 y 90 de estudio. Se observa que la estabilidad de los curcuminoides se afecta conforme pasa el tiempo de almacenaje, es decir, la cantidad de curcuminoides disminuye un 27% (dosis de 50 mg), 20% (dosis de

100 mg) y 13% (dosis de 200 mg) al día 20 de estudios. Para el día 40 de estudio el porcentaje de curcuminoides que había disminuido en las galletas fue de 35% (dosis de 50 mg), 45% (dosis de 100 mg) y 17% (dosis de 200 mg). Al día 90 se observa una disminución del 60% (dosis de 50 mg), 55.3% (dosis de 100 mg) y un 22% (dosis de 200 mg). El resultado del día uno de muestreo se tomó como el 100% de curcuminoides totales. La galleta que presenta mejor estabilidad durante los 90 días de muestreo fue la dosis de 200 mg de polvo de *C. longa*, ya que durante todo el estudio perdió 22% de los curcuminoides totales. Con estos resultados podemos decir que la galleta debe de ser consumida dentro de los primeros 20 días de después de su elaboración.

Cuadro 5. Cuantificación de los curcuminoides totales durante los días 1, 20, 40 y 90 de estudio de las tres diferentes dosis de polvo de *C. longa* (50, 100 y 200 mg por unidad) utilizadas en las galletas (modificado de Velázquez García 2016)

Día de muestreo	Muestra (dosis)	mg curcuminoides/galleta	% curcuminoides
1	50 mg	1.425	0.055
	100 mg	2.558	0.110
	200 mg	5.825	0.258
20	50 mg	1.029	0.039
	100 mg	2.051	0.092
	200 mg	5.041	0.223
40	50 mg	0.921	0.035
	100 mg	1.395	0.062
	200 mg	4.794	0.213
90	50 mg	0.570	0.025
	100 mg	1.143	0.052
	200 mg	4.548	0.205



Gráfica 1. Estabilidad de los curcuminoides totales (mg) en las galletas de 50,100 y 200 mg de polvo de *C. longa* durante los días 1, 20, 40 y 90 de almacenamientos en refrigeración y protegidos de la luz (modificado de Velázquez García 2016)

7.1.4. Identificación de curcuminoides, curcumina y demetoxicurcumina en las muestras de polvo de *C. longa* por HPLC.

Curcumina y demetoxicurcumina forman parte de los principales curcuminoides reportados con efectos farmacológicos. En el Cuadro 6 se resume el contenido de curcuminoides totales, y en el Cuadro 7 se resume el contenido de curcumina y demetoxicurcumina encontrados en los diferentes polvos de *C. longa* por el método HPLC.

Cuadro 6. Cuantificación de curcuminoides totales en los diferentes polvos de *C. longa* por medio de HPLC (modificado de Velázquez García 2016)

Muestra	Área total	Curcuminoides ($\mu\text{g/mL}$)	Masa muestra (mg)	% curcuminoides
Shan Khalis	1569759	50.296	44.9	1.07
Muestras 1	2089315	68.034	41.5	1.55
Muestra 2	1847936	59.958	42.6	1.33
Muestra 3	1893242	61.474	40.3	1.44
Muestra 4	1679037	54.307	41.5	1.24
Muestra 5	1383024	44.403	40.7	1.03

Cuadro 7. Cuantificación de curcumina y demetoxicurcumina en los diferentes polvos de *C. longa* por medio de HPLC (modificado de Velázquez García 2016)

Muestras		Área	t_R	% Curcuminoides
Shan Khalis	DMC	76089	13.191	0.056
	C	1493670	18.804	1.013
Muestra 1	DMC	94892	13.245	0.077
	C	1994423	18.891	1.473
Muestra 2	DMC	78658	13.392	0.062
	C	1769278	19.141	1.270
Muestra 3	DMC	87154	13.283	0.072
	C	1806088	18.985	1.372
Muestra 4	DMC	75826	13.636	0.061
	C	1603211	19.474	1.178
Muestra 5	DMC	67879	13.658	0.056
	C	1315145	19.532	0.979

DMC = Demetoxicurcumín
C = Curcumina

7.1.5. Identificación de curcuminoides, curcumina y demetoxicurcumina en las galletas elaboradas con polvo de *C. longa* (dosis de 50, 100 y 200 mg por unidad) y en la galleta placebo por HPLC.

En el Cuadro 8 y 9 se resume el contenido de curcuminoides, curcumina y demetoxicurcumina encontrados en las galletas elaboradas con polvo de *C. longa* (dosis 50, 100 y 200 mg) y en la galleta placebo HPLC.

Cuadro 8. Cuantificación de curcuminoides totales en las galletas elaboradas con polvo de *C. longa* (dosis 50, 100 y 200 mg por unidad) y en la galleta placebo por medio de HPLC (modificado de Velázquez García 2016)

Muestra	Peso promedio (mg)	mg de curcuminoides/galleta	% de curcuminoides
Placebo	2128.6	0	0
50 mg	2135.1	1.425	0.067
100 mg	2163.6	2.558	0.118
200 mg	2210.1	5.825	0.264

Cuadro 9. Cuantificación de curcumina y demetoxicurcumina en las galletas elaboradas con polvo de *C. longa* (dosis 50, 100 y 200 mg por unidad) y en la galleta placebo por medio de HPLC (modificado Velázquez García)

Muestra		Área	t _R	Curcuminoides (mg / galleta)	% curcuminoides
50 mg	DMC	444102	12.877	0.2643	0.003
	C	1994737	18.301	1.1606	0.074
100 mg	DMC	156801	12.871	0.2157	0.007
	C	1747548	18.289	2.3423	0.110
200 mg	DMC	69850	12.867	0.1984	0.011
	C	2026363	18.307	5.627	0.264

DMC = Demetoxicurcumina

C = Curcumina

7.2. Estudio *in vivo*.

Small Ruminant Research 135 (2016) 27–35



Contents lists available at ScienceDirect

Small Ruminant Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/smallrumres



Effects of *Curcuma longa* dietary inclusion against *Eimeria* spp. in naturally-infected lambs



Maria Eugenia Cervantes-Valencia^a, Yazmín Alcalá-Canto^{b,*}, Hector Sumano-Lopez^c,
Adriana Margarita Ducoing-Watty^d, Lilia Gutierrez-Olvera^c

^a Graduate Program of Animal Health and Production, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

^b Departamento de Parasitología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

^c Departamento de Fisiología y Farmacología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

^d Departamento de Genética y Bioestadística, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico



Effects of *Curcuma longa* dietary inclusion against *Eimeria* spp. in naturally-infected lambs

Maria Eugenia Cervantes-Valencia^a, Yazmín Alcalá-Canto^{b,*}, Hector Sumano-Lopez^c, Adriana Margarita Ducoing-Watty^d, Lilia Gutierrez-Olvera^c

^a Graduate Program of Animal Health and Production, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

^b Departamento de Parasitología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

^c Departamento de Fisiología y Farmacología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

^d Departamento de Genética y Bioestadística, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 October 2015

Received in revised form

18 December 2015

Accepted 21 December 2015

Available online 28 December 2015

Keywords:

Curcuma longa

Eimeria

Cytokines

Oxidative stress

Sheep coccidiosis

ABSTRACT

Ovine coccidiosis caused by *Eimeria* spp. can negatively impact health and overall productive performance in sheep with mortalities up to 20% in lambs. It is characterized by high production of pro-inflammatory cytokines and oxidative stress that can damage intestinal tissue. Currently, only drugs are used for the treatment of ovine coccidiosis. Nevertheless, anticoccidial resistance and the concern of drug residues in edible tissues and milk have prompted the evaluation of alternatives to prevent and control this disease. Based on preliminary findings, the use of *Curcuma longa* dietary supplementation was evaluated in this trial. Twenty crossbred lambs naturally infected with *Eimeria* spp., aged 28-days-old with an average weight of 12 kg, were divided in five groups. Three groups were treated orally for 14 days with 50 mg/kg, 100 mg/kg, or 200 mg/kg of *C. longa*. A placebo-treated group and untreated controls were included in this trial, too. Stool samples were obtained every other day to determine anticoccidial efficacy. Also, animals were weighed on day 0 and 42. To evaluate the immunomodulatory activity of curcumin, a proinflammatory (IRN- γ) and an immunoregulatory (IL-10) cytokine were measured by ELISA. Lipid peroxidation and nitrite generation were determined by means of the serum malondialdehyde test and the Griess reaction, respectively. *C. longa* anticoccidial activity increased over time in treated groups and reached a 100% efficacy on day 42. Animals treated with 200 mg/kg of this plant gained twice the daily weight recorded for untreated groups. IL-10 levels were higher in supplemented animals, whereas lipid peroxidation and generation of nitrites were significantly lower. Results showed that curcumin administration may reduce oocyst output, weight-loss, inflammation and oxidative stress-related effects caused by *Eimeria* spp. infection in lambs.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Ovine coccidiosis is a disease caused by *Eimeria* protozoans. It affects the small and large intestine portions of the gastrointestinal tract. Animals become orally infected and they can be simultaneously affected by different species. Currently, 11 species that affect sheep have been recognized with *Eimeria crandallis* and *Eimeria ovionoidalis* being the most pathogenic ones (Andrews, 2013; Chartier and Paraud, 2012). This disease has economic and health impacts, mainly because lambs develop a subclinical disease. Yet, mortal-

ity can reach up to 20% in lambs, mainly because they have not yet acquired specific immunity (Catchpole et al., 1998; Kommuru et al., 2014; Veira, 2002). Currently, there is no vaccine available to prevent coccidiosis in sheep. However, in recent years, many studies have shed light on the protective immune responses that the ruminant host develops against *Eimeria*. The parasite is capable of inducing a functional immune response associated with the induction of innate and adaptive immune responses. Macrophages and polymorphonuclear neutrophils (PMN), are the main contributors to the cytokine generation that is observed in ruminant coccidiosis (Hermosilla et al., 2006). Previous studies have also shown that these cells are the main sources of reactive oxygen species (ROS) (Taubert et al., 2009), such as peroxynitrite, hypochlorous acid and hydroxyl radicals (Sild et al., 2011). In turn, there is a

* Corresponding author.

E-mail addresses: yazmin@unam.mx, yazalcata@hotmail.com (Y. Alcalá-Canto).

growing body of evidence that suggests that ROS contribute to several signalling pathways and can produce dysregulated responses eventually cause lethal pro-inflammatory-mediated tissue damage (Aline et al., 2002; Chow et al., 2011; Simons et al., 2012). It is also well known that neutrophils and leukocytes trigger an increased production of reactive nitrogen species in the intestinal mucosa, and cause protein modification and induction of pro-inflammatory cytokines (Catanzaro et al., 2015). Regarding coccidiosis, it has been shown that PMN induce iNOS upon exposure to *Eimeria bovis* sporozoites (Behrendt et al., 2008). Previous reports have demonstrated that challenge infections with *E. bovis* generate an infiltration of CD4+ and CD8+ T cells in the intestinal tissue (Sühwold et al., 2010). Cytokines such as interleukin-2 (IL-2) and IFN- γ increase during prepatency in the primary infection caused by *E. bovis*; whereas IL-4 is dominant in patency (Taubert et al., 2008). On the other hand, IL-10 displays an immunoregulatory function and prevents tissue damage induced by infection with pathogens that are controlled by CD4+ T under high inoculum situations or certain immunoregulatory deficiencies (Jankovic et al., 2010; Barbosa et al., 2015; Magombedze et al., 2015).

Several drugs are licensed for the control of ovine coccidiosis, such as decoquinate, didazuril and toltrazuril. However, there is growing concern in using them due to drug-residue issues, and strict withdrawal periods that must be observed prior to marketing milk or meat (Andrews, 2013). This has prompted the study of alternative methods to control this parasite while keeping in mind that concerns of potentially toxicity derived from residues in edible animal proteins and environmental impact must be accounted for (Chagas, 2004). Some natural products have shown promising results; for example clinoptilolite (Akala-Canto et al., 2011), plants that contain condensed tannins (Burke et al., 2013); and the dried rhizome of *Curcuma longa*, all having anticoccidial effects (Kommuru et al., 2014; Saratsis et al., 2012). In recent decades, there have been several studies detailing the antiparasitic effects of curcumin, especially in *Plasmodium falciparum* (Reddy et al., 2005), *Cryptosporidium parvum* (Shahiduzzaman et al., 2009), *Giardia lamblia* (Said et al., 2012), *Trypanosoma* spp. (Nagajyothi et al., 2012) and *Eimeria tenella*. In this latter scenario, curcumin induces apoptosis by the presence of precipitates on the sporozoite surface that affect its morphology, viability and adhesion ability (Chattopadhyay et al., 2004). The severity of these alterations depend on the dose and delivery time of the *C. longa* extract denominated curcumin (Khalafalla et al., 2011). In spite of the above, information about the dosage and delivery time of curcumin from *C. longa* in lambs is not available. Under certain circumstances, a severe inflammation of the intestinal tissue of infected lambs can occur i.e., ingestion of a high inoculum of *Eimeria* and a dysfunctional immune response. Consequently, a field trial with lambs naturally-infected with *Eimeria* spp. was regarded as a useful setting to assess the anticoccidial and immunomodulatory activities of a powdered preparation of *C. longa*, measuring oocyst counts, lipid peroxidation, nitrite generation, as well as concentrations of a proinflammatory (IFN- γ) and an immunoregulatory cytokine that prevents excessive inflammation (IL-10).

2. Materials and methods

2.1. Study site and animals

The study was conducted at the experimental farm of the Autonomous University of Chapingo, which is located in Texcoco, State of Mexico, according to procedures approved by its Animal Care and Use Committee. This area has a semi-humid weather, with an average annual temperature of 15.9 °C and an annual rainfall of 686 mm.

This trial included 20 crossbred female lambs with a mean body weight (\pm standard deviation) of 12.345 \pm 1–15 kg, naturally infected with *Eimeria* spp. and without a history of anticoccidial treatment. The lambs were approximately 28 days old at the beginning of this study. Animals were fed with a diet that consisted of 60.5% of corn silage, 24.2% alfalfa pellets, 8.5% oatmeal, 5% molasses, 1.5% calcium carbonate, 0.2% of salt and 0.5% of a vitamin and mineral premix, with a content of 13.56% crude protein, 2.68% ether extract, 19.66% fiber and 13.29% ashes, according to the Proximal Chemical Analysis performed in the Animal Nutrition and Biochemistry laboratory of the Veterinary Medicine and Animal Science Faculty of the UNAM. Water was provided ad libitum. Lambs were kept on 8-m² concrete floor pens with rough surfaces to prevent slipping and straw bedding. A shovel was used to remove bedding and manure in order to clean the pens. Each animal was screened for the presence of *Eimeria* spp. by faecal oocyst count examination prior to the start of the study. Initially, 30 animals were included. Nevertheless, ten lambs shed less than 100 *Eimeria* oocysts per gram of faeces. In consequence, they were not used in the study.

2.2. *Curcuma longa* crackers and total curcuminoid quantification

To reduce costs, a food-grade brand of commercial powdered *C. longa* (Shan Khalis Haldee Turmeric Powder) was used in this study and purchased from a local spice-importing company (Ultra Chem, Estado de Mexico, Mexico). Total curcuminoid concentration of the powdered presentation of *C. longa* was quantitatively determined using a UV spectrophotometric method validated in a previous study (Sharma et al., 2012). In order to carry out the analytical method, the UV spectra of a standard solution of curcumin prepared in methanol (3 μ g/ml) was registered. The wavelength of maximum absorbance determined via UV spectrophotometry was 421 nm. A curcumin standard (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) containing 94% of curcuminoids was used. Subsequently, different concentrations of curcumin were prepared to evaluate linearity, range and accuracy of the method. Validation of this method was carried out according to the International Conference on Harmonization (2005). The coefficient of variation was <2.0% and linear correlation coefficient was 0.9982, suggesting a good model fit.

In order to ease *C. longa* intake by the animals, crackers (biscuits) were made with this spice. Each cracker contained wheat flour, water, distilled sugar cane and an artificial pineapple flavoring. For each cracker, *C. longa* powder was incorporated according to the dose used for each animal and for each group. For the purpose of making the *C. longa* powder homogenous, distilled sugar cane was added. To improve palatability, an artificial pineapple food flavouring was stirred into the mixture. Crackers without *C. longa* were made as placebo.

In the interest of determining curcuminoid contents, *C. longa* crackers were oven-dried at 35 °C for 24 h. Each cracker was individually weighed using an analytical balance and crushed to a fine powder. A sample of homogenized powder was weighed and diluted in methanol. For extraction purposes, ultrasound was applied to the samples for 15 min. The extract was then filtered through 45 μ m filter membranes (Millipore México). The commercial curcumin standard was prepared in the same way as the samples. Both samples and the standard were introduced into a spectrophotometer (Evolution™ 60, Thermo Scientific), which was set at 421 nm. A calibration curve was created by plotting the peak area ratio of curcumin to internal standard versus the curcumin concentration (Jäger et al., 2014). Crackers prepared with 50 mg, 100 mg or 200 mg of *C. longa* powder were shown to contain 1.248 mg, 2.307 mg or 4.336 mg of curcumin per 100 mg of powder, respectively.

2.3. Experimental design

A day before the beginning of the experiment (day 0), faecal samples were obtained using polyethylene bags kept in refrigeration until their analysis. Samples were examined using a faecal flotation technique in order to confirm the presence of *Eimeria* spp. oocysts; and parasite load quantification was conducted using the McMaster technique (Gordon and Whitlock, 1939). Oocyst counts were expressed as oocyst output per gram of faeces (OPG) and were determined in three independent individual faecal samples by the mean of three counts performed per sample using the McMaster technique. Before the study began, lambs were assigned to a group based upon faecal oocyst count (Kommuru et al., 2014).

For allocation purposes, stratified sampling was used. Animals were ranked from lowest to highest OPG and randomly assigned to one of five groups ($n = 4$) by blocking based on OPG count determined on day zero (0) before treatment. One group remained as the untreated control (T01) whereas the remaining animals were divided into the following groups: sheep that received water as placebo (T02); sheep given a dose of 50 mg/kg of body weight of *C. longa* (T03); lambs that received a supplementation of 100 mg/kg of *C. longa* (T04); and the last group consisted of sheep supplemented with a dose of 200 mg/kg of *C. longa* (T05). Criteria for selecting these doses was based upon a previous study (unpublished data).

During 14 consecutive days, the animals received the placebo or crackers prepared with *C. longa*. To evaluate the effectiveness of each treatment (T03, T04 and T05), faecal samples were taken on days 3, 7, 10, 14, 18, 21, 28, 35 and 42.

2.4. Weight gain recording

Each lamb was weighed at the beginning of the experiment (initial body weight) on day 0 and on the last day of the experiment, 42 days later. All lambs were weighed individually during morning hours using a suspended weighing scale with a sensitivity of 100 g. The experiment was initiated in July, during the rainy season. Daily health observations were performed throughout the experiment.

2.5. Sample processing for the identification of *Eimeria* species

Eimeria oocysts were speciated by morphology of the sporulated oocysts (da Silva and Miller, 1991). Briefly, individual faecal samples collected on days 0, 14, 21, 28, 35 and 42 were incubated in 2.5% potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$) at $27 \pm 2^\circ C$ during five days under constant oxygenation. Sporulated oocysts were concentrated with a saturated sodium chloride solution. An ocular micrometer (reticle) (Leica Microsystems, ASPELAB, Mexico) was used to measure at least 100 individual sporulated oocysts that were randomly taken from each sample.

2.6. Blood sampling and processing for IFN- γ , IL-10, peroxidation and lipid peroxidation

Blood was collected from the external jugular vein (10 ml/animal) during morning hours using a Vacutainer[®] tube containing or not EDTA. The samples were centrifuged at room temperature for 10 min at $800 \times g$. When no EDTA was used, serum was divided into aliquots in Eppendorf vials and kept at $-20^\circ C$ until further use. Cytokine analyses were performed in triplicate.

2.6.1. IL-10 levels

Interleukin-10 was directly assayed in serum obtained on days 0, 7, 15, 30 and 42, and determined by a colorimetric method described previously (Kwong et al., 2002). A commercial ELISA kit was used, according to the manufacturer's instruction (Sheep Interleukin 10 Receptor Alpha ELISA Kit; MyBioSource, San Diego, CA,

USA) The colour intensity was measured spectrophotometrically at 450 nm.

2.6.2. IFN- γ levels

IFN- γ levels were assayed using an ELISA kit (Bovigam, Zoetis, USA) on serum collected from blood sampled on days 0, 7, 14, 30, and 42 using a colorimetric method (Plain et al., 2012). Ninety-six-well plates (Corning Costar COR3596, USA), were coated with 100 μ l of anti-sheep IFN- γ antibodies in PBS (2 μ g/ml) and incubated overnight at $4^\circ C$. Plates were washed 5 times with wash buffer (PBS with 0.05% Tween 20). Frozen samples were thawed and brought to room temperature. The antibody was blocked with PBS-1% BSA during 1 h. IFN- γ standards (AbD Serotec, USA), as well as experimental samples were added into the plates for 1 h at room temperature and then washed 4 times using wash buffer. Afterwards, a biotinylated secondary anti-sheep IFN- γ (AbD Serotec) antibody in PBS (0.5 μ g/ml) was added and plates were incubated for 1 h at room temperature. This step was followed by the addition of 100 μ l of streptavidin-horseradish peroxidase (AbD Serotec). After room-temperature incubation, the plates were washed with buffer. Then, 100 μ l of TMB substrate solution were added to each cell for 30 min; and 50 μ l of 4 M H_2SO_4 were also added in order to stop the reaction. IFN- γ levels were colorimetrically measured at 450 nm in an ELISA reader and quantified by interpolation from a standard curve.

2.7. Determination of lipid peroxidation

Serum malondialdehyde (MDA) is a breakdown product of the oxygen free radical metabolism, which is frequently quantified as a lipid peroxidation index. MDA was measured in blood spectrophotometrically, based on the MDA reaction with thiobarbituric acid (TBA, Sigma-Aldrich, Mexico) adapted for a microtiter plate reader (Ramos et al., 2010). Briefly, a TBA solution was added to 0.1 ml of each sample. This mixture was heated at $100^\circ C$ for 1 h and then cooled. After vigorous shaking, samples were centrifuged at 12,000 rpm for 15 min at $4^\circ C$. Absorbance was measured spectrophotometrically at 532 nm. Each sample was tested in triplicate.

2.8. Determination of nitrites in serum

Total nitrites as measurement of nitric oxide were measured using the Griess reaction (Kosior-Korzecka et al., 2008). Briefly, for 200 μ l of the reduced samples, 200 μ l of Griess solution (sulphanilamide 2% (w/v), *N*-(1-naphthyl) ethylenediamine 0.2% (w/v), was added and incubated for 15 min at room temperature in the dark. The absorbance was measured at 550 nm using a UV/vis spectrophotometer (Jenway 6305 UV/vis, Princeton, NJ, USA). The relative nitrite concentration was calculated with the standard curve of nitric sodium. All the measurements were taken in triplicate and the mean values were calculated.

2.9. Data analysis

Prior to analysis, oocyst counts were converted into natural logarithms ($\log [OPG + 1]$) to obtain normal distributions. All values were calculated from at least three independent experiments. The statistical model was a single factor design, with five randomized levels in complete blocks with repeated observations through time. A multivariate variance analysis was performed for repeated observations ($p < 0.0001$). In those cases where the time-treatment interaction was significant, we conducted for each time, a univariate analysis of a single randomized factor design in complete blocks, using the Bonferroni adjustment. For multiple comparisons a Tukey test was used. If the variances were heterogeneous, a Welch test

Table 1
Mean initial and final body weights in *Eimeria*-infected sheep treated or not with *Curcuma longa*.

	Experimental groups (means ± standard error)				
	Control (T01)	Placebo (T02)	50 mg/kg (T03)	100 mg/kg (T04)	200 mg/kg (T05)
IBW (kg)	12.425 ± 0.455 ^a	11.900 ± 0.455 ^a	12.650 ± 0.455 ^a	12.700 ± 0.455 ^a	12.050 ± 0.455 ^a
FBW (kg)	16.185 ± 0.652 ^a	15.838 ± 0.652 ^a	17.873 ± 0.652 ^{ab}	19.180 ± 0.652 ^{ab}	19.825 ± 0.652 ^b
DWI (g)	0.089 ± 0.0096 ^a	0.093 ± 0.0096 ^a	0.124 ± 0.0096 ^{ab}	0.154 ± 0.0096 ^{bc}	0.185 ± 0.0096 ^c

^{a,b,c} Different letters within a row indicate statistical significant differences ($p < 0.05$).
IBW: initial body weight; FBW: final body weight; DWI: daily weight increase.

was used, and for multiple comparisons a Dunnett's-*T* test was performed (Cardoso and Veitfa, 2008).

3. Results

3.1. Effect of *Curcuma longa* administration on body weight

Table 1 shows the mean and standard error of daily body weight gains recorded at the beginning of the study and 42 days after lambs were supplemented or not with the experimental product. In this table, different letters show significant differences ($P \leq 0.05$). Regarding these results, differences in body weight from the animals that ingested 200 mg/kg *C. longa* were significantly higher than the corresponding control (T01) and placebo (T02) groups. At the end of this trial, sheep that consumed 50 mg/kg, 100 mg/kg, or 200 mg/kg *C. longa* showed a daily increase in mean body weight of: 0.124 g, 0.154 g and 0.185 g respectively; in contrast to control and placebo groups, as these animals gained 0.089 g and 0.093 g daily, respectively.

3.2. *Eimeria oocyst* output

Table 2 summarizes the average OPG recorded during the trial. *C. longa* produced an anticoccidial effect as it decreased the faecal excretion of *Eimeria* OPG. Statistically significant differences ($p < 0.005$) were observed 7 days after treatment between sheep that did not consume *C. longa* and those that were given 100 mg/kg *C. longa*. From day 21 onward, there was a significant ($p < 0.005$) reduction in OPG shedding in all *C. longa*-treated sheep (T03, T04 and T05), as compared to the control and placebo groups (T01 and T02).

As far as the shedding of oocysts per gram of litter is concerned, an anticoccidial efficacy equal to or higher than 50% was achieved in groups treated with *C. longa* (T03, T04 and T05). On day 10, the three treated groups showed an anticoccidial efficacy higher than 70%, reaching a 100% anticoccidial efficacy from day 21 until the end of the experiment (Table 2).

Identified *Eimeria* species in the five groups were: *E. ashata*, *E. faurei*, *E. parva*, *E. bakuensis*, *E. ovinoidalis*, *E. pallida*, *E. weybridgei*, *E. granulosa*, *E. crandallii*, *E. marisca* and *E. intricata*. The number

of infected animals and their frequency over time are shown in Table 3.

3.4. IL-10

Sheep that consumed 100 mg/kg or 200 mg/kg *C. longa* generated significantly ($P < 0.05$) higher levels of the regulatory cytokine IL-10 as compared to untreated, placebo and lambs supplemented with 50 mg/kg *C. longa*. Moreover, the latter showed significantly ($P < 0.05$) higher levels of IL-10 than the unsupplemented animals. Significant differences were observed throughout the study among the effect of different doses of *C. longa* on the increase of IL-10 levels as compared to untreated controls and placebo groups (Fig. 1A).

3.5. IFN- γ

Fig. 1B shows the effect of dietary supplementation with 50 mg/kg, 100 mg/kg, or 200 mg/kg *C. longa* on the serum levels of a proinflammatory cytokine, namely, IFN- γ in *Eimeria*-infected sheep. IFN- γ levels varied all along the study in the three treated groups, yet the cytokine levels were found to be significantly increased in all *C. longa*-treated groups as compared to untreated and placebo-treated groups all along the experiment ($P < 0.05$).

3.6. Measurement of malondialdehyde (MDA) levels

Fig. 2A shows the protective effects of supplementing *Eimeria*-infected sheep with *C. longa* as it significantly reduced ($P < 0.05$) lipid peroxidation activity as demonstrated by MDA decreased levels in animals that consumed 50 mg/kg, 100 mg/kg, or 200 mg/kg *C. longa* in contrast to untreated and placebo groups. Interestingly, MDA levels were significantly higher ($P < 0.05$) in lambs that ingested 50 mg/kg *C. longa* as compared to sheep supplemented with 100 or 200 mg/kg *C. longa*. MDA levels of sheep that received either 100 mg/kg or 200 mg/kg *C. longa* were similar.

3.7. Determination of nitric oxide generation

Results of the effect of daily oral administration of *C. longa* for 14 consecutive days on nitrosative stress are presented in Fig. 2B. Dietary supplementation with either quantity of *C. longa* produced

Table 2
Shedding of oocyst per gram of faeces (logarithm-transformed) of *Eimeria* spp. in sheep treated or not with curcumin.

	Experimental groups (Means ± S.E.M)				
	Control (T01)	Placebo (T02)	50 mg/kg curcumin (T03)	100 mg/kg curcumin (T04)	200 mg/kg curcumin (T05)
7	7.4392 ± 0.1836 ^a	7.2440 ± 0.1836 ^{ab}	6.4566 ± 0.1836 ^{abc}	6.2660 ± 0.1836 ^{bc}	6.6483 ± 0.1836 ^{abc}
10	7.5998 ± 0.2442 ^a	7.4263 ± 0.2442 ^b	6.2210 ± 0.2442 ^c	5.7644 ± 0.2442 ^c	6.3746 ± 0.2442 ^c
14	7.7784 ± 0.6173 ^a	7.5988 ± 0.6173 ^a	4.1567 ± 0.6173 ^{ab}	4.1083 ± 0.6173 ^b	5.4463 ± 0.6173 ^b
18	7.9246 ± 0.8880 ^a	7.6883 ± 0.8880 ^a	2.8466 ± 0.8880 ^b	2.4097 ± 0.8880 ^b	3.9354 ± 0.8880 ^{ab}
21	8.7217 ± 0.6876 ^a	8.3791 ± 0.6876 ^a	0.9830 ± 0.6876 ^b	0.9830 ± 0.6876 ^b	1.9659 ± 0.6876 ^b
28	8.9972 ± 0.5291 ^a	8.7903 ± 0.5291 ^a	0 ± 0.5291 ^b	1.2543 ± 0.5291 ^b	1.3323 ± 0.5291 ^b
35	8.8745 ± 0.1536 ^a	8.5412 ± 0.1536 ^a	0 ± 0.1536 ^b	4.4409 ± 0.1536 ^b	4.4409 ± 0.1536 ^b
42	8.6015 ± 0.1780 ^a	8.1512 ± 0.1780 ^a	0 ± 0.1780 ^b	0 ± 0.1780 ^b	0 ± 0.1780 ^b

^{a,b,c} Different letters within a row indicate statistical significant differences ($p < 0.05$).

Table 3
Frequency (%) of *Eimeria* species identified at the beginning and end of the study in lambs.

Frequency ^a of <i>Eimeria</i> species (%)	Day 0 (n=20)	Day 42 50 mg/kg curcumin (n=4)	Day 42 100 mg/kg curcumin (n=4)	Day 42 200 mg/kg curcumin (n=4)
	%	%	%	%
<i>E. ashara</i>	35	50	0	0
<i>E. faurei</i>	65	75	75	0
<i>E. parva</i>	45	100	100	0
<i>E. bakervensis</i>	100	100	100	0
<i>E. ovinoidalis</i>	100	100	100	0
<i>E. pallida</i>	80	75	75	0
<i>E. weybridgeensis</i>	70	100	100	0
<i>E. granulosa</i>	65	75	50	0
<i>E. cranialis</i>	85	75	100	0
<i>E. murisica</i>	20	25	50	0
<i>E. intricata</i>	25	0	25	0

^a Frequencies were estimated by dividing the number of animals infected with one or more species of *Eimeria* by the total number of sheep (day 0), as well as by the number of curcumin-treated lambs (day 42).

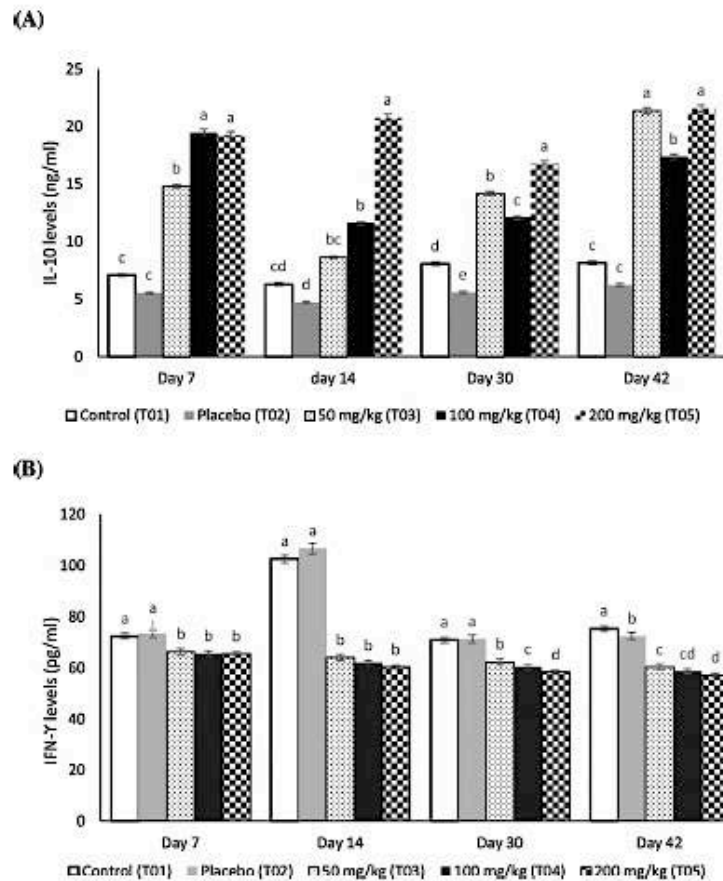


Fig. 1. Blood was collected on days 7, 14, 30 and 42 to analyse the effects of curcumin on concentrations of IL-10 (A) and IFN- γ (B) in serum of *Eimeria*-infected sheep treated or not with 50 mg/kg, 100 mg/kg or 200 mg/kg curcumin. Results were expressed as the mean \pm S.E.M. ^{a,b,c} Different letters above bars indicate statistical significant differences ($P < 0.05$).

significantly ($P < 0.05$) lower blood nitrite levels as compared to untreated controls and the placebo group.

4. Discussion

To date, it is customary to control sheep coccidiosis by using anticoccidial drugs either as in feed medication or as oral indi-

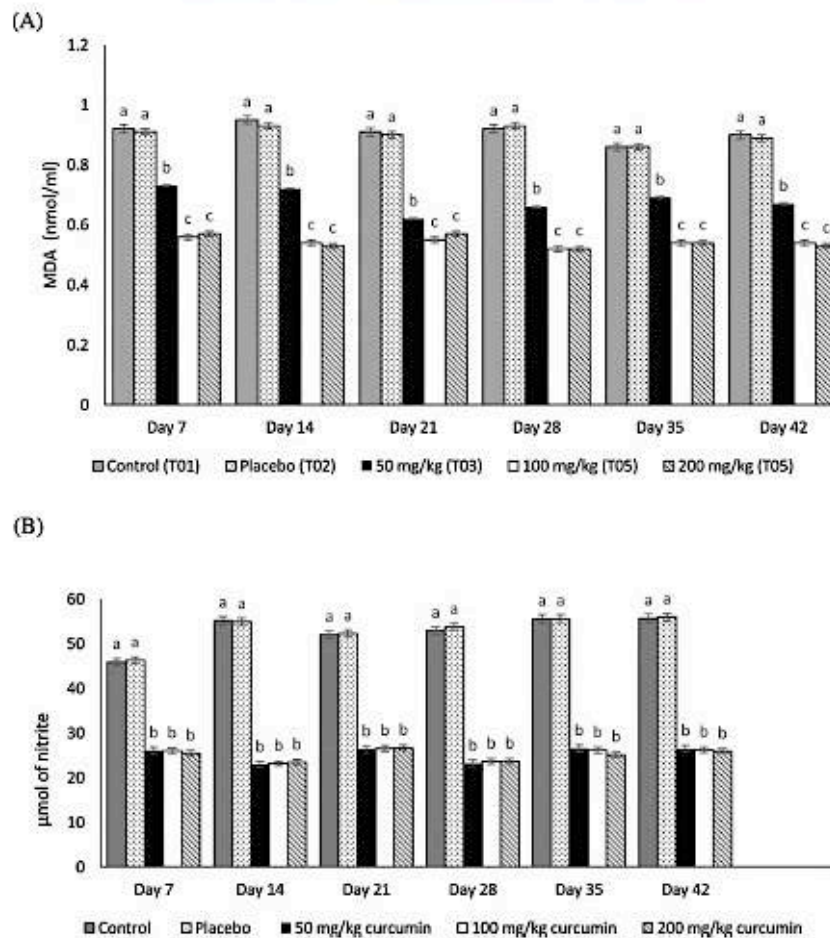


Fig. 2. Serum malondialdehyde (nmol/ml) concentration (A) and nitrite levels (nmol/ml) (B) measured in lambs fed or not a curcumin-supplemented diet.

vidual treatments. Undoubtedly, this practice has played a crucial role in the growth of livestock industry and has facilitated a higher availability and sustainability of animal protein for consumers over the past 50 years (Tewari and Maharana, 2011). However, this procedure has increased the resistant selection pressure against most anticoccidial drugs (Abbas et al., 2010; Peek et al., 2013; Saratsis et al., 2011). Additionally, there is a growing concern on the potential toxicity of drug residues in edible tissues and milk (Ul Hassan et al., 2014). One potentially well accepted alternative to chemical additives, is the use of herbal preparations and plant extracts, among which curcumin has been recognized to possess an important potential as anticoccidial preparation (Khalafalla et al., 2011). Depending on geographical and seasonal conditions *C. longa* extracts usually contain 60–70% carbohydrate, 8.6% protein, 5–10% fat, 2–7% fiber, 3–5% curcuminoids (50–70% curcumin) and up to 5% essential oils and resins (Chinedum et al., 2015; Jiang et al., 2014; Trujillo et al., 2013).

C. longa has been used as an additive to decrease the harmful effects of coccidiosis in broilers (Khalafalla et al., 2011; Kim et al., 2013), having positive effects even against *Eimeria acervulina* infection (Peek et al., 2013). It reduces coccidiosis lesion scores and oocyst shedding (Peek et al., 2013). Supplementation with curcumin has also been found to improve the quality, redness or yellowness of meat of coccidiosis-infected broilers as a result of

its antioxidant activity (Rajput et al., 2014). Similar results were obtained by Cervantes-Valencia et al. (2015), who demonstrated that, *C. longa* administered orally at a dose of 25–50 mg/kg to rabbits produced a decrease in oocyst shedding. Results obtained in this trial, also show that, under the conditions here described, *C. longa* significantly reduced oocyst production in lambs. The action mechanism was not determined; however, it is reasonable to speculate that its effects are similar to the ones already mentioned i.e., through a direct toxic effect on coccidia, (Ramsewak et al., 2000), affecting mainly the sporozoite's morphology and viability (Chattopadhyay et al., 2004). As far as we know, this is the first report of *C. longa* used to treat an *Eimeria* spp. infection in lambs.

Additional to its antiprotozoal effects, it has been demonstrated that curcumin possesses anti-inflammatory and antioxidant properties, and considering that oxidative stress is a hallmark of intracellular infections (Hering et al., 2012), these actions can complement the anticoccidial activity observed. Curcumin exerts its antioxidant effect by interacting with different signalling pathway or interacting with enzymes or genes implicated in oxidative stress (Aggarwal and Harikumar, 2009; Duan et al., 2012; Pagliaro et al., 2015; Yarru et al., 2009). Previous studies have shown that curcumin can reduce nitrosative stress by inhibiting iNOS gene expression in peritoneal macrophages and liver (Chan et al., 1998), and also due to its peroxynitrite anion scavenging activ-

ity (Sumanont et al., 2004). On the other hand, it has been demonstrated that curcumin prevents the inflammatory pain-like behaviour caused by the overstimulation of pro-inflammatory cytokines, by enhancing IL-10 production (Fattori et al., 2015; Gao et al., 2004; Kim et al., 2013; Sears et al., 2011). In this trial the antioxidant effects of *C. longa* against *Eimeria* naturally-infected lambs were confirmed by the reduction of both, lipid peroxidation and production of serum nitric oxide. Such effects are relevant if the main characteristics of ovine coccidiosis are considered. For example: alterations in the quantity of physiological antioxidants such as vitamins A, C and E in sheep suffering coccidiosis (Georgieva et al., 2006); intestinal epithelial inflammation and increased tissue and blood concentrations of reactive oxygen species (Hörak et al., 2004; Nweze and Obiwulu, 2009; Prowse et al., 1992; Rajput et al., 2014). Additionally, it has been shown in goats that other protozoan infections, such as toxoplasmosis and neosporosis, are paired with a clear increase level of nitric oxide (Tonin et al., 2015). These effects were somehow predictable. Administration of curcumin to humans and animal models with liver, hepatic, lung and intestinal lesions, has resulted in a significant reduction in oxidative stress associated with tissue damage (Badria et al., 2015; Cho and Park, 2015; He et al., 2015; Rajput et al., 2014). It has been previously demonstrated that curcumin increases antioxidant markers such as GSH, SOD and CAT activities, as well as the antioxidant enzyme glutathione peroxidase (Ahmida, 2012; Al-Rubaei et al., 2014; El-Bahr, 2015; García-Niño et al., 2015; He et al., 2015). Added up, all these effects can counteract the damage *Eimeria* spp. induces in epithelial cell integrity and impairment of mucosal recovery due to cellular oxidative injury (Cornelissen et al., 2009).

Interleukin-10 (IL-10) was here studied because of its relevance in preventing the immune-mediated pathology associated to the increase of a Th1 effector phenotype in coccidian infections (Taubert et al., 2008; Cohen and Denkers, 2015). Pathogenesis of ruminant coccidiosis is characterized by an increased production of pro-inflammatory cytokines such as IFN- γ (Hermosilla et al., 2012, 1999; Taubert and Hermosilla, 2008; Taubert et al., 2007). In the present study, the elevated concentration of this cytokine in the untreated controls is an important evidence of leukocyte infiltration and is in accordance with previous experimental studies (Taubert and Hermosilla, 2008). On the other hand, IL-10 exerts anti-inflammatory effects mediated by several mechanisms that include the down-regulation of pro-inflammatory cytokine induction (Haritova and Stanilova, 2012; Jiang et al., 2013; Lykken et al., 2015). Present results show decreased concentration of this cytokine similar to previous published data, in which *C. longa* was administered to piglets with an intestinal infection caused by *Escherichia coli* (Xun et al., 2015). It has been suggested that the anti-inflammatory properties of curcumin include several mechanisms including the inhibition of the TLR-4/NF- κ B signaling pathway (Fan et al., 2015; Zhong, 2015; Zhou et al., 2015). By blocking NF- κ B activation, target genes of this signaling pathway such as iNOS are down-regulated (Yadav et al., 2013; Zhong, 2015). This enzyme catalyzes oxidative stress-induction of nitric oxide, which was previously mentioned to be an important mediator in coccidiosis (Allen, 1997; Georgieva et al., 2011, 2006).

5. Conclusion

This is the first study demonstrating the beneficial actions of in-feed administration of *C. longa* in lambs to control *Eimeria* infection and to limit the host inflammatory reaction as assessed by the determination of oocyst faecal output, as well as concentrations of IL-10, IFN- γ , nitrites and lipid peroxidation. After 42 days, the body weight of lambs that received 200mg/kg of *C. longa* increased approximately twofold as compared to untreated

lambs. These results prompt the future clinical use of *C. longa* as a natural, environmentally-friendly, and non-toxic dietary supplement in ruminants infected with coccidiosis. Further work that involves experimental infections with one or more highly pathogenic species of *Eimeria* is, therefore, recommended.

Conflict of interest

None

Acknowledgments

The authors are grateful to Profr. Fausto Rivero Cruz and Profr. Blanca Rivero Cruz for the determination of curcuminoid contents and to Profr. Aldo B. Alberti Navarro and Mateo Salazar Islas for technical help. We would also like to thank Profr. Abdelfattah Zeidan Mohamed Salem for revising the manuscript. This study was supported by the scholarship 378283 granted by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). The study with animals comply with Subcomité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales Experimentados (SICUAE) of the Posgrado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal of the Universidad Nacional Autónoma de México.

References

- Abbas, R., Iqbal, Z., Khan, M., 2010. Anticoccidial activity of *Curcuma longa* L. in broilers. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 53, 63–67.
- Aggarwal, B.B., Harikumar, K.B., 2009. Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41, 40–59. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bioce.2008.06.010>.
- Ahmida, M.H.S., 2012. Protective role of curcumin in nephrotoxic oxidative damage induced by vancomycin in rats. *Exp. Toxicol. Pathol.* 64, 149–153. <http://dx.doi.org/10.1016/j.etp.2010.07.010>.
- Al-Rubaei, Z.M., Mohammad, T.U., Ali, L.K., 2014. Effects of local curcumin on oxidative stress and total antioxidant capacity in vivo study. *Pak. J. Biol. Sci.* 17, 1237–1241.
- Alcala-Canto, Y., Gutierrez-Olvera, L., Sumano-Lopez, C.H., 2011. Effects of clinopitolate on *Eimeria* spp. infection in sheep. *Small Rumin. Res.* 100, 184–188. <http://dx.doi.org/10.1016/j.smalrumres.2011.05.014>.
- Aline, F., Bout, D., Dimier-Poisson, I., 2002. Dendritic cells as effector cells: gamma interferon activation of murine dendritic cells triggers oxygen-dependent inhibition of *Toxoplasma gondii* replication. *Infect. Immun.* 70, 2368–2374. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI70.5.2368>.
- Allen, P.C., 1997. Nitric oxide production during *Eimeria tenella* infections in chickens. *Poult. Sci.* 76, 810–813.
- Andrews, A.H., 2013. Some aspects of coccidiosis in sheep and goats. *Small Rumin. Res.* 110, 93–95. <http://dx.doi.org/10.1016/j.smalrumres.2012.11.011>.
- Badria, F.A., Ibrahim, A.S., Badria, A.F., Elmarakby, A.A., 2015. Curcumin attenuates iron accumulation and oxidative stress in the liver and spleen of chronic iron-overloaded rats. *PLoS One* 10, e0134156. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0134156>.
- Barbosa, B.F., Lopes-Maria, J.B., Gomes, A.O., Argeloni, M.B., Castro, A.S., Franco, P.S., Ferrino, M.L., Roque-Barreira, M.C., Ietta, F., Martins-Filho, O.A., Silva, D.A.O., Mineo, J.R., Ferro, E.A.V., 2015. IL10, TGF beta1, and IFN gamma modulate intracellular signaling pathways and cytokine production to control *Toxoplasma gondii* infection in BeWo trophoblast cells. *Biol. Reprod.* 92, 82. <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod.114.124115>.
- Behrendt, J.H., Hermosilla, C., Hardt, M., Failing, K., Zahner, H., Taubert, A., 2008. PMN-mediated immune reactions against *Eimeria abovis*. *Vet. Parasitol.* 151, 97–109. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.11.013>.
- Burke, J.M., Miller, J.E., Terrill, T.H., Orlik, S.T., Acharya, M., Garza, J.J., Mosjidis, J.A., 2013. Sericea lespedeza as an aid in the control of *Eimeria* spp. in lambs. *Vet. Parasitol.* 193, 39–46. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.11.046>.
- Cardoso, G.C., Veitfa, N., 2008. Aplicación de métodos de comparaciones múltiples en biotecnología vegetal. *Biotecnol. Veg.* 8, 67–71.
- Catarzaro, D., Rancan, S., Orso, G., Dall'Acqua, S., Brun, P., Giron, M.C., Carrara, M., Castagliuolo, I., Ragazzi, E., Caparrotta, L., Montopoli, M., 2015. *Boswellia serrata* preserves intestinal epithelial barrier from oxidative and inflammatory damage. *PLoS One* 10, 15. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0125375>.
- Catchpole, J., Norton, C.C., Gregory, M.W., 1993. Immunisation of lambs against coccidiosis. *The Veterinary Record*. <http://dx.doi.org/10.1136/vr.132.3.56>.
- Cervantes-Valencia, M.E., Alcala-Canto, Y., Salem, A.Z.M., Kholif, A.E., Ducoring-Watty, A.M., Bernad-Bernad, M.J., Gutierrez-Olvera, C., 2015. Influence of curcumin (*Curcuma longa*) as a natural anticoccidial alternative in adult rabbits: first results. *Ital. J. Anim. Sci.* 14(3). <http://dx.doi.org/10.4081/ijis.2015.3838>.

ity (Sumanont et al., 2004). On the other hand, it has been demonstrated that curcumin prevents the inflammatory pain-like behaviour caused by the overstimulation of pro-inflammatory cytokines, by enhancing IL-10 production (Fattori et al., 2015; Gao et al., 2004; Kim et al., 2013; Sears et al., 2011). In this trial the antioxidant effects of *C. longa* against *Eimeria* naturally-infected lambs were confirmed by the reduction of both, lipid peroxidation and production of serum nitric oxide. Such effects are relevant if the main characteristics of ovine coccidiosis are considered. For example: alterations in the quantity of physiological antioxidants such as vitamins A, C and E in sheep suffering coccidiosis (Georgieva et al., 2006); intestinal epithelial inflammation and increased tissue and blood concentrations of reactive oxygen species (Hörak et al., 2004; Nweze and Obiwulu, 2009; Prowse et al., 1992; Rajput et al., 2014). Additionally, it has been shown in goats that other protozoan infections, such as toxoplasmosis and neosporosis, are paired with a clear increase level of nitric oxide (Tonin et al., 2015). These effects were somehow predictable. Administration of curcumin to humans and animal models with liver, hepatic, lung and intestinal lesions, has resulted in a significant reduction in oxidative stress associated with tissue damage (Badria et al., 2015; Cho and Park, 2015; He et al., 2015; Rajput et al., 2014). It has been previously demonstrated that curcumin increases antioxidant markers such as GSH, SOD and CAT activities, as well as the antioxidant enzyme glutathione peroxidase (Ahmida, 2012; Al-Rubaei et al., 2014; El-Bahr, 2015; García-Niño et al., 2015; He et al., 2015). Added up, all these effects can counteract the damage *Eimeria* spp. induces in epithelial cell integrity and impairment of mucosal recovery due to cellular oxidative injury (Cornelissen et al., 2009).

Interleukin-10 (IL-10) was here studied because of its relevance in preventing the immune-mediated pathology associated to the increase of a Th1 effector phenotype in coccidian infections (Taubert et al., 2008; Cohen and Denkers, 2015). Pathogenesis of ruminant coccidiosis is characterized by an increased production of pro-inflammatory cytokines such as IFN- γ (Hermosilla et al., 2012, 1999; Taubert and Hermosilla, 2008; Taubert et al., 2007). In the present study, the elevated concentration of this cytokine in the untreated controls is an important evidence of leukocyte infiltration and is in accordance with previous experimental studies (Taubert and Hermosilla, 2008). On the other hand, IL-10 exerts anti-inflammatory effects mediated by several mechanisms that include the down-regulation of pro-inflammatory cytokine induction (Haritova and Stanilova, 2012; Jiang et al., 2013; Lykken et al., 2015). Present results show decreased concentration of this cytokine similar to previous published data, in which *C. longa* was administered to piglets with an intestinal infection caused by *Escherichia coli* (Xun et al., 2015). It has been suggested that the anti-inflammatory properties of curcumin include several mechanisms including the inhibition of the TLR-4/NF- κ B signaling pathway (Fan et al., 2015; Zhong, 2015; Zhou et al., 2015). By blocking NF- κ B activation, target genes of this signaling pathway such as iNOS are down-regulated (Yadav et al., 2013; Zhong, 2015). This enzyme catalyzes oxidative stress-induction of nitric oxide, which was previously mentioned to be an important mediator in coccidiosis (Allen, 1997; Georgieva et al., 2011, 2006).

5. Conclusion

This is the first study demonstrating the beneficial actions of in-feed administration of *C. longa* in lambs to control *Eimeria* infection and to limit the host inflammatory reaction as assessed by the determination of oocyst faecal output, as well as concentrations of IL-10, IFN- γ , nitrites and lipid peroxidation. After 42 days, the body weight of lambs that received 200mg/kg of *C. longa* increased approximately twofold as compared to untreated

lambs. These results prompt the future clinical use of *C. longa* as a natural, environmentally-friendly, and non-toxic dietary supplement in ruminants infected with coccidiosis. Further work that involves experimental infections with one or more highly pathogenic species of *Eimeria* is, therefore, recommended.

Conflict of interest

None

Acknowledgments

The authors are grateful to Profr. Fausto Rivero Cruz and Profr. Blanca Rivero Cruz for the determination of curcuminoid contents and to Profr. Aldo B. Alberti Navarro and Mateo Salazar Islas for technical help. We would also like to thank Profr. Abdelfattah Zeidan Mohamed Salem for revising the manuscript. This study was supported by the scholarship 378283 granted by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). The study with animals comply with Subcomité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales Experimentados (SICUAE) of the Posgrado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal of the Universidad Nacional Autónoma de México.

References

- Abbas, R., Kibali, Z., Khan, M., 2010. Anticoccidial activity of *Curcuma longa* L. in broilers. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 53, 63–67.
- Aggarwal, B.B., Harikumar, K.B., 2009. Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41, 40–59. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bioce.2008.06.010>.
- Ahmida, M.H.S., 2012. Protective role of curcumin in nephrotoxic oxidative damage induced by vancomycin in rats. *Exp. Toxicol. Pathol.* 64, 149–153. <http://dx.doi.org/10.1016/j.etp.2010.07.010>.
- Al-Rubaei, Z.M., Mohammad, T.U., Ali, L.K., 2014. Effects of local curcumin on oxidative stress and total antioxidant capacity in vivo study. *Pak. J. Biol. Sci.* 17, 1237–1241.
- Alcala-Canto, Y., Gutierrez-Olvera, L., Sumanant-Lopez, C.H., 2011. Effects of clinopilolite on *Eimeria* spp. infection in sheep. *Small Rumin. Res.* 100, 184–188. <http://dx.doi.org/10.1016/j.smalrumres.2011.05.014>.
- Aline, F., Bout, D., Dimier-Poisson, I., 2002. Dendritic cells as effector cells: gamma interferon activation of murine dendritic cells triggers oxygen-dependent inhibition of *Toxoplasma gondii* replication. *Infect. Immun.* 70, 2368–2374. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.70.5.2368>.
- Allen, P.C., 1997. Nitric oxide production during *Eimeria tenella* infections in chickens. *Poult. Sci.* 76, 810–813.
- Andrews, A.H., 2013. Some aspects of coccidiosis in sheep and goats. *Small Rumin. Res.* 110, 93–95. <http://dx.doi.org/10.1016/j.smalrumres.2012.11.011>.
- Badria, F.A., Ibrahim, A.S., Badria, A.F., Elmarakby, A.A., 2015. Curcumin attenuates iron accumulation and oxidative stress in the liver and spleen of chronic iron-overloaded rats. *PLoS One* 10, e0134156. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0134156>.
- Barbosa, B.F., Lopes-Maria, J.B., Gomes, A.O., Angeloni, M.B., Castro, A.S., Franco, P.S., Fermino, M.L., Roque-Barreira, M.C., Jetta, F., Martins-Filho, O.A., Silva, D.A.O., Mineo, J.R., Ferro, E.A.V., 2015. IL10, TGF beta1, and IFN gamma modulate intracellular signaling pathways and cytokine production to control *Toxoplasma gondii* infection in BeWo trophoblast cells. *Biol. Reprod.* 92, 82. <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod.114.124115>.
- Behrendt, J.H., Hermosilla, C., Hardt, M., Failing, K., Zahner, H., Taubert, A., 2008. PMN-mediated immune reactions against *Eimeria bovis*. *Vet. Parasitol.* 151, 97–109. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.11.013>.
- Burke, J.M., Miller, J.E., Terrill, T.H., Orlik, S.T., Acharya, M., Garza, J.J., Mosjidis, J.A., 2013. Sericea lespedeza as an aid in the control of *Eimeria* spp. in lambs. *Vet. Parasitol.* 193, 39–46. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.11.046>.
- Cardoso, G.C., Veitía, N., 2008. Aplicación de métodos de comparaciones múltiples en biotecnología vegetal. *Biotechnol. Veg.* 8, 67–71.
- Catanzaro, D., Rancan, S., Orso, G., Dall'Acqua, S., Brun, P., Giron, M.C., Carrara, M., Castagliuolo, I., Ragazzi, E., Caparrotta, L., Montopoli, M., 2015. *Boswellia serrata* preserves intestinal epithelial barrier from oxidative and inflammatory damage. *PLoS One* 10, 15. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0125375>.
- Catchpole, J., Norton, C.C., Gregory, M.W., 1993. Immunisation of lambs against coccidiosis. *The Veterinary Record*. <http://dx.doi.org/10.1136/vr.132.3.56>.
- Cervantes-Valencia, M.E., Alcala-Canto, Y., Salem, A.Z.M., Kholif, A.E., Ducuing-Watty, A.M., Bernad-Bernad, M.J., Gutierrez-Olvera, C., 2015. Influence of curcumin (*Curcuma longa*) as a natural anticoccidial alternative in adult rabbits: first results. *Ital. J. Anim. Sci.* 14(3). <http://dx.doi.org/10.4081/ijas.2015.3838>.

- Chan, M.M., Huang, H.L., Fenton, M.R., Fong, D., 1998. *In vivo* inhibition of nitric oxide synthase gene expression by curcumin, a cancer preventive natural product with anti-inflammatory properties. *Biochem. Pharmacol.* 55, 1955–1962.
- Chartier, C., Paraud, C., 2012. Coccidiosis due to *Eimeria* in sheep and goats: a review. *Small Rumin. Res.* 103, 84–92, <http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2011.10.022>.
- Chattopadhyay, I., Biswas, K., Bandyopadhyay, U., Banerjee, R.K., 2004. Turmeric and curcumin: biological actions and medicinal applications. *Curr. Sci.* 87, 44–53, ISSN 0011–3891.
- Chinedum, E., Kate, E., Soria, C., Ironkwe, A., Andrew, I., 2015. Polyphenolic composition and antioxidant activities of 6 new turmeric (*Curcuma longa* L.) accessions. *Recent Pat. Food. Nutr. Agric.* 7, 22–27.
- Cho, J.A., Park, E., 2015. Curcumin utilizes the anti-inflammatory response pathway to protect the intestine against bacterial invasion. *Nutr. Res. Pract.* 9, 117, <http://dx.doi.org/10.4162/nrp.2015.9.2.117>.
- Chow, Y.-P., Wan, K.-L., Blake, D.P., Tomley, F., Nathan, S., 2011. Immunogenic *Eimeria tenella* glycosylphosphatidylinositol-anchored surface antigens (SAGs) induce inflammatory responses in avian macrophages. *PLoS One* 6, e25233, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0025233>.
- Cohen, S.B., Denkers, E.Y., 2015. The gut mucosal immune response to *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunol.* 37, 108–117, <http://dx.doi.org/10.1111/pim.12164>.
- Cornelissen, J.B.W.J., Swinkels, W.J.C., Boersma, W.A., Rebel, J.M.J., 2009. Host response to simultaneous infections with *Eimeria acervulina*, *maxima* and *tenella*: a cumulation of single responses. *Vet. Parasitol.* 162, 58–66, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.02.001>.
- da Silva, N.R., Miller, J.E., 1991. Survey of *Eimeria* spp. oocysts in faeces from Louisiana State University ewes. *Vet. Parasitol.* 40 (1–2), 147–150.
- Duan, W., Yang, Y., Yan, J., Yu, S., Liu, J., Zhou, J., Zhang, J., Jin, Z., Yi, D., 2012. The effects of curcumin post-treatment against myocardial ischemia and reperfusion by activation of the JAK2/STAT3 signaling pathway. *Basic Res. Cardiol.* 107, 263, <http://dx.doi.org/10.1007/s00395-012-0263-7>.
- El-Bahr, S.M., 2015. Effect of curcumin on hepatic antioxidant enzymes activities and gene expressions in rats intoxicated with aflatoxin B1. *Phyther. Res.* 140, 134–140.
- Fan, Z., Yao, J., Li, Y., Hu, X., Shao, H., Tian, X., 2015. Anti-inflammatory and antioxidant effects of curcumin on acute lung injury in a rodent model of intestinal ischemia reperfusion by inhibiting the pathway of NF- κ B. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 8, 3415–3459.
- Fattori, V., Pinho-Ribeiro, F.A., Borghi, S.M., Alves-Filho, J.C., Cunha, T.M., Cunha, F.Q., Casagrande, R., Verri, W.A., 2015. Curcumin inhibits superoxide anion-induced pain-like behavior and leukocyte recruitment by increasing NF κ B expression and reducing NF- κ B activation. *Inflamm. Res.* 64, 993–1003, <http://dx.doi.org/10.1007/s00011-015-0885-y>.
- Gao, X., Kuo, J., Jiang, H., Deeb, D., Liu, Y., Divine, G., Chapman, R.A., Dulchavsky, S.A., Gautam, S.C., 2004. Immunomodulatory activity of curcumin: suppression of lymphocyte proliferation, development of cell-mediated cytotoxicity, and cytokine production *in vitro*. *Biochem. Pharmacol.* 68, 51–61, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2004.03.015>.
- García-Niño, W.R., Zatarain-Barrón, Z.L., Hernández-Pardo, R., Vega-García, C.C., Tapia, E., Pedraza-Chaverri, J., 2015. Oxidative stress markers and histological analysis in diverse organs from rats treated with a hepatotoxic dose of Cr(VI): effect of curcumin. *Biol. Trace Elem. Res.* 130–145, <http://dx.doi.org/10.1007/s12011-015-0283-x>.
- Georgieva, N.V., Gabra Shanska, M., Koinarski, V., Yaneva, Z., 2011. Zinc supplementation against *Eimeria acervulina* induced oxidative damage in broiler chickens. *Vet. Med. Int.* 647124, <http://dx.doi.org/10.4061/2011/647124>.
- Georgieva, N.V., Koinarski, V., Gadjeva, V., 2006. Antioxidant status during the course of *Eimeria tenella* infection in broiler chickens. *Vet. J.* 172, 488–492, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2005.07.016>.
- Gordon, H.M., Whitlock, H.V., 1999. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. *J. Coun. Sci. Ind. Res.* 12, 50–52.
- Haritova, A.M., Stanilova, S.A., 2012. Enhanced expression of IL-10 in contrast to IL-12B mRNA in poultry with experimental coccidiosis. *Exp. Parasitol.* 132, 378–382, <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2012.08.017>.
- He, Y., Yue, Y., Zheng, X., Zhang, K., Chen, S., Du, Z., 2015. Curcumin, inflammation, and chronic diseases: how are they linked? *Molecules* 20, 9183–9213, <http://dx.doi.org/10.3390/molecules20069183>.
- Hering, N.A., Fromm, M., Schulze, J.-D., 2011. Determinants of colonic barrier function in inflammatory bowel disease and potential therapeutics. *J. Physiol.* 590, 1035–1044, <http://dx.doi.org/10.1113/jphysiol.2011.224568>.
- Hermosilla, C., Bürger, H.J., Zahner, H., 1999. T cell responses in calves to a primary *Eimeria bovis* infection: phenotypical and functional changes. *Vet. Parasitol.* 84, 49–64, [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017\(99\)00075-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017(99)00075-8).
- Hermosilla, C., Ruiz, A., Taubert, A., 2012. *Eimeria bovis*: an update on parasite-host cell interactions. *Ink. J. Med. Microbiol.* 302, 210–215, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jimm.2012.07.002>.
- Hermosilla, C., Zahner, H., Taubert, A., 2006. *Eimeria bovis* modulates adhesion molecule gene transcription in and PMN adhesion to infected bovine endothelial cells. *Int. J. Parasitol.* 36, 423–431, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.01.001>.
- Hörak, P., Saks, L., Kanu, U., Ots, I., Surai, P.F., McGraw, K.J., 2004. How coccidian parasites affect health and appearance of greenfinches. *J. Anim. Ecol.* 73, 935–947, <http://dx.doi.org/10.1111/j.0021-8790.2004.00870.x>.
- ICH Guideline Q2 (R1), Validation of analytical procedures: text and methodology, November 2005.
- Jäger, R., Lowery, R.P., Calvanese, A.V., Joy, J.M., Purpura, M., Wilson, J.M., 2014. Comparative absorption of curcumin formulations. *Nutr. J.* 24, <http://dx.doi.org/10.1185/1475-2891-13-11>, 13:11.
- Jankovic, D., Kugler, D.G., Sher, A., 2010. IL-10 production by CD4+ effector T cells: a mechanism for self-regulation. *Mucosal Immunol.* 3, 239–246, <http://dx.doi.org/10.1038/mi.2010.8>.
- Jiang, H., Wang, Z., Wang, Y., Xie, K., Zhang, Q., Luan, Q., Chen, W., Liu, D., 2013. Antidepressant-like effects of curcumin in chronic mild stress of rats: involvement of its anti-inflammatory action. *Prog. Neuro-psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 47, 33–39, <http://dx.doi.org/10.1016/j.pnpb.2013.07.003>.
- Jiang, J.-L., Li, Z.-D., Zhang, H., Li, Y., Zhang, X.-H., Yuan, Y., Yuan, Y., 2014. Feature selection for the identification of antitumor compounds in the alcohol extracts of *Curcuma longa*. *Planta Med.* 80, 1036–1044, <http://dx.doi.org/10.1055/s-0034-1382951>.
- Khalafalla, R.E., Müller, U., Shahiduzzaman, M., Dyachenko, V., Desouky, A.Y., Alber, C., Dauschies, A., 2011. Effects of curcumin (diiferuloylmethane) on *Eimeria tenella* sporozoites *in vitro*. *Parasitol. Res.* 108, 879–886, <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-010-2129-y>.
- Kim, D.K., Lillehoj, H.S., Lee, S.H., Jang, S.I., Lillehoj, E.P., Bravo, D., 2013. Dietary *Curcuma longa* enhances resistance against *Eimeria animada* and *Eimeria tenella* infections in chickens. *Poult. Sci.* 92, 2635–2643.
- Kommuru, D.S., Barker, T., Desai, S., Burke, J.M., Ramsay, A., Mueller-Harvey, I., Miller, J.E., Mosjidis, J., Kamisetti, N., Terrill, T.H., 2014. Use of pelleted sericea lespedeza (*Lespedeza cuneata*) for natural control of coccidia and gastrointestinal nematodes in weaned goats. *Vet. Parasitol.* 204, 191–198, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.04.017>.
- Kosior-Korzecka, U., Ducci, M., Martelli, F., Bobowiec, R., 2008. Leptin influences histidine dipeptides and nitric oxide release from anterior pituitary cells of sheep *in vitro*. *J. Physiol. Pharmacol.* 59 (Suppl. 9), 19–27.
- Kwong, L.S., Hope, J.C., Thom, M.L., Sopp, P., Duggan, S., Bembridge, G.P., Howard, C.J., 2002. Development of an ELISA for bovine IL-10. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 85, 213–223, [http://dx.doi.org/10.1016/S0165-2427\(02\)00007-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0165-2427(02)00007-7).
- Lykken, J.M., Candiano, M.K., Tedder, T.F., 2015. Regulatory B10 cell development and function. *Int. Immunol.* 27, 471–477.
- Magombedze, G., Eda, S., Stabel, J., 2015. Predicting the role of IL-10 in the regulation of the adaptive immune responses in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infections using mathematical models. *PLoS One* 10, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0141539>, e0141539.
- Nagajyothi, F., Zhao, D., Weiss, L., Tanowitz, H., 2012. Curcumin treatment provides protection against *Trypanosoma cruzi* infection. *Parasitol. Res.* 2491–2499, <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-011-2790-9>.
- Nweze, N.E., Obiwulu, I.S., 2009. Anticoccidial effects of *Ageratum conyzoides*. *J. Ethnopharmacol.* 122, 6–9, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2008.11.014>.
- Pagliari, B., Santolamazza, C., Simonelli, F., Rubattu, S., 2015. Phytochemical compounds and protection on cardiovascular diseases: a state of the art. *Biomed. Res. Int.* 2015, 1–17, <http://dx.doi.org/10.1155/2015/918069>.
- Peek, H.W., Halkes, S.B., Mes, J.J., Landman, W.J., 2013. *In vivo* screening of four phytochemical extracts and a fungal immunomodulatory protein against an *Eimeria acervulina* infection in broilers. *Vet. Q.* 33, 132–138, <http://dx.doi.org/10.1080/01652176.2013.844378>.
- Plain, K.M., Begg, D.J., de Silva, K., Purdie, A.C., Whittington, R.J., 2012. Enhancement of the interferon gamma assay to detect paratuberculosis using interleukin-7 and interleukin-12 potentiation. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 149(1–2), 28–37, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2012.05.023>.
- Prowse, S.J., Michalski, W.P., Fahy, K.J., 1992. Enhanced H₂O₂ release from immune chicken leucocytes following infection with *Eimeria tenella*. *Immunol. Cell Biol.* 70 (Pt. 1), 41–48, <http://dx.doi.org/10.1038/icb.1992.6>.
- Rajput, N.A., Saeed, M., Khan, M.A., Wang, T., 2014. The effect of dietary supplementation with the natural carotenoids curcumin and lutein on pigmentation, oxidative stability and quality of meat from broiler chickens affected by a coccidiosis challenge. *Br. Poult. Sci.* 1–9, <http://dx.doi.org/10.1080/00071668.2014.925537>.
- Ramos, A., Laguna, I., Martín de Lucía, M.-L., Martín-Palmino, P., Regodón, S., Míguez, M.-P., 2010. Evolution of oxidative/nitrosative stress biomarkers during an open-field vaccination procedure in sheep: effect of melatonin. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 133, 16–24, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2009.06.016>.
- Ramsewak, R.S., DeWitt, D.L., Nair, M.G., 2000. Cytotoxicity, antioxidant and anti-inflammatory activities of curcumin I-III from *Curcuma longa*. *Phytochemistry* 7, 303–308, [http://dx.doi.org/10.1016/S0944-7113\(00\)00048-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0944-7113(00)00048-3).
- Reddy, R.C., Vatsala, P.G., Keshamoni, V.G., Padmanaban, G., Rangarajan, P.N., 2005. Curcumin for malaria therapy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 326, 472–474, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.11.051>.
- Said, D.E., Elsamad, L.M., Gohar, Y.M., 2012. Validity of silver, chitosan, and curcumin nanoparticles as anti-giardia agents. *Parasitol. Res.* 111, 545–554, <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-012-2866-1>.
- Saratsis, A., Joachim, A., Alexandros, S., Sotiraki, S., 2011. Lamb coccidiosis dynamics in different dairy production systems. *Vet. Parasitol.* 181, 131–138, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.04.027>.
- Saratsis, A., Regos, I., Tsanidakis, N., Voutzourakis, N., Stefanakis, A., Treuter, D., Joachim, A., Sotiraki, S., 2012. *In vivo* and *in vitro* efficacy of sainfoin

- (*Orobrydhis viduifolia*) against *Eimeria* spp. in lambs. *Vet. Parasitol.* 188, 1–9, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.03.014>.
- Sears, B.F., Rohr, J.R., Allen, J.E., Martin, L.B., 2011. The economy of inflammation: when is less more? *Trends Parasitol.* 27, 382–387, <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2011.05.004>.
- Shahiduzzaman, M., Dyachenko, V., Khalafalla, R.E., Desouky, A.Y., Dauschies, A., 2009. Effects of curcumin on *Cryptosporidium parvum* in vitro. *Parasitol. Res.* 105, 1155–1161, <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-009-1535-5>.
- Sharma, K., Agrawal, S.S., Gupta, M., 2012. Development and validation of uv spectrophotometric method for the estimation of curcumin in bulk drug and pharmaceutical dosage forms. *Int. J. Drug Dev. Res.* 4, 375–380.
- Sikl, E., Sepp, T., Münniste, M., Hörak, P., 2011. Carotenoid intake does not affect immune-stimulated oxidative burst in great reedfinches. *J. Exp. Biol.* 214, 3467–3473, <http://dx.doi.org/10.1242/jeb.062182>.
- Simons, M.J.P., Cohen, A.A., Verhulst, S., 2012. What does carotenoid-dependent coloration tell? Plasma carotenoid level signals immunocompetence and oxidative stress state in birds—a meta-analysis. *PLoS One* 7, e43088, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0043088>.
- Sühwold, A., Hermosilla, C., Seeger, T., Zahner, H., Taubert, A., 2010. T cell reactions of *Eimeria bovis* primary and challenge-infected calves. *Parasitol. Res.* 106, 595–605, <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-009-1705-5>.
- Sumanoont, Y., Murakami, Y., Tohda, M., Vajragupta, O., Matsumoto, K., Watanabe, H., 2004. Evaluation of the nitric oxide radical scavenging activity of manganese complexes of curcumin and its derivative. *Biol. Pharm. Bull.* 27, 170–173, <http://dx.doi.org/10.1248/bpb.27.170>.
- Taubert, A., Hermosilla, C., 2008. Bovine recombinant IFN γ induces endothelial cell gene transcription of immunoregulatory molecules and upregulates PMN and PBMC adhesion on bovine endothelial cells. *Vet. Res. Commun.* 32, 35–47, <http://dx.doi.org/10.1007/s11259-007-9001-2>.
- Taubert, A., Behrendt, J.H., Sühwold, A., Zahner, H., Hermosilla, C., 2009. Monocyte- and macrophage-mediated immune reactions against *Eimeria bovis*. *Vet. Parasitol.* 164, 141–153, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.06.003>.
- Taubert, A., Hermosilla, C., Sühwold, A., Zahner, H., 2008. Antigen-induced cytokine production in lymphocytes of *Eimeria bovis* primary and challenge infected calves. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 126, 309–320, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.09.003>.
- Taubert, A., Zahner, H., Hermosilla, C., 2007. *Eimeria bovis* infection enhances adhesion of peripheral blood mononuclear cells to and their transmigration through an infected bovine endothelial cell monolayer in vitro. *Parasitol. Res.* 101, 591–598, <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-007-0517-8>.
- Tewari, A.K., Maharana, B.R., 2011. Control of poultry coccidiosis: changing trends. *J. Parasit. Dis.* 35, 10–17, <http://dx.doi.org/10.1007/s12639-011-0034-7>.
- Tonin, A.A., Weber, A., Ribeiro, A., Camillo, G., Vogel, F.F., Moura, A.B., Bochi, G.V., Moresco, R.N., Da Silva, A.S., 2015. Serum levels of nitric oxide and protein oxidation in goats seropositive for *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 41, 55–58, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cimid.2015.05.002>.
- Trujillo, J., Chirino, Y.I., Molina-Jijón, E., Andérica-Romero, A.C., Tapia, E., Pedraza-Chaverri, J., 2013. Renoprotective effect of the antioxidant curcumin: recent findings. *Redox Biol.* 1, 448–456, <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2013.09.003>.
- Ul Hassan, H., Murad, W., Tariq, A., Ahmad, A., 2014. Ethnoveterinary study of medicinal plants in Malakand Valley, District Dir (Lower), Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan. *Ir. Vet. J.* 67 (1), 1–6, <http://dx.doi.org/10.1186/2046-0481-67-6>.
- Veira, L. da S., 2002. Eimeriose de pequenos ruminantes—panorama da pesquisa no Nordeste do Brasil.pdf.
- Xun, W., Shi, L., Zhou, H., Hou, G., Cao, T., Zhao, C., 2015. Effects of curcumin on growth performance, jejunal mucosal membrane integrity, morphology and immune status in weaned piglets challenged with enterotoxigenic *E. coli*. *Int. Immunopharmacol.* 27, 46–52, <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2015.04.038>.
- Yadav, S.K., Adhikary, B., Bandyopadhyay, S.K., Chattopadhyay, S., 2013. Inhibition of TNF- α , and NF- κ B and JNK pathways accounts for the prophylactic action of the natural phenolic, allylpyrocatechol against indomethacin gastropathy. *Biochim. Biophys. Acta* 1830, 3776–3786, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.03.013>.
- Yarru, L.P., Settivar, R.S., Gowda, N.K.S., Antoniou, E., Ledoux, D.R., Rottinghaus, G.E., 2009. Effects of turmeric (*Curcuma longa*) on the expression of hepatic genes associated with biotransformation, antioxidant, and immune systems in broiler chicks fed aflatoxin. *Poult. Sci.* 88, 2620–2627, <http://dx.doi.org/10.3382/ps.2009-00204>.
- Zhong, K., 2015. Curcumin mediates a protective effect via TLR-4/NF- κ B signaling pathway in rat model of severe acute pancreatitis. *Cell Biochem. Biophys.*, <http://dx.doi.org/10.1007/s12013-015-0664-y>.
- Zhou, Y., Zhang, T., Wang, X., Wei, X., Chen, Y., Guo, L., Zhang, J., Wang, C., 2015. Curcumin modulates macrophage polarization through the inhibition of the toll-like receptor 4 expression and its signaling pathways. *Cell. Physiol. Biochem.* 36, 631–641, <http://dx.doi.org/10.1159/000430126>.

7.3. Estudios *in vitro*

7.3.1. Efecto del polvo de *Curcuma longa* (producto comercial) y la curcumina (Sigma-Aldrich ®) sobre los esporozoitos de *E. bovis*.

7.3.2. Efecto de la *Curcuma longa* sobre la viabilidad de los esporozoitos de *E. bovis*

En los esporozoitos incubados durante 24 h se presentó una mortalidad mayor al 50% en el grupo control, ya que el tiempo de incubación fue muy largo, pero aún así, se observa una mayor mortalidad en los esporozoitos tratados con *C. longa*. Las tres dosis utilizadas (0.02 g, 0.04 g y 0.08 g) presentaron efecto letal dosis-dependiente. La DL₅₀, DL₉₀ y DL₉₉ bajo estas condiciones de incubación; fueron de 0.018 g, 0.032 g y 0.051 g respectivamente (anexo 2). Los resultados del porcentaje de mortalidad de los esporozoitos de *E. bovis* ocasionada por el polvo de *C. longa* y el grupo control incubados por 24 h, así como las dosis letales con sus límites inferiores y superior se presentan en el Cuadro 10. En la Figura 13 se presentan las respuestas transformadas por PROBIT.

Por otro lado, los esporozoitos incubados durante 4 horas se presentó una mortalidad del 31.11% en el grupo control, mientras, los esporozoitos tratados con 0.02 g y 0.04 g de polvo de *C. longa* mostraron una mortalidad mayor al 50%. Las dos dosis utilizadas (0.02 g y 0.04 g) del polvo de *C. longa* presentaron un efecto letal dosis-dependiente. La DL₅₀, DL₉₀ y DL₉₉ bajo estas condiciones de incubación fueron de 0.017 g, 0.07 g y 0.11 g, respectivamente (anexo 3). En el Cuadro 11 se presentan los porcentajes de mortalidad de los esporozoitos de *E. bovis* tratados con el polvo de *C. longa* (0.02 g y 0.04 g) y el grupo control, así como las dosis letales con sus límites superiores e inferiores. En la Figura 14 se presentan las respuestas transformadas por PROBIT .

Cuadro 10. Porcentaje de mortalidad de los esporozoitos de *E. bovis* incubados durante 24 h con diferentes dosis de *C. longa*

	Dosis (g)	Porcentaje de mortalidad	DL ₅₀ (g) (LI, LS)	DL ₉₀ (g) (LI, LS)	DL ₉₉ (g) (LI, LS)	X ² (P)
Control	0	51.96				
	0.02	59.90	0.018	0.032	0.051	2.030
<i>C. longa</i>	0.04	78.88	(0.016, 0.019)	(0.030, 0.035)	(0.045, 0.062)	(0.73)
	0.08	96.23				

µM: micro Molar; DL: Dosis letal, LI: Límite inferior, LS: Límite superior.

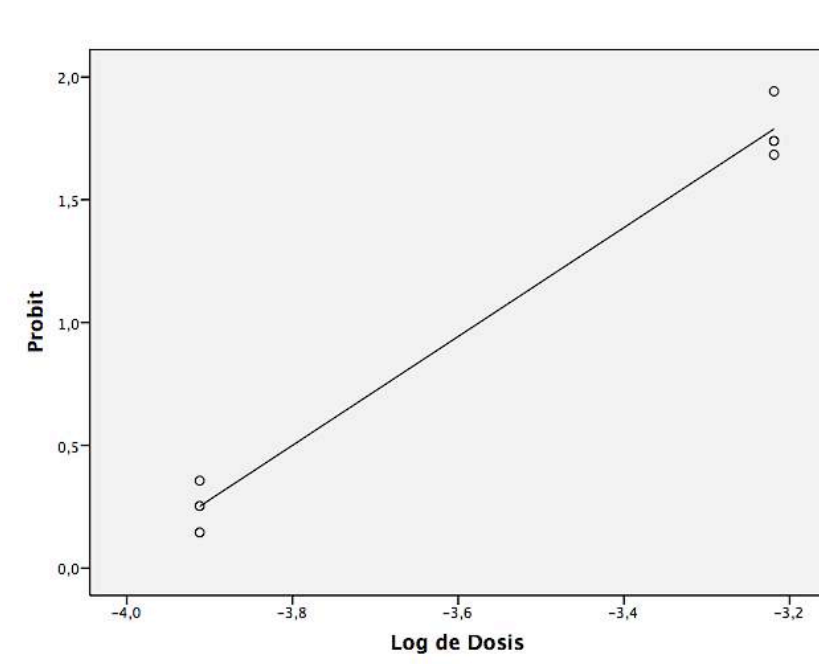


Figura 13. Respuestas transformadas por PROBIT. Esporozoitos de *E. bovis* incubados durante 24 h con polvo de *C. longa*.

Cuadro 11. Porcentaje de mortalidad de los esporozoitos de *E. bovis* incubados durante 4 h con dos diferentes dosis de *C. longa*.

	Dosis (g)	Porcentaje de mortalidad	DL ₅₀ (g) (LI, LS)	DL ₉₀ (g) (LI, LS)	DL ₉₉ (g) (LI, LS)	X ² (P)
Control	0	31.11	0.01	0.07	0.11	8.78
<i>C. longa</i>	0.02	57.70	(0.006, 0.02)	(0.05, 0.11)	(0.08, 0.20)	(0.55)
	0.04	66.69				

µM: micro Molar; DL: Dosis letal, LI: Límite inferior, LS: Límite superior.

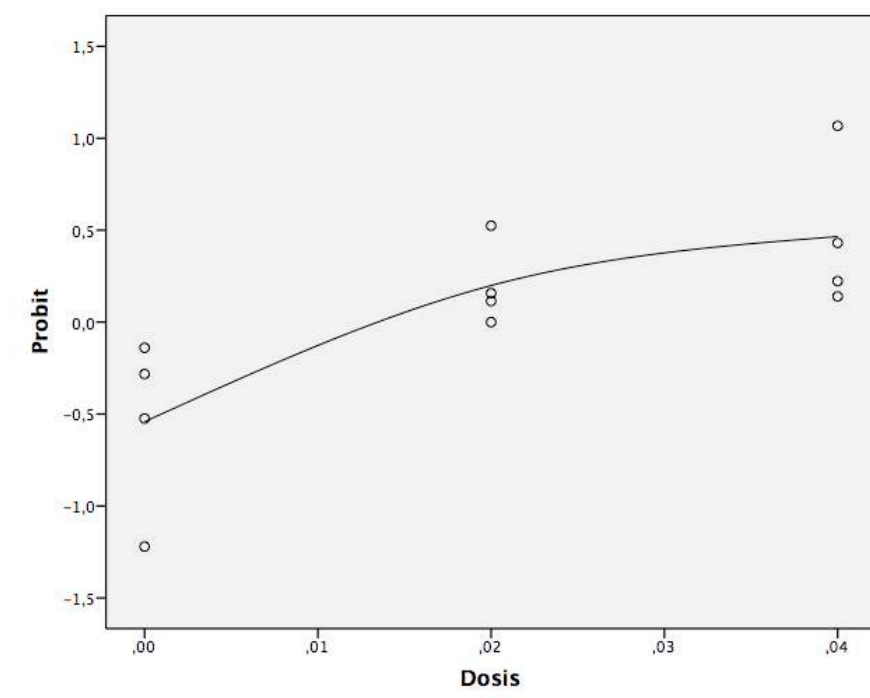


Figura 14. Respuestas transformadas por PROBIT. Esporozoitos de *E. bovis* incubados durante 4 h con polvo de *C. longa*.

7.3.3. Ensayo de viabilidad de los esporozoitos de *E. bovis* y curcumina (Sigma-Aldrich ®)

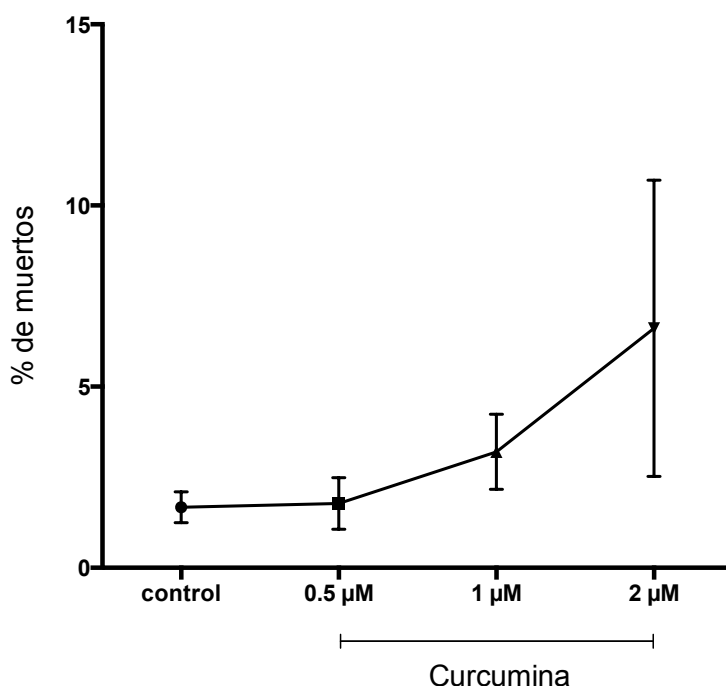
Se presentó una mortalidad menor al 2% en el grupo control, mientras que en los grupos tratados con curcumina (dosis utilizadas 0.05 µM, 1 µM y 2 µM) presentaron una mortalidad no mayor al 6.6% con un efecto letal dosis-dependiente. La DL₅₀, DL₉₀ y DL₉₉ bajo estas condiciones de incubación fueron de 45,758.129 µM (0.45 Molar), 147,304,716.710 µM (147 Molar) y 106,644,808,388.920 µM (106, 666.8 Molar) respectivamente. Dado que las dosis utilizadas no provocaron más del 6% de mortalidad en los esporozoitos, al momento de hacer la estimación, los límites superiores e inferiores no se pudieron calcular. Los resultados del porcentaje de mortalidad y las dosis letales se presentan en el Cuadro 12. En la Figura 15 se muestran las respuestas transformadas por PROBIT (anexo 5).

Por otro lado, los esporozoitos tratados con curcumina e incubados durante 4 horas con las siguientes dosis 1 µM, 2 µM, 4 µM y 8 µM se observó una mortalidad del 11% al 50%, mientras que el grupo control y el grupo tratado con DMSO presentaron una mortalidad no mayor al 14.5%. La DL₅₀, DL₉₀ y DL₉₉ bajo estas condiciones de incubación, fueron de 6.53, 56.02 y 323.01, respectivamente. En el Cuadro 13 se muestran los porcentajes de mortalidad y las dosis letales con sus límites inferiores y superiores para cada dosis. En la Gráfica 2 se presenta el porcentaje de mortalidad de los esporozoitos tratados con curcumina y el grupo control.

Cuadro 12. Porcentaje de mortalidad de los esporozoitos de *E. bovis* incubados durante 60 min con diferentes dosis de curcumina (Sigma-Aldrich ®) y grupo control.

	Dosis (µM)	Porcentaje de mortalidad	DL ₅₀ (µM) (LI, LS)	DL ₉₀ (µM) (LI, LS)	DL ₉₉ (µM) (LI, LS)	X ² (P)
Control	0	1.68				
	0.5	1.77	45758.1	147304716.7	106,644,808,388.920	19.97
Curcumina	1	3.2	(ND,ND)	(ND, ND)	(ND, ND)	(0.06)
	2	6.61				

µM: micro Molar; DL: Dosis letal; LI: Límite inferior; LS: Límite superior; ND: no disponible.



Gráfica 2. Porcentaje de la mortalidad de los esporozoitos de *E. bovis* tratados con tres diferentes dosis de curcumina (0.5 µM, 1 µM y 2 µM) y el grupo control incubados durante 60 minutos. Se presentan las medias y su DE (desviación estándar).

Cuadro 13. Porcentaje de mortalidad de los esporozoitos de *E. bovis* incubados durante 4 h con diferentes dosis de curcumina (Sigam-Aldrich ®), DMSO y grupo control.

	Dosis (µM)	Porcentaje de mortalidad	DL ₅₀ (µM) (LI, LS)	DL ₉₀ (µM) (LI, LS)	DL ₉₉ (µM) (LI, LS)	X ² (P)
Control	0	14.53				
	DMSO	11.11				
Curcumina	1	8.93	6.53	56.02	323.01	3.86 (0.95)
	2	27.78	(4.06, 21.78)	(18.46, 5576.69)	(55.62, 584597.12)	
	4	38.21				
	8	54.81				

µM: micro Molar; DL: Dosis letal, LI: Límite inferior, LS: Límite superior.

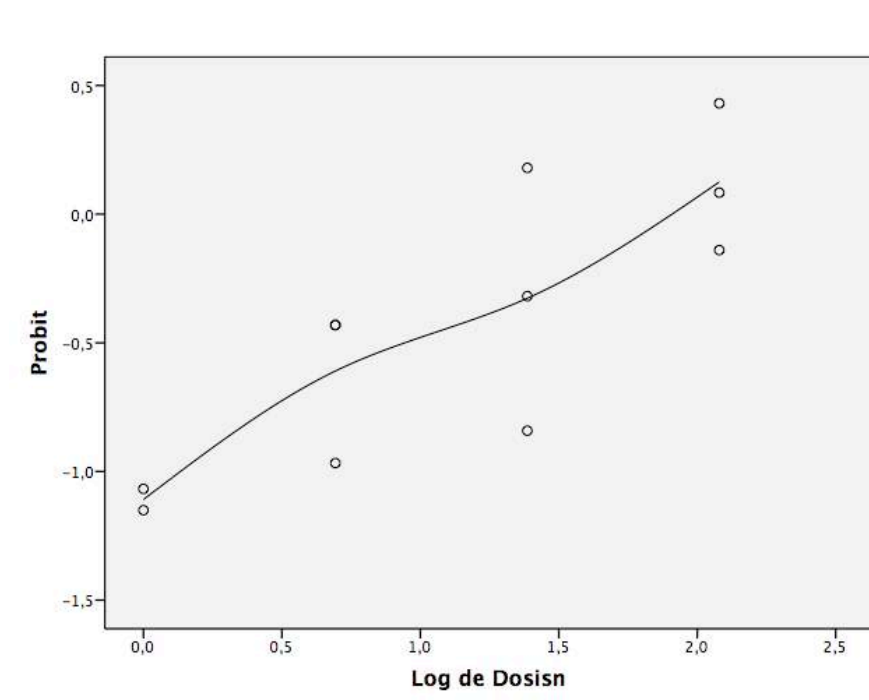
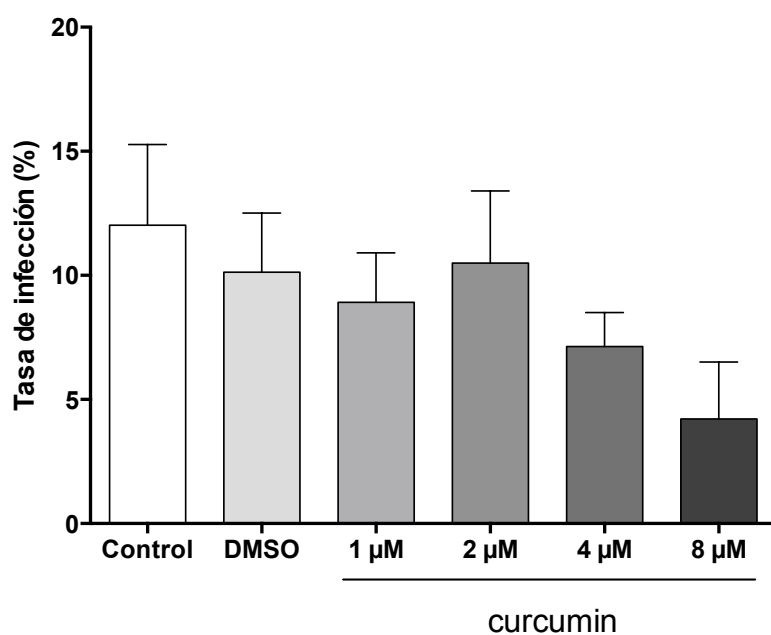


Figura 15. Respuestas transformadas por PROBIT. Esporozoitos de *E. bovis* incubados durante 4 hrs con curcumina (Sigma-Aldrich ®).

7.3.4. Tasa de infección de esporozoitos de *E. bovis* tratados con curcumina (Sigma-Aldrich ®)

Dos diferentes aislados de células BUVEC se infectaron con los esporozoitos tratados con curcumina, DMSO y no tratados (control). Las tasas de infección fueron de 4.20% (8 μ M), 7.13% (4 μ M), 10.50% (2 μ M) y 8.91% (1 μ M), mientras que los esporozoitos tratados con DMSO y el grupo control infectaron 10.13% y 12.02% de las BUVEC respectivamente (Gráfica 3). Se observaron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) entre el grupo control y el grupo que recibió la dosis de 1 μ M, mientras que los grupos que recibieron dosis de 4 μ M y 8 μ M presentaron diferencias altamente significativas ($p < 0.01$) comparadas con el grupo control. El grupo con DMSO y el que recibió la dosis de 2 μ M, no se observaron diferencias estadísticamente significativas con el grupo control. Las diferencias encontradas entre tratamientos se muestran en el Cuadro 14 (anexo 6).



Gráfica 3. Porcentaje de la tasa de infección de los esporozoitos de *E. bovis* tratados con curcumina y los grupos controles, a las 24 hpi

Cuadro 14. Medias marginales (24 hpi) de las células infectadas con esporozoitos de *E. bovis* incubados con cuatro diferentes dosis de curcumina (1 µM, 2 µM, 4 µM y 8 µM) y los grupos controles.

Dosis (µM)	Media	Error típico
Control	8.25	0.453
DMSO	6.75	0.453
1	6.33*	0.453
2	7.25	0.453
4	5.41**	0.453
8	3.16**	0.453

* Diferencias significativas $p < 0.05$, ** Diferencias altamente significativas $p < 0.01$ con la prueba de Dunnett todos contra el grupo control. $F = 6.866$; gl 5,10 $P = 0.005$ con el modelo lineal general el cual incluyó dosis (efecto fijo) y célula (efecto aleatorio).

Se tomaron fotografías a las 24 hpi, en un microscopio invertido (IX81, Olympus®), de los diferentes aislados celulares BUVEC infectados con esporozoitos de *E. bovis* por tratamiento (control, DMSO, 1 μ M, 2 μ M, 4 μ M y 8 μ M). La figura 16 ilustra el desarrollo *in vitro* de los esporozoitos de *E. bovis* tratados y no tratados con curcumina. Los esporozoitos se encuentran situados cerca del núcleo de la célula huésped.

7.3.1. Desarrollo de esporozoitos de *E. bovis* tratados con curcumina (Sigma-Aldrich ®)

Se documentó el desarrollo intracelular de los esporozoitos de *E. bovis* los días 12, 14 y 19 pi en todos los grupos tratados con curcumina y en el grupo tratado con DMSO y grupo control, hasta el día 19 se observaron merontes en todos los grupos. En las Figuras 17, 18 y 19 se ilustran el desarrollo de los merontes y la liberación de los merozoitos en los grupos tratados y no tratados con curcumina a través del tiempo.

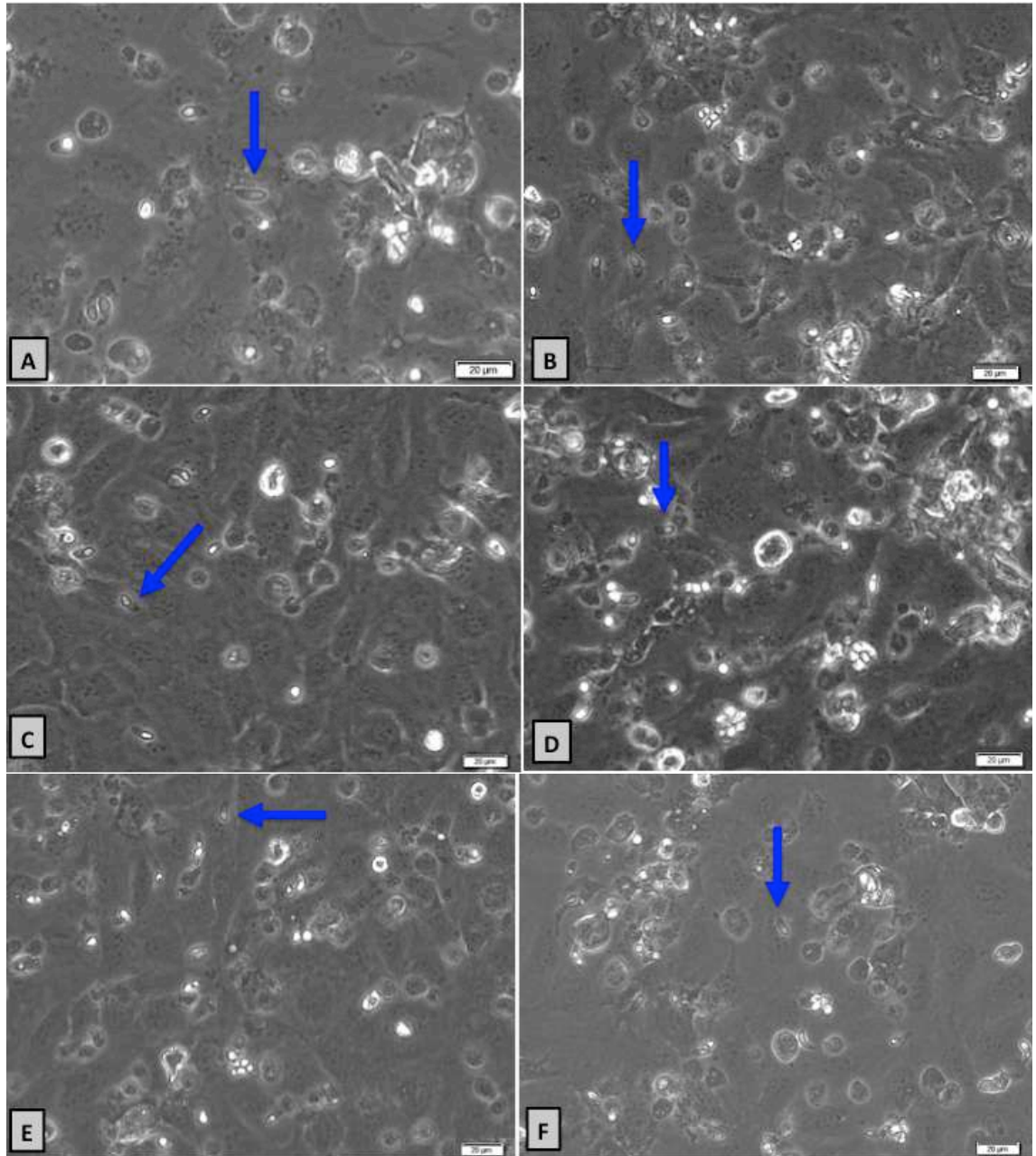


Figura 16. Tasa de infección (24 hpi) de los esporozoitos de *E. bovis* en cultivo celular BUVEC (dos diferentes aislados celulares), los esporozoitos de *E. bovis* se encuentran situados cerca del núcleo de la célula huésped (flecha azul). (A) Grupo control, (B) DMSO, (C) 1 μ M curcumina, (D) 2 μ M curcumina, (E) 4 μ M curcumina y (F) 8 μ M curcumina. La escala que se encuentra en la esquina inferior derecha de cada foto corresponde a 20 μ m (400x).

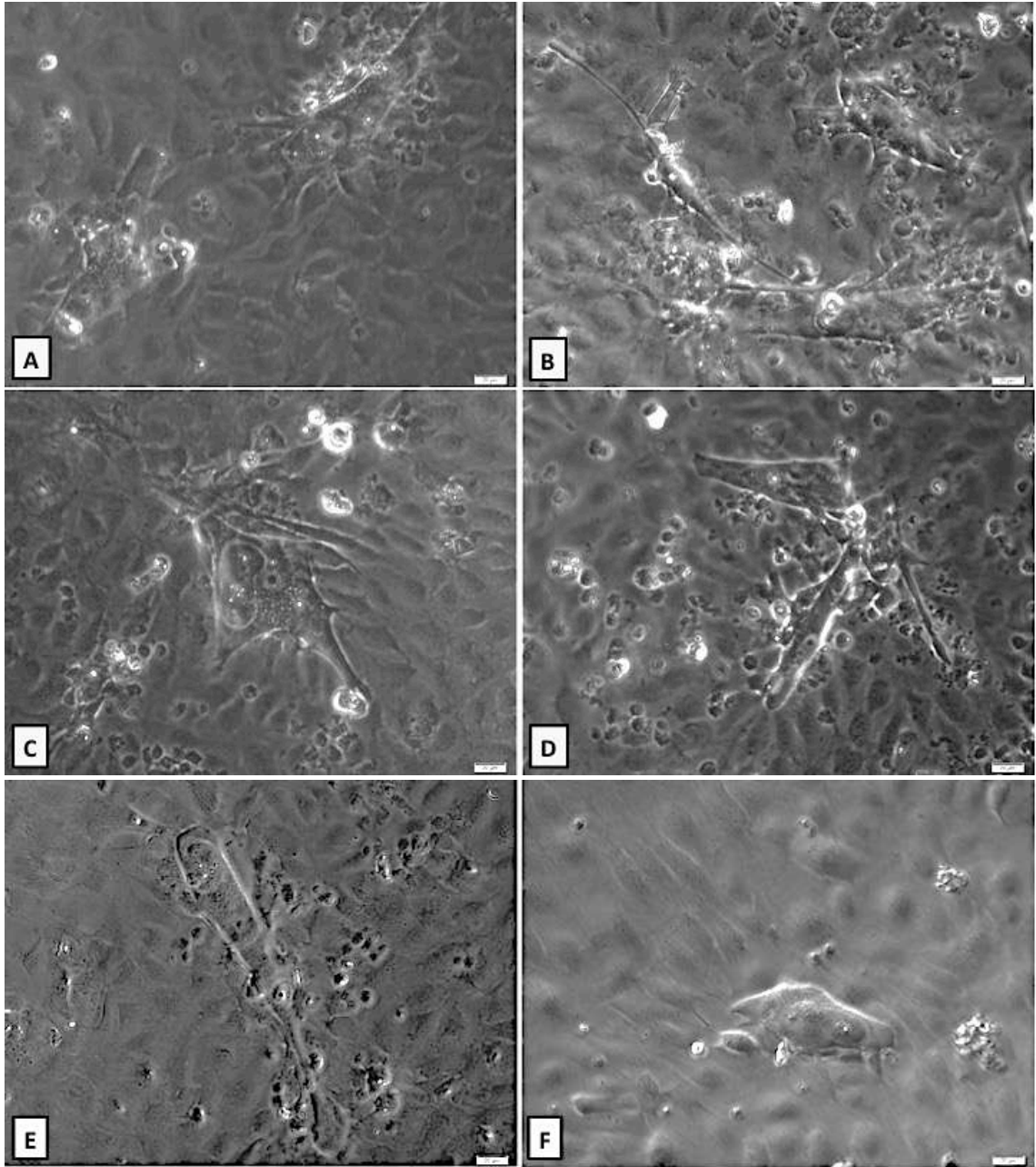


Figura 17. Células BUVEC infectadas con *E. bovis* 12 dpi. (A) Grupo control, (B) DMSO, (C) 1 μ M curcumina, (D) 2 μ M curcumina, (E) 4 μ M curcumina y (F) 8 μ M curcumina. La escala que se encuentra en la esquina inferior derecha de cada foto corresponde a 20 μ m (400x).

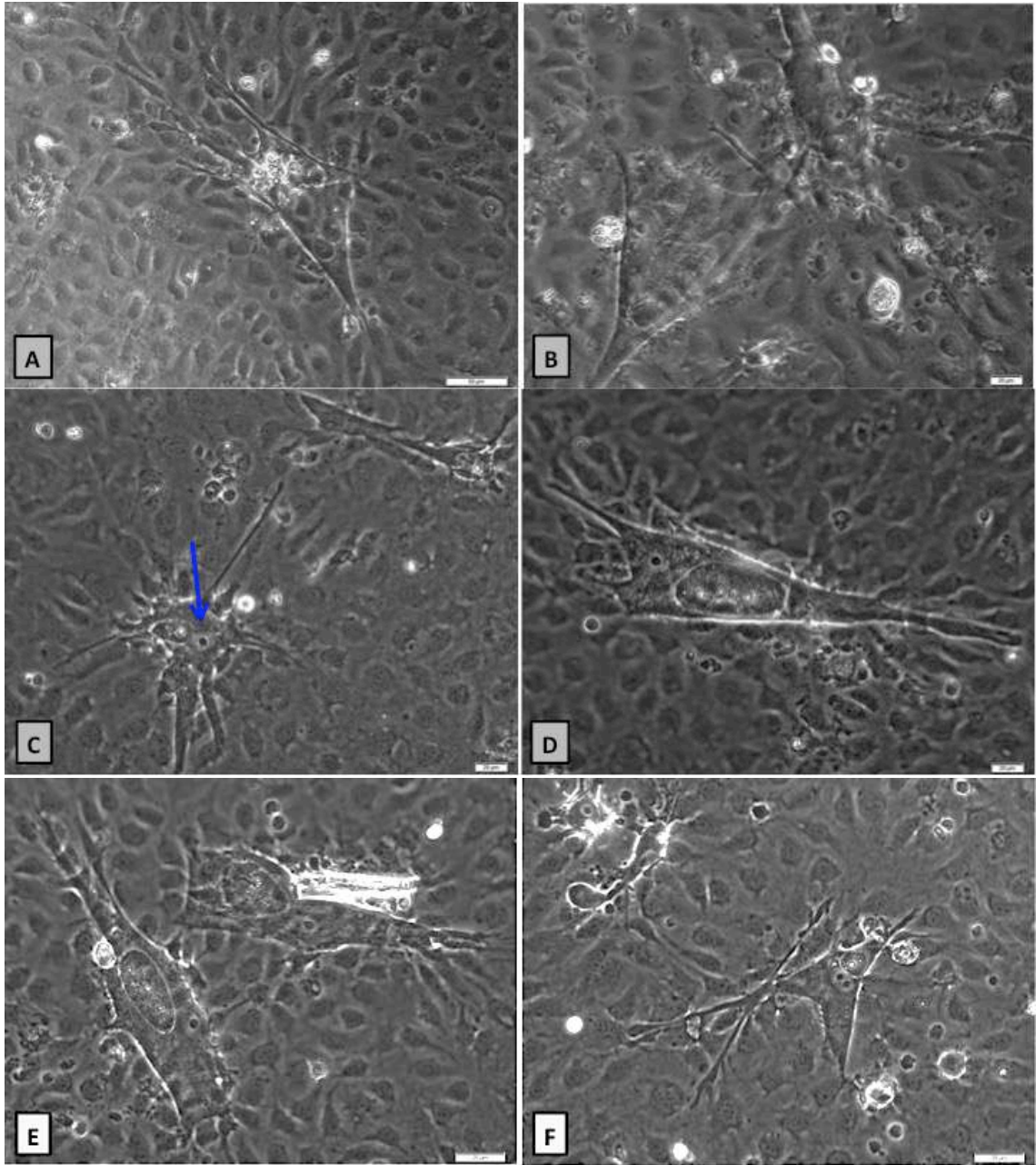


Figura 18. Células BUVEC infectadas con *E. bovis* 14 dpi., se observa alargamiento de la célula huésped y el núcleo tiene apariencia de “huevo frito” (flecha azul) (A) Grupo control, (B) DMSO, (C) 1 μM curcumina, (D) 2 μM curcumina, (E) 4 μM curcumina y (F) 8 μM curcumina. La escala que se encuentra en la esquina inferior derecha de cada foto corresponde a 20 μm (400x).

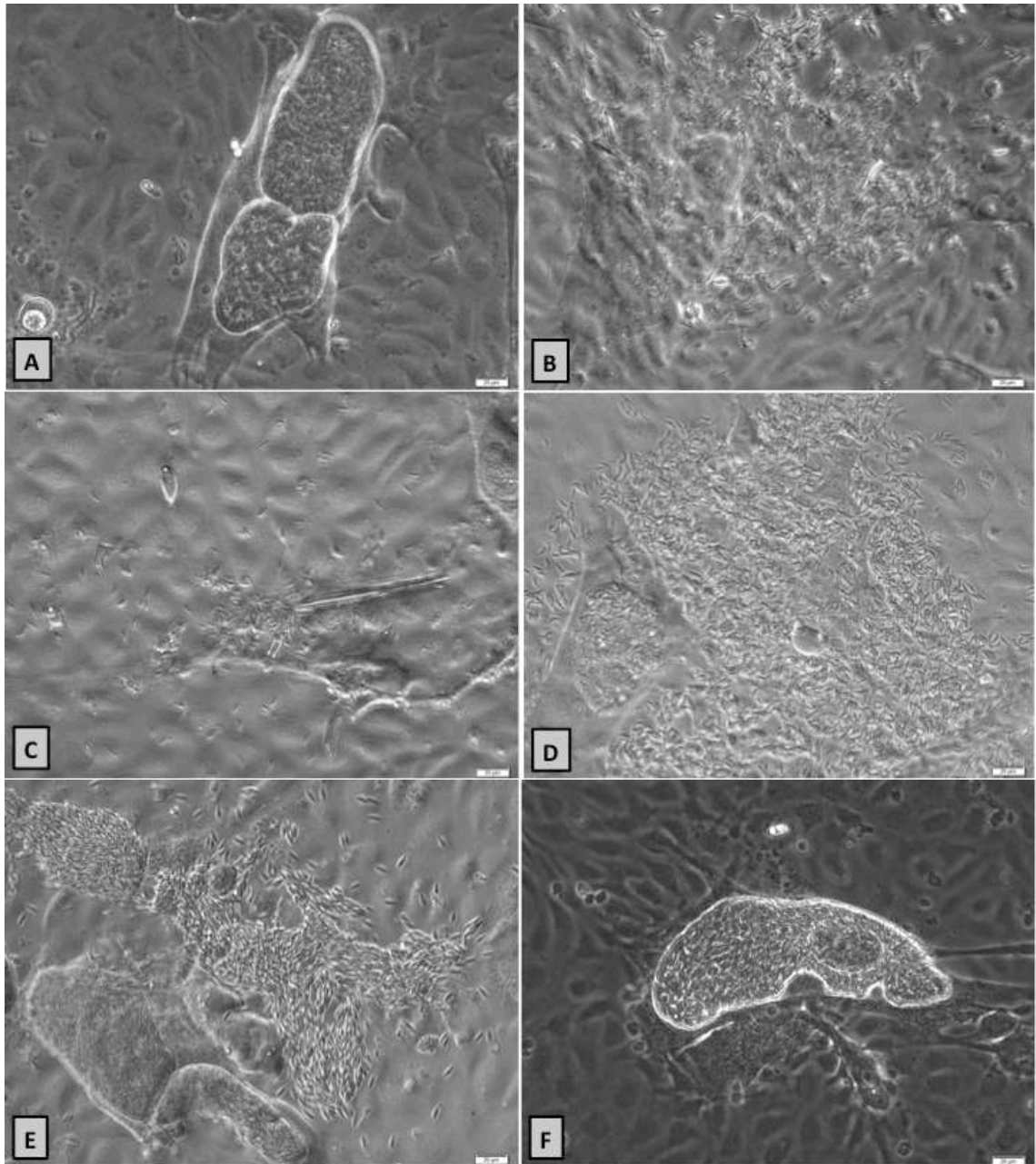


Figura 19. Células BUVEC infectadas con *E. bovis* 19 dpi. Macromerontes I y liberación de merozoitos I. (A) Grupo control, (B) DMSO, (C) 1 μM curcumina, (D) 2 μM curcumina, (E) 4 μM curcumina y (F) 8 μM curcumina. La escala que se encuentra en la esquina inferior derecha de cada foto corresponde a 20 μm (400x).

8. DISCUSIÓN GENERAL

La Eimeriosis ovina es una enfermedad que afecta principalmente a los corderos recién destetados (3-8 semanas de edad), provocando una mortalidad de hasta un 20%. En 1980 se estimaron pérdidas de hasta \$731 millones de dólares por coccidiosis en bovinos y bisontes; los factores que se consideraron en este estudio fueron: mortalidad, retraso permanente en el crecimiento (eimeriosis subclínica), gastos veterinarios y fármacos (Jolley and Bardsley, 2006). Los coccidicidas y los coccidiostatos se han usado como estrategia principal para controlar la coccidiosis ovina, el efecto que tienen estos fármacos es sobre el estadio temprano del desarrollo, incluyendo esporozoitos, merontes y merozoitos. Normalmente estos fármacos son administrados en el agua o en el alimento. Recientemente se ha limitado el uso de estos fármacos debido al mal manejo (subdosificación o sobredosificación), a los residuos que se eliminan en el medio ambiente afectando a otros organismos (ej. escarabajos peloteros), y residuos que se encuentran en la carne y en la leche del animal por no respetar el tiempo de retiro de cada fármaco (Andrews, 2013; Jolley and Bardsley, 2006). Desde el 2006, en la Unión Europea, se ha limitado estrictamente el uso de anticoccidianos químicos como aditivos en el alimento, y han propuesto para el 2021 prohibirlos en su totalidad (Muthamilselvan et al., 2016; Serratosa et al., 2006). Para hacer frente a esta situación, recientemente se han realizado investigaciones sobre la utilización de métodos alternativos para combatir la coccidiosis. Actualmente en el mercado existen cuatro productos a base de plantas que son utilizados como anticoccidianos, los cuales pueden ser usados como aditivos en el alimento de aves y otros animales (Muthamilselvan et al., 2016).

La cúrcuma es una especia ampliamente utilizada en la gastronomía asiática y en la medicina tradicional, lo cual ha sido motivo de muchas investigaciones. La curcumina es el principal curcuminoide que se encuentra en el rizoma de *C. longa*. La zona geográfica y las condiciones medioambientales van a determinar la cantidad de curcuminoideos, la literatura reporta que los productos comerciales contienen entre 2 y 8% de curcuminoideos (50-70% curcumina), 60-70% de carbohidratos, 8.6% de proteínas, 5-10% de grasa, 2-7% de fibra y hasta un 5% de aceites esenciales y resinas (Asghari et al., 2009; Chinedum et al., 2015). En las seis muestras analizadas se encontró en promedio un 2.4% de curcuminoideos totales, de los cuales, más del 50% de

curcuminoides correspondía a curcumina. En la determinación de los curcuminoides totales de las galletas se observó uniformidad en las unidades de dosificación, lo cual nos indica que el método de fabricación de la galleta fue el correcto. En cuanto a la estabilidad de los curcuminoides en la galleta, se recomienda que sean utilizadas dentro de los primeros 20 días después de su elaboración y mantenerlas en refrigeración. La principal vía por la cual se degrada la curcumina es por la autooxidación, ya que la curcumina empieza a degradarse cuando hay aumento de temperatura y de pH, así como presencia de oxígeno en el medio ambiente (Naksuriya et al., 2016).

La *C. longa* ha sido usada como aditivo para disminuir los efectos de la coccidiosis en aves demostrando efectos positivos incluso contra *E. acervulina* (especie patógena en pollos), disminuyendo las lesiones en el intestino (lesion score) y la eliminación de ooquistes (Khalafalla et al., 2011; Kim et al., 2013; Lee et al., 2010; Peek et al., 2013). Se ha encontrado que la suplementación de curcumina mejora la pigmentación (amarillo) y mantiene la estabilidad de almacenamiento de la carne (1 mes a -18°C y 3 días a 4°C) como resultado de la actividad antioxidante (Rajput et al., 2014). Resultados similares fueron descritos por Cervantes-Valencia et al. (2015), quienes demostraron que la administración *per os* de *C. longa* a dosis de 25 y 50 mg/kg en conejos infectados naturalmente con *Eimeria* spp. disminuye la eliminación de ooquistes. Los resultados obtenidos en el estudio *in vivo* con corderos (Cervantes-Valencia et al., 2016) se observa una disminución estadísticamente significativa en la eliminación de ooquiste entre los grupos tratados con *C. longa* (T03, T04 y T05) y los grupos controles (T01 y T02), observando una eficacia del 50% a partir del tercer día de administración de la galleta y llegando hasta el 100% a partir del día 21, esto comparado con el grupo placebo. Uno de los principales problemas que reporta el productor cuando sus animales tienen coccidiosis es la disminución de la ganancia diaria de peso, en este estudio se observó que los animales que recibieron 200 mg/kg de polvo de *C. longa* aumentaron el doble de peso comparado con el grupo no tratado, lo cual es similar a estudios realizados con pollos de engorda donde observaron que a mayor dosis los animales tienen un efecto positivo en cuanto al peso (Abbas et al., 2010; Kim et al., 2013).

Se ha descrito el mecanismo de acción de la curcumina sobre el parásito en *E. tenella*. Se ha demostrado que afecta principalmente la morfología y la viabilidad del esporozoito. Cuando nosotros incubamos a los esporozoitos con el polvo de *C. longa*

observamos una disminución en el número similar a estudios previos publicados (Khalafalla et al., 2011). La DL₅₀ se logró con la dosis más baja que se utilizó en los experimentos (0.02 g), mientras que la DL₉₀ y DL₉₉ las encontramos en las dosis de 0.04 g y 0.08 g, esto nos indica que las dosis utilizadas en el experimento tienen un efecto citotóxico sobre el esporozoito.

Cuándo se utilizó el extracto de curcumina (Sigma- Aldrich ® >65% pureza) sobre los esporozoitos de *E. bovis* no se logró el mismo efecto que al utilizar el polvo de *C. longa*, esto puede deberse a que hay un sinergismo entre los tres principales curcuminoides y los aceites esenciales (Kiuchi et al., 1993; Yue et al., 2012) a lo cual se le puede atribuir su efecto citotóxico. Además de observarse un efecto dosis-dependiente, también se observó un efecto tiempo-dosis-dependiente al incubarse por 60 minutos y por 4 horas los esporozoitos con las diferentes dosis de curcumina, ya que a mayor tiempo y a mayor dosis el porcentaje de mortalidad de los esporozoitos aumentaba logrando obtener la DL₅₀ con la dosis de 8 µM. Cuando estos esporozoitos tratados con curcumina los pusimos en células BUVEC para evaluar la tasa de infección observamos diferencias estadísticas altamente significativas entre el grupo control y las dosis de 4 µM y 8 µM, observándose a los 19 dpi la presencia de merontes en todos los grupos (tratados y no tratados con curcumina). Esto nos indica que no hay un efecto remanente de la curcumina sobre los esporozoitos, ya que aquellos que sobrevivieron al tratamiento lograron penetrar la célula y producir merontes. Con estos resultados podemos concluir que el efecto de la curcumina es principalmente sobre las fases extracelulares de *Eimeria*, en donde ejerce su efecto citotóxico. Se ha informado que los fitocompuestos de las plantas pueden inhibir la multiplicación de *Eimeria* (al provocar la muerte del esporozoito en la fase extracelular) y expandir el crecimiento de bacterias beneficiosas en el intestino de los animales (Muthamilselvan et al., 2016).

Adicionalmente a los efectos antiprotozoarios, se ha demostrado que la curcumina posee propiedades antiinflamatorias y antioxidantes, considerando que el estrés oxidativo es una característica de las infecciones intracelulares (Hering et al., 2012). La curcumina ejerce el efecto antioxidante al interactuar con diferentes vías de señalización o interactuando con enzimas o genes implicados en el estrés oxidativo (Aggarwal and Harikumar, 2009; Duan et al., 2012; Pagliaro et al., 2015; Yarru et al., 2009). En estudios previos se ha demostrado que la curcumina puede reducir el estrés nitrosativo,

el cual es producido en animales a través de la reacción del óxido nítrico con superóxido para formar peroxinitrito y actúa en conjunto con las especies reactivas del oxígeno en el daño celular, al inhibir la expresión de iNOS en macrófagos peritoneales y de hígado (Chan et al., 1998). Esto también se debe a su actividad de eliminación de anión peróxido (Sumanont et al., 2004). Por otro lado, se ha demostrado que previene la inflamación provocada por la sobre-estimulación de las citocinas proinflamatorias al aumentar la producción de IL-10 (Fattori et al., 2015; Gao et al., 2004; Kim et al., 2013; Sears et al., 2011). En este estudio, los efectos antioxidantes de *C. longa* contra los corderos infectados naturalmente con *Eimeria* se confirmó al observar una disminución en la peroxidación lipídica y en la producción de óxido nítrico en suero. Tales efectos son relevantes si se consideran las principales características de la coccidiosis ovina. Se ha demostrado en las cabras con toxoplasmosis o neosporosis, está vinculado con un incremento en los niveles de óxido nítrico (Tonin et al., 2015).

La IL-10 se midió en este estudio debido a su importancia en la prevención de la patología inmune mediada asociado al incremento del fenotipo efector Th1 en las infecciones por coccidias (Cohen and Denkers, 2015; Taubert and Hermosilla, 2008). En estudios realizados con ratones “knockout” demostraron que IL-10, IFN- γ , LOX-5 e iNOS están directamente involucrados en la regulación de la inflamación (Raberg et al., 2009). Durante la infección por *Eimeria* spp., los altos niveles de IFN- γ están asociados a una respuesta inmune protectora a la coccidiosis, ya que la invasión y el desarrollo intracelular de los estadios de *Eimeria* está asociada con la inducción de una respuesta inflamatoria local (Hermosilla et al., 2012, 1999; Hong et al., 2006; Taubert et al., 2007; Taubert and Hermosilla, 2008). En el presente estudio, las concentraciones elevadas de IFN- γ en el grupo control y el grupo placebo es una importante evidencia de la infiltración leucocitaria la cual está en concordancia con estudios experimentales previos (Taubert et al., 2008). Por otro lado, la IL-10 ejerce efecto antiinflamatorio mediado por varios mecanismos que incluyen la desregulación de citocina proinflamatorias (Haritova and Stanilova, 2012; Jiang et al., 2013; Lykken et al., 2015). En el presente estudio se observó una disminución en la concentración de IL-10 similar a estudios previos publicados, en donde se administró polvo de *C. longa* a cerdos con infección intestinal causada por *Escherichia coli* (Xun et al., 2015). Se ha sugerido que las propiedades antiinflamatorias de la curcumina incluyen varios mecanismos como la

inhibición de la vía de señalización de TLR-4/NF- κ B al bloquear la activación de NF- κ B, genes diana de esta vía de señalización como iNOS son desregulados (Fan et al., 2015; Zhong, 2015; Zhou et al., 2015). Los niveles plasmáticos de esta enzima aumentan cuando hay una infección por *Eimeria* (Allen, 1997), lo cual se observó en este estudio con el grupo control y el grupo placebo, mientras que los grupos que recibieron la galleta de *C. longa* disminuyeron significativamente los niveles de iNOS.

9. CONCLUSIONES GENERALES

El control de las enfermedades parasitarias se basa principalmente en el uso de fármacos. Sin embargo, los parásitos tienden a desarrollar resistencia a los fármacos, en particular cuando los productos se dan en dosis bajas, se administran por un largo periodo de tiempo o cuando una sola familia química se prescribe sucesivamente a los animales por varios ciclos productivos. Por lo tanto, se han buscado medidas de control alternativas, principalmente productos naturales que sean seguros para el hospedero y el medio ambiente. En este estudio, el polvo de *C. longa* produce un efecto anticoccidial cuando se administró como medicamento en forma de galleta. Este producto natural puede llegar a ser útil para controlar infecciones por coccidias si se definen las relaciones dosis-respuesta y el modo de acción. Se sugieren investigaciones futuras sobre perfiles farmacocinéticos de la *C. longa* en rumiantes y el mecanismo de acción a nivel vías de señalización y corroborar la ausencia de citotoxicidad y genotoxicidad.

10. REFERENCIAS

- Augustine, P. C. (2001). Cell: sporozoite interactions and invasion by apicomplexan parasites of the genus *Eimeria*. *International Journal for Parasitology*, 31(1), 1–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11286188>
- Abbas, R., Iqbal, Z., Khan, M., 2010. Anticoccidial activity of *Curcuma longa* L. in broilers. *Brazilian Arch. Biol. Technol.* 53, 63–67.
- Aggarwal, B.B., Harikumar, K.B., 2009. Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41, 40–59. doi:10.1016/j.biocel.2008.06.010
- Aggarwal, B.B., Sundaram, C., Malani, N., Ichikawa, H., 2007. Curcumin: the Indian solid gold. *Adv. Exp. Med. Biol.* 595, 1–75. doi:10.1007/978-0-387-46401-5_1
- Alcala-Canto, Y., Gutierrez-Olvera, L., Gutierrez-Olvera, C., Sumano-Lopez, H., 2011. Effects of clinoptilolite on *Eimeria* spp. Infection in sheep. *Small Rumin. Res.* 100, 184–188. doi:10.1016/j.smallrumres.2011.05.014
- Aline, F., Bout, D., 2002. Dendritic Cells as Effector Cells: Gamma Interferon Activation of Murine Dendritic Cells Triggers Oxygen-Dependent Inhibition of Society 70, 2368–2374. doi:10.1128/IAI.70.5.2368
- Allam, G., 2009. Immunomodulatory effects of curcumin treatment on murine schistosomiasis mansoni. *Immunobiology* 214, 712–27. doi:10.1016/j.imbio.2008.11.017
- Allen, P.C., 1997. Nitric oxide production during *Eimeria tenella* infections in chickens. *Poult. Sci.* 76, 810–3.
- Almalki, E., Al-Shaebi, E.M., Al-Quarishy, S., El-Matbouli, M., Abdel-Baki, A.-A.S., 2016. In vitro effectiveness of *Curcuma longa* and *Zingiber officinale* extracts on *Echinococcus protoscoleces*. *Saudi J. Biol. Sci.* doi:10.1016/j.sjbs.2016.05.007
- Alrubaie, A.L., 2015. Effects of alcoholic extract of *Curcuma longa* on *Ascaridia* infestation affecting chicken 53, 452–456.
- Anand, P., Thomas, S.G., Kunnumakkara, A.B., Sundaram, C., Harikumar, K.B., Sung, B., Tharakan, S.T., Misra, K., Priyadarsini, I.K., Rajasekharan, K.N., Aggarwal, B.B., 2008. Biological activities of curcumin and its analogues (Congeners) made by man and Mother Nature. *Biochem. Pharmacol.* 76, 1590–1611. doi:10.1016/j.bcp.2008.08.008
- Andrews, a. H., 2013. Some aspects of coccidiosis in sheep and goats. *Small Rumin. Res.* 110, 93–95. doi:10.1016/j.smallrumres.2012.11.011
- Antony, S., Kuttan, R., Kuttan, G., 1999. Immunomodulatory activity of curcumin. *Immunol. Investig.* 291–303.
- Asghari, G., Mostajeran, A., Shebli, M., 2009. Curcuminoid and essential oil components of turmeric at different stages of growth cultivated in Iran. *Res. Pharm. Sci.* 4, 55–61.

- Augustine, P.C., 2001. Cell: sporozoite interactions and invasion by apicomplexan parasites of the genus *Eimeria*. *Int. J. Parasitol.* 31, 1–8.
- Barbosa, B.F., Lopes-Maria, J.B., Gomes, A.O., Angeloni, M.B., Castro, A.S., Franco, P.S., Fermino, M.L., Roque-Barreira, M.C., Ietta, F., Martins-Filho, O.A., Silva, D.A.O., Mineo, J.R., Ferro, E.A. V., 2015. IL10, TGF Beta1, and IFN Gamma Modulate Intracellular Signaling Pathways and Cytokine Production to Control *Toxoplasma gondii* Infection in BeWo Trophoblast Cells. *Biol. Reprod.* 92, 82–82. doi:10.1095/biolreprod.114.124115
- Basnet, P., Skalko-Basnet, N., 2011. Curcumin: An anti-inflammatory molecule from a curry spice on the path to cancer treatment. *Molecules* 16, 4567–4598. doi:10.3390/molecules16064567
- Beck, H.-P., Blake, D., Dardé, M.-L., Felger, I., Pedraza-Díaz, S., Regidor-Cerrillo, J., Gómez-Bautista, M., Ortega-Mora, L.M., Putignani, L., Shiels, B., Tait, A., Weir, W., 2009. Molecular approaches to diversity of populations of apicomplexan parasites. *Int. J. Parasitol.* 39, 175–89. doi:10.1016/j.ijpara.2008.10.001
- Behrendt, J.H., Hermosilla, C., Hardt, M., Failing, K., Zahner, H., Taubert, A., 2008. PMN-mediated immune reactions against *Eimeria bovis*. *Vet. Parasitol.* 151, 97–109. doi:10.1016/j.vetpar.2007.11.013
- Belli, S.I., Smith, N.C., Ferguson, D.J.P., 2006. The coccidian oocyst: a tough nut to crack! *Trends Parasitol.* 22, 416–423. doi:10.1016/j.pt.2006.07.004
- Bhowmik, D., Kumar, K.P., Chandira, M., Jayakar, B., Jit, 2009. Turmeric: A Herbal and Traditional Medicine. *Arch. Appl. Sci. Res.* 1, 86–108.
- Boskou, D., Dusemund, B., Gott, D., Hallas-Møller, T., Hearty, A., König, J., Parent-Massin, D., Rietjens, I.M.C.M., Speijers, G.J.A., Tobback, P., Verguieva, T., Woutersen, R.A., 2010. Scientific Opinion on the re-evaluation of curcumin (E 100) as a food additive. *EFSA J.* 8, 46. doi:10.2903/j.efsa.2010.1679. Available
- Bowman, D.D., 2014. *Georgis' Parasitology for Veterinarians*, 10th ed. Elsevier, China.
- Burke, J.M., Miller, J.E., Terrill, T.H., Orlik, S.T., Acharya, M., Garza, J.J., Mosjidis, J. a, 2013. *Sericea lespedeza* as an aid in the control of *Eimeria* spp. in lambs. *Vet. Parasitol.* 193, 39–46. doi:10.1016/j.vetpar.2012.11.046
- Cardoso, G.C., Veitía, N., 2008. Aplicación de métodos de comparaciones múltiples en Biotecnología Vegetal. *Biotecnol. Veg.* 8, 67–71.
- Catanzaro, D., Rancan, S., Orso, G., Dall'Acqua, S., Brun, P., Giron, M.C., Carrara, M., Castagliuolo, I., Ragazzi, E., Caparrotta, L., Montopoli, M., 2015. *Boswellia serrata* Preserves Intestinal Epithelial Barrier from Oxidative and Inflammatory Damage. *PLoS One* 10, 15. doi:10.1371/journal.pone.0125375
- Catchpole, J., Norton, C.C., Gregory, M.W., 1993. Immunisation of lambs against coccidiosis. *The Veterinary record.* doi:10.1136/vr.132.3.56
- Cervantes-Valencia, M.E., Alcalá-Canto, Y., Salem, A.Z.M., Kholif, A.E., Ducoing-Watty, A.M., Bernad-Bernad, M.J., Gutiérrez-Olvera, C., 2015. Influence of

- curcumin (*Curcuma longa*) as a natural anticoccidial alternative in adult rabbits : first results. *Ital. J. Anim. Sci.* 14, 3–7. doi:10.4081/ijas.2015.3838
- Cervantes-Valencia, M.E., Alcalá-Canto, Y., Sumano-Lopez, H., Ducoing-Watty, A.M., Gutierrez-Olvera, L., 2016. Effects of *Curcuma longa* dietary inclusion against *Eimeria* spp . in naturally-infected lambs. *Small Rumin. Res.* 135, 27–35. doi:10.1016/j.smallrumres.2015.12.035
- Chan, M.M., Huang, H.I., Fenton, M.R., Fong, D., 1998. In vivo inhibition of nitric oxide synthase gene expression by curcumin, a cancer preventive natural product with anti-inflammatory properties. *Biochem. Pharmacol.* 55, 1955–62.
- Chapman, H.D., Barta, J.R., Blake, D., Gruber, A., Jenkins, M., Smith, N.C., Suo, X., Tomley, F.M., 2013. A selective review of advances in coccidiosis research., 1st ed, *Advances in parasitology*. Elsevier Ltd. doi:10.1016/B978-0-12-407705-8.00002-1
- Charles, D.J., 2013. Antioxidant properties of spices, herbs and other sources, *Journal of Chemical Information and Modeling*. Springer New York, New York, NY. doi:10.1017/CBO9781107415324.004
- Chartier, C., Paraud, C., 2012. Coccidiosis due to *Eimeria* in sheep and goats, a review. *Small Rumin. Res.* 103, 84–92. doi:10.1016/j.smallrumres.2011.10.022
- Chattopadhyay, I., Biswas, K., Bandyopadhyay, U., Banerjee, R.K., 2004. Turmeric and curcumin : Biological actions and medicinal applications 87.
- Cheng, A., Hsu, C., Lin, J.J., Hsu, M., Ho, Y., Shen, T., Ko, J., Lin, J.J., Lin, B., Ming-Shiang W., Yu, H., Jee, S., Chen, G., Chen, T., Chen, C., Lai, M., Pu, Y., Pan, M., Wang, Y., Tsai, C., Hsieh, C., 2001. Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with high-risk or pre-malignant lesions. *Anticancer Res.* 21, 2895–900.
- Chinedum, E., Kate, E., Sonia, C., Ironkwe, A., Andrew, I., 2015. Polyphenolic composition and antioxidant activities of 6 new turmeric (*Curcuma longa* L) accessions. *Recent Pat. Food. Nutr. Agric.* 7, 22–27.
- Chow, Y.-P., Wan, K.-L., Blake, D.P., Tomley, F., Nathan, S., 2011. Immunogenic *Eimeria tenella* glycosylphosphatidylinositol-anchored surface antigens (SAGs) induce inflammatory responses in avian macrophages. *PLoS One* 6, e25233. doi:10.1371/journal.pone.0025233
- Cohen, S.B., Denkers, E.Y., 2015. The gut mucosal immune response to *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunol.* 37, 108–117. doi:10.1111/pim.12164
- Cui, L., Miao, J., Cui, L., 2007. Cytotoxic effect of curcumin on malaria parasite *Plasmodium falciparum*: inhibition of histone acetylation and generation of reactive oxygen species. *Antimicrob. Agents Chemother.* 488–494.
- da Silva, N.R.S., Miller, J.E., 1991. Survey of *Eimeria* spp . oocysts in feces from Louisiana State University ewes. *Vet. Parasitol.* 40, 147–150.

- de Andrade, A.L.F., da Silva, P.C., de Aguiar, E.M., Santos, F.G.D.A., 2012. Use of coccidiostat in mineral salt and study on ovine eimeriosis. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 21, 16–21.
- Douglass, B.J., Clouatre, D.L., 2015. Beyond Yellow Curry: Assessing Commercial Curcumin Absorption Technologies. *J. Am. Coll. Nutr.* 1–12. doi:10.1080/07315724.2014.950392
- Duan, W., Yang, Y., Yan, J., Yu, S., Liu, J., Zhou, J., Zhang, J., Jin, Z., Yi, D., 2012. The effects of curcumin post-treatment against myocardial ischemia and reperfusion by activation of the JAK2/STAT3 signaling pathway. *Basic Res. Cardiol.* 107, 263. doi:10.1007/s00395-012-0263-7
- Dubremetz, J.F., Garcia-Réguet, N., Conseil, V., Fourmaux, M.N., 1998. Apical organelles and host-cell invasion by Apicomplexa. *Int. J. Parasitol.* 28, 1007–13.
- El-Bahy, N.M., Bazh, E.K.A., 2015. Anthelmintic activity of ginger, curcumin, and praziquantel against *Raillietina cesticillus* (in vitro and in vivo). *Parasitol. Res.* 114, 2427–2434. doi:10.1007/s00436-015-4416-0
- Entzeroth, R., Mattig, F.R., Werner-Meier, R., 1998. Structure and function of the parasitophorous vacuole in *Eimeria* species. *Int. J. Parasitol.* 28, 1015–8.
- Esatbeyoglu, T., Huebbe, P., Ernst, I.M.A., Chin, D., Wagner, A.E., Rimbach, G., 2012. Curcumin—from molecule to biological function. *Angew. Chemie - Int. Ed.* 51, 5308–5332. doi:10.1002/anie.201107724
- Fan, Z., Yao, J., Li, Y., Hu, X., Shao, H., Tian, X., 2015. Anti-inflammatory and antioxidant effects of curcumin on acute lung injury in a rodent model of intestinal ischemia reperfusion by inhibiting the pathway of NF- κ B. *Inflamm. Res.* 64, 3451–3459.
- Fattori, V., Pinho-Ribeiro, F.A., Borghi, S.M., Alves-Filho, J.C., Cunha, T.M., Cunha, F.Q., Casagrande, R., Verri, W.A., 2015. Curcumin inhibits superoxide anion-induced pain-like behavior and leukocyte recruitment by increasing Nrf2 expression and reducing NF- κ B activation. *Inflamm. Res.* 64, 993–1003. doi:10.1007/s00011-015-0885-y
- Forward, N. a, Conrad, D.M., Power Coombs, M.R., Doucette, C.D., Furlong, S.J., Lin, T.-J., Hoskin, D.W., 2011. Curcumin blocks interleukin (IL)-2 signaling in T-lymphocytes by inhibiting IL-2 synthesis, CD25 expression, and IL-2 receptor signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 407, 801–6. doi:10.1016/j.bbrc.2011.03.103
- Gao, X., Kuo, J., Jiang, H., Deeb, D., Liu, Y., Divine, G., Chapman, R. a, Dulchavsky, S. a, Gautam, S.C., 2004. Immunomodulatory activity of curcumin: suppression of lymphocyte proliferation, development of cell-mediated cytotoxicity, and cytokine production in vitro. *Biochem. Pharmacol.* 68, 51–61. doi:10.1016/j.bcp.2004.03.015
- Gjerde, B., Helle, O., 1991. Chemoprophylaxis of coccidiosis in lambs with a single oral dose of toltrazuril. *Vet. Parasitol.* 38, 97–107.

- Gordon, H.M., Whitlock, H.V., 1939. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. *J. Counc. Sci. Ind. Res.* 12, 50–52.
- Gregory, M.W., Catchpole, J., 1990. OVINE COCCIDIOSIS : THE PATHOLOGY OF EIMERIA CRANDALLIS INFECTION. *Int. J. Parasitol.* 20, 849–860.
- Gregory, W., Catchpole, J., Pittilo, R.M., Norton, C.C., 1987. OVINE COCCIDIOSIS : OBSERVATIONS ON “ OOCYST PATCHES ” AND POLYPS IN NATURALLY-ACQUIRED INFECTIONS. *Int. J. Parasitol.* 17, 1113–1124.
- Gressler, L.T., Oliverira, C.B., Coradini, K., Dalla Rosa, L., Grando, T.H., Baldissera, M.D., Zimmermann, C.E., da Silva, A.S., Almeida, T.C., Hermes, C.L., Wolkmer, P., Silva, C.B., Moreira, K.L.S., Beck, R.C.R., Moresco, R.N., da Veiga, M.L., Stefani, L.M., Monteiro, S.G., 2015. Trypanocidal activity of free and nanoencapsulated curcumin on *Trypanosoma evansi*.pdf. *Parasitology* 142, 439–448. doi:10.1017/S0031182014001292
- Gupta, S.C., Prasad, S., Kim, J.H., Patchva, S., Webb, L.J., Priyadarsini, I.K., Aggarwal, B.B., 2011. Multitargeting by curcumin as revealed by molecular interaction studies. *Nat. Prod. Rep.* 28, 1937–55. doi:10.1039/c1np00051a
- Hamid, P.H., Hirzmann, J., Kerner, K., Gimpl, G., Lochnit, G., Hermosilla, C.R., Taubert, A., 2015. *Eimeria bovis* infection modulates endothelial host cell cholesterol metabolism for successful replication. *Vet. Res.* 46. doi:10.1186/s13567-015-0230-z
- Haritova, a. M., Stanilova, S. a., 2012. Enhanced expression of IL-10 in contrast to IL-12B mRNA in poultry with experimental coccidiosis. *Exp. Parasitol.* 132, 378–382. doi:10.1016/j.exppara.2012.08.017
- Harper, C.K., Penzhorn, B.L., 1999. Occurrence and diversity of coccidia in indigenous, Saanen and crossbred goats in South Africa. *Vet. Parasitol.* 82, 1–9.
- He, Y., Yue, Y., Zheng, X., Zhang, K., Chen, S., Du, Z., 2015. Curcumin, Inflammation, and Chronic Diseases: How Are They Linked? *Molecules* 20, 9183–9213. doi:10.3390/molecules20059183
- Hendrix, C.M., Robinson, E., 2012. *Diagnostic Parasitology for Veterinary Technicians*, 4th ed. Elsevier, United States of America.
- Hering, N. a, Fromm, M., Schulzke, J.-D., 2012. Determinants of colonic barrier function in inflammatory bowel disease and potential therapeutics. *J. Physiol.* 590, 1035–1044. doi:10.1113/jphysiol.2011.224568
- Hermosilla, C., Barbisch, B., Heise, A., Kowalik, S., Zahner, H., 2002. Development of *Eimeria bovis* in vitro : suitability of several bovine, human and porcine endothelial cell lines , bovine fetal gastrointestinal , Madin-Darby bovine kidney (MDBK) and African green monkey kidney (VERO) cells. *Parasitol. Res.* 88, 301–307. doi:10.1007/s00436-001-0531-1
- Hermosilla, C., Bürger, H.J., Zahner, H., 1999. T cell responses in calves to a primary *Eimeria bovis* infection: Phenotypical and functional changes. *Vet. Parasitol.* 84, 49–64. doi:10.1016/S0304-4017(99)00075-8

- Hermosilla, C., Diakou, A., Psychas, V., 2016. Fatal Eimeria gilruthi- Induced Abomasal Coccidiosis : a still Fatal Eimeria gilruthi-Induced Abomasal Coccidiosis : a still Neglected Parasitosis ? J. Vet. Med. Res. 3, 2–5.
- Hermosilla, C., Ruiz, A., Taubert, A., 2012. Eimeria bovis: An update on parasite-host cell interactions. Int. J. Med. Microbiol. 302, 210–215.
doi:10.1016/j.ijmm.2012.07.002
- Hermosilla, C., Zahner, H., Taubert, A., 2006. Eimeria bovis modulates adhesion molecule gene transcription in and PMN adhesion to infected bovine endothelial cells. Int. J. Parasitol. 36, 423–31. doi:10.1016/j.ijpara.2006.01.001
- Holder, G.M., Plummer, J.L., Ryan, A.J., 1978. The Metabolism and Excretion of Curcumin. Xenobiotica 8, 761–768.
- Hong, Y.H., Lillehoj, H.S., Lillehoj, E.P., Lee, S.H., 2006. Changes in immune-related gene expression and intestinal lymphocyte subpopulations following Eimeria maxima infection of chickens. Vet. Immunol. Immunopathol. 114, 259–272.
doi:10.1016/j.vetimm.2006.08.006
- Huang, L., Zhang, J., Song, T., Yuan, L., Zhou, J., Yin, H., He, T., Gao, W., Sun, Y., Hu, X., Huang, H., 2016. Antifungal curcumin promotes chitin accumulation associated with decreased virulence of Sporothrix schenckii. Int. Immunopharmacol. 34, 263–270.
doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2016.03.010
- ICH, 2005. ICH Topic Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures : Text and Methodology. Int. Conf. Harmon. 1994, 17.
doi:http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf
- Iqbal, a., Tariq, K. a., Wazir, V.S., Singh, R., 2012. Antiparasitic efficacy of Artemisia absinthium, toltrazuril and amprolium against intestinal coccidiosis in goats. J. Parasit. Dis. doi:10.1007/s12639-012-0137-9
- Jagetia, G.C., Aggarwal, B.B., 2007. “Spicing up” of the immune system by curcumin. J. Clin. Immunol. 27, 19–35. doi:10.1007/s10875-006-9066-7
- Jankovic, D., Kugler, D.G., Sher, a, 2010. IL-10 production by CD4+ effector T cells: a mechanism for self-regulation. Mucosal Immunol. 3, 239–246.
doi:10.1038/mi.2010.8
- Jiang, H., Wang, Z., Wang, Y., Xie, K., Zhang, Q., Luan, Q., Chen, W., Liu, D., 2013. Antidepressant-like effects of curcumin in chronic mild stress of rats: involvement of its anti-inflammatory action. Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry 47, 33–9. doi:10.1016/j.pnpbp.2013.07.009
- Jolley, W.R., Bardsley, K.D., 2006. Ruminant Coccidiosis. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 22, 613–621. doi:10.1016/j.cvfa.2006.07.004
- Jurenka, J.S., 2009. Anti-inflammatory properties of curcumin, a major constituent of Curcuma longa: A review of preclinical and clinical research. Altern. Med. Rev. 14, 141–153.

- Khalafalla, R.E., Müller, U., Shahiduzzaman, M., Dyachenko, V., Desouky, A.Y., Alber, G., Dausgchies, A., 2011. Effects of curcumin (diferuloylmethane) on *Eimeria tenella* sporozoites in vitro. *Parasitol. Res.* 108, 879–86. doi:10.1007/s00436-010-2129-y
- Kim, D.K., Lillehoj, H.S., Lee, S. H., Jang, S.I., Lillehoj, E.P., Bravo, D., 2013. Dietary *Curcuma longa* enhances resistance against *Eimeria maxima* and *Eimeria tenella* infections in chickens. *Poult. Sci.* 2635–2643.
- Kiuchi, F., Yoshihisa, G., Sugimoto, N., Akao, N., Kondo, K., Yoshisuke, T., 1993. Nematocidal Activity of Turmeric: Synergistic Action of Curcuminoids. *Chem. Pharm. Bull.* 41, 1640–1643.
- Kohli, K., Ali, J., Ansari, J.M., Reheman, Z., 2005. Curcumin: A natural antiinflammatory agent. *Indian J. Pharmacol.* 37, 141–147.
- Koide, T., Nose, M., Ogihara, Y., Yabu, Y., Ohta, N., 2002. Leishmanicidal effect of curcumin in vitro. *Biol. Pharm. Bull.* 25, 131–3.
- Kommuru, D.S., Barker, T., Desai, S., Burke, J.M., Ramsay, A., Mueller-Harvey, I., Miller, J.E., Mosjidis, J. a, Kamisetti, N., Terrill, T.H., 2014. Use of pelleted sericea lespedeza (*Lespedeza cuneata*) for natural control of coccidia and gastrointestinal nematodes in weaned goats. *Vet. Parasitol.* 204, 191–198. doi:10.1016/j.vetpar.2014.04.017
- Kosior-Kerzecka, U., Ducci, M., Martelli, F., Bobowiec, R., 2008. LEPTIN INFLUENCES HISTIDINE DIPEPTIDES AND NITRIC OXIDE RELEASE FROM ANTERIOR PITUITARY CELLS OF SHEEP IN VITRO. *J. Physiol. Pharmacol.* 59, 19–27.
- Kunnumakkara, A.B., Guha, S., Aggarwal, B.B., 2009. Curcumin and Colorectal Cancer : Add Spice to Your Life. *Curr. Colorectal Cancer Rep.* 5, 5–14. doi:10.1007/s11888-009-0002-0
- Kwong, L.S., Hope, J.C., Thom, M.L., Sopp, P., Duggan, S., Bembridge, G.P., Howard, C.J., 2002. Development of an ELISA for bovine IL-10. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 85, 213–223. doi:10.1016/S0165-2427(02)00007-7
- Lee, S.H., Lillehoj, H.S., Jang, S.I., Kim, D.K., Ionescu, C., Bravo, D., 2010. Effect of Dietary *Curcuma*, *Capsicum*, and *Lentinus* on Enhancing Local Immunity against *Eimeria acervulina* Infection. *J. Poult. Sci.* 47, 89–95. doi:10.2141/jpsa.009025
- Li, X., Liu, X., 2005. Effect of curcumin on immune function of mice. *J. Huazhong Univ. Sci. Technol. Med. Sci.* 25, 137–40.
- Lillehoj, H., 1998. Role of T lymphocytes and cytokines in coccidiosis. *Int. J. Parasitol.* 28, 1071–81.
- Lin, J.-K., 2007. Molecular targets of curcumin. *Adv. Exp. Med. Biol.* 595, 227–43. doi:10.1007/978-0-387-46401-5_10
- Lykken, J.M., Candado, M.K., Tedder, T.F., 2015. No TitleRegulatory B10 cell development and function. *Int. Immunol. Adv. Acces* 1–26.

- Magalhães, L.G., Machado, C.B., Morais, E.R., Moreira, E.B.D.C., Soares, C.S., da Silva, S.H., Da Silva Filho, A. a, Rodrigues, V., 2009. In vitro schistosomicidal activity of curcumin against *Schistosoma mansoni* adult worms. *Parasitol. Res.* 104, 1197–201. doi:10.1007/s00436-008-1311-y
- Magombedze, G., Eda, S., Stabel, J., 2015. Predicting the Role of IL-10 in the Regulation of the Adaptive Immune Responses in *Mycobacterium avium* Subsp. *paratuberculosis* Infections Using Mathematical Models. *PLoS One* 10, e0141539. doi:10.1371/journal.pone.0141539
- Malo, E. del C., 2013. Coccidiosis : La enfermedad , consecuencias y tratamiento, in: Congreso Científico de Avicultura.
- Maratea, K. a., Miller, M. a., 2007. Abomasal Coccidiosis Associated with Proliferative Abomasitis in a Sheep. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 19, 118–121. doi:10.1177/104063870701900122
- Mesa, M.D., Ramírez-Tortosa, M.C., Aguilera, M.C., Ramiírez-Boscá, A., Gil, A., 2000. Pharmacological and nutritional effects of *Curcuma Longa* L. extracts and curcuminoides. *Ars Pharm.* 41, 307–321.
- Mohammed, R.A., Idris, O.A., el Sanousi, S.M., Abdelsalam, E.B., 2000. The effect of coccidian infection on the gut microflora of Nubian goat kids. *DTW. Dtsch. tier{ä}rztliche Wochenschrift* 107, 414–416.
- Morais, E.R., Oliveira, K.C., Magalhães, L.G., Moreira, É.B.C., Verjovski-Almeida, S., Rodrigues, V., 2013. Effects of curcumin on the parasite *Schistosoma mansoni*: A transcriptomic approach. *Mol. Biochem. Parasitol.* 187, 91–97. doi:10.1016/j.molbiopara.2012.11.006
- Müller, J., Hemphill, A., 2013. In vitro culture systems for the study of apicomplexan parasites in farm animals. *Int. J. Parasitol.* 43, 115–24. doi:10.1016/j.ijpara.2012.08.004
- Muthamilselvan, T., Kuo, T.-F., Wu, Y.-C., Yang, W.-C., 2016. Herbal Remedies for Coccidiosis Control: A Review of Plants, Compounds, and Anticoccidial Actions. *Evidence-Based Complement. Altern. Med.* 2016, 1–19. doi:10.1155/2016/2657981
- Nagajyothi, F., Zhao, D., Weiss, L., Tanowitz, H., 2012. Curcumin treatment provides protection against *Trypanosoma cruzi* infection. *Parasitol. Res.* 110, 2491–2499. doi:10.1007/s00436-011-2790-9
- Naksuriya, O., van Steenberg, M.J., Torano, J.S., Okonogi, S., Hennink, W.E., 2016. A Kinetic Degradation Study of Curcumin in Its Free Form and Loaded in Polymeric Micelles. *AAPS J.* 18. doi:10.1208/s12248-015-9863-0
- Nasai, N.B., Abba, Y., Abdullah, F.F.J., Marimuthu, M., Tijjani, A., Sadiq, M.A., Mohammed, K., Chung, E.L.T., Omar, M.A. Bin, 2016. In vitro larvicidal effects of ethanolic extract of *Curcuma longa* Linn. on *Haemonchus* larval stage. *Vet. World* 9, 417–420. doi:10.14202/vetworld.2016.417-420
- Nayak, A., Gayen, P., Saini, P., Mukherjee, N., Babu, S.P.S., 2012. Molecular evidence

- of curcumin-induced apoptosis in the filarial worm *Setaria cervi*. *Parasitol. Res.* 111, 1173–86. doi:10.1007/s00436-012-2948-0
- Noorafshan, A., Ashkani-Esfahani, S., 2013. A review of therapeutic effects of curcumin. *Curr. Pharm. Des.* 19, 2032–46. doi:10.2174/138161213805289273
- Nyberg, P. a, Bauer, D.H., Knapp, S.E., 1968. Carbon dioxide as the initial stimulus for excystation of *Eimeria tenella* oocysts. *J. Protozool.* 15, 144–148.
- Oakes, R.D., Kurian, D., Bromley, E., Ward, C., Lal, K., Blake, D.P., Reid, A.J., Pain, A., Sinden, R.E., Wastling, J.M., Tomley, F.M., 2013. The rhoptry proteome of *Eimeria tenella* sporozoites. *Int. J. Parasitol.* 43, 181–8. doi:10.1016/j.ijpara.2012.10.024
- Orozco, E., Marchat, L.A., Gómez, C., López-camarillo, C., Pérez, D.G., 2009. Antimicrobial Drug Resistance. doi:10.1007/978-1-59745-180-2
- Padín-Irizarry, V., Colón-Lorenzo, E.E., Vega-Rodríguez, J., Castro, M. del R., González-Méndez, R., Ayala-Peña, S., Serrano, A.E., 2016. Glutathione-deficient *Plasmodium berghei* parasites exhibit growth delay and nuclear DNA damage. *Free Radic. Biol. Med.* 95, 43–54. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2016.02.032
- Pagliaro, B., Santolamazza, C., Simonelli, F., Rubattu, S., 2015. Phytochemical Compounds and Protection from Cardiovascular Diseases: A State of the Art. *Biomed Res. Int.* 2015, 1–17. doi:10.1155/2015/918069
- Peek, H.W., Halkes, S.B. a, Mes, J.J., Landman, W.J.M., 2013. In vivo screening of four phytochemicals/extracts and a fungal immunomodulatory protein against an *Eimeria acervulina* infection in broilers. *Vet. Q.* 33, 132–8. doi:10.1080/01652176.2013.844378
- Plain, K.M., Begg, D.J., de Silva, K., Purdie, A.C., Whittington, R.J., 2012. Enhancement of the interferon gamma assay to detect paratuberculosis using interleukin-7 and interleukin-12 potentiation. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 149, 28–37. doi:10.1016/j.vetimm.2012.05.023
- Raberg, L., Graham, A.L., Read, A.F., 2009. Decomposing health : tolerance and resistance to parasites in animals. *Philos. Trans. R. Soc. B* 364, 37–49. doi:10.1098/rstb.2008.0184
- Rajput, N., Ali, S., Naeem, M., Khan, M. a, Wang, T., 2014. The effect of dietary supplementation with the natural carotenoids curcumin and lutein on pigmentation, oxidative stability and quality of meat from broiler chickens affected by a coccidiosis challenge. *Br. Poult. Sci.* 1–9. doi:10.1080/00071668.2014.925537
- Ramos, A., Laguna, I., Martín de Lucia, M.-L., Martín-Palomino, P., Regodón, S., Míguez, M.-P., 2010. Evolution of oxidative / nitrosative stress biomarkers during an open-field vaccination procedure in sheep : Effect of melatonin. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 133, 16–24. doi:10.1016/j.vetimm.2009.06.016
- Reddy, R.C., Vatsala, P.G., Keshamouni, V.G., Padmanaban, G., Rangarajan, P.N.,

2005. Curcumin for malaria therapy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 326, 472–4. doi:10.1016/j.bbrc.2004.11.051
- Roberts, L.S., Janovy, J.J., 2009. Gerald D. Schmidt & Larry S. Roberts' Foundations of Parasitology, EIGHTH. ed. McGraw Hill, New York, USA.
- Rodríguez-Vivas, R.I., Cob-Galera, L.A., Domínguez-Alpizar, J.L., 2001. Frecuencia de parásitos gastrointestinales en animales domésticos diagnosticados en Yucatan, México. *Rev Biomed* 12, 19–25.
- Ruiz, A., Muñoz, M.C., Molina, J.M., Hermosilla, C., Andrada, M., Lara, P., Bordón, E., Pérez, D., López, A.M., Matos, L., Guedes, A.C., Falcón, S., Falcón, Y., Martín, S., Taubert, A., 2014. Immunization with *Eimeria ninakohlyakimovae*-live attenuated oocysts protect goat kids from clinical coccidiosis. *Vet. Parasitol.* 199, 8–17. doi:10.1016/j.vetpar.2013.09.032
- Said, D.E., Elsamad, L.M., Gohar, Y.M., 2012. Validity of silver, chitosan, and curcumin nanoparticles as anti-*Giardia* agents. *Parasitol. Res.* 111, 545–54. doi:10.1007/s00436-012-2866-1
- Saiz De Cos, P., Pérez-Urria Carril, E., 2014. Cúrcuma I (*Curcuma longa* L.). *Reduca (Biología)* 7, 84–99.
- Sandur, S.K., Pandey, M.K., Sung, B., Ahn, K.S., Murakami, A., Sethi, G., Limtrakul, P., Badmaev, V., Aggarwal, B.B., 2007. Curcumin, demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin, tetrahydrocurcumin and turmerones differentially regulate anti-inflammatory and anti-proliferative responses through a ROS-independent mechanism. *Carcinogenesis* 28, 1765–1773. doi:10.1093/carcin/bgm123
- Sangster, N.C., 2001. Managing parasiticide resistance. *Vet. Parasitol.* 98, 89–109.
- Saratsis, A., Regos, I., Tzanidakis, N., Voutzourakis, N., Stefanakis, A., Treuter, D., Joachim, A., Sotiraki, S., 2012. In vivo and in vitro efficacy of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) against *Eimeria* spp in lambs. *Vet. Parasitol.* 188, 1–9. doi:10.1016/j.vetpar.2012.03.014
- Sears, B.F., Rohr, J.R., Allen, J.E., Martin, L.B., 2011. The economy of inflammation: when is less more? *Trends Parasitol.* 27, 382–7. doi:10.1016/j.pt.2011.05.004
- Serratos, J., Blass, a, Rigau, B., Mongrell, B., Rigau, T., Tortadès, M., Tolosa, E., Aguilar, C., Ribó, O., Balagué, J., 2006. Residues from veterinary medicinal products, growth promoters and performance enhancers in food-producing animals: a European Union perspective. *Rev. Sci. Tech.* 25, 637–653.
- Shahiduzzaman, M., Dyachenko, V., Khalafalla, R.E., Desouky, A.Y., Dauschies, A., 2009. Effects of curcumin on *Cryptosporidium parvum* in vitro. *Parasitol. Res.* 105, 1155–61. doi:10.1007/s00436-009-1535-5
- Sharma, K., Agrawal, S.S., Gupta, M., 2012. Development and Validation of UV spectrophotometric method for the estimation of Curcumin in Bulk Drug and Pharmaceutical Dosage Forms. *Int. J. drug Dev. Res.* 4, 375–380.
- Sharma, R.A., Steward, W.P., Gescher, A.J., 2007. Pharmacokinetics and

pharmacodynamics of curcumin. *Adv. Exp. Med. Biol.* 595, 453–70.
doi:10.1007/978-0-387-46401-5_20


- Sharma, R. a, Euden, S. a, Platton, S.L., Cooke, D.N., Shafayat, A., Hewitt, H.R., Marczylo, T.H., Morgan, B., Hemingway, D., Plummer, S.M., Pirmohamed, M., Gescher, A.J., Steward, W.P., 2004. Phase I Clinical Trial of Oral Curcumin : Biomarkers of Systemic Activity and Compliance Phase I Clinical Trial of Oral Curcumin : Biomarkers of Systemic Activity and Compliance. *Clin. Cancer Res.* 10, 6847–6854. doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-0744
- Shoba, G., Joy, D., Joseph, T., Majeed, M., Rajendran, R., Srinivas, P.S., 1998. Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers. *Planta Med.* doi:10.1055/s-2006-957450
- Sild, E., Sepp, T., Männiste, M., Hõrak, P., 2011. Carotenoid intake does not affect immune-stimulated oxidative burst in greenfinches. *J. Exp. Biol.* 214, 3467–73. doi:10.1242/jeb.062182
- Simons, M.J.P., Cohen, A.A., Verhulst, S., 2012. What does carotenoid-dependent coloration tell? Plasma carotenoid level signals immunocompetence and oxidative stress state in birds-A meta-analysis. *PLoS One* 7, e43088. doi:10.1371/journal.pone.0043088
- Singh, R., Mehta, A., Mehta, P., Shukla, K., 2011. Anthelmintic activity of rhizome extracts of *Curcuma longa* and *Zingiber officinale* (Zingiberaceae). *Int J Pharm Pharm. Sci* 3, 11–12.
- Siviero, A., Gallo, E., Maggini, V., Gori, L., Mugelli, A., Firenzuoli, F., Vannacci, A., 2015. Curcumin, a golden spice with a low bioavailability. *J. Herb. Med.* 5, 57–70. doi:10.1016/j.hermed.2015.03.001
- South, E.H., Exon, J.H., Hendrix, K., 1997. Dietary curcumin enhances antibody responses in rats. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 105–119.
- Subramanian, M., Sreejayan, M.N., Devasagayam, T.P., Singh, B.B., 1994. Disminution of singlet oxygen-induced DNA damage by curcumin and related antioxidants. *Mutat. Res.* 249–255.
- Sühwold, A., Hermosilla, C., Seeger, T., Zahner, H., Taubert, A., 2010. T cell reactions of *Eimeria bovis* primary and challenge-infected calves. *Parasitol. Res.* 106, 595–605. doi:10.1007/s00436-009-1705-5
- Sumanont, Y., Murakami, Y., Tohda, M., Vajragupta, O., Matsumoto, K., Watanabe, H., 2004. Evaluation of the nitric oxide radical scavenging activity of manganese complexes of curcumin and its derivative. *Biol. Pharm. Bull.* 27, 170–173. doi:10.1248/bpb.27.170
- Taubert, A., Behrendt, J.H., Sühwold, A., Zahner, H., Hermosilla, C., 2009. Monocyte- and macrophage-mediated immune reactions against *Eimeria bovis*. *Vet. Parasitol.* 164, 141–53. doi:10.1016/j.vetpar.2009.06.003
- Taubert, A., Hermosilla, C., 2008. Bovine recombinant IFN-gamma induces endothelial cell gene transcription of immunoregulatory molecules and

- upregulates PMN and PBMC adhesion on bovine endothelial cells. *Vet. Res. Commun.* 32, 35–47. doi:10.1007/s11259-007-9001-2
- Taubert, A., Hermosilla, C., Sühwold, A., Zahner, H., 2008. Antigen-induced cytokine production in lymphocytes of *Eimeria bovis* primary and challenge infected calves. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 126, 309–20. doi:10.1016/j.vetimm.2008.09.003
- Taubert, A., Zahner, H., Hermosilla, C., 2007. *Eimeria bovis* infection enhances adhesion of peripheral blood mononuclear cells to and their transmigration through an infected bovine endothelial cell monolayer in vitro. *Parasitol. Res.* 101, 591–8. doi:10.1007/s00436-007-0517-8
- Taubert, A., Zahner, H., Hermosilla, C., 2006. Dynamics of transcription of immunomodulatory genes in endothelial cells infected with different coccidian parasites. *Vet. Parasitol.* 142, 214–222. doi:10.1016/j.vetpar.2006.07.021
- Taylor, M.A., Coop, R.L., Wall, R.L., 2007. *Veterinary Parasitology*, Third. ed. Blackwell Publishing, Oxford, UK.
- Taylor, M. a., Catchpole, J., Marshall, J., Marshall, R.N., Hoeben, D., 2003. Histopathological observations on the activity of diclazuril (Vecoxan®) against the endogenous stages of *Eimeria crandallis* in sheep. *Vet. Parasitol.* 116, 305–314. doi:10.1016/S0304-4017(03)00256-5
- Tonin, A.A., Weber, A., Ribeiro, A., Camillo, G., Vogel, F.F., Moura, A.B., Bochi, G.V., Moresco, R.N., Da Silva, A.S., 2015. Serum levels of nitric oxide and protein oxidation in goats seropositive for *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 41, 55–58. doi:10.1016/j.cimid.2015.05.002
- Trujillo, J., Chirino, Y.I., Molina-Jijón, E., Andérica-Romero, A.C., Tapia, E., Pedraza-Chaverri, J., 2013. Renoprotective effect of the antioxidant curcumin: Recent findings. *Redox Biol.* 1, 448–456. doi:10.1016/j.redox.2013.09.003
- Trujillo, J., Granados-Castro, L.F., Zazueta, C., Andérica-Romero, A.C., Chirino, Y.I., Pedraza-Chaverri, J., 2014. Mitochondria as a Target in the Therapeutic Properties of Curcumin. *Arch. Pharm. (Weinheim)*. 1–12. doi:10.1002/ardp.201400266
- Tyagi, P., Singh, M., Kumari, H., Kumari, A., Mukhopadhyay, K., 2015. Bactericidal activity of curcumin I is associated with damaging of bacterial membrane. *PLoS One* 10, 1–15. doi:10.1371/journal.pone.0121313
- Valero, A., Romero, M.C., Gómez-Mateos, M., Hierro, I., Navarro, M.C., 2015. Natural products: Perspectives in the pharmacological treatment of gastrointestinal anisakiasis. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 8, 612–617. doi:10.1016/j.apjtm.2015.07.017
- Varalakshmi, C., Ali, a M., Pardhasaradhi, B.V. V, Srivastava, R.M., Singh, S., Khar, A., 2008. Immunomodulatory effects of curcumin: in-vivo. *Int. Immunopharmacol.* 8, 688–700. doi:10.1016/j.intimp.2008.01.008


- Vathsala, P.G., Dende, C., Nagaraj, V.A., Bhattacharya, D., Das, G., Rangarajan, P.N., Padmanaban, G., 2012. Curcumin-arteether combination therapy of *Plasmodium berghei*-infected mice prevents recrudescence through immunomodulation. *PLoS One* 7, 1–10. doi:10.1371/journal.pone.0029442
- Veira, L. da S., 2002. Eimeriose de pequenos ruminantes- panorama da pesquisa no Nordeste do Brasil. *Embrapa Caprinos* 1–23.
- Velázquez García, O., 2016. Cuantificación de curcuminas con actividad antiparasitaria en insumos de uso veterinario. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Xun, W., Shi, L., Zhou, H., Hou, G., Cao, T., Zhao, C., 2015. Effects of curcumin on growth performance, jejunal mucosal membrane integrity, morphology and immune status in weaned piglets challenged with enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Int. Immunopharmacol.* 27, 46–52. doi:10.1016/j.intimp.2015.04.038
- Yarru, L.P., Settivari, R.S., Gowda, N.K.S., Antoniou, E., Ledoux, D.R., Rottinghaus, G.E., 2009. Effects of turmeric (*Curcuma longa*) on the expression of hepatic genes associated with biotransformation, antioxidant, and immune systems in broiler chicks fed aflatoxin. *Poult. Sci.* 88, 2620–2627. doi:10.3382/ps.2009-00204
- Yue, G.G.L., Cheng, S.-W., Yu, H., Xu, Z.-S., Lee, J.K.M., Hon, P.-M., Lee, M.Y.H., Kennelly, E.J., Deng, G., Yeung, S.K., Cassileth, B.R., Fung, K.-P., Leung, P.-C., Lau, C.B.S., 2012. The role of turmerones on curcumin transportation and P-glycoprotein activities in intestinal Caco-2 cells. *J. Med. Food* 15, 242–52. doi:10.1089/jmf.2011.1845
- Yun, C.H., Lillehoj, H.S., Lillehoj, E.P., 2000. Intestinal immune responses to coccidiosis. *Dev. Comp. Immunol.* 24, 303–24.
- Zhong, K., 2015. Curcumin Mediates a Protective Effect Via TLR-4/NF- κ B Signaling Pathway in Rat Model of Severe Acute Pancreatitis. *Cell Biochem. Biophys.* doi:10.1007/s12013-015-0664-y
- Zhongfa, L., Chiu, M., Wang, J., Chen, W., 2012. Enhancement of curcumin oral absorption and pharmacokinetics of curcuminoids and curcumin metabolites in mice. *Cancer Chemother. ...* 679–689. doi:10.1007/s00280-011-1749-y
- Zhou, Y., Zhang, T., Wang, X., Wei, X., Chen, Y., Guo, L., Zhang, J., Wang, C., 2015. Curcumin Modulates Macrophage Polarization Through the Inhibition of the Toll-Like Receptor 4 Expression and its Signaling Pathways. *Cell. Physiol. Biochem.* 36, 631–641. doi:10.1159/000430126

ANEXOS

Anexo 1. Solicitud de apoyo para tramitar patente de la galleta utilizada en el experimento *in vivo*.


UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
DIRECCIÓN



ACUSE

OFICIO No. FMVZ/D/FSG/289/2016
ASUNTO: Se solicita apoyo para trámite de solicitud de Patente

IQ. SALVADOR E. MORALES HERRERA
COORDINADOR DE PROPIEDAD INTELECTUAL
COORDINACIÓN DE INNOVACIÓN Y DESARROLLO
Presente

A través del presente solicito a usted el apoyo de la Coordinación de Innovación y Desarrollo, para proceder con el trámite de solicitud de patente de la invención titulada: **Galletas de *Curcuma longa* para disminuir la eliminación de ooquistes de *Eimeria* spp. en ovinos**

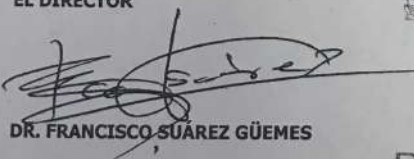
En dicha invención han participado como inventores los siguientes investigadores que forman parte de este Instituto/Facultad: Yazmín Alcalá Canto (Profesora Titular "A" tiempo completo, definitiva) y María Eugenia Cervantes Valencia (estudiante de doctorado, Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal).


Estamos adjuntando la descripción de la invención, así como las cartas de cesión de derechos de los inventores y copia de las publicaciones relacionadas con dicha invención.


Quedamos a sus órdenes en caso de que requiera cualquier información adicional, aprovechando para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 27 de septiembre de 2016

EL DIRECTOR


DR. FRANCISCO SUÁREZ GÜEMES


UNAM
29 SEP 2016
10:18


DIRECCIÓN GENERAL DE VINCULACIÓN
RECIBIDO
innovación

Jhony R
29-09-16
10:20 h

c.c.p.- Mtro. Juan Manuel Romero Ortega, Coordinador de Innovación y Desarrollo.- Presente.
c.c.p.- Dra. Gloria Soberón Chávez, Directora General de Vinculación.- Presente.
c.c.p.- Archivo.

FSG/ecv*

Av. Universidad 3000, Universidad Nacional Autónoma de México, CU, Del. Coyoacán, Distrito Federal, CP 04510.
Tels.: 01 (55) 5616-5963, 5622-5883 y 5622-5884, Fax: 5616-7110.

Anexo 2. PROBIT Viabilidad de los esporozoitos de *E. bovis* incubados con polvo de *C. longa* durante 24 h.

Información sobre los datos

		Nº de casos
Válidos		6
	Perdidos	0
	La transformación log no se puede realizar	0
Rechazados	Número de respuestas > Número de sujetos	0
Grupo control		3

Información sobre la convergencia

	Número de iteraciones	Solución óptima encontrada
PROBIT	8	Sí

Estimaciones de los parámetros

Parámetro	Estimación	Error típico	Z	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
PROBIT ^a Dosis	2,194	,205	10,691	,000	1,792	2,597
Intersección	8,836	,766	11,541	,000	8,071	9,602

a. Modelo PROBIT: $PROBIT(p) = \text{Intersección} + BX$ (Las covariables X se transforman utilizando el logaritmo en base 2.718.)

Contrastes de chi-cuadrado

		Chi-cuadrado	gl ^b	Sig.
PROBIT	Contraste de la bondad de ajuste de Pearson	2,030	4	,730 ^a

a. Como el nivel de significación es mayor que .150, no se utiliza un factor de heterogeneidad en el cálculo de los límites de confianza.

b. Los estadísticos basados en casos individuales difieren de los estadísticos basados en casos agregados.

Residuos y frecuencias de casillas

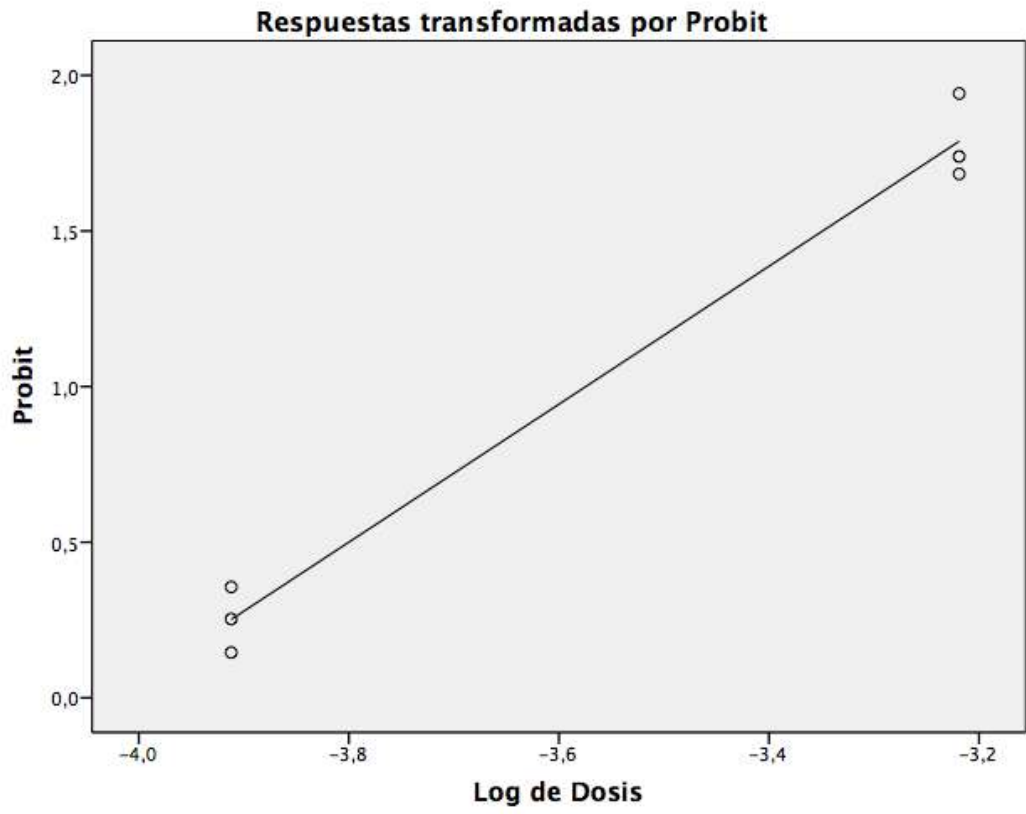
	Número	Dosis	Número de sujetos	Respuestas observadas	Respuestas esperadas	Residuos	Probabilidad
PROBIT	1	- 3,912	90	54	53,936	,064	,599
	2	- 3,912	95	53	56,933	-3,933	,599
	3	- 3,912	97	62	58,131	3,869	,599
	4	- 3,219	122	117	117,346	-,346	,962
	5	- 3,219	115	112	110,613	1,387	,962
	6	- 3,219	130	124	125,041	-1,041	,962

Límites de confianza

Probabilidad	Límites de confianza al 95% para Dosis			Límites de confianza al 95% para log(Dosis) ^a		
	Estimación	Límite inferior	Límite superior	Estimación	Límite inferior	Límite superior
,010	,006	,005	,008	-5,087	-5,401	-4,868
,020	,007	,005	,009	-4,963	-5,249	-4,762
,030	,008	,006	,009	-4,884	-5,153	-4,695
,040	,008	,006	,010	-4,824	-5,081	-4,645
,050	,008	,007	,010	-4,776	-5,022	-4,604
,060	,009	,007	,010	-4,735	-4,972	-4,569
,070	,009	,007	,011	-4,699	-4,929	-4,538
,080	,009	,008	,011	-4,667	-4,889	-4,511
,090	,010	,008	,011	-4,638	-4,854	-4,486
,100	,010	,008	,012	-4,611	-4,821	-4,462
,150	,011	,009	,013	-4,499	-4,685	-4,367
,200	,012	,010	,014	-4,410	-4,578	-4,290

,250	,013	,011	,015	-4,334	-4,486	-4,225
,300	,014	,012	,016	-4,266	-4,404	-4,165
,350	,015	,013	,016	-4,202	-4,328	-4,110
,400	,016	,014	,017	-4,142	-4,256	-4,057
,450	,017	,015	,018	-4,084	-4,187	-4,006
,500	,018	,016	,019	-4,027	-4,120	-3,955
,550	,019	,017	,020	-3,969	-4,053	-3,903
,600	,020	,019	,021	-3,911	-3,987	-3,849
,650	,021	,020	,023	-3,851	-3,919	-3,792
,700	,023	,021	,024	-3,788	-3,850	-3,730
,750	,024	,023	,026	-3,719	-3,778	-3,661
,800	,026	,025	,028	-3,643	-3,700	-3,581
,850	,029	,027	,031	-3,554	-3,614	-3,483
,900	,032	,030	,035	-3,443	-3,511	-3,355
,910	,033	,031	,036	-3,416	-3,487	-3,324
,920	,034	,031	,037	-3,386	-3,460	-3,289
,930	,035	,032	,039	-3,354	-3,432	-3,251
,940	,036	,033	,040	-3,318	-3,400	-3,209
,950	,038	,035	,042	-3,277	-3,363	-3,160
,960	,040	,036	,045	-3,229	-3,321	-3,103
,970	,042	,038	,048	-3,170	-3,270	-3,032
,980	,045	,041	,053	-3,091	-3,201	-2,937
,990	,051	,045	,062	-2,967	-3,094	-2,787

a. Base del logaritmo = 2.718.



Anexo 3. PROBIT Viabilidad de los esporozoitos de *E. bovis* incubados con polvo de *C. longa* durante 4 h.

Información sobre los datos

		Nº de casos
Válidos		12
	Perdidos	0
Rechazados	Número de respuestas > Número de sujetos	0
Grupo control		4

Información sobre la convergencia

	Número de iteraciones	Solución óptima encontrada
PROBIT	10	Sí

Estimaciones de los parámetros

Parámetro	Estimación	Error típico	Z	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
PROBIT ^a Dosis	24,308	6,106	3,981	,000	12,340	36,276
Intersección	-,413	,159	-2,590	,010	-,572	-,253

a. Modelo PROBIT: $PROBIT(p) = \text{Intersección} + BX$

Contrastes de chi-cuadrado

		Chi-cuadrado	gl ^b	Sig.
PROBIT	Contraste de la bondad de ajuste de Pearson	8,784	10	,553 ^a

a. Como el nivel de significación es mayor que .150, no se utiliza un factor de heterogeneidad en el cálculo de los límites de confianza.

b. Los estadísticos basados en casos individuales difieren de los estadísticos basados en casos agregados.

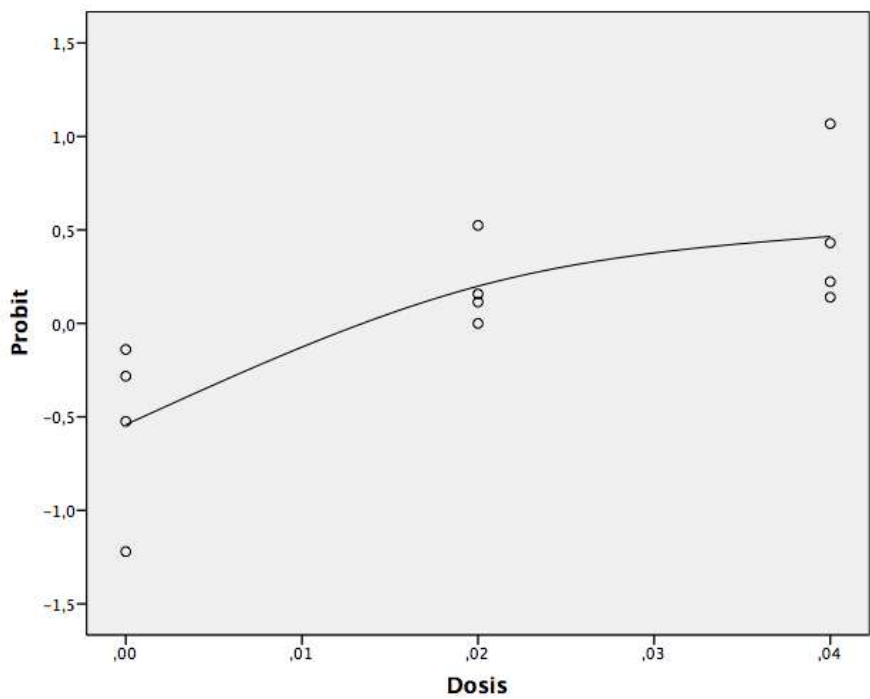
Residuos y frecuencias de casillas

Número	Dosis	Número de sujetos	Respuestas observadas	Respuestas esperadas	Residuos	Probabilidad
1	,000	18	7	6,119	,881	,340
2	,000	9	4	3,060	,940	,340
3	,000	20	6	6,799	-,799	,340
4	,000	9	1	3,060	-2,060	,340
5	,020	10	7	5,293	1,707	,529
PROBI T 6	,020	11	6	5,823	,177	,529
7	,020	10	5	5,293	-,293	,529
8	,020	16	9	8,469	,531	,529
9	,040	17	10	12,107	-2,107	,712
10	,040	9	5	6,410	-1,410	,712
11	,040	12	8	8,546	-,546	,712
12	,040	21	18	14,956	3,044	,712

Límites de confianza

Probabilidad	Límites de confianza al 95% para Dosis		
	Estimación	Límite inferior	Límite superior
,010	-,079	-,175	-,045
,020	-,068	-,153	-,038
,030	-,060	-,139	-,033
,040	-,055	-,129	-,029
,050	-,051	-,120	-,026
,060	-,047	-,113	-,024
,070	-,044	-,107	-,022
,080	-,041	-,101	-,020
PROBIT ,090	-,038	-,096	-,018
,100	-,036	-,091	-,016
,150	-,026	-,071	-,009
,200	-,018	-,056	-,003
,250	-,011	-,043	,002
,300	-,005	-,031	,006
,350	,001	-,020	,011
,400	,007	-,011	,015
,450	,012	-,002	,020

,500	,017	,006	,026
,550	,022	,013	,032
,600	,027	,019	,040
,650	,033	,024	,049
,700	,039	,029	,060
,750	,045	,034	,071
,800	,052	,039	,084
,850	,060	,045	,100
,900	,070	,052	,119
,910	,072	,054	,124
,920	,075	,056	,129
,930	,078	,058	,135
,940	,081	,060	,141
,950	,085	,062	,148
,960	,089	,065	,157
,970	,094	,069	,167
,980	,101	,074	,181
,990	,113	,081	,203



Anexo 4. PROBIT Viabilidad de los esporozoitos de *E. bovis* incubados con curcumina (Sigma-Aldrich ®) durante 60 min.

Información sobre los datos

		Nº de casos
Válidos		9
	Perdidos	0
	La transformación log no se puede realizar	0
Rechazados	Número de respuestas > Número de sujetos	0
Grupo control		3

Información sobre la convergencia

	Número de iteraciones	Solución óptima encontrada
PROBIT	18	Sí

Estimaciones de los parámetros

Parámetro	Estimación	Error típico	Z	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
PROBIT ^a Dosis	,159	,044	3,628	,000	,073	,244
Intersección	-1,703	,055	-30,885	,000	-1,758	-1,648

a. Modelo PROBIT: $PROBIT(p) = \text{Intersección} + BX$ (Las covariables X se transforman utilizando el logaritmo en base 2.718.)

Contrastes de chi-cuadrado

		Chi-cuadrado	gl ^b	Sig.
PROBIT	Contraste de la bondad de ajuste de Pearson	19,978	7	,006 ^a

- a. Como el nivel de significación es menor que .150, se utiliza un factor de heterogeneidad en el cálculo de los límites de confianza.
- b. Los estadísticos basados en casos individuales difieren de los estadísticos basados en casos agregados.

Residuos y frecuencias de casillas

	Número	Dosis	Número de sujetos	Respuestas observadas	Respuestas esperadas	Residuos	Probabilidad
PROBIT	1	-2,996	163	4	2,396	1,604	,015
	2	-2,996	195	2	2,867	-,867	,015
	3	-2,996	163	3	2,396	,604	,015
	4	,000	209	9	9,261	-,261	,044
	5	,000	231	7	10,236	-3,236	,044
	6	,000	221	5	9,793	-4,793	,044
	7	,693	214	24	11,901	12,099	,056
	8	,693	207	7	11,512	-4,512	,056
	9	,693	191	10	10,622	-,622	,056

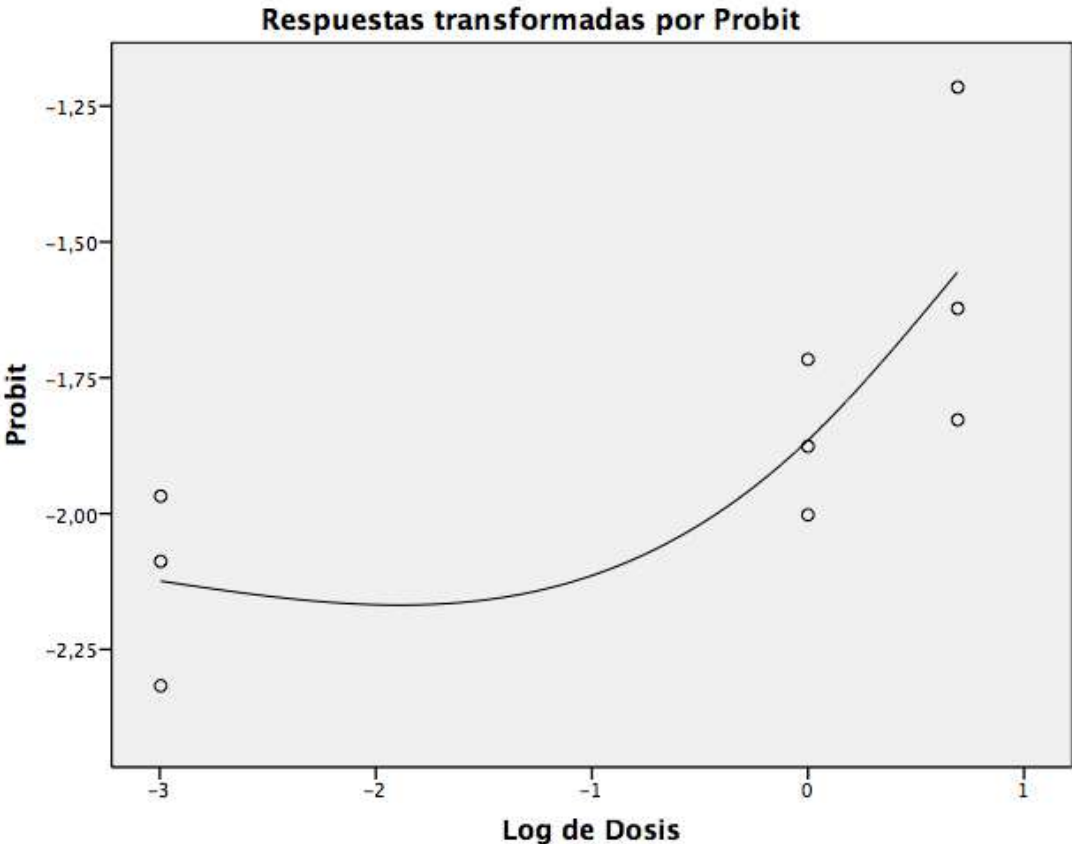
Límites de confianza

Probabilidad	Límites de confianza al 95% para Dosis			Límites de confianza al 95% para log(Dosis) ^b		
	Estimación	Límite inferior	Límite superior	Estimación	Límite inferior	Límite superior
,010	,020	.	.	-3,931	.	.
,020	,109	.	.	-2,212	.	.
,030	,325	.	.	-1,122	.	.
,040	,739	.	.	-,302	.	.
,050	1,440	.	.	,365	.	.
,060	2,540	.	.	,932	.	.
,070	4,179	.	.	1,430	.	.
,080	6,526	.	.	1,876	.	.
,090	9,788	.	.	2,281	.	.
,100	14,214	.	.	2,654	.	.
,150	66,625	.	.	4,199	.	.
,200	227,435	.	.	5,427	.	.

,250	652,102	.	.	6,480	.	.
,300	1679,291	.	.	7,426	.	.
,350	4034,628	.	.	8,303	.	.
,400	9268,922	.	.	9,134	.	.
,450	20726,180	.	.	9,939	.	.
,500	45758,129	.	.	10,731	.	.
,550	101022,304	.	.	11,523	.	.
,600	225895,358	.	.	12,328	.	.
,650	518958,942	.	.	13,160	.	.
,700	1246839,26	.	.	14,036	.	.
	5					
,750	3210859,59	.	.	14,982	.	.
	7					
,800	9206163,26	.	.	16,035	.	.
	0					
,850	31426867,3	.	.	17,263	.	.
	16					
,900	147304716,	.	.	18,808	.	.
	710					
,910	213925765,	.	.	19,181	.	.
	263					
,920	320851845,	.	.	19,586	.	.
	675					
,930	501039018,	.	.	20,032	.	.
	537					
,940	824243571,	.	.	20,530	.	.
	802					
,950	1454167993	.	.	21,098	.	.
	,254					
,960	2833281252	.	.	21,765	.	.
	,827					
,970	6432923816	.	.	22,585	.	.
	,023					
,980	1913401906	.	.	23,675	.	.
	0,792					
,990	1066448083	.	.	25,393	.	.
	88,920					

a. Se utiliza un factor de heterogeneidad.

b. Base del logaritmo = 2.718.



Anexo 5. PROBIT Viabilidad de los esporozoitos de *E. bovis* incubados con curcumina (Sigma-Aldrich ®) durante 4 h.

Información sobre los datos

		Nº de casos
Válidos		12
	Perdidos	0
	La transformación log no se puede realizar	0
Rechazados	Número de respuestas > Número de sujetos	0
Grupo control		6

Información sobre la convergencia

	Número de iteraciones	Solución óptima encontrada
PROBIT	12	Sí

Estimaciones de los parámetros

Parámetro	Estimación	Error típico	Z	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
PROBIT ^a Dosisn	,596	,190	3,134	,002	,223	,969
Intersección	-1,119	,288	-3,891	,000	-1,407	-,832

a. Modelo PROBIT: $PROBIT(p) = \text{Intersección} + BX$ (Las covariables X se transforman utilizando el logaritmo en base 2.718.)

Contrastes de chi-cuadrado

		Chi-cuadrado	gl ^b	Sig.
PROBIT	Contraste de la bondad de ajuste de Pearson	3,863	10	,953 ^a

a. Como el nivel de significación es mayor que .150, no se utiliza un factor de heterogeneidad en el cálculo de los límites de confianza.

b. Los estadísticos basados en casos individuales difieren de los estadísticos basados en casos agregados.

Residuos y frecuencias de casillas

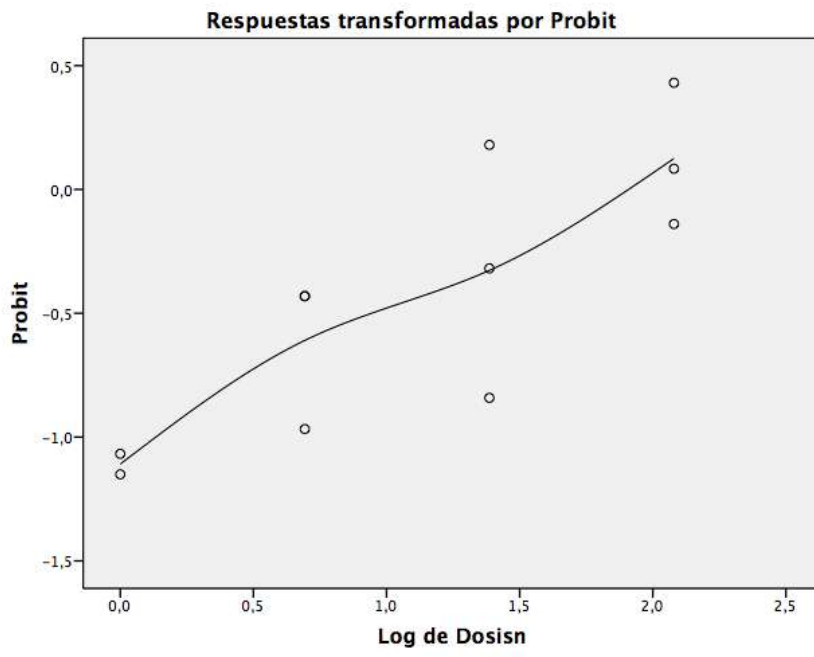
	Número	Dosis	Número de sujetos	Respuestas observadas	Respuestas esperadas	Residuos	Probabilidad
PROBIT	1	,000	8	1	1,052	-,052	,132
	2	,000	7	1	,921	,079	,132
	3	,000	4	0	,526	-,526	,132
	4	,693	6	2	1,441	,559	,240
	5	,693	6	2	1,441	,559	,240
	6	,693	6	1	1,441	-,441	,240
	7	1,386	8	3	3,080	-,080	,385
	8	1,386	5	1	1,925	-,925	,385
	9	1,386	7	4	2,695	1,305	,385
	10	2,079	6	4	3,289	,711	,548
	11	2,079	9	4	4,933	-,933	,548
	12	2,079	15	8	8,222	-,222	,548

Límites de confianza

Probabilidad	Límites de confianza al 95% para Dosis			Límites de confianza al 95% para log(Dosis) ^a		
	Estimación	Límite inferior	Límite superior	Estimación	Límite inferior	Límite superior
,010	,132	,000	,502	-2,024	-7,644	-,688
,020	,209	,002	,671	-1,567	-6,432	-,399
,030	,279	,003	,807	-1,277	-5,664	-,214
,040	,347	,006	,929	-1,059	-5,088	-,074
,050	,414	,010	1,042	-,881	-4,620	,041
,060	,482	,015	1,150	-,730	-4,222	,140
PROBIT ,070	,550	,021	1,255	-,598	-3,874	,227
,080	,619	,028	1,358	-,479	-3,563	,306
,090	,690	,038	1,460	-,371	-3,281	,378
,100	,762	,049	1,561	-,272	-3,022	,445
,150	1,149	,141	2,081	,139	-1,960	,733
,200	1,593	,322	2,666	,465	-1,134	,980
,250	2,108	,635	3,391	,746	-,454	1,221

,300	2,711	1,119	4,400	,997	,112	1,482
,350	3,423	1,768	5,992	1,231	,570	1,790
,400	4,271	2,512	8,723	1,452	,921	2,166
,450	5,291	3,280	13,497	1,666	1,188	2,602
,500	6,532	4,060	21,788	1,877	1,401	3,081
,550	8,064	4,879	36,229	2,087	1,585	3,590
,600	9,990	5,776	61,829	2,302	1,754	4,124
,650	12,464	6,800	108,660	2,523	1,917	4,688
,700	15,738	8,012	198,392	2,756	2,081	5,290
,750	20,242	9,510	382,097	3,008	2,252	5,946
,800	26,790	11,456	796,412	3,288	2,439	6,680
,850	37,140	14,177	1882,214	3,615	2,652	7,540
,900	56,020	18,462	5576,693	4,026	2,916	8,626
,910	61,867	19,668	7252,947	4,125	2,979	8,889
,920	68,913	21,065	9651,221	4,233	3,048	9,175
,930	77,589	22,712	13215,377	4,351	3,123	9,489
,940	88,577	24,698	18776,380	4,484	3,207	9,840
,950	103,020	27,171	28033,275	4,635	3,302	10,241
,960	123,025	30,386	44904,588	4,812	3,414	10,712
,970	153,018	34,853	80165,759	5,031	3,551	11,292
,980	204,501	41,803	173295,784	5,321	3,733	12,063
,990	323,010	55,627	584597,129	5,778	4,019	13,279

a. Base del logaritmo = 2.718.



Anexo 6. Tasa de infección de los esporozoitos de *E. bovis* incubados con curcumina (Sigma-Aldrich ®) 24 hpi.

Factores inter-sujetos

	N	
Dosis	,00	12
	,10	12
	1,00	12
	2,00	12
	4,00	12
	8,00	12
Celula	1	24
	2	24
	3	24

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: infectadas

Origen		Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Intersección	Hipótesis	2762,722	1	2762,722	424,128	,002
	Error	13,028	2	6,514 ^a		
Dosis	Hipótesis	185,278	5	37,056	6,866	,005
	Error	53,972	10	5,397 ^b		
Celula	Hipótesis	13,028	2	6,514	1,207	,339
	Error	53,972	10	5,397 ^b		
Dosis * Celula	Hipótesis	53,972	10	5,397	2,191	,032
	Error	133,000	54	2,463 ^c		

a. MS(Celula)

b. MS(Dosis * Celula)

c. MS(Error)

Media cuadrática esperada^{a,b}

Origen	Componente de la varianza			
	Var(Celula)	Var(Dosis * Celula)	Var(Error)	Término cuadrático
Intersección	24,000	4,000	1,000	Intersección,
Dosis	,000	4,000	1,000	Dosis
Celula	24,000	4,000	1,000	Dosis
Dosis * Celula	,000	4,000	1,000	
Error	,000	,000	1,000	

a. Para cada fuente, la media cuadrática esperada es igual a la suma de los coeficientes de las casillas por las componentes de la varianza, más un término cuadrático que incluye los efectos de la casilla Término cuadrático.

b. Las medias cuadráticas esperadas se basan en la suma de cuadrados tipo III.

Medias marginales estimadas

Dosis

Variable dependiente: infectadas

Dosis	Media	Error típ.	Intervalo de confianza 95%	
			Límite inferior	Límite superior
,00	8,250	,453	7,342	9,158
,10	6,750	,453	5,842	7,658
1,00	6,333	,453	5,425	7,242
2,00	7,250	,453	6,342	8,158
4,00	5,417	,453	4,508	6,325
8,00	3,167	,453	2,258	4,075

Pruebas post hoc
Dosis

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: infectadas

(I)Dosis	(J)Dosis	Diferencia de medias (I-J)	Error típ.	Sig.	Intervalo de confianza 95%	
					Límite inferior	Límite superior
	,10	1,50	,641	,196	-,39	3,39
	1,00	1,92*	,641	,046	,02	3,81
,00	2,00	1,00	,641	,627	-,89	2,89
	4,00	2,83*	,641	,001	,94	4,73
	8,00	5,08*	,641	,000	3,19	6,98
,00	,10	-1,50	,641	,196	-3,39	,39
	1,00	,42	,641	,986	-1,48	2,31
,10	2,00	-,50	,641	,970	-2,39	1,39
	4,00	1,33	,641	,312	-,56	3,23
	8,00	3,58*	,641	,000	1,69	5,48
,00	,10	-1,92*	,641	,046	-3,81	-,02
	,10	-,42	,641	,986	-2,31	1,48
1,00	2,00	-,92	,641	,708	-2,81	,98
	4,00	,92	,641	,708	-,98	2,81
DHS de Tukey	8,00	3,17*	,641	,000	1,27	5,06
,00	,10	-1,00	,641	,627	-2,89	,89
	,10	,50	,641	,970	-1,39	2,39
2,00	1,00	,92	,641	,708	-,98	2,81
	4,00	1,83	,641	,063	-,06	3,73
	8,00	4,08*	,641	,000	2,19	5,98
,00	,10	-2,83*	,641	,001	-4,73	-,94
	,10	-1,33	,641	,312	-3,23	,56
4,00	1,00	-,92	,641	,708	-2,81	,98
	2,00	-1,83	,641	,063	-3,73	,06
	8,00	2,25*	,641	,011	,36	4,14
,00	,10	-5,08*	,641	,000	-6,98	-3,19
8,00	,10	-3,58*	,641	,000	-5,48	-1,69
	1,00	-3,17*	,641	,000	-5,06	-1,27
	2,00	-4,08*	,641	,000	-5,98	-2,19

t de Dunnett (bilateral) ^b	4,00	-2,25*	,641	,011	-4,14	-,36
	,10	,00	-1,50	,641	,089	,16
	1,00	,00	-1,92*	,641	,018	-,26
	2,00	,00	-1,00	,641	,392	,66
	4,00	,00	-2,83*	,641	,000	-1,17
	8,00	,00	-5,08*	,641	,000	-3,42

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = 2.463.

*. La diferencia de medias es significativa al nivel

b. Las pruebas t de Dunnett tratan un grupo como control y lo comparan con todos los demás grupos.

Subconjuntos homogéneos

		infectadas		
Dosis	N	Subconjunto		
		1	2	3
8,00	12	3,17		
4,00	12		5,42	
1,00	12		6,33	
,10	12		6,75	6,75
2,00	12		7,25	7,25
,00	12			8,25
Sig.		1,000	,063	,196

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.

Basadas en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = 2.463.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 12.000

b. Alfa =

Gráficos de perfil

