



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA  
PRODUCCIÓN Y LA SALUD ANIMAL  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

*“DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTICOCCIDIANO IN VITRO DE LA NARINGENINA Y  
CÁSCARAS DE TORONJA DESHIDRATADAS (Citrus x Paradisi)”*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

AGUSTÍN PÉREZ FONSECA

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Yazmín Alcalá Canto

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Lilia Gutiérrez Olvera

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM

Dra. María Esther Ortega Cerrilla

Colegio de Postgraduados, Universidad Autónoma Chapingo

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX.

MARZO, 2023



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## DEDICATORIA

A Isabel

A la familia

## **AGRADECIMIENTOS**

A la UNAM, que todo me dio y a la cuál siempre le estaré en deuda.

A la FMVZ-UNAM, mi segundo hogar, donde todo aprendí y conocí.

Al Departamento de Parasitología de la FMVZ-UNAM que, a pesar de todo, llevo siempre en mi memoria y en mi corazón.

A la Dra. Yazmín Alcalá Canto por dirigir mis tres tesis, por su amistad y acompañamiento.

A las Dras. Lilia Gutiérrez Olvera y Esther Ortega Cerrilla, mi comité tutor.

A la Dra, Cintli Martínez Ortiz de Montellano por su siempre sincera amistad, sabios consejos y experiencias.

A la Dra. Cristina Guerrero Molina por siempre mantenerme presente.

Al Dr. Alejandro Benítez Guzmán y su maravilloso equipo (Claudia, Omar, Montse) por todo el conocimiento compartido y la oportunidad de trabajar en su laboratorio.

Al Dr. Carlos Gutiérrez Olvera por su apoyo, sabios consejos y siempre interesantes charlas.

Al Dr. Alejandro Besné Mérida, quien me inició en este camino y que me tiró un salvavidas cuando más lo necesitaba.

Al Dr. Gilberto Ballesteros Rodea por las muestras y el alojamiento en San Luis Potosí.

A la ENALLT-UNAM; su directora, Dra. Carmen Contijoch Escontria; Dra. Claudia García Llampallas; Mtra. Sussy Rodríguez Orta, y en especial a la Lic. Yunué Pliego Jiménez por su maravilloso y cálido recibimiento, alojamiento, apoyo y cariño durante el término de este proceso.

A todas y todos las y los aprendientes con los que he tenido el gusto de compartir en un salón de clases.

A la Dra. Rose Marie Venegas por abrirme un espacio de atención psicológica sin el cual no hubiera podido terminar este durísimo camino.

Y mi mayor y más grande agradecimiento a la MMVZ Isabel Barragán López, quien nunca me dejó rendirme y que constantemente me hace consciente de mis capacidades. Solamente ella sabe lo difícil que fue este arduo camino.

## RESUMEN

**PÉREZ FONSECA AGUSTÍN.** “Determinación del efecto anticoccidiano *in vitro* de la naringenina y cáscaras de toronja deshidratadas (*Citrus x paradisi*).”

Los anticoccidianos son los fármacos de elección para el control de la coccidiosis, pero la necesidad de tener alternativas naturales para este fin ha promovido que se investiguen plantas, sus subproductos y extractos que promuevan el desempeño animal y que a la vez puedan reducir la eliminación de ooquistes de *Eimeria* sin dejar residuos farmacológicos. En la presente investigación se realizaron dos experimentos independientes para evaluar el efecto de la naringenina y las cáscaras deshidratadas de toronja sobre la infección con *Eimeria* y sobre la integridad intestinal. En el primer experimento se utilizó un cultivo celular con Células Endoteliales de la Vena del Cordón Umbilical Bovino (BUVEC) infectadas con esporozoitos de la coccidia caprina *Eimeria ninakohlyakimovae* e incubadas con soluciones de naringenina. Se observó mortalidad de esporozoitos en los grupos tratados así como una disminución de la tasa de infección. En el segundo experimento, se utilizó un cultivo celular con Células Endoteliales Intestinales Caprinas (CIEC) para evaluar la integridad de las células infectadas con esporozoitos de la coccidia caprina *Eimeria ninakohlyakimovae* e incubadas con cáscaras deshidratadas de toronja (CDT), así como el porcentaje de infección y desarrollo de esquizontes de los parásitos expuestos a CDT. Los grupos CDT y los incubados con Toltrazuril (TTZ) incrementaron los valores de la resistencia eléctrica transepitelial (TEER), disminuyeron la invasión de los esporozoitos de *E. ninakohlyakimovae* y redujeron el número y el tamaño de los esquizontes/mm<sup>2</sup> de las células cultivadas. Estos hallazgos demuestran el efecto benéfico de la naringenina y las CDT en la coccidiosis caprina *in vitro*.

## **Abstract**

**Pérez Fonseca Agustín.** “In vitro anticoccidial effect determination of naringenin and dehydrated grapefruit peel (*Citrus x paradisi*).”

Anticoccidial drugs are among the preferred resources to control coccidiosis, but the need to have natural alternatives has prompted research into plant products that improve animal performance and reduce *Eimeria* oocyst shedding while avoiding problems of drug residues. Two studies were conducted to evaluate the effects of naringenin and dehydrated grapefruit peels (GDP) on *Eimeria* infection and intestinal health. In the first study, Bovine Umbilical Cord Endothelial Cells (BUVEC) were cultured and infected with *Eimeria ninakohlyakimovae* sporozoites and then exposed to different concentrations of a naringenin solution. Sporozoites mortality was observed as well as a diminished infection rate. In the second study, an in vitro culture system was used to evaluate the integrity of caprine epithelial cells infected with *Eimeria ninakohlyakimovae* and incubated with GDP, as well as the infection rate and schizont development of parasites exposed to GDP. Transepithelial Electric Resistance (TEER) values were increased in GDP and Toltrazuril (TTZ) groups, as well as a decreased cell invasion rate of sporozoites of *E. ninakohlyakimovae* and a reduced number and size of schizonts/mm<sup>2</sup> of the intestinal cells culture. These findings demonstrate the beneficial activities of naringenin and GDP on caprine coccidiosis *in vitro*.

# ÍNDICE

<b>1. Introducción.....</b>	<b>1</b>
1.1 Generalidades de la coccidiosis.....	1
1.2 Ciclo biológico de <i>Eimeria</i> spp.....	1
1.3 Patogenia y lesiones de la coccidiosis.....	2
1.4 Manifestaciones clínicas de la coccidiosis.....	3
1.5 Respuesta inmune a la coccidiosis.....	3
1.6 Diagnóstico de la coccidiosis.....	3
1.7 Tratamiento y control de la coccidiosis.....	4
2. Revisión de literatura.....	4
2.1 Flavonoides.....	6
3. Hipótesis.....	9
4. Objetivos.....	10
4.1 Objetivos generales.....	10
4.2 Objetivos específicos.....	10
5. EXPERIMENTO 1: Determinación del efecto anticoccidiano del extracto comercial de naringenina <i>in vitro</i> .....	11
5.1 Material y métodos.....	11
5.1.1 Estudios <i>in vitro</i> .....	11
5.1.2 Parásitos.....	11
5.1.3 Cultivo celular.....	11
5.1.4 Efecto de la naringenina sobre la viabilidad, tasa de infección y porcentaje de reproducción de los esporozoitos de <i>Eimeria ninakohlyakimovae</i> .....	12
5.1.4.1 Naringenina comercial.....	12
5.1.4.2 Ensayos de viabilidad de los esporozoitos de <i>E. ninakohlyakimovae</i> .....	12
5.1.4.3 Tasa de infección de esporozoitos de <i>E. ninakohlyakimovae</i> .....	13
5.1.4.4 Inhibición del porcentaje de reproducción.....	14

5.1.4.5 Determinación de la concentración inhibitoria 50% de la naringenina (Sigma Aldrich®) contra <i>Eimeria in vitro</i> .....	14
5.2 Analisis de datos.....	14
5.2.1 Estudios <i>in vitro</i> .....	14
5.2.2 Tasa de infección de <i>Eimeria</i> y desarrollo de esquizontes.....	14
5.2.3 Viabilidad celular.....	15
5.3 Resultados.....	15
5.3.1 Porcentaje de mortalidad de esporozoitos de <i>Eimeria ninakohlyakimovae</i> expuestas a la naringenina <i>in vitro</i> .....	15
5.3.2 Tasa de infección de esporozoitos de <i>E. ninakohlyakimovae</i> expuestos a naringenina.....	16
5.3.3 Inhibición del porcentaje de reproducción.....	16
5.3.4 Determinación de la DL <sub>50</sub> .....	17
6. Experimento 2. Determinación del efecto anticoccidiano de las cáscaras deshidratadas de toronja <i>in vitro</i> .....	18
6.1 Material y métodos.....	18
6.1.2 Cáscara deshidratada de toronja (GDP).....	18
6.1.3 Análisis HPLC.....	18
6.1.4 Estudios <i>in vitro</i> .....	18
6.1.4.1 Parásitos para los estudios <i>in vitro</i> .....	18
6.1.4.2 Ensayos de citotoxicidad de los compuestos experimentales.....	19
6.1.4.3 Infección del cultivo celular.....	21
6.1.4.4 Efecto de las GDP sobre la integridad de la barrera intestinal.....	22
6.2 Análisis estadístico.....	22
6.2.1 Estudios <i>in vitro</i> .....	22
6.2.2 Viabilidad celular.....	23
6.2.3 Resistencia de la monocapa epitelial.....	23
6.3 Resultados.....	23



6.3.1 HPLC.....	23
6.3.2 Citotoxicidad de los compuestos experimentales.....	23
6.3.3 Desarrollo del cultivo celular.....	24
6.3.4 Efecto de las GDP sobre la integridad de la membrana de las células intestinales.....	27
7. Discusión.....	29
8. Conclusiones.....	35
9. Referencias.....	36

## LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Mortalidad ( $\pm$ error estándar) de los esporozoitos de <i>E. ninakohlyakimovae</i> expuestos al medio de cultivo (Medio), DMSO y cinco dosis de naringenina durante 1, 4 y 24 horas.....	15
Cuadro 2. Porcentaje medio de infección $\pm$ error estándar de los esporozoitos de <i>E. ninakohlyakimovae</i> expuestos al medio de cultivo (Medio), DMSO y cinco dosis de naringenina durante 24 horas.....	16
Cuadro 3. Diferencias del promedio del número de esquizontes de <i>Eimeria</i> por mm <sup>2</sup> cultivados por 8 y 15 días.....	17
Cuadro 4. Dosis letal 50 (DL <sub>50</sub> ) (límite inferior, límite superior) de cinco diferentes dosis de naringenina (NAR).....	17
Cuadro 5. Efecto de la adición de una solución de 100 $\mu$ M de cáscaras deshidratadas de toronja (CDT), toltrazuril comercial (TTZ) o DMSO (vehículo) sobre la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) en diferentes puntos de tiempo sobre células caprinas epiteliales cultivadas in vitro ( $\Omega$ .cm <sup>2</sup> , media $\pm$ E.E.) (n = 10 repeticiones independientes).....	28

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Tasa de invasión celular.....	25
Figura 2A. Media de esquizontes/mm <sup>2</sup> a los 8 dpi.....	26
Figura 2B. Media de esquizontes/mm <sup>2</sup> a los 15 dpi.....	27

## 1. Introducción

### 1.1 Generalidades de la coccidiosis

Las coccidiosis o eimeriosis son causadas por protozoarios que se agrupan taxonómicamente dentro del género *Eimeria*, perteneciente a la familia *Eimeriidae* del phylum *Apicomplexa*. En general, todas las especies de *Eimeria* que infectan rumiantes completan su desarrollo y reproducción en el tubo digestivo de hospedadores específicos (Taylor, 2007).

La coccidiosis o eimeriosis se considera como la enfermedad parasitaria de mayor importancia en rumiantes durante el periodo de destete, debido a las pérdidas económicas provocadas por las altas tasas de mortalidad y el retraso del crecimiento en los animales infectados. La coccidiosis clínica se desarrolla cuando un alto número de ooquistes esporulados acceden al tubo intestinal por ingestión, invadiendo las células intestinales del hospedador para, posteriormente, realizar una reproducción asexual dentro de las células invadidas, provocando su destrucción (Jolley and Bardsley, 2006; Chartier and Paraud, 2012).

La mayoría de las especies que infectan rumiantes no provocan signos en animales adultos, a pesar de que se encuentren cuando se realizan análisis diagnósticos estándar. Consecuentemente, es importante diferenciar las especies patógenas de las de menor importancia clínica (Kauffman, 1996).

Se han descrito 16 especies de *Eimeria* que comúnmente infectan a las cabras, de las cuales, *E. ninakohlyakimovae*, *E. arloingi*, *E. alijevi* y *E. christenseni* son consideradas las más prevalentes y patógenas en caprinos (Jolley and Bardsley, 2006; Chartier and Paraud, 2012).

### 1.2 Ciclo biológico de *Eimeria* spp.

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

ambientales letales (Levine, 1978). La esquizogonia o merogonia involucra dos ciclos en los que los merozoitos se reproducen por fisión múltiple. Después de la maduración de los merontes, la célula parasitada del hospedador se rompe y libera los merozoitos que penetran a otras células y el ciclo se repite o progresa hacia gamogonia o gametogonia. La gamogonia o gametogonia es el estadio sexual del desarrollo y la fase terminal en el hospedador. El merozoito entra a las células y produce macrogamontes o microgamontes que maduran a macrogametos y microgametos, respectivamente. Se fertiliza el macrogameto y produce un cigoto, alrededor del cual se forma una pared quística que se conoce como ooquiste, el cual se excreta del hospedador con la materia fecal. La esporogonia consiste en la maduración del ooquiste al exponerse a temperatura, oxígeno y humedad favorables. El ooquiste esporulado e infeccioso contiene 4 esporoquistes o esporoblastos que en el interior presentan cada uno 2 esporozoitos. La infección del hospedador comienza cuando las heces que contienen ooquistes infecciosos son ingeridas con agua o alimento contaminados. Se liberan los esporozoitos y se inicia la fase asexual del desarrollo. El ciclo biológico completo dura aproximadamente de 12 a 28 días, dependiendo de la especie de *Eimeria* y del hospedador (Chartier and Paraud, 2012).

### **1.3 Patogenia y lesiones de la coccidiosis**

La severidad de la infección por *Eimeria* depende de dos factores importantes: los parásitos como tales y la reacción del hospedador hacia ellos. Ambos causan cambios estructurales que reducen la función del tubo intestinal y desencadenan una serie de cambios fisiológicos, tales como enteritis catarral, congestión intestinal con moco y fibrina; edema en las capas mucosa y submucosa y nódulos grisáceos de 1-2 mm de diámetro en la mucosa intestinal debidas al desarrollo de las diversas fases del parásito. Histológicamente se observa hiperplasia, pérdida de la superficie celular, pérdida de células de la cripta intestinal, atrofia de las vellosidades; lo que provocará reducción de la absorción de nutrientes (Mehlhorn, 2016; Urquhart, 1996, Chartier and Paraud, 2012).

#### **1.4 Manifestaciones clínicas de la coccidiosis**

En los animales que cursan con coccidiosis clínica se observa diarrea acuosa con moco y con diversas tonalidades de color que pueden variar, siendo café, verde o amarillenta. La presencia de sangre es poco frecuente (Chartier and Paraud, 2012). Los animales muestran dolor abdominal, anemia macrocítica hipocrómica, pérdida del apetito, deshidratación, tenesmo, debilidad y pérdida de peso. La depresión, inactividad y recumbencia también son evidentes. La susceptibilidad de los animales hacia la enfermedad se incrementa a las cuatro semanas de edad por la condición de estrés que desarrollan los animales al ser destetados, pues esto tiene un efecto depresor sobre la respuesta inmune que debe ser considerada en la presentación de enfermedades en el periodo de adaptación (Tórtora, 2003).

#### **1.5 Respuesta inmune a la coccidiosis**

Los protozoarios del género *Eimeria* spp son capaces de inducir una respuesta inmune funcional.

Al montarse una respuesta inmune contra la invasión de las coccidias, se activan células como los macrófagos y polimorfonucleares (PMNc), cuya función principal es la generación de citocinas y especies reactivas de oxígeno (ROS); los neutrófilos y leucocitos aumentan la producción de especies reactivas de nitrógeno (NOS), las cuales inducirán a la producción de citocinas pro-inflamatorias en la mucosa intestinal.

De igual forma serán activadas las células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, las cuáles infiltrarán el tejido intestinal posterior a la exposición a *Eimeria* spp (Chartier and Paraud, 2012).

#### **1.6 Diagnóstico de la coccidiosis**

Los animales jóvenes que manifiestan diarrea, deshidratación, debilidad, anorexia y emaciación deben ser examinados para diagnosticar eimeriosis. El examen microscópico de las heces es el método de diagnóstico más efectivo desde el punto de vista costo-beneficio, así como el más sencillo y directo, aunque también se han desarrollado métodos serológicos analíticos mediante inmunoensayos (Jolley and Bardsley, 2006). El análisis fecal habitual involucra la concentración de los ooquistes

de las heces mediante el método de flotación con azúcar o sal, seguido de la identificación de las especies mediante la diferenciación microscópica de los ooquistes concentrados. La cuantificación de la carga parasitaria puede realizarse mediante el conteo de ooquistes en la cámara de McMaster (Figuroa, 2015). Los ooquistes son más numerosos entre los días 12 y 28 posteriores a la ingestión de ooquistes (Chartier and Paraud, 2012).

### **1.7 Tratamiento y control de la coccidiosis**

Los fármacos anticoccidianos son el recurso de elección para el control de la coccidiosis en diversas especies animales, teniendo como posibles opciones a elegir las sulfonamidas, el amprolio, los ionóforos, el decoquinato, toltrazuril y diclazuril (Chartier and Paraud, 2012; Ruiz et al., 2012).

La tendencia mundial actual para el control de la coccidiosis y otras enfermedades parasitarias es la de mantener a los animales con cargas parasitarias tolerables, lo cual estimulará la inmunidad y prolongará la aparición de resistencia a los fármacos anticoccidianos (Torres-Acosta et al., 2012). Dichas prácticas han demostrado resultados positivos en el control de la coccidiosis aviar (Alnassan et al., 2015; Nogareda et al., 2015).

Además, se ha observado que el desarrollo de inmunidad después de una infección por coccidias es rápido, por lo que se han dedicado varias investigaciones a encontrar productos administrados con fines profilácticos que proporcionen un nivel de protección suficiente al animal expuesto para permitir que desarrolle inmunidad propia (Greif 2000).

## **2. Revisión de literatura**

En la actualidad, el manejo de las enfermedades parasitarias incluye diferentes alternativas y una combinación de estrategias que persiguen el objetivo de realizar un control sustentable, manteniendo a los animales con cargas parasitarias tolerables que estimulen la inmunidad y así prolongar el tiempo de aparición de resistencia a los antiparasitarios. Dentro de estas alternativas se contempla el uso de alimentos con principios bioactivos que hayan mostrado un efecto contra agentes

etiológicos específicos (Hoste, 2015).

Con base en el principio de que el uso de plantas medicinales, ingredientes o alimentos que posean metabolitos con propiedades bioactivas son estrategias alternativas para controlar las parasitosis (Waller 2004), y en este caso particular la coccidiosis, una de las estrategias que se pueden utilizar para la prevención (profilaxis) de esta enfermedad es la de servir raciones complementadas con una selección de ingredientes con propiedades antiparasitarias que pueda mejorar la salud de los animales y brindar un control efectivo.

Para lograr esto, en el caso específico de la coccidiosis, se ha propuesto el uso de plantas con principios bioactivos que muestren un efecto anticoccidiano (Hoste, 2011; Wunderlich, 2014). Además, se ha documentado el efecto benéfico de plantas sobre la salud animal que puede ser alcanzado al utilizar tratamientos con base en plantas y sus derivados (Hoste, 2015; Lima, 2019; Saratsi, 2020).

Así mismo, la identificación y utilización de las sustancias activas provenientes de plantas permitirá la reducción de residuos químicos en los productos de origen animal, así como la prolongación del tiempo de aparición de resistencia a los fármacos más utilizados (Nordi, 2014), lo que se observará en la salud y la inmunidad contra las enfermedades (Patra, 2009).

El uso y efectos de las plantas y sus extractos sobre los parásitos es ampliamente conocido (Kauffman, 1996; Waller, 2004; Hoste, 2006; Alonso-Diaz, 2011; Hoste, 2015) por lo que se propone que el uso de terapéuticos de origen vegetal con potencial en la medicina veterinaria.

Los subproductos de la industria de alimentos pueden ser utilizados en la producción animal con dos propósitos específicos: disminución de costos y disminución del impacto ambiental (Gungor, 2021; Rakita, 2021; Tamiru, 2021). La cáscara y pulpa de las frutas del género *Citrus* son un ejemplo de cómo un subproducto de la industria puede ser incorporado a la alimentación animal debido a su alto contenido de sustancias bioactivas (Nordi, 2014; Tayengwa, 2021). Se ha demostrado que la pulpa y cáscaras de los cítricos contienen compuestos



polifenólicos con diversos efectos biológicos conocidos (Sun, 2013; Dourado, 2015; Wang, 2015).

De igual forma, se ha demostrado que su inclusión en la dieta de ovinos reduce las cargas parasitarias causadas por nematodos e incrementa las ganancias de peso (Nordi, 2014).

En un estudio previo se demostró que un extracto de naringenina, una flavanona presente en la cascara de tronja, podía disminuir la eliminación de ooquistes en ovinos infectados naturalmente con *Eimeria* spp, además de disminuir la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y aumentar la capacidad antioxidante en los animales infectados (Pérez-Fonseca et al., 2016).

## **2.1 Flavonoides**

Las cáscaras de los cítricos poseen numerosos flavonoides como los polimetoxilados, las flavanonas glicosiladas, flavonoles y el ácido fenólico entre otros (Anagnostopoulou, 2005).

Los flavonoides son un grupo de compuestos polifenólicos que poseen gran importancia en los vegetales. Se han identificado más de 8,000 compuestos de tipo flavonoide (Benavente-García, 2008). Estos compuestos han demostrado tener diversas actividades farmacológicas como inhibición enzimática, anti inflamatorios y anti oxidantes (Ishii, 1996). Gran parte de la actividad de los flavonoides tiene lugar sobre las células endoteliales, por lo que importante parte de la investigación que se ha realizado sobre las flavanonas de *Citrus* ha sido estudiando su actividad sobre la inflamación (García-Lafuente, 2009). En estudios *in vitro* se ha demostrado la capacidad que tienen los flavonoides para captar los radicales libres y por ende, ayudar en eventos degenerativos que involucran radicales de oxígeno (Benavente-García, 2008). En los últimos años se ha sustentado la idea de que ciertos flavonoides son moduladores de la expresión de genes pro-inflamatorios, favoreciendo la atenuación de la respuesta inflamatoria. Se ha demostrado que los flavonoides inhiben la producción de óxido nítrico en respuesta al estímulo inflamatorio (García-Lafuente, 2009). Asimismo, se ha comprobado la actividad de

los flavonoides como antiprotozoarios, principalmente contra *Trypanosoma*, *Leishmania* (dos Santos, 2012) *Cryptosporidium parvum* (Mead,2006), y *Plasmodium falciparum* (Tasdemir, 2006). Existe evidencia que indica que los flavonoides suprimen el desarrollo de algunos estadios de vida de los protozoarios al inhibir factores que protegen a los parásitos de los efectos de la respuesta inmune del hospedador. Un ejemplo de esto es la estimulación de citocinas protectoras hacia el mismo hospedador. Así mismo, se ha demostrado la capacidad de estos compuestos para inducir la apoptosis de protozoarios parásitos (Tasdemir, 2006).

Existe un amplio rango de flavonoides, entre los que se mencionan la naringenina, hesperedina, catequina, epicatequina, quercetina y genisteina entre otras (Vafeiadou, 2009). La naringenina (4',5,7-trihidroxiflavanona) es una flavanona predominante en *Citrus* y tiene un rango amplio de actividades farmacológicas. Esta flavanona está presente en las cáscaras de las naranjas y toronjas y tiene un potencial mayor para ingresar a la célula que otros flavonoides, lo que contribuye a su mayor actividad anti-inflamatoria con respecto a los otros compuestos con dosis menores (Ting, 2011; Chen, 2017). Otra de sus propiedades es la de bloquear la producción de óxido nítrico (Min-Hsiung, 2009). La naringenina ejerce parte de su efecto anti-inflamatorio mediante la inhibición de la producción de óxido nítrico y prostaglandina E<sub>2</sub> (Bodet, 2008). Además, la naringenina tiene la habilidad de activar a los PMNc para inducir actividad citotóxica (Ishii, 1996).

La naringenina y otros flavonoides han demostrado proteger la integridad de las uniones estrechas de las células intestinales que es la barrera mucosa intestinal (Chen and Kitts, 2017). Esta barrera queda expuesta cada vez que una carga alta de ooquistes de *Eimeria* spp es ingerida o cuando se presenta una deficiente respuesta inmune (Chartier and Paraud, 2012; Walker, 2015). El potencial anticoccidiano y antioxidante de los subproductos cítricos contra *Eimeria* ha sido previamente descrito en corderos *in vivo* (Perez-Fonseca, 2016). Desafortunadamente, aún no hay evidencias de los efectos de estos subproductos o sus extractos en cultivos celulares de células caprinas infectadas con *Eimeria ninakohlyakimovae*.

El mecanismo exacto por el cual la naringenina o el extracto de cáscaras de toronja

disminuyen la eliminación de ooquistes de *Eimeria* en pequeños ruminantes no ha sido descrito; sin embargo, no se descarta la posibilidad de que el efecto coccidiostático observado después de la ingestión de un extracto comercial de naringenina (>98% pureza) en corderos sea una consecuencia directa de un efecto tóxico de los flavonoides sobre los protozoarios (Perez-Fonseca et al., 2016). Por lo tanto, la reducción en la carga parasitaria resulta en una disminución de la inducción de mediadores inflamatorios y mecanismos oxidativos. Debido a esto, se propone el uso de un cultivo celular para obtener evidencia que pueda demostrar el efecto tóxico de las flavanonas sobre los parásitos *Eimeria* directamente expuestos al extracto de cítricos. Además, la disminución de la carga parasitaria en los animales que han sido tratados con extractos de cítricos puede deberse a un efecto de las flavanonas sobre la integridad de la barrera intestinal.

Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue el explorar el efecto la naringenina y de un extracto de cáscaras de toronja sobre el porcentaje de infección y desarrollo de esquizontes de *E. ninakohlyakimovae in vitro*

### **3. Hipótesis**

La administración de naringenina comercial ejerce un efecto anticoccidiano en cultivos *in vitro* infectados con protozoarios del género *Eimeria ninakohlyakimovae*.

La administración de cáscaras de toronja pulverizadas ejerce un efecto anticoccidiano en cultivos *in vitro* infectados con protozoarios del género *Eimeria ninakohlyakimovae*.

## **4. Objetivos**

### **4.1 Objetivos generales**

Determinar si la naringenina comercial y un pulverizado de cáscaras de toronja deshidratadas ejercen un efecto anticoccidiano en cultivos celulares.

### **4.2 Objetivos específicos**

- Determinar el efecto de la naringenina comercial en un cultivo *in vitro*.
- Determinar el efecto del pulverizado de cáscaras de toronja deshidratadas en un cultivo *in vitro*.

## 5. EXPERIMENTO 1

*Determinación del efecto anticoccidiano del extracto comercial de naringenina in vitro.*

### 5.1 Material y métodos

#### 5.1.1 Estudios *in vitro*

Los estudios *in vitro* se realizaron con la colaboración de la Dra. Liliana Silva del Institute of Parasitology de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Justus Liebig University Giessen, en Giessen, Alemania.

#### 5.1.2 Parásitos

La cepa de *E. ninakohlyakimovae* usada en el presente estudio fue proporcionada por la Dra. Liliana Silva del Institute of Parasitology de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Justus Liebig University Giessen, en Giessen, Alemania. Esta cepa ha sido mantenida por pasajes en cabritos machos libres de parásitos. Para la obtención de esporozoitos, estos fueron desenquistados de los ooquistes esporulados de acuerdo a la técnica descrita por Hermosilla et al. (2002), y posteriormente fueron suspendidos en medio ECGM modificado (ECGM Endothelial Cell Growth Medium (30%) + Medium 199 (70%) + 1% PS + 10% suero fetal bovino) (Carrau, 2016).

#### 5.1.3 Cultivo celular

Se usaron Células Endoteliales de la Vena del Cordón Umbilical Bovino (BUVEC). Estas células fueron aisladas de acuerdo a Taubert (2006) y cultivadas en medio ECGM modificado. Para determinar la influencia de los tratamientos, las BUVEC fueron cultivadas en placas de cultivo celular de 12 pozos y se incubaron a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>, cambiando el medio de cultivo cada 2 días hasta que las células fueron confluentes (Cervantes-Valencia, 2018).

#### 5.1.4 Efecto de la naringenina sobre la viabilidad, tasa de infección y porcentaje de reproducción de los esporozoitos de *Eimeria ninakohlyakimovae*

##### 5.1.4.1 Naringenina comercial

La naringenina con una pureza superior al 98% se obtuvo comercialmente (Sigma-Aldrich **T66001**), y se usó a dosis de 0.5  $\mu$ M, 1.0  $\mu$ M, 2.0  $\mu$ M, 4.0  $\mu$ M y 8.0  $\mu$ M basado en estudios previos (Cervantes, 2018). Previo a esto, se preparó una solución madre 20 mM añadiendo 11 mg de naringenina a 1500  $\mu$ l de dimetilsulfóxido (DMSO).

Esta solución madre fue utilizada para realizar las diferentes diluciones previamente mencionadas en Medio de Crecimiento de Células Endoteliales modificado (ModECGM).

Los diferentes tratamientos se prepararon de la siguiente manera:

Control (T01) = 5 ml ModECGM

DMSO (T02) = 5 ml ModECGM + 2  $\mu$ l DMSO

8 $\mu$ M (T03) = 10 ml ModECGM + 2  $\mu$ l DMSO + 4  $\mu$ l solución madre de naringenina (20mM)

4  $\mu$ M (T04) = 5 ml ModECGM + 2  $\mu$ l DMSO + 5 ml de 8  $\mu$ M naringenina

2  $\mu$ M (T05) = 5 ml ModECGM + 2  $\mu$ l DMSO + 5 ml de 4  $\mu$ M naringenina

1  $\mu$ M (T06) = 5 ml ModECGM + 2  $\mu$ l DMSO + 5 ml de 2  $\mu$ M naringenina

0.5  $\mu$ M (T06) = 5 ml ModECGM + 2  $\mu$ l DMSO + 5 ml de 1  $\mu$ M naringenina

##### 5.1.4.2 Ensayos de viabilidad de los esporozoitos de *E. ninakohlyakimovae*

Para determinar si el tratamiento fue capaz de producir daño en los esporozoitos de *E. ninakohlyakimovae*, se utilizaron  $4 \times 10^6$  esporozoitos recién desenquistados por tratamiento y fueron resuspendidos en los distintos tratamientos e incubados a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 60 minutos y 4 horas, en dos experimentos independientes. La viabilidad de los esporozoitos fue verificada mediante el método de tinción de azul de Trypan (Sigma). Con esta tinción, los parásitos que no fueron teñidos se consideraron viables y los que fueron teñidos se consideraron muertos.

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

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

#### 5.1.4.3 Tasa de infección de esporozoitos de *E. ninakohlyakimovae*

Para determinar si hubo un efecto remanente del tratamiento sobre los esporozoitos de *E. ninakohlyakimovae*, el cual resulte en una menor capacidad para infectar células del hospedador comparado con parásitos no tratados (testigo negativo), después que los parásitos fueron incubados en el tratamiento, se centrifugaron a 1200 rpm por 12 min, se eliminó el sobrenadante y los parásitos fueron lavados en medio ECGM modificado dos veces para eliminar cualquier residuo del tratamiento. Se infectaron pozos de células confluentes BUVEC con esporozoitos de *E. ninakohlyakimovae*, y se incubaron durante 24 h a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. A las 24 horas post-infección, se determinó la tasa de invasión. A las 24 y 48 horas post-infección (hpi), se contaron las células infectadas y las células totales de 4 campos visuales por tratamiento. Para determinar la tasa de infección se utilizó la siguiente fórmula:

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



#### *5.1.4.4 Inhibición del porcentaje de reproducción*

La evaluación del desarrollo del ciclo intracelular de *Eimeria* se determinó a los días 8 y 15 días post-infección. El día 8 se contaron los esquizontes, considerando un máximo de 50 campos microscópicos con o sin esquizontes. El día 15 se contaron los esquizontes maduros. El grado de desarrollo se expresó como número de esquizontes por mm<sup>2</sup> (Odden, 2019).

#### *5.1.4.5 Determinación de la concentración inhibitoria 50% de la naringenina (Sigma-Aldrich®) contra Eimeria in vitro*

Se determinó la concentración de naringenina capaz de inhibir al 50% de los parásitos (IC<sub>50</sub>).

### *5.2 Analisis de datos*

#### *Determinación de la concentración inhibitoria 50% de la naringenina*

Para determinar la IC<sub>50</sub> se usó la regresión probit usando el programa GraphPad Prim 8 (GraphPad Software Inc. USA) para tres experimentos independientes realizados por triplicado. Para el resto de los ensayos se realizaron las pruebas de ANDEVA y Tukey para comparar la actividad en los diferentes grupos experimentales. Los datos están expresados como media ± EE. Las diferencias se consideraron significativas cuando  $P < 0.05$ .

#### *5.2.1 Estudio in vitro*

Los análisis se realizaron usando el programa GraphPad Prism versión 9 para MacOs (GraphPad Software, San Diego, California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)).

#### *5.2.2 Tasa de infección de Eimeria y desarrollo de esquizontes*

El porcentaje de células infectadas por *Eimeria* se calculó como la media ± S.E.M. de al menos 5 replicas independientes. El nivel de significancia para las diferencias en invasión por parásitos, número y tamaño de esquizontes fue de 0.05. La prueba de Shapiro-Wilk se usó para determinar la normalidad. Los datos distribuidos normalmente fueron analizados usando un análisis de varianza (ANDEVA) y la

prueba de *t* de Dunnett (Tukey). Si la distribución normal no se cumpliera, se usó la prueba de Kruskal-Wallis.

### 5.2.3 Viabilidad celular

Los datos fueron comparados usando una prueba ANDEVA de una sola vía. Las diferencias fueron comparadas usando una prueba de Tukey con  $P < 0.05$  representando diferencias estadísticas significativas.

## 5.3 RESULTADOS

### 5.3.1 Porcentaje de mortalidad de esporozoitos de *Eimeria ninakohlyakimovae* expuestas a la naringenina *in vitro*

Los porcentajes de mortalidad de esporozoitos de *E. ninakohlyakimovae* se muestran en el Cuadro 1.

**Cuadro 1.** Mortalidad ( $\pm$  error estándar) de los esporozoitos de *E. ninakohlyakimovae* expuestos al medio de cultivo (Medio), DMSO y cinco dosis de naringenina durante 1, 4 y 24 horas.

Tiempo (horas)	Control (Medio)	Control (DMSO)	NAR1 (0.05 $\mu$ M)	NAR2 (1.0 $\mu$ M)	NAR3 (2.0 $\mu$ M)	NAR4 (4.0 $\mu$ M)	NAR5 (8.0 $\mu$ M)
1 h	1.380 $\pm$ 0.03622 <sup>a</sup>	1.488 $\pm$ 0.04308 <sup>a</sup>	1.434 $\pm$ 0.04124 <sup>a</sup>	1.493 $\pm$ 0.04798 <sup>a</sup>	1.458 $\pm$ 0.05603 <sup>a</sup>	1.401 $\pm$ 0.03661 <sup>a</sup>	1.509 $\pm$ 0.03596 <sup>a</sup>
4 h	2.890 $\pm$ 0.01387 <sup>a</sup>	3.263 $\pm$ 0.03480 <sup>b</sup>	10.43 $\pm$ 0.05741 <sup>c</sup>	15.07 $\pm$ 0.02951 <sup>d</sup>	16.03 $\pm$ 0.01384 <sup>e</sup>	17.03 $\pm$ 0.004787 <sup>f</sup>	17.90 $\pm$ 0.01794 <sup>g</sup>
24 h	3.003 $\pm$ 0.006072 <sup>a</sup>	3.870 $\pm$ 0.01435 <sup>b</sup>	11.31 $\pm$ 0.006317 <sup>c</sup>	32.72 $\pm$ 0.008072 <sup>d</sup>	39.07 $\pm$ 0.08828 <sup>e</sup>	53.32 $\pm$ 0.03715 <sup>f</sup>	67.34 $\pm$ 0.05442 <sup>g</sup>

Literales distintas entre columnas indican diferencia significativa ( $P < 0.0001$ )

No se observó diferencia significativa para la mortalidad de *E. ninakohlyakimovae* incubada en células expuestas o no expuestas a la naringenina (NAR) durante una hora. El porcentaje de mortalidad de esporozoitos de *E. ninakohlyakimovae* después de cuatro horas de incubación con ModECGM, DMSO o 0.5  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 2  $\mu$ M, 4  $\mu$ M y 8  $\mu$ M NAR fue de: 2.89%, 3.26%, 10.437%, 15.07%, 16.038%, 17.03% y 17.90%, respectivamente. Después de 24 horas de incubación, se observó una mortalidad del 3.00%, 3.87%, 11.31%, 32.72%, 39.07%, 53.32% y 67.34% respectivamente. Se observó una diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) entre los grupos

expuestos a NAR y los grupos incubados con ModECGM y DMSO a las 4 y 24 horas de incubación.

### 5.3.2 Tasa de infección de esporozoitos de *E. ninakohlyakimovae* expuestos a naringenina

Después de 24 horas de incubación, los tratamientos de 0.5 µM, 1 µM, 2 µM, 4 µM y 8 µM NAR resultaron en un porcentaje de infección celular de 80.72%, 76.50%, 67.60%, 46.95% y 40.49% respectivamente; mientras que los parásitos de los grupos control y DMSO resultaron en un porcentaje de infección de 79.10% y 78.87% respectivamente. El Cuadro 2 muestra las diferencias estadísticas entre los porcentajes de infección de cada grupo.

**Cuadro 2.** Porcentaje medio de infección ± error estándar de los esporozoitos de *E. ninakohlyakimovae* expuestos al medio de cultivo (Medio), DMSO y cinco dosis de naringenina durante 24 horas

Tiempo (horas)	Control (Medio)	Control (DMSO)	NAR1 (0.05 µM)	NAR2 (1.0 µM)	NAR3 (2.0 µM)	NAR4 (4.0 µM)	NAR5 (8.0 µM)
24 h	79.10 ± 0.3210 <sup>a</sup>	78.87 ± 0.3104 <sup>a</sup>	80.72 ± 0.3491 <sup>a</sup>	76.50 ± 0.3403 <sup>a</sup>	67.60 ± 0.2682 <sup>b</sup>	46.95 ± 0.2840 <sup>bc</sup>	40.49 ± 0.3257 <sup>bc</sup>

Literales distintas entre columnas indican diferencia significativa (P < 0.0001)

### 5.3.3 Inhibición del porcentaje de reproducción

El número promedio de esquizontes inmaduros (8 días) y maduros (15 días) de *Eimeria* por mm<sup>2</sup> cultivados en ModEcgM, DMSO, 0.5 µM, 1 µM, 2 µM, 4 µM y 8 µM NAR se muestra en el Cuadro 3. No existió diferencia estadísticamente significativa entre el tamaño de los esquizontes del medio y DMSO.

**Cuadro 3.** Diferencias del promedio del número de esquizontes de *Eimeria* por mm<sup>2</sup> cultivados por 8 y 15 días

Tiempo	Control (Medio)	Control (DMSO)	NAR1 (0.05 µM)	NAR2 (1.0 µM)	NAR3 (2.0 µM)	NAR4 (4.0 µM)	NAR5 (8.0 µM)
8 días	39.74 ± 2.709 <sup>a</sup>	45.62 ± 1.284 <sup>b</sup>	38.05 ± 0.4520 <sup>b</sup>	38.77 ± 0.4257 <sup>b</sup>	30.11 ± 0.3754 <sup>a</sup>	21.64 ± 0.3719 <sup>bc</sup>	20.50 ± 0.4996 <sup>bd</sup>
15 días	29.24 ± 0.3468 <sup>a</sup>	28.59 ± 0.2243 <sup>a</sup>	22.20 ± 0.3409 <sup>b</sup>	21.24 ± 0.3178 <sup>b</sup>	16.53 ± 0.3930 <sup>c</sup>	16.38 ± 0.4361 <sup>c</sup>	14.39 ± 0.4483 <sup>cd</sup>

Literales distintas entre columnas indican diferencia significativa (P < 0.0001)

#### 5.2.4 Determinación de la DL<sub>50</sub>

El Cuadro 4 muestra la DL<sub>50</sub> de la naringenina contra los esporozoitos de *E. ninakohlyakimovae*. Se usó el análisis de regresión para las dosis crecientes del compuesto.

**Cuadro 4.** Dosis Letal 50 (DL<sub>50</sub>) (límite inferior, límite superior) de cinco diferentes dosis de naringenina (NAR)

	Dosis	DL <sub>50</sub> (µMolar) (LI, LS)
Control (Medio)	No tratado	0.04705 (0.02766, 0.06644)
Control (DMSO)	No tratado	0.07703 (0.05504, 0.09901)
NAR1	0.005 g	0.2899 (0.1758, 0.4040)
NAR2	0.01 g	1.185 (1.045, 1.326)
NAR3	0.02 g	1.460 (1.317, 1.603)
NAR4	0.04 g	2.097 (1.966, 2.228)
NAR5	0.08 g	2.721 (2.605, 2.836)

## **6. Experimento 2**

*Determinación del efecto anticoccidiano de las cáscaras deshidratadas de toronja in vitro.*

### **6.1 Material y métodos**

#### *6.1.2 Cáscara deshidratada de toronja (GDP)*

Se utilizaron toronjas (*Citrus x paradisi*) previamente cosechadas de las cuales se obtuvieron las cáscaras para ser liofilizadas industrialmente por la empresa Liomex® Co. (Mexico). Se usó un molino de café para moler las cáscaras deshidratadas hasta obtener partículas 1 mm (Tayengwa, 2021).

#### *6.1.3 Análisis HPLC*

Con la finalidad de conocer la concentración de flavanonas presentes en la cáscara deshidratada de toronja, se realizó la prueba de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC por sus siglas en inglés) en un sistema de cromatografía líquida (Hewlett Packard ® model 1100, Ramsey, Minnesota, 55303 USA) en el Instituto Politecnico Nacional, Mexico. El equipo se ajustó por 60 min con la fase móvil constituida por metanol grado HPLC y agua mili-Q (CH<sub>3</sub>CH): H<sub>2</sub>O (50:50), y fue calibrado con estándares de hesperidina, neohesperidina, naringina, naringenina, nobiletina y quercetina del laboratorio Sigma-Aldrich a 100 partes por millón (ppm), a una temperatura de 30°C, rango de flujo de 1 ml/min y 280 nm, con una columna RP-C18 (Beckman Ultrasphere) de 150 mm de largo y un diámetro interno de 4.6 mm. El volumen de inyección de las muestras y los estándares fue de 20 µl con un tiempo de 10 min.

#### *6.1.4 Estudios in vitro*

##### *6.1.4.1 Parásitos para los estudios in vitro*

Se aislaron ooquistes de *Eimeria ninakohlyakimovae* de materia fecal de cabras positivas a coccidias después de un proceso de esporulación en una suspensión de dicromato de potasio al 2% (w/v) e identificación basada en características morfométricas (Joachim, 2018). El aislamiento se realizó al mezclar la suspensión de heces y la solución de dicromato con agua (1:1) para su posterior filtrado y

suspension en una solución saturada de azúcar (1:1) en cubreobjetos de vidrio que fueron lavados cada 2 h con agua destilada. Los lavados colectados se centrifugaron a  $2300 \times g$  por 20 min para recuperar el sedimento y almacenarlo a  $4^{\circ}\text{C}$  en botellas de cultivo celular hasta que fueron utilizados (Odden et al., 2019). Los esporozoitos fueron obtenidos siguiendo la metodología descrita por Ruiz et al. (2010 y 2015). Brevemente, los ooquistes esporulados fueron suspendidos en una solución estéril de 0.02 M L-Cysteina HCl/0.2 M  $\text{NaHCO}_3$  (Sigma-Aldrich, Mexico) e incubados a  $37^{\circ}\text{C}$  por 20 min en una atmósfera de  $\text{CO}_2$  al 100%. Posteriormente, los ooquistes fueron suspendidos en una solución salina balanceada de Hank (HBSS; Gibco) con 0.4% (w/v) de tripsina (Sigma-Aldrich, Mexico) y 8% (v/v) de bilis caprina estéril que fue obtenida de un rastro en Atlacomulco, Mexico e incubados a  $37^{\circ}\text{C}$  en una atmósfera de 5%  $\text{CO}_2$  por 4 h. Los esporozoitos liberados fueron lavados 3 veces (20 min,  $1,100 \times g$ ) y suspendidos en medio de cultivo celular ( $2.5 \times 10^5$  esporozoitos/ml).

#### *6.1.4.2 Ensayos de citotoxicidad de los compuestos experimentales*

Se aislaron células primarias caprinas epiteliales del intestino (CIEC) siguiendo la metodología de Ibarra-Velarde y Alcalá-Canto (2007), en la que el tejido intestinal se extrae de las cabras inmediatamente después del sacrificio. Se colocó el tejido en RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, Mexico) suplementado con suero fetal bovino (FBS), estreptomycin y anfotericina B (Sigma-Aldrich, Mexico). Una vez en el laboratorio, las células se colocan en solución de Hank (HBSS) (Sigma-Aldrich, México) con ácido etilenediaminotetraacético (EDTA) y ditiotritol (Sigma-Aldrich, México) para incubarse a  $37^{\circ}\text{C}$  por 10 min con agitación vigorosa. Se removió el sobrenadante y el tejido se pone en RPMI 1640 con colagenasa (Sigma-Aldrich, Mexico) y es incubado a  $37^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos con agitación vigorosa. Se remueve el sobrenadante nuevamente y se centrifuga a las células a  $800 \times g$  por 5 minutos y se resuspenden en RPMI 1640 con FBS y colagenasa. Este paso se repitió hasta que se completó el aislamiento celular. Las células fueron sembradas en placas plásticas de cultivo (Costar) de 13-mm con medio de cultivo Eagle modificado Dulbecco-Ham's F-12 adicionado con 10% (vol/vol) FBS,  $8 \mu\text{g/ml}$  insulina,  $10 \mu\text{g/ml}$  gentamicina,  $50 \mu\text{g/ml}$  hidrocortisona,  $100 \mu\text{g/ml}$  streptomycin,  $100 \text{U/ml}$  penicilina,

and 2.5 µg/ml anfoteracina B (Ibarra-Velarde and Alcala-Canto, 2007). Este proceso requirió 48 h, siendo importante no mover las placas de cultivo durante el proceso. Las células CIEC son una línea primaria celular que se mantuvo a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> y con una humedad relativa de 98% durante 4 días previos a la infección experimental, donde fueron cultivadas en una solución de tripsina/EDTA (Sigma-Aldrich, México) (0.025/0.02%) por 18 days.

Los ensayos de citotoxicidad del compuesto de cítricos se determinaron con MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio] (Scudiero, 1988). Las células CIEC fueron sembradas en placas de 96 pozos a una densidad de 1 x 10<sup>4</sup> células/pozo e incubadas con 100 µl del medio de cultivo en 5% CO<sub>2</sub> a 37 °C por 48 h. Las GDP fueron diluidas en 0.1% DMSO (Sigma-Aldrich, Mexico). Se cambió el medio de cultivo por 150 µl de GDP a concentraciones de 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 y 1.5625 µM en el medio de cultivo (n= 5 pozos por concentración). Se incluyó Toltrazuril (TTZ) diluido en DMSO a concentraciones de 0.01, 0.1, 0.1, 1.0, 5.0 y 25.0 g/ml en medio de cultivo (n= 5 pozos por concentration) (Odden et al., 2019). Las células se cultivaron de nuevo por 4 h a 37 °C. La viabilidad celular se determinó al incubar células por 4 h a 37 °C con 20 µl de solución MTT en una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> (5 mg/ml MTT in buffer fosfato, pH 7.4) (Thermo Fisher Scientific, México) después de remover completamente la solución que contenía GDP para evitar interferencia de los antioxidantes de los flavonoides. Se extrajeron y cuantificaron los cristales intracelulares de cloruro de tetrazolio en 100 µl DMSO midiendo la absorbancia del lisado celular en 590 nm. La viabilidad celular se calculó como un porcentaje basado en la absorbancia comparada con la absorbancia obtenida de células expuestas al medio de cultivo solamente. La viabilidad se calculó usando la siguiente fórmula (Chen and Kitts, 2017)

$$Viabilidad\ celular\ (\%) = \frac{absorbancia\ de\ la\ muestra\ 590\ nm}{absorbancia\ control\ 590\ nm} \times 100$$

#### 6.1.4.3 Infección del cultivo celular

Después de retirar el medio de cultivo las células CIEC, se agregaron  $2.5 \times 10^5$  esporozoitos de *E. ninakohlyakimovae* por pozo para alcanzar una confluencia de 80 - 90%. Después de un periodo de incubación de 3 h, las células infectadas fueron lavadas con PBS para remover lo ooquistes no liberados. Se agregaron 500  $\mu$ l de medio de cultivo adicionado con 100 U/ml de penicilina y 100  $\mu$ g/ml de estreptomycin. Pasadas 1 y 6 horas después de la inoculación de los esporozoitos, se obtuvieron las células intestinales (Ibarra-Velarde y Alcala-Canto, 2007). Se seleccionaron las concentraciones de GDP (6.25  $\mu$ M) y TTZ (25  $\mu$ g/ml) con base en los resultados de los ensayos de citotoxicidad y estudios previos (Cervantes-Valencia, 2018; Odden, 2019; Nakashima, 2020). Se usó 0.1% de DMSO para diluir las GDP y el TTZ, así como para establecer el grupo control. La tasa de infección se calculó con la siguiente fórmula después de observar 10 campos visuales al azar (Hamid, 2014):

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

Se revisaron las células al inicio del estudio, 30 minutos después y posteriormente a las 1, 2, 4, 8, 12 y 24 horas. El medio se cambió cada cuatro días para mantener 80-90% de confluencia (Ruiz, 2010), observar esporozoitos, contar y medir merontes usando un microscopio invertido. Se usaron células CIEC no infectadas como control negativo, las cuales pasaron por el mismo procedimiento de replicación que las células infectadas en los mismos tiempos. La evaluación del desarrollo celular se realizó en los días 8 y 15 posteriores a la infección. En el día 8, entre 15 y 20 fotografías se tomaron usando un objetivo microscópico de 400X (Leica microscope), para realizar conteo y medición de los esquizontes. Se tomaron fotografías cuando había al menos un esquizonte por campo, y el total de campos examinados fue registrado hasta un máximo de 50 campos (Odden et al., 2019). El día 15 se contaron y midieron esquizontes usando un aumento de 100X en 15 a 20 fotografías. Solamente se contaron células conteniendo esquizontes, mientras que



las que contenían esporozoitos sin desarrollar fueron descartadas (Hamid, 2014). Se presentan los resultados como el promedio de 5 replicados independientes.

#### *6.1.4.4 Efecto de las GDP sobre la integridad de la barrera intestinal*

Con el objetivo de investigar el efecto que ejercen los parásitos *Eimeria* y las GDP sobre las propiedades de la barrera de las células CIEC, se midió la resistencia transepitelial (TEER) de acuerdo con un estudio realizado previamente (Xu, 2003) usando un medidor EVOM X (World Precision Instruments) acoplado a una cámara Endohm (World Precision Instruments). Siete días después de haber iniciado el cultivo con células CIEC, estas alcanzaron valores TEER de 600-900  $\Omega$ -cm<sup>2</sup>. Las GDP fueron disueltas en DMSO como una solución 10 mM, basándose en los valores molares de la naringenina (Nakashima, 2020). Para evaluar la integridad de las uniones estrechas (TJ), se expuso a las células infectadas y no infectadas a 100  $\mu$ M de GDP y a una suspensión comercial de toltrazuril. Se usó 0.1% de DMSO como diluyente de las GDP y como grupo control. Previamente se ha demostrado que el DMSO al 1% no afecta el transporte en los ensayos TEER (Kobayashi, 2008). Las mediciones TEER se realizaron bajo condiciones estériles 30 min, 1 h, 3 h, 12 h, 24 h, 48 h, posteriores a la infección y 5, 10 y 15 días posteriores a la infección. Las capas confluentes de células con valores TEER por encima de 500  $\Omega$ .cm<sup>2</sup> se usaron para los experimentos de transporte después de realizar la corrección para la resistencia obtenida en los pozos de control. Una disminución en los valores TEER indican un aumento en la permeabilidad en la monocapa y pérdida de la barrera epitelial. Los datos se presentan como la media  $\pm$  S.E.M. de diez ensayos independientes.

## **6.2 Análisis estadístico**

### *6.2.1 Estudio in vitro*

Los análisis se realizaron usando el programa GraphPad Prism versión 9 para MacOs (GraphPad Software, San Diego, California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)).

### *Tasa de infección de Eimeria y desarrollo de esquizontes*

El porcentaje de células infectadas por *Eimeria* se calculó como la media  $\pm$  S.E.M.

de al menos 5 replicas independientes. El nivel de significancia para las diferencias en invasión por parásitos, número y tamaño de esquizontes fue de 0.05. La prueba de Shapiro-Wilk se usó para determinar la normalidad. Los datos distribuidos normalmente fueron analizados usando un análisis de varianza (ANDEVA) y la prueba de *t* de Dunnett. Si la distribución normal no se cumpliera, se usó la prueba de Kruskal-Wallis.

#### *6.2.2 Viabilidad celular*

Los datos fueron comparados usando una prueba ANDEVA de una sola vía. Las diferencias fueron comparadas usando una prueba de Tukey con  $P < 0.05$  representando diferencias estadísticas significativas.

#### *6.2.3 Resistencia de la monocapa epitelial*

Los datos se presentan como la media de diez repeticiones  $\pm$  S.E.M. Los análisis se realizaron mediante una ANDEVA de una sola vía seguida por una prueba de Tukey. Una diferencia de  $p < 0.05$  se consideró significativa.

### **6.3 Resultados**

#### *6.3.1 HPLC*

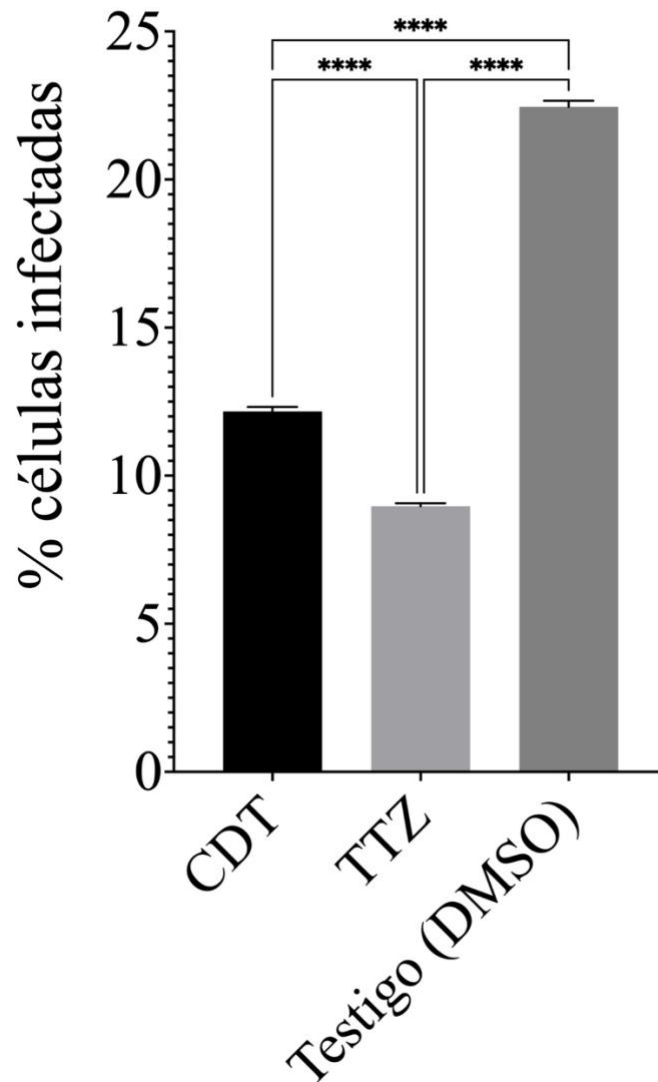
De las seis flavanonas usadas como estándar, la naringina y la naringenina fueron las más abundantes en las GDP. Las concentraciones (mg/kg) fueron: hesperidina  $5.22 \pm 0.7$ ; neohesperidina  $14.54 \pm 0.87$ ; naringina  $285.22 \pm 9.35$ ; naringenina  $37.21 \pm 2.43$ ; nobiletina  $10.15 \pm 1.02$  y quercetina  $2.08 \pm 0.04$ .

#### *6.3.2 Citotoxicidad de los compuestos experimentales*

La medición de la citotoxicidad en las células con el ensayo MTT confirmó que el producto experimental no presenta efectos adversos al ser cultivado con las células CIEC. La viabilidad (%) de las células incubadas con diferentes concentraciones de GDP, en comparación con el grupo control fue de  $95.79 \pm 1.47$  (100  $\mu$ M),  $96.85 \pm 1.04$  (50  $\mu$ M),  $97.09 \pm 1.08$  (25  $\mu$ M),  $97.32 \pm 2.24$  (12.5  $\mu$ M),  $97.85 \pm 1.07$  (6.25  $\mu$ M),  $98.42 \pm 2.09$  (3.125  $\mu$ M) y  $98.85 \pm 1.94$  (1.5625  $\mu$ M).

### 6.3.3 Desarrollo del cultivo celular

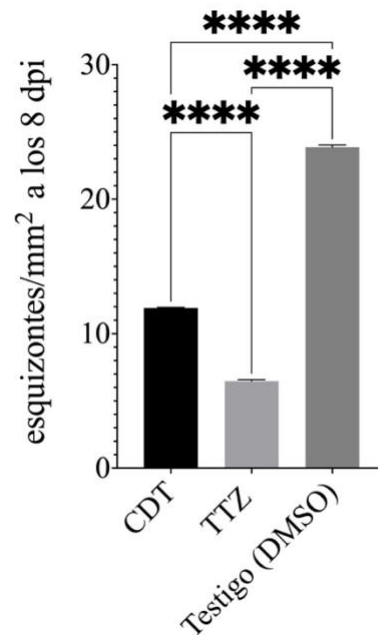
Las células epiteliales del intestino de cabra que fueron infectadas se observaron a las 0, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 24 h, así como a los 8 y 15 días post infección (dpi). Se detectaron esporozoitos dentro de las células desde los primeros 60 minutos. Posteriormente se pudieron observar merontes a partir del día 8 pi. No se observaron merontes de segunda generación, estadios sexuales o formación de ooquistes en el cultivo celular. La media de la tasa de invasión celular fue de  $12.17 \pm 0.1491\%$  (GDP),  $8.969 \pm 0.1003\%$  (TTZ) y  $22.45 \pm 0.2054\%$  (DMSO) a las 24 h post-infección. La tasa de invasión celular registrada para el grupo TTZ fue significativamente menor que la registrada por el grupo GDP ( $P = 0.0003$ ) y el grupo DMSO ( $P < 0.0001$ ). De igual forma, la invasión celular fue significativamente menor en el grupo GDP que en el grupo DMSO ( $P = 0.0003$ ) (Figura 1).



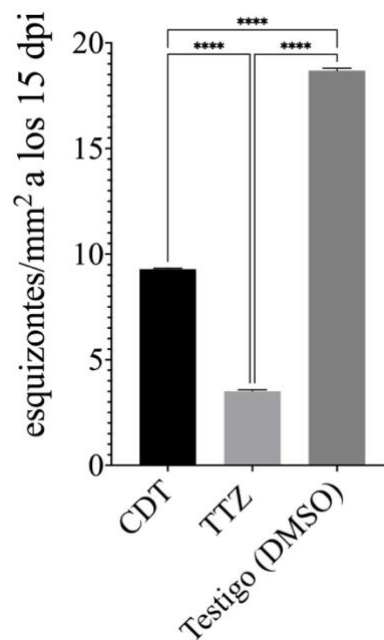
**Figura 1.** Tasa de invasión celular

En lo que respecta a la media de esquizontes/mm<sup>2</sup>, en el día 8 pi se observaron pocas estructuras parasitarias en las células expuestas a las GDP ( $11.91 \pm 0.04418$ ) y al TTZ en comparación con el grupo CTRL ( $6.469 \pm 0.1109$  y  $23.86 \pm 0.1664$ , respectivamente) ( $P < 0.0001$ ) (Figura 2A). A los 8 dpi, los esquizontes expuestos GDP midieron  $68.67 \pm 0.6188 \mu\text{m}$ ; aquellos esquizontes incubados con TTZ midieron  $39.81 \pm 0.5402 \mu\text{m}$  y aquellos dentro del grupo CTRL  $97.58 \pm 0.6021 \mu\text{m}$ . Se encontraron diferencias significativas en todas las comparaciones ( $P < 0.0001$ ).

Por otro lado, el número de esquizontes/mm<sup>2</sup> contados al día 15 pi (Figura 2B) fueron significativamente menores en las células tratadas con GDP (9.284 ± 0.04282), y las células tratadas con TTZ (3.505 ± 0.07312), comparados con aquellos incubados con DMSO (18.68 ± 0.1177) (P <0.0001 en todos los casos). El tamaño promedio de los esquizontes en el día 15 post infección fue significativamente diferente entre todos los grupos, midiendo 62.65 ± 0.8210 μm (GDP); 32.06 ± 0.2518 μm (TTZ), y 126.3 ± 1.878 μm (DMSO) (P <0.0001 en todos los casos). Los datos se presentan como la media de cinco experimentos ± S.E.M.



**Figura 2A.** Media de esquizontes/mm<sup>2</sup> a los 8 dpi



**Figura 2B.** Media de esquizontes/mm<sup>2</sup> a los 15 dpi

#### 6.3.4 Efecto de las GDP sobre la integridad de la membrana de las células intestinales

Los resultados de la medición de la integridad de la membrana de las células intestinales se presenta en el Cuadro 2. Los valores encontrados en los cultivos con CIEC no infectadas se encontraban entre 319.94 a 1087.76  $\Omega$ .cm<sup>2</sup>. Pasados 30 minutos después de la exposición de las células a los esporozoitos, los valores de resistencia transepitelial (TEER) disminuyeron significativamente ( $P < 0.05$ ), ya sea con o sin tratamiento en comparación con las células no infectadas. Debido a esto, se asume que existe una disfunción de la barrera epitelial durante la infección celular con *E. ninakohlyakimovae in vitro*. Sin embargo, 30 minutos después y hasta 360 h después, las células CIEC infectadas que fueron incubadas con GDP y TTZ tuvieron valores TEER significativamente más altos ( $P < 0.05$ ) que las células infectadas no tratadas. A las 3, 24, y 48 horas post infección, las células infectadas y tratadas tuvieron valores similares ( $P = 0.1370$ ). A partir de las 120 hpi y hasta el final del experimento (360 hpi), se observó un aumento significativo en los valores TEER de las células infectadas tratadas TTZ ( $P < 0.05$ ), el cual fue similar a los valores registrados para las células no infectadas ( $P = 0.7925$ ). No se encontró diferencia

significativa en los valores TEER de las células no infectadas que fueron cultivadas con GDP, TTZ, o DMSO durante el estudio ( $P = 0.4550$  en todos los casos). Los datos se presentan como la media de diez repeticiones  $\pm$  S.E.M.

**Cuadro 5.** Efecto de la adición de una solución de 100  $\mu$ M de cáscaras deshidratadas de toronja (CDT), toltrazuril comercial (TTZ) o DMSO (vehículo) sobre la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) en diferentes puntos de tiempo sobre células caprinas epiteliales cultivadas *in vitro*. ( $\Omega$ .cm<sup>2</sup>, media  $\pm$  E.E.) (n = 10 repeticiones independientes).

Tiempo (horas)	Infectadas- CDT	Infectadas- TTZ	Infectadas- DMSO	No infectadas- CDT	No infectadas- TTZ	No infectadas- DMSO
0.0	732.14 $\pm$ 1.16 <sup>a</sup>	747.19 $\pm$ 2.60 <sup>a</sup>	729.25 $\pm$ 3.25 <sup>a</sup>	738.86 $\pm$ 2.14 <sup>a</sup>	735.37 $\pm$ 7.53 <sup>a</sup>	748.33 $\pm$ 5.95 <sup>a</sup>
0.5	626.39 $\pm$ 2.06 <sup>a</sup>	612.77 $\pm$ 2.32 <sup>a</sup>	519.6 $\pm$ 10.85 <sup>a</sup>	754.19 $\pm$ 4.13 <sup>b</sup>	722.69 $\pm$ 3.01 <sup>b</sup>	718.43 $\pm$ 3.25 <sup>b</sup>
1.0	628.73 $\pm$ 3.40 <sup>a</sup>	627.98 $\pm$ 2.69 <sup>a</sup>	432.65 $\pm$ 8.61 <sup>b</sup>	786.70 $\pm$ 9.29 <sup>c</sup>	778.03 $\pm$ 4.72 <sup>c</sup>	802.37 $\pm$ 8.38 <sup>c</sup>
3.0	634.76 $\pm$ 2.18 <sup>a</sup>	618.11 $\pm$ 6.05 <sup>a</sup>	476.66 $\pm$ 4.67 <sup>b</sup>	799.85 $\pm$ 4.65 <sup>c</sup>	794.18 $\pm$ 2.01 <sup>c</sup>	770.89 $\pm$ 2.85 <sup>c</sup>
24	659.24 $\pm$ 1.15 <sup>a</sup>	653.78 $\pm$ 4.67 <sup>a</sup>	445.84 $\pm$ 9.96 <sup>b</sup>	786.44 $\pm$ 2.36 <sup>c</sup>	797.88 $\pm$ 0.60 <sup>c</sup>	796.67 $\pm$ 5.74 <sup>c</sup>
48	676.12 $\pm$ 0.70 <sup>a</sup>	689.59 $\pm$ 8.40 <sup>a</sup>	453.04 $\pm$ 5.52 <sup>b</sup>	849.28 $\pm$ 5.27 <sup>c</sup>	869.31 $\pm$ 6.02 <sup>c</sup>	844.76 $\pm$ 7.00 <sup>c</sup>
120	695.07 $\pm$ 2.83 <sup>a</sup>	879.84 $\pm$ 4.48 <sup>b</sup>	419.38 $\pm$ 6.94 <sup>c</sup>	890.19 $\pm$ 1.08 <sup>bd</sup>	913.93 $\pm$ 2.42 <sup>bd</sup>	892.16 $\pm$ 5.53 <sup>bd</sup>
240	752.82 $\pm$ 2.06 <sup>a</sup>	915.16 $\pm$ 7.10 <sup>b</sup>	372.86 $\pm$ 5.92 <sup>c</sup>	992.83 $\pm$ 8.82 <sup>bd</sup>	950.60 $\pm$ 7.56 <sup>bd</sup>	977.20 $\pm$ 3.21 <sup>bd</sup>
360	757.96 $\pm$ 1.66 <sup>a</sup>	968.33 $\pm$ 3.61 <sup>b</sup>	328.07 $\pm$ 7.75 <sup>c</sup>	997.665 $\pm$ 5.42 <sup>bd</sup>	987.34 $\pm$ 8.40 <sup>bd</sup>	981.31 $\pm$ 5.87 <sup>bd</sup>

<sup>abcd</sup> Literales distintas en una fila indican diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ).

## 7. Discusión

Varias especies de parásitos *Eimeria* se encuentran alrededor del mundo, siendo *E. arloingi*, *E. ninakohlyakimovae*, and *E. christensenii* las más patógenas para los cabritos, etapa en la que el animal es más susceptible y que favorece la multiplicación del parásito y la eliminación de ooquistes, lo que perpetuará la coccidiosis debido a la contaminación de las instalaciones (Bangoura and Bardsley, 2020). Esta es la razón por la que se justifica el uso de fármacos con efecto anticoccidiano con fines profilácticos y/o terapéuticos para controlar esta enfermedad. A pesar de esto, la aparición de resistencia a algunos antiparasitarios así como la prohibición del uso de algunos de estos (Burt, 2013), se ha impulsado el estudio de métodos alternativos para prevenir y/o tratar esta enfermedad.

En un estudio previo se realizó la determinación de la eficacia anticoccidiana y la actividad antioxidante de un extracto de cítricos en corderos (Pérez-Fonseca et al., 2016). El presente estudio difiere del anteriormente mencionado no solo en que se realizó en una especie animal diferente, sino también en la manera en la que se manejó la preparación de los cítricos.

Es sabido que existen diferentes preparaciones obtenidas de las cáscaras de toronja y que su composición variará dependiendo del método de extracción utilizado (Bronner and Beecher, 1995; El-Nawawi, 1995; Ledesma-Escobar and Luque de Castro, 2014). En la mayoría de las frutas del género *Citrus* existen altas concentraciones de flavononas, cuyos valores muestran constantes fluctuaciones, lo que se atribuye a la variabilidad de las muestras y al método de extracción (Bronner and Beecher, 1995). En este estudio se realizó una extracción acuosa seguida de una liofilización debido a que estas dos metodologías son las más confiables para preservar los flavonoides (Demir and Celik, 2019), con el beneficio de poder almacenar los liofilizados por largos periodos de tiempo sin que estos sufran mucha degradación (Berk, 2009).

El compuesto liofilizado se eligió en el presente trabajo, porque, de acuerdo con estudios previos, el proceso de liofilización reúne los dos métodos más confiables



de conservación, la congelación y la deshidratación (Demir and Celik, 2019). La liofilización consiste en la eliminación del agua de un producto por sublimación del agua libre de la fase sólida, lo que da como resultado productos deshidratados de alta calidad debido a la ausencia de agua líquida, ya que el estado sólido de agua durante la liofilización protege la estructura primaria y minimiza los cambios en las propiedades del producto para que se preserven constituyentes nutricionales, sabor y aroma (Abdelwahed et al., 2006; Baker, 1997). Generalmente, al liofilizar adecuadamente un alimento, se puede almacenar por periodos muy largos con reducciones muy bajas de sus características organolépticas, físicas, químicas y biológicas (Berk, 2009).

Los resultados del análisis HPLC de este trabajo mostraron que la naringina y la naringenina fueron las flavanonas más abundantes en el extracto de cáscaras de toronja. Otros flavonoides estaban presentes, y no se descarta que también sean responsables del efecto anticoccidiano. Por lo anterior, se recomienda realizar más estudios para poder determinar el papel que estos otros flavonoides juegan en el efecto anticoccidiano. En un estudio previo se demostró que el extracto de naringenina comercial (>98% pureza) tuvo un efecto coccidiostático cuando se administró de manera oral a corderos infectados (Perez-Fonseca et al., 2016). Debido a esto, es razonable proponer que la naringenina causa una reducción en el desarrollo de ooquistes de *Eimeria*. Para poder mejorar los resultados presentados en este estudio, se propone realizar estudios para determinar la biodisponibilidad y eficacia que los flavonoides contenidos en las cáscaras deshidratadas de toronja. Lo anterior permitiría la optimización de preparaciones farmacéuticas que pretendan ser usados como métodos de prevención y/o control de la coccidiosis.

La eficacia anticoccidiana de las cáscaras de toronja deshidratadas ha sido demostrada *in vivo* en ovinos (Pérez-Fonseca et al., 2016), pero hasta donde tenemos conocimiento, se desconocía su actividad anti-*Eimeria in vitro*. Por lo anterior, se desarrolló el cultivo celular y se confirmó que los esporozoitos de *Eimeria* infectaron y se reprodujeron en las células intestinales. Una vez verificada la viabilidad de los parásitos *in vitro*, se compararon las tasas de invasión de los

esporozoitos, el número y tamaño de los esquizontes a los 8 y 15 días post-infección. Los tiempos de observación de los distintos estadios del ciclo biológico del protozooario fueron similares a los de estudios previos en los que se demostró la utilidad del cultivo celular de células endoteliales umbilicales caprinas, bovinas y humanas para reproducir el ciclo endógeno de *E. ninakohlyakimovae* (Ruiz et al., 2010). Los resultados de eficacia del toltrazuril para inhibir la reproducción intracelular de *Eimeria* fueron inconsistentes con un estudio que comparó el efecto de los anticoccidianos puros y comerciales en un cultivo de células epiteliales colónicas bovinas infectado con *E. ninakohlyakimovae*, en el que no se observaron diferencias significativas entre las concentraciones más altas de toltrazuril y diclazuril para reducir la tasa de infección y el número de esquizontes inmaduros. Los autores lo atribuyen a las altas desviaciones estándar asociadas con un número bajo de repeticiones del estudio (Odden et al., 2019). Por ejemplo, en el presente estudio, se observó una tasa de invasión de esporozoitos cercana al 9%, mientras que los autores antes mencionados reportaron 14.1%. Esto puede deberse al uso de distintos cultivos celulares y la permeabilidad a los fármacos de diferentes tipos de células, pero se requerirían estudios futuros que demuestren esta especulación que, con los datos obtenidos en este experimento, carece de sustento.

La barrera de la superficie epitelial intestinal es crucial para separar un amplio espectro de sustancias nocivas e inmunogénicas que pueden estar presentes en el lumen intestinal, ya que la interacción directa provocaría una inflamación exacerbada y desregulada (Béduneau et al., 2014). La función de la barrera intestinal se regula principalmente mediante la acción del complejo de las proteínas de uniones estrechas (TJ, por sus siglas en inglés: *tight junction proteins*), que incluye proteínas de la membrana y miembros del citoplasma asociados a la TJ que controlan el flujo selectivo de macromoléculas, moléculas pequeñas moléculas y iones (Liang and Weber, 2014). Existen varios factores de etiología infecciosa que pueden dañar la integridad del epitelio intestinal, disminuyendo así la absorción de nutrientes, favoreciendo la invasión del patógeno, una respuesta inflamatoria y, en consecuencia, una disminución en el aprovechamiento de nutrientes y el crecimiento (Park et al., 2020). *Eimeria* es un parásito intracelular que

ingresa y sale del enterocito. Con base en este hecho, es razonable especular que el parásito ejerce un efecto negativo sobre la integridad de la barrera epitelial de células caprinas intestinales. En el presente experimento se utilizó un modelo *in vitro* intestinal de células caprinas, pero la mayor parte de los modelos intestinales que se usan en estudios de resistencia eléctrica transepitelial se basan normalmente en células epiteliales de adenocarcinoma colorrectal denominadas Caco-2. Estos modelos presentan numerosas limitaciones en comparación con las condiciones *in vivo*. En las células Caco-2 el tipo de TJ reduce el transporte celular, lo que dificultaría el ingreso de sustancias como GDP o TTZ. Por otro lado, hasta donde tenemos conocimiento, se desconocen los valores TEER del intestino caprino. Por ejemplo, los valores TEER de las células Caco-2 humanas suelen estar comprendidos entre 250 y 500  $\Omega \cdot \text{cm}^2$ , mientras que el intestino humano tiene valores TEER que oscilan entre 12 y 69  $\Omega \cdot \text{cm}^2$ , dependiendo de la parte del intestino (Srinivasan et al., 2015). Con esos datos en mente, se optó por utilizar un modelo *in vitro* con propiedades biológicas más parecidas a las existentes en el hospedero natural de *E. ninakohlyakimovae*. Es importante resaltar que nuestros resultados fueron congruentes con mediciones TEER realizadas en células epiteliales intestinales porcinas (Jiang, 2021), por lo que se sugeriría utilizar las CIEC para futuros estudios de TEER.

Nuestros resultados proporcionan evidencia de que la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) disminuye por la infección con *E. ninakohlyakimovae*. Este dato es consistente con estudios previos que han evidenciado que las coccidias del género *Eimeria* alteran la integridad de la barrera intestinal en ratones (Inagaki-Ohara et al., 2006), aves (Park et al., 2020) y bovinos (Walker et al., 2015). En esta última especie, se ha demostrado que *E. bovis* irrumpe en esa integridad intestinal al observar una disminución en la expresión de mRNA de las proteínas efectoras involucradas en el mantenimiento de las TJ como la molécula de adhesión estrecha 2, ocludina (OCLN) proteína de unión estrecha ZO-1 (TJP1) y una reducción de 1.5 a 1.9 veces en la expresión de las proteínas coxsackie y receptor de adenovirus, claudina 4 y receptor F11 (Walker et al., 2015).

Por otro lado, el tratamiento con GDP y TTZ aumentó los valores TEER. Sin

embargo, a partir de las 120 horas post-infección y tratamiento, el fármaco fue más eficaz para proteger la barrera intestinal que el compuesto natural. Este resultado puede deberse a que el modo de acción del toltrazuril está dirigido contra las fases intracelulares como los esquizontes de primera y segunda generación, microgamontes y macrogamontes (Mehlhorn, 2016) y a partir de las 120 h incrementan en tamaño los estadios intracelulares parasitarios, desarrollándose en merontes inmaduros y maduros (Ruiz et al., 2010). Sin embargo, debido a que no se conoce cuál es la distribución en segmentos intestinales de la enzima dihidroorotato-deshidrogenasa que es inhibida por el TTZ, no es posible extrapolar la eficacia que desempeña el TTZ en los complejos procesos biológicos que ocurren *in vivo* y, por consiguiente, se requerirían más estudios para determinar el mecanismo exacto a través del cual el TTZ protege la barrera epitelial intestinal. Por otro lado, nuestros resultados coinciden con estudios previos que demuestran que los flavonoides protegen las propiedades de la permeabilidad TJ, principalmente la epigallocatequina, genisteína, myricetina, quercetina, kaempferol, nobiletina y naringenina (Chen and Kitts, 2017). Particularmente, se sabe que las cáscaras de *Citrus* contienen flavonas polimetoxiladas (PMF), flavonas C- o O-glicosiladas, flavanonas oglicosiladas, flavonoles y muchos otros ácidos fenólicos diferentes, junto con sus derivados relacionados (Xu et al., 2003) que reducen el estrés oxidativo que produce una dislocación de las proteínas TJ: claudina 4, ocludina y ZO-1 (Chen and Kitts, 2017). Asimismo, se ha indicado el papel protector de los flavonoides dietarios contra una barrera celular debilitada mediante el aumento de las TJ al limitar la pérdida de ocludina y ZO-1 (Sharma et al., 2020). Asimismo, se ha evidenciado que los flavonoides de *Citrus* tales como la nobiletina y naringenina protegen la barrera intestinal, esta última mediante efectos en la asociación citoesquelética de las proteínas TJ tales como ZO-2, ocludina, Claudina-1 y claudina-4 (Chen and Kitts, 2017). Los hallazgos del presente estudio proporcionan una visión de cómo los flavonoides dietéticos podrían minimizar el daño causado por la coccidiosis caprina y conferir protección contra la disfunción de la TJ inducida por la disrupción de la integridad celular que provoca *Eimeria*. Esto justifica la realización de más estudios para explorar las vías de señalización moduladas por

estos flavonoides y poder establecer su mecanismo de acción.

El mecanismo exacto por el cual la cáscara deshidratada de toronja o la naringenina comercial produjeron un efecto coccidiostático no ha sido completamente dilucidado hasta el momento. Sin embargo, este estudio demuestra que el efecto anticoccidiano puede ser provocado por alguno de los siguientes mecanismos: 1) un efecto tóxico de la naringenina o las flavanonas presentes en el extracto de cítricos. Pruebas de esto son la baja tasa de infección de las células cultivadas y el bajo número de esquizontes; 2) un efecto protector de la naringenina o la cáscara deshidratada de cítricos sobre la integridad de la barrera intestinal, lo que impediría la invasión de los parásitos.

Los hallazgos de este estudio brindan información sobre cómo los flavonoides pueden minimizar el daño causado por la coccidiosis caprina y brindar protección contra la destrucción de las uniones estrechas provocada por el daño inducido por *Eimeria* sobre la integridad celular. Esto abre la posibilidad a que se realicen futuros estudios que exploren las vías de señalización que están siendo moduladas por estos flavonoides para establecer concretamente su mecanismo de acción.

De esta forma, las investigaciones subsecuentes deben buscar la posibilidad de brindar más evidencia que apoye el efecto benéfico de los flavonoides y los fármacos anticoccidianos en las uniones estrechas de las células intestinales. Finalmente, estos datos establecen las bases para establecer métodos *in vitro* para estudiar el efecto protector de los flavonoides presentes en los cítricos y, posteriormente llevarlos a su aplicación en estudios *in vivo*.

## 8. Conclusiones

Este estudio demostró el efecto anticoccidiano in vitro de la naringenina y la cáscara deshidratada de toronja. Se propone que los dos compuestos aquí estudiados contribuyen a la manutención de la integridad de la barrera de las células epiteliales del intestino bajo condiciones de coccidiosis. Debido al bajo costo de este subproducto obtenido de la manufactura de jugos, se proponen más estudios que puedan optimizar la dosis y biodisponibilidad de los flavonoides presentes en los cítricos cuando exista una infección por *Eimeria* spp. De igual forma, se propone evaluar estos principios bioactivos bajo diferentes escenarios clínicos y modificar la presentación farmacéutica de los mismos en caso de ser necesario.

## 9. Referencias

- Abdelwahed, W., Degobert, G., Stainmesse, S., Fessi, H., 2006. Freeze-drying of nanoparticles: formulation, process and storage considerations. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 58, 1688-1713. doi: 10.1016/j.addr.2006.09.017
- Alnassan, A.A., Thabet, A., Dauschies, A., Bangoura, B., 2015. In vitro efficacy of allicin on chicken *Eimeria tenella* sporozoites. *Parasitol. Res.* 114, 3913-3915. doi.org/10.1007/s00436-015-4637-2
- Alonso-Diaz MA, Torres-Acosta JFJ, Sandoval-Castro CA, Hoste H. 2011. Comparing the sensitivity of two in vitro assays to evaluate the anthelmintic activity of tropical tannin rich plant extracts against *Haemonchus contortus*. *Vet Parasitol.* 181: 360-364.
- Anagnostopoulou, M.A., Kefalas, P., Kokkalou, E., Assimopoulou, A.N., Papageorgiou, V.P., 2005. Analysis of antioxidant compounds in sweet orange peel by HPLC-diode array detection-electrospray ionization mass spectrometry. *Biomed. Chromatogr.* 19, 138-148. doi: 10.1002/bmc.430.
- Baker, C., 1997. Industrial drying of foods. Blackie Academic & Professional, London.
- Bangoura, B., Bardsley, K.D., 2020. Ruminant Coccidiosis. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 36, 187-203. doi: 10.1016/j.cvfa.2019.12.006.
- Béduneau, A., Tempesta, C., Fimbel, S., Pellequer, Y., Jannin, V., Demarne, F., Lamprecht, A., 2014. A tunable Caco-2/HT29-MTX co-culture model mimicking variable permeabilities of the human intestine obtained by an original seeding procedure. *Eur J Pharm Biopharm* 87, 290-298.
- Benavente-García, O., Castillo, J., 2008. Update on uses and properties of *Citrus* flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. *J. Agric. Food Chem.* 56, 6185-6205. doi.org/10.1021/jf8006568
- Berk, Z., 2009. Food process engineering and technology, 1st Edition. Academic, Amsterdam ; Boston ; London.

- Bodet, C., La, V.D., Epifano, F., Grenier, D. 2008. Naringenin has anti-inflammatory properties in macrophage and *ex vivo* human whole-blood models. *J. Periodont. Res.* 43: 400-407.
- Bronner, W.E., Beecher, G.R., 1995. Extraction and measurement of prominent flavonoids in orange and grapefruit juice concentrates. *J. Chromatogr. A* 705, 247-256. doi.org/10.1016/0021-9673(95)00304-6
- Burt, S.A., Tersteeg-Zijderveld, M.H., Jongerius-Gortemaker, B.G., Vervelde, L., Vernooij, J.C., 2013. In vitro inhibition of *Eimeria tenella* invasion of epithelial cells by phytochemicals. *Vet. Parasitol.* 191, 374-378. doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.09.001
- Carrau T, Silva LMR, Pérez D, Ruiz de Ybáñez R, Taubert A, Hermosilla C. 2016. First description of an *in vitro* culture system for *Eimeria ovinoidalis* macromeront formation in primary host endothelial cells. *Parasitol Int.*; 65: 516-519.
- 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.* 136, 27-35. doi.org/10.1016/j.smallrumres.2015.12.035
- Cervantes-Valencia, M.E., Hermosilla, C., Alcalá-Canto, Y., Tapia, G., Taubert, A., Silva, LMR., 2018. Antiparasitic Efficacy of curcumin against *Besnoitia besnoiti* tachyzoites in vitro. *Front. Vet. Sci.* 5, 333. doi.org/10.3389/fvets.2018.00333
- Chartier, C., Paraud, C., 2012. Coccidiosis due to *Eimeria* in sheep and goats, a review. *Small Rumin. Res.* 103, 84-92. doi.org/10.1016/j.smallrumres.2011.10.022.
- Chen, X.M., Kitts, D.D., 2017. Flavonoid composition of orange peel extract ameliorates alcohol-induced tight junction dysfunction in Caco-2 monolayer. *Food Chem. Toxicol.* 105, 398-406. doi: 10.1016/j.fct.2017.04.009
- de Oliveira, L.R., Cezário, G.A., de Lima, C.R., Nicolete, V.C., Peresi, E., de Sábio, M.T., Picka, M.C., Calvi, S.A., 2011. DNA damage and nitric oxide production in mice following infection with *L. chagasi*. *Mutat. Res.* 723, 177-181. doi: 10.1016/j.mrgentox.2011.04.009



- Demir, A., Celik, I., 2019. Investigation of healing effects of lemon (*Citrus limonum*) seeds lyophilized extracts on experimental diabetic rats. Arch. Physiol. Biochem. 1-8. doi: 10.1080/13813455.2019.1702061
- dos Santos S, Reimao J, Tempone A, Sartorelli P, Cunha R, Romoff P, Ferreira M, Fávero O, Lago J. 2012. *In vitro* antileishmanial and antitrypanosomal activities of flavanones from *Baccharis retusa* DC (Asteraceae). Experimental Parasitology, 130: 141-145.
- Dourado, G.K., Stanilka, J.M., Percival, S.S., Cesar, T.B., 2015. Chemopreventive Actions of Blond and Red-Fleshed Sweet Orange Juice on the Loucy Leukemia Cell Line. Asian Pac. J. Cancer Prev. 16, 6491-6499. doi: 10.7314/apjcp.2015.16.15.6491
- El-Nawawi, S.A., 1995. Extraction of *Citrus* glucosides. Carbohydr. Polym. 27, 1-4. doi.org/10.1016/0144-8617(95)00036-7
- Figuroa, C.J.A., Jasso, V.C., Liébano, H.E., Martínez, L.P., Rodríguez, V.R.I., Zárate, R.J.J., 2015. Examen Coproparasitoscópico. In: Técnicas para el diagnóstico de parásitos con importancia en salud pública y veterinaria. AMPAVE-CONASA, Mexico, D.F., 517 p.
- García-Lafuente A, Guillamón E, Villares A, Rostagno MA, Martínez, JA. 2009. Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. Inflamm. Res. 58: 537-552.
- Gungor, E., Altop, A., Erener, G., 2021. Effect of raw and fermented grape seed on growth performance, antioxidant capacity, and cecal microflora in broiler chickens. Animal 15, 100194. doi: 10.1016/j.animal.2021.100194
- Hamid, P.H., Hirzmann, J., Hermosilla, C., Taubert, A., 2014. Differential inhibition of host cell cholesterol de novo biosynthesis and processing abrogates *Eimeria bovis* intracellular development. Parasitol. Res. 113, 4165-4176. doi: 10.1007/s00436-014-4092-5
- Hoste, H., Torres-Acosta, J.F., 2011. Non chemical control of helminths in ruminants: adapting solutions for changing worms in a changing world. Vet Parasitol 180, 144-154.

- Hoste, H., Torres-Acosta, J.F., Sandoval-Castro, C.A., Mueller-Harvey, I., Sotiraki, S., Louvandini, H., Thamsborg, S.M., Terrill, T.H., 2015. Tannin containing legumes as a model for nutraceuticals against digestive parasites in livestock. *Vet. Parasitol.* 212, 5-17. DOI: 10.1016/j.vetpar.2011.05.035
- Ibarra-Velarde, F., Alcalá-Canto, Y., 2007. Downregulation of the goat beta-defensin-2 gene by IL-4 in caprine intestinal epithelial cells infected with *Eimeria* spp. *Parasitol. Res.* 101, 613-618. doi: 10.1007/s00436-007-0523-x.
- Inagaki-Ohara, K., Dewi, F.N., Hisaeda, H., Smith, A.L., Jimi, F., Miyahira, M., Abdel-Aleem, A.S., Horii, Y., Nawa, Y., 2006. Intestinal intraepithelial lymphocytes sustain the epithelial barrier function against *Eimeria vermiformis* infection. *Infect. Immun.* 74, 5292-5301. doi: 10.1128/IAI.02024-05
- Ishii K., Furuta T. 1996. Determination of naringin and naringenin in human plasma by high-performance liquid chromatography. *Journal of chromatography B*, 683; 225-229.
- Jiang, Q., Yin, J., Chen, J., Ma, X., Wu, M., Li, X., Yao, K., Tan, B., Yin, Y., 2021. 4-Phenylbutyric acid accelerates rehabilitation of barrier function in intestinal porcine epithelial cell (IPEC-J2) monolayer model. *Anim. Nutr.* 7, 1061-1069. doi:10.1016/j.aninu.2021.02.003
- Joachim, A., Altreuther, G., Bangoura, B., Charles, S., Dauschies, A., Hinney, B., Lindsay, D.S., Mundt, H.C., Ocak, M., Sotiraki, S., 2018. W.A.A.V.P. guideline for evaluating the efficacy of anticoccidials in mammals (pigs, dogs, cattle, sheep). *Vet. Parasitol.* 253, 102-119. doi: 10.1016/j.vetpar.2018.02.029.
- 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.
- Kauffman J. Parasitic infections of domestic animals. 1996. A Diagnostic Manual. Birkhäuser Boston.
- Kobayashi, S., Tanabe, S., Sugiyama, M., Konishi, Y., 2008. Transepithelial transport of hesperetin and hesperidin in intestinal Caco-2 cell monolayers. *Biochim. Biophys. Acta* 1778, 33-41. doi: 10.1016/j.bbamem.2007.08.020.

- Ledesma-Escobar, CA., Luque de Castro, MD., 2014. Towards a comprehensive exploitation of *Citrus*. Trends Food Sci. Technol. 39, 63-75.  
doi:10.1016/j.tifs.2014.07.002
- Levine N. 1978. Protozoan parasites of domestic animal and of man. 2 nd. Ed. Miniapolis,USA: Burgess publishing Company.
- Liang, G.H., Weber, C.R., 2014. Molecular aspects of tight junction barrier function. Curr Opin Pharmacol 19, 84-89.
- Lima, P.M.T., Crouzoulon, P., Sanches, T.P., Zabré, G., Kabore, A., Niderkorn, V., Hoste, H., Amarante, A.F.T.D., Costa-Júnior, L.M., Abdalla, A.L., Louvandini, H., 2019. Effects of *Acacia mearnsii* supplementation on nutrition, parasitological, blood parameters and methane emissions in Santa Inês sheep infected with *Trichostrongylus colubriformis* and *Haemonchus contortus*. Exp. Parasitol. 207, 107777. doi: 10.1016/j.exppara.2019.107777
- Mead J.R., McNair, N. 2006. Antiparasitic activity of flavonoids and isoflavones against *Cryptosporidium parvum* and *Encephalitozoon intestinalis*. FEMS Microbiol. Lett., 259:153-157.
- Mehlhorn, H., 2016. Encyclopedia of Parasitology, 4th 2016. Edition. Springer Berlin Heidelberg : Imprint: Springer, Berlin, Heidelberg.
- Min-Hsiung, P., Ching-Shu, L., Slavik, D., Chi-Tang, H. 2009. Modulation of inflammatory genes by natural dietary bioactive compounds. J. Agric. Food Chem. 57: 4467-4477.
- Nakashima, M., Hisada, M., Goda, N., Tenno, T., Kotake, A., Inotsume, Y., Kameoka, I., Hiroaki, H., 2020. Opposing effect of naringenin and quercetin on the junctional compartment of MDCK II cells to modulate the tight junction. Nutrients 12, 3285. doi: 10.3390/nu12113285
- Nogareda, C., Moreno, J.A., Angulo, E., Sandmann, G., Portero, M., Capell, T., Zhu, C., Christou, P., 2015. Carotenoid-enriched transgenic corn delivers bioavailable carotenoids to poultry and protects them against coccidiosis. Plant. Biotechnol. J. 14, 160-168. doi.org/10.1111/pbi.12369
- Nordi, E.C., Costa, R.L., David, C.M., Parren, G.A., Freitas, A.C., Lameirinha, L.P., Katiki, L.M., Bueno, M.S., Quirino, C.R., Gama, P.E., Bizzo, H.R., Chagas,

- A.C., 2014. Supplementation of moist and dehydrated *Citrus* pulp in the diets of sheep artificially and naturally infected with gastrointestinal nematodes on the parasitological parameters and performance. *Vet. Parasitol.* 205, 532-539. doi: 10.1016/j.vetpar.2014.09.015
- Odden, A., Stuen, S., Enemark, H.L., Robertson, L.J., Molina, J.M., Ruiz, A., 2019. Preliminary studies on in vitro methods for the evaluation of anticoccidial efficacy/resistance in ruminants. *Exp. Parasitol.* 201, 34-41. doi: 10.1016/j.exppara.2019.04.009
- Park, I., Lee, Y., Goo, D., Zimmerman, N.P., Smith, A.H., Rehberger, T., Lillehoj, H.S., 2020. The effects of dietary *Bacillus subtilis* supplementation, as an alternative to antibiotics, on growth performance, intestinal immunity, and epithelial barrier integrity in broiler chickens infected with *Eimeria maxima*. *Poult. Sci.* 99, 725-733. doi:10.1016/j.psj.2019.12.002
- Patra AK, Saxena J. 2009. Dietary phytochemicals as rumen modifiers: a review of the effects on microbial population. *Antonie van Leeuwenhoek*; 96: 363-375.
- Pérez-Fonseca, A., Alcalá-Canto, Y., Salem, A.Z., Alberti-Navarro, A.B., 2016. Anticoccidial efficacy of naringenin and a grapefruit peel extract in growing lambs naturally-infected with *Eimeria* spp. *Vet. Parasitol.* 232, 58-65. doi: 10.1016/j.vetpar.2016.11.009
- Rakita, S., Banjac, V., Djuragic, O., Cheli, F., Pinotti, L., 2021. Soybean Molasses in Animal Nutrition. *Animals.* 11, 514. doi: 10.3390/ani11020514
- Ruiz, A., Behrendt, J.H., Zahner, H., Hermosilla, C., Pérez, D., Matos, L., Muñoz, M.e.C., Molina, J.M., Taubert, A., 2010. Development of *Eimeria ninakohlyakimovae* in vitro in primary and permanent cell lines. *Vet. Parasitol.* 173, 2-10. doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.05.023
- Ruiz, A., Guedes, A.C., Muñoz, M.C., Molina, J.M., Hermosilla, C., Martín, S., Hernández, Y.I., Hernández, A., Pérez, D., Matos, L., López, A.M., Taubert, A., 2012. Control strategies using diclazuril against coccidiosis in goat kids. *Parasitol. Res.* 110, 2131-2136. doi.org/10.1007/s00436-011-2746-0
- Ruiz, A., Pérez, D., Muñoz, M.C., Molina, J.M., Taubert, A., Jacobs-Lorena, M., Vega-Rodríguez, J., López, A.M., Hermosilla, C., 2015. Targeting essential

- Eimeria ninakohlyakimovae* sporozoite ligands for caprine host endothelial cell invasion with a phage display peptide library. Parasitol. Res. 114, 4327-4331. doi: 10.1007/s00436-015-4666-x
- Saratsi, K., Hoste, H., Voutzourakis, N., Tzanidakis, N., Stefanakis, A., Thamsborg, S.M., Mueller-Harvey, I., Hadjigeorgiou, I., Sotiraki, S., 2020. Feeding of carob (*Ceratonia siliqua*) to sheep infected with gastrointestinal nematodes reduces faecal egg counts and worm fecundity. Vet. Parasitol. 284, 109200. doi: 10.1016/j.vetpar.2020.109200
- Scudiero, D.A., Shoemaker, R.H., Paull, K.D., Monks, A., Tierney, S., Nofziger, T.H., Currens, M.J., Seniff, D., Boyd, M.R., 1988. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. Cancer Res. 48, 4827-4833.
- Sharma, S., Tripathi, P., Sharma, J., Dixit, A., 2020. Flavonoids modulate tight junction barrier functions in hyperglycemic human intestinal Caco-2 cells. Nutrition 78, 110792.
- Srinivasan, B., Kolli, A.R., Esch, M.B., Abaci, H.E., Shuler, M.L., Hickman, J.J., 2015. TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems. J. Lab. Autom. 20, 107-126. doi: 10.1177/2211068214561025
- Sun, H., Dong, T., Zhang, A., Yang, J., Yan, G., Sakurai, T., Wu, X., Han, Y., Wang, X., 2013. Pharmacokinetics of hesperetin and naringenin in the Zhi Zhu Wan, a traditional Chinese medicinal formulae, and its pharmacodynamics study. Phytother. Res. 27, 1345-1351. doi: 10.1002/ptr.4867
- Tamiru, B., Alkhtib, A., Tamiru, M., Demeke, S., Burton, E., Tolemariam, T., Debela, L., Janssens, G.P.J., 2021. Evaluation of dried papaya pomace meal in laying hen diets. Vet. Med. Sci.7, 1914-1920 doi:10.1002/vms3.516
- 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.

- Tasdemir D, Lack G, Brun R, Ruedi P, Scapozza L, Perozzo R. 2006. Inhibition of *Plasmodium falciparum* fatty acid biosynthesis: evaluation of FabG, FabZ, and FabI as drug targets for flavonoids. *J Med Chem.* 49: 3345–3353.
- Tayengwa, T., Chikwanha, O.C., Raffrenato, E., Dugan, M.E.R., Mutsvangwa, T., Mapiye, C., 2021. Comparative effects of feeding *Citrus* pulp and grape pomace on nutrient digestibility and utilization in steers. *Animal* 15, 100020. doi.org/10.1016/j.animal.2020.100020
- Taylor MA, Coop RL, Wall RL. 2007. *Veterinary Parasitology*. 3rd. ed. Oxford: Blackwell,
- Taylor, M.A., Marshall, R.N., Marshall, J.A., Catchpole, J., Bartram, D., 2011. Dose-response effects of diclazuril against pathogenic species of ovine coccidia and the development of protective immunity. *Vet. Parasitol.* 178, 48–57. doi: 10.1016/j.vetpar.2010.12.024
- Ting S, Yeh HS, Lien TF. Effect of supplemental levels of hesperetin and naringenin on egg quality, serum traits and antioxidant activity of laying hens. *Animal Feed Science and Technology* 2011; 163:59-66.
- Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C.A., Hoste, H., Aguilar-Caballero, A.J., Cámara-Sarmiento, R., Alonso-Díaz, M.A., 2012. Nutritional manipulation of sheep and goats for the control of gastrointestinal nematodes under hot humid and subhumid tropical conditions. *Small Rumin. Res.* 103, 28-40. doi.org/10.1016/j.smallrumres.2011.10.016
- Tórtora J. 2003. *Memorias del Segundo Seminario Sobre Producción Intensiva de Ovinos*. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Villahermosa, Tab.
- Urquhart M, Armour J, Duncan JL, Dunn AM, and Jennings F W. 1996 *Vet. Parasitol.* Second Edition. Blackwell Publishing. Ames, Iowa.
- Vafeiadou K, Vauzour D, Yi Lee H, Rodríguez-Mateos A, Williams RJ, Spencer JPE. 2009. The citrus flavanone naringenin inhibits inflammatory signaling in glial cells and protects against neuroinflammatory injury. *Arch. Biochem. Biophys.*, 484:100-109.
- Walker, M.P., Evock-Clover, C.M., Elsasser, T.H., Connor, E.E., 2015. Short communication: Glucagon-like peptide-2 and coccidiosis alter tight junction gene

expression in the gastrointestinal tract of dairy calves. *J. Dairy Sci.* 98, 3432-3437. doi: 10.3168/jds.2014-8919.

Wang, A., Zhu, C., Fu, L., Wan, X., Yang, X., Zhang, H., Miao, R., He, L., Sang, X., Zhao, H., 2015. *Citrus* fruit intake substantially reduces the risk of esophageal cancer: a meta-analysis of epidemiologic studies. *Medicine (Baltimore)* 94, e1390. doi: 10.1097/MD.0000000000001390

Wunderlich, F., Al-Quraishy, S., Steinbrenner, H., Sies, H., Dkhil, M.A., 2014. Towards identifying novel anti-*Eimeria* agents: trace elements, vitamins, and plant-based natural products. *Parasitol. Res.* 113, 3547-3556. doi: 10.1007/s00436-014-4101-8

Xu, J., Go, M.L., Lim, L.Y., 2003. Modulation of digoxin transport across Caco-2 cell monolayers by *Citrus* fruit juices: lime, lemon, grapefruit, and pummelo. *Pharm. Res.* 20, 169-176. doi: 10.1023/a:1022254617664