



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

---

**UNIDAD XOCHIMILCO**

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

**EFECTO DE SUPLEMENTAR COLINA HERBAL EN EL CRECIMIENTO Y  
RESPUESTA INMUNE DE BECERRAS HOLSTEIN**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

PRESENTA:

**M. en C. CESAR DÍAZ GALVÁN**

COMITÉ TUTORAL

DIRECTORA: DRA. ESTELA TERESITA MÉNDEZ OLVERA

CO DIRECTOR: DR. PEDRO ABEL HERNÁNDEZ GARCÍA

ASESOR: DR. ADRIÁN GLORIA TRUJILLO

CIUDAD DE MÉXICO

FEBRERO 2023



**UNIVERSIDAD  
AUTÓNOMA  
METROPOLITANA**

**EFFECTO DE SUPLEMENTAR COLINA HERBAL EN EL CRECIMIENTO Y RESPUESTA  
INMUNE DE BECERRAS HOLSTEIN**

La presente tesis fue realizada bajo la supervisión del comité Tutorial indicado a continuación y aprobada como requisito en el plan de estudios para obtener el grado de:

**DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**COMITÉ TUTORAL:**

**Directora**

**DRA. ESTELA TERESITA MÉNDEZ OLVERA**

**Co Director**

**DR. PEDRO ABEL HERNÁNDEZ GARCÍA**

**Asesor**

**DR. ADRIÁN GLORIA TRUJILLO**

## ÍNDICE GENERAL

1.	RESUMEN .....	3
2.	ABSTRACT .....	4
3.	INTRODUCCIÓN .....	7
4.	REVISIÓN DE LITERATURA .....	9
2.1	Sistemas de producción lechero .....	9
2.1.1	Tecnificado .....	9
2.1.2	No tecnificado .....	9
2.2	SISTEMA DE PIE DE CRÍA EN CONDICIONES INTENSIVAS.....	10
2.2.1	Crianza de becerras lecheras .....	10
2.2.2	Etapas de pre rumiante a rumiante (desarrollo del ambiente ruminal) .....	11
2.3	PRINCIPALES PROBLEMAS DE SALUD EN BECERRAS .....	12
2.3.1	Manejo de salud de los recién nacidos .....	12
2.3.2	Diarrea .....	13
2.3.3	Neumonía .....	13
2.4	ESTRATEGIAS NUTRICIONALES .....	14
2.4.1	Nutracéuticos .....	14
2.4.2	Metabolitos secundarios de plantas .....	15
2.4.3	Aditivos herbales .....	16
2.4.4	Mezcla polihierbal BioCholine.....	16
2.4.4.1	<i>Citrullus colocynthis</i> .....	16
2.4.4.2	<i>Azadirachta indica</i> .....	17
2.4.4.3	<i>Achyranthes aspera</i> .....	19
2.4.4.4	<i>Trachyspermum ammi</i> .....	20
2.4.4.5	<i>Andrographis paniculate</i> .....	22
2.5	Compuestos volátiles del polihierbal.....	22
2.6	Colina .....	23
2.7	Metabolismo de colina .....	25
2.8	Función de colina en inmunidad y salud de la becerro .....	25
2.9	Mezclas herbales en producción de rumiantes .....	26
2.10	REFERENCIAS .....	28
3	Pregunta de investigación .....	55
4	Hipótesis .....	55
5	Objetivo .....	55
6	CAPÍTULO 2: INFLUENCIA DE UNA MEZCLA POLIHERBAL EN BECERRAS LECHERAS: COMPORTAMIENTO PRODUCTIVO Y EXPRESIÓN GÉNICA .....	56
	RESUMEN .....	57
	INTRODUCCIÓN .....	59
	MATERIALES Y MÉTODOS .....	60

<b>Animales, dieta y diseño experimental</b> .....	60
<b>Muestras y recopilación de datos</b> .....	61
<b>Análisis de inmunoglobulinas</b> .....	62
<b>Extracción de ARN de muestras de sangre</b> .....	63
<b>Análisis de microarreglos</b> .....	63
<b>Análisis de ontología génica</b> .....	64
<b>Validación del gen diferencial expresado mediante PCR cuantitativa en tiempo real</b> .....	64
<b>Análisis estadístico</b> .....	65
<b>RESULTADOS</b> .....	66
<b>Parámetros de rendimiento y salud en becerras</b> .....	66
<b>Bioquímica y biometría sanguínea</b> .....	66
<b>Variaciones de la expresión génica</b> .....	70
<b>DISCUSIÓN</b> .....	77
<b>Parámetros de las becerras</b> .....	77
<b>Bioquímica y biometría sanguínea</b> .....	78
<b>Variaciones de la expresión génica</b> .....	81
<b>CONCLUSIONES</b> .....	86
<b>REFERENCIAS</b> .....	88
<b>7 CAPÍTULO 3. EFECTO DE BIOCOLINA EN GENES IMPLICADOS EN EL METABOLISMO DE LÍPIDOS E INMUNIDAD EN BECERRAS HOLSTEIN EN CRECIMIENTO</b> .....	101
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	101
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	102
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	102
<b>CONCLUSIÓN</b> .....	108
<b>REFERENCIAS</b> .....	109

## 1. RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar una mezcla polihierbal compuesta por *Achyranthes aspera*, *Trachyspermum ammi*, *Citrullus colocynthis*, *Andrographis paniculata* y *Azadirachta indica* en becerras en crecimiento en química sanguínea, biometría hemática y expresión de genes. Se emplearon cuarenta becerras Holstein (peso inicial  $45.6 \pm 3.2$  kg), los tratamientos evaluados fueron dosis de 0, 3, 4 y 5 g/d de la mezcla polihierbal las cuales se proporcionaron en forma de gelatinas. Las becerras fueron alojadas en jaulas individuales provistas de comedero y bebedero con acceso *ad libitum* al agua y alimento iniciador con 21.5 % de PC, además de proporcionarles una mezcla de leche y un sustituto de leche no medicado (22 % de PC). Al día 59 del experimento se colectaron muestras de sangre para el análisis de química sanguínea, biometría sanguínea y expresión de genes en leucocitos a través de ensayos de microarreglos de DNA. Las becerras con la mezcla polihierbal mostraron un efecto cuadrático en peso final, ganancia diaria de peso, altura final de la cadera y el perímetro torácico, siendo las dosis de 4 g/d la que mostró los mejores resultados de rendimiento. El análisis de expresión de genes mostró tres procesos biológicos con mayor enriquecimiento siendo proteínas de unión estrecha, biosíntesis de mucinas tipo O-glicanos y la red inmune intestinal para la producción de IgA. Los genes diferencialmente expresados al alza influyeron en el metabolismo del ácido araquidónico y la biosíntesis de pantotenato y CoA. Las vías enriquecidas fueron proteínas que interactúan con el receptor de estrógeno PELP1, receptores nucleares en el metabolismo y la toxicidad de los lípidos, unión estrecha, interacción ECM-receptor, vías de señalización de la hormona tiroidea, contracción del músculo liso vascular, función de los ribosomas, vía de sinapsis glutamatérgica, vías de señalización de adhesión focal, Hippo, calcio y MAPK.

**Palabras clave:** comportamiento productivo, becerras Holstein, nutrigenómica.

## 2. ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate a polyherbal mixture composed of *Achyranthes aspera*, *Trachyspermum ammi*, *Citrullus colocynthis*, *Andrographis paniculata* and *Azadirachta indica* in growing calves on blood chemistry, blood biometry and gene expression. Forty Holstein calves (initial weight  $45.6 \pm 3.2$  kg) were used, the treatments evaluated were doses of 0, 3, 4 and 5 g/d of the polyherbal mixture which were provided in the form of gelatins. Calves were housed in individual cages provided with a feeder and drinker with ad libitum access to water and starter feed with 21.5% CP, in addition to providing them with a mixture of milk and a non-medicated milk replacer (22% CP). On day 59 of the experiment, blood samples were collected for analysis of blood chemistry, blood biometry and gene expression in leukocytes by DNA microarray assays. Calves fed the polyherbal mixture showed a quadratic effect on final weight, daily weight gain, final hip height and thoracic perimeter, with the 4 g/d dose showing the best performance results. Gene expression analysis showed three biological processes with the highest enrichment being tight junction proteins, O-glycan type mucin biosynthesis and the intestinal immune network for IgA production. Differentially up-expressed genes influenced arachidonic acid metabolism and pantothenate and CoA biosynthesis. Pathways enriched were estrogen receptor interacting proteins PELP1, nuclear receptors in lipid metabolism and toxicity, tight junction, ECM-receptor interaction, thyroid hormone signaling pathways, vascular smooth muscle contraction, ribosome function, glutamatergic synapse pathway, focal adhesion signaling pathways, Hippo, calcium and MAPK.

**Key words:** productive performance, Holstein calves, nutrigenomics.

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Compuestos volátiles reportados en el polihierbal BioCholine .....	24
Cuadro 2. Secuencias (5' a 3') de primers usados en qPCR .....	65
Cuadro 3. Efectos de la mezcla polihierbal en el comportamiento productivo y estado de salud. .....	68
Cuadro 4. Efecto de una mezcla polihierbal en parámetros sanguíneos.....	69
Cuadro 5. Efectos de la mezcla polihierbal en los parámetros sanguíneos. ....	70
Cuadro 6. Análisis de microarreglos del perfil de expresión génica diferencial en células de sangre periférica (genes regulados al alza).....	72
Cuadro 7. Análisis de microarreglos del perfil de expresión génica diferencial en células de sangre periférica (genes regulados a la baja).....	73
Cuadro 8. Análisis de enriquecimiento de ontología génica en células de sangre periférica. ...	75
Cuadro 9. Análisis de la expresión génica.....	76
Cuadro 10. Genes implicados en el metabolismo de lípidos en becerras lecheras. ....	103
Cuadro 11. Genes en inmunidad de becerras lecheras. ....	105

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Procesos biológicos enriquecidos para genes expresados diferencialmente (DEG; transcritos regulados hacia arriba y hacia abajo).....	76
Figura 2. Componente celular de genes en el metabolismo de lípidos e inmunidad y función molecular; $\Sigma$ : receptor; $\theta$ : unión RNA; $\Psi$ : unión DNA; $\Delta$ : antimicrobiano; $\text{€}$ : transferasa; $\text{¥}$ : oxidoreductasa.....	108



### 3. INTRODUCCIÓN

En México, la producción láctea es considerada una actividad de importancia dentro del sector alimentario, la cual se desarrolla bajo sistemas con distintos niveles de tecnología (García-Martínez *et al.*, 2015). Dentro de estos sistemas, la crianza de becerras empleadas como reemplazos se considera clave para el éxito del sistema productivo, proporcionándoles ingredientes de alta calidad en su dieta para un óptimo desarrollo buscando el fortalecimiento del sistema inmune de las becerras para reducir la incidencia de enfermedades, tanto entéricas como respiratorias, disminuyendo los porcentajes de morbilidad y mortalidad (Rosadiuk *et al.*, 2021).

Ante esta situación, el uso de aditivos naturales a base de hierbas ha cobrado un auge en la alimentación animal debido a los efectos benéficos que generan (Bagchi, 2006), los cuales dependen del tipo de planta y sobre todo por los metabolitos secundarios que contengan. Entre los efectos que se han reportado en distintas especies animales están: mejoras en producción, actividades antimicrobianas, antiinflamatorias, antioxidantes, inmunoestimulantes, así como antiparasitarias (Naidoo *et al.*, 2008; Frankič *et al.*, 2009; Bombik *et al.*, 2012), así mismo se han empleado para el tratamiento o prevención de enfermedades digestivas y respiratorias (Nowroozinia *et al.*, 2022), siendo este tipo de enfermedades más comunes en becerras antes del destete (Urie *et al.*, 2018).

Estudios realizados en becerras han reportado efectos benéficos con el uso de plantas, tal es el caso de Lee-Rangel *et al.* (2022) quienes al emplear una mezcla polihierbal en becerras lecheras observaron aumento en consumo de leche y en alimento iniciador, así como un incremento lineal en la concentración sérica de proteínas, bilirrubina, fosfatasa alcalina y concentraciones de anticuerpos, aumento en las concentraciones de hematocrito, hemoglobina

y eritrocitos. Del mismo modo, Sánchez *et al.* (2021) al emplear un aditivo polihierbal en becerras lecheras observaron que los animales que consumieron el producto herbal mostraron mayor altura de la cadera y la circunferencia torácica, se presentó una disminución en los casos de neumonías, se redujo linealmente la glucosa sérica en sangre y el butirato B-OH, la urea y los monocitos mostraron una respuesta cuadrática mientras que los basófilos disminuyeron.

El producto herbal BioCholine se encuentra conformado por plantas utilizadas en la medicina Ayurvédica (*Citrullus colocynthis*, *Azadirachta indica*, *Achyranthes aspera*, *Trachyspermum ammi* y *Andrographis paniculate*), el cual reporta que contiene metabolitos de colina en forma de conjugados aportando principalmente fosfatidilcolina, por lo cual los efectos con este producto herbal se atribuyen nutricionalmente a la fosfatidilcolina y a los compuestos secundarios que conforman cada una de las plantas (Upadhaya y Kim, 2017). Investigaciones realizadas reportan incrementos en producción de leche, mejoras en comportamiento productivo, disminución en problemas de fertilidad, menor incidencia de abortos, así como de mastitis clínica y subclínica (Mendoza *et al.*, 2020; Gutiérrez *et al.*, 2019).

Por lo anterior, en esta disertación se realizó un estudio para conocer en forma más amplia los efectos del polihierbal en el crecimiento y metabolismo de becerras, con nutrigenómica.

## **4. REVISIÓN DE LITERATURA**

### **2.1 Sistemas de producción lechero**

En México la producción láctea es considerada la tercera actividad más importante dentro del sector alimentario. La productividad y rentabilidad de los sistemas de producción lechero, y su relación con la industrialización y comercialización de leche, así como sus derivados, es un tema de vital importancia para la economía nacional (Loera y Banda, 2017). Los sistemas de producción láctea se caracterizan por su diversidad desarrollándose bajo ciertas condiciones tecnológicas, agroecológicas, así como socioeconómicas (García-Martínez *et al.*, 2015) identificando aquellos altamente tecnificados e integrados y los sistemas de producción tradicionales, con escaso o nulo acceso a nuevas tecnologías (Ruíz *et al.*, 2004).

#### **2.1.1 Tecnificado**

Este sistema de producción se localiza principalmente en la zona norte y en el altiplano central de México, se caracteriza por su elevado uso en infraestructura, maquinaria, acceso a nuevas tecnologías, asesorías técnicas especializadas, además de contribuir con el 50% de la producción total nacional. En este sistema de producción se adoptó el conocido modelo Holstein, el cual consiste en incorporar elementos tecnológicamente nuevos con la finalidad de producir la mayor cantidad de leche posible, bajo este modelo se implementó la inseminación artificial para el mejoramiento genético de los animales, se introdujo en la alimentación forrajes de la mejor calidad, la ordeña se realizó de manera mecanizada y se desarrolló el proceso de cadena fría, el cual mantiene y preserva las condiciones idóneas de la leche, desde su recepción, traslado y distribución, destinándose a las principales plantas procesadoras y transformadoras del país (Escoto *et al.*, 2001).

#### **2.1.2 No tecnificado**

La producción láctea bajo este sistema de producción se realiza en unidades relativamente pequeñas en las cuales el número de animales es variable, empleando mano de obra familiar además de carecer de infraestructura productiva adecuada dando como resultado una baja producción de leche y baja rentabilidad (Soto y Reynoso, 2008). La producción láctea bajo este sistema es en pequeña escala, sin embargo, representa el 79% de las unidades especializadas en producción de leche aportando el 37% de la producción láctea de México, esto representa un ingreso económico extra a las familias que están inmersas en este tipo de sistemas (Pacheco *et al.*, 2014).

## **2.2 SISTEMA DE PIE DE CRÍA EN CONDICIONES INTENSIVAS**

### **2.2.1 Crianza de becerras lecheras**

En los sistemas de producción lechera, las becerras son separadas de las vacas inmediatamente después del parto siendo alojadas individualmente y alimentadas artificialmente mediante sistemas automatizados. De acuerdo con la literatura reportada, el 60% de las granjas en Europa occidental y central crían becerras de manera individual (Marcé *et al.*, 2010), 63% en Estados Unidos (USDA, 2016), 88% en Canadá (Vasseur *et al.*, 2010) y el 70% en el sur de Brasil (Hötzel *et al.*, 2014).

En los últimos años se ha enfatizado la importancia de la crianza de becerras lecheras, ya que su empleo como reemplazos en los sistemas de producción láctea es la clave del éxito, debido a esto se ha dado prioridad a la estimulación del desarrollo temprano del rumen de la becerro en el consumo de alimento iniciador, lo cual se ve reflejado a corto y largo plazo en salud, bienestar y producción (Rosadiuk *et al.*, 2021). Investigaciones realizadas mencionan la importancia de la alimentación desde la vida temprana de la becerro, ya que al proporcionar los

nutrientes necesarios se maximiza el crecimiento, desarrollo, aumenta la producción, se reducen los gastos generados por servicios veterinarios además de que se mejora la respuesta inmune (Ollivett *et al.*, 2012; Overton *et al.*, 2013).

### **2.2.2 Etapa de pre rumiante a rumiante (desarrollo del ambiente ruminal)**

El periodo de transición de pre rumiante a rumiante es un proceso delicado en becerras el cual se encuentra constituido por múltiples mecanismos (Vi *et al.*, 2004), durante el periodo previo al destete en el tracto gastrointestinal la leche se digiere y absorbe en el abomaso y en el intestino delgado suministrando los nutrientes necesarios a la becerro, tales como proteínas y carbohidratos para el mantenimiento y crecimiento, además de proveer glucosa, la cual es la principal fuente de energía durante esta etapa (Vi *et al.*, 2004; Drackley, 2008; Benschop y Cant, 2009).

Posterior a esto, cuando las becerras comienzan a consumir alimento sólido continua el desarrollo del rumen, el cual no solo implica crecimiento y diferenciación celular, sino que también da como resultado un cambio importante en el patrón de nutrientes que llegan al intestino e hígado. El rumen aumenta del 30 al 70% de su capacidad durante el proceso de destete (Warner *et al.*, 1956), es responsable de varias funciones fisiológicas, como la absorción, transporte, así como metabolismo de ácidos grasos, los cuales representan hasta el 80% de la energía de los rumiantes (Bergman, 1990; Galfi *et al.*, 1991). Las becerras que son alimentadas con fuentes ricas en carbohidratos durante el periodo del destete exhiben un incremento en la producción de ácidos grasos, así como mayor producción de ácido láctico (Laarman y Oba, 2011).

Las bacterias ruminales pueden adaptarse a los cambios en la dieta, la diversidad bacteriana, así como el tamaño de población presentes en el epitelio ruminal son afectadas por el tipo de alimentación (Liu *et al.*, 2015). Estudios han demostrado que se establecen comunidades bacterianas poco tiempo después del nacimiento de las becerras, antes del consumo de alimentos sólidos (Jami *et al.*, 2013; Rey *et al.*, 2014). Estas bacterias pueden transmitirse al momento del nacimiento y por medio de la piel o saliva, (Chaucheyras–Durand y Ossa, 2014), encontrándose bacterias esenciales para el desarrollo y madurez del rumen en becerras desde el primer día de nacimiento (Jami *et al.*, 2013).

## **2.3 PRINCIPALES PROBLEMAS DE SALUD EN BECERRAS**

### **2.3.1 Manejo de salud de los recién nacidos**

El periodo crítico en la crianza de becerras se presenta en el primer mes de vida debido a un sistema inmune deficiente, acompañado de factores estresantes que predisponen al riesgo de adquirir enfermedades generando mayor tasa de mortalidad, en la mayoría de esos casos las becerras son infectadas por agentes patógenos causantes de enfermedades entéricas y respiratorias infectándose a menudo en el área de maternidad, por un ambiente contaminado o por contacto directo con animales enfermos (Van Zijderveld *et al.*, 1982; Faubert y Litvinsky, 2000; Santin *et al.*, 2004; Svensson *et al.*, 2006; Wieler *et al.*, 2007). Debido a que las becerras nacen carentes de anticuerpos, el calostro resulta uno de los factores más importantes y cruciales a considerar que afecta la salud y supervivencia de las becerras, la ingesta inadecuada da como resultado una mala transferencia de inmunidad pasiva, de la inmunoglobulina IgG, lo cual conlleva a un mayor riesgo de mortandad (Godden, 2008).

Estudios realizados en sistemas de producción lecheros han reportado que al colocar las beceras recién nacidas en jaulas y alimentarlas de manera individual, limitando el contacto directo con otros animales se disminuye la transmisión de enfermedades (Stull y Reynolds, 2008; Medrano-Galarza *et al.*, 2017), por otra parte, investigaciones realizadas han demostrado que el riesgo de enfermedades respiratorias, así como la presencia de diarreas fue significativamente mayor para las beceras alimentadas automáticamente y alojadas en grupo en comparación aquellas que fueron alimentadas y alojadas de manera individual (Lundborg *et al.*, 2003, 2005; Svensson *et al.*, 2003).

### **2.3.2 Diarrea**

La diarrea en beceras es la mayor causa de pérdidas económicas la cual genera una morbilidad y mortalidad alta en sistemas de producción lechera (Lanz Uhde *et al.*, 2008; Bartels *et al.*, 2010). Durante el primer mes de vida las beceras son susceptibles principalmente a enfermedades entéricas causadas por múltiples patógenos como *Escherichia coli*, rotavirus bovino grupo A (BRV-A), coronavirus bovino (BCoV), virus de la diarrea viral bovina (BVDV), *Salmonella* spp., *Clostridium perfringens* tipo C y *Cryptosporidium parvum* (Maunsell y Donovan, 2008; McGuirk, 2008), las beceras que usualmente sobreviven a esas infecciones presentan una tasa de crecimiento relativamente baja siendo más susceptibles a otras enfermedades con posibles consecuencias negativas a largo plazo, específicamente en cuanto al rendimiento a la primera lactancia (Donovan *et al.*, 1998; Van der Fels-Klerx *et al.*, 2002)

### **2.3.3 Neumonía**

Las enfermedades respiratorias en beceras lecheras en conjunto con infecciones entéricas representan la principal causa de mortandad en los sistemas de producción lechera con un 80%, originando graves consecuencias económicas debido al impacto negativo en el crecimiento,

rendimiento reproductivo, producción de leche y la longevidad (Waltner-Toews *et al.*, 1986; Wells *et al.*, 1996; Warnick *et al.*, 1997; Donovan *et al.*, 1998; USDA, 2002).

La enfermedad respiratoria es considerada como un problema en becerras que se encuentran en la etapa predestete (Virtala *et al.*, 1996; Lago *et al.*, 2006). Entre los principales agentes causantes de esta enfermedad se encuentran *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica* e *Histophilus somni*, también se han identificado algunos virus involucrados en el desarrollo de la enfermedad, tales como virus del herpes bovino 1 (rinotraqueítis infecciosa bovina), virus de la parainfluenza bovina tipo 3, virus sincitial respiratorio bovino y virus de la diarrea viral bovina (Baker *et al.*, 1986; Sivula *et al.*, 1996; Virtala *et al.*, 1996; Callan y Garry, 2002).

## **2.4 ESTRATEGIAS NUTRICIONALES**

### **2.4.1 Nutraceuticos**

Los productos naturales a base de plantas han sido utilizados como agentes profilácticos debido a los efectos benéficos para la salud en humanos y animales (Merchant *et al.*, 2004; Bagchi, 2006) y en los últimos años se ha aumentado el interés en los alimentos funcionales y nutraceuticos (Howes, 2018), los cuales, bajo sus diferentes formas farmacéuticas (píldoras, polvos, cápsulas, viales, etc.) contienen compuestos bioactivos alimentarios como principio activo y son utilizados con el propósito de mejorar la salud en dosis que exceden las que se podrían obtener de los alimentos normales (Zeisel, 1999). Entre los fitoquímicos se encuentran los polifenoles (antocianinas, proantocianidinas, flavanonas, isoflavonas, resveratrol y ácido elálgico), los cuales son utilizados actualmente en la industria nutraceutica (Espín *et al.*, 2007). En la industria de alimentación animal se han desarrollado nuevos aditivos naturales conocidos



como fitobióticos (poliherbales, aceites esenciales, etc.) cuya eficacia debe ser evaluada en forma experimental y en condiciones de campo.

#### **2.4.2 Metabolitos secundarios de plantas**

El uso de metabolitos secundarios de plantas son una alternativa empleada para modular la fermentación ruminal (Calsamiglia *et al.*, 2007; Macheboeuf *et al.*, 2008), modular los microorganismos presentes en el intestino (Bampidis *et al.*, 2006), así como mejorar la productividad de los animales (Hill *et al.*, 2007; Chester-Jones *et al.*, 2010). Existe una diversidad de aceites esenciales de plantas que comprenden una serie de compuestos complejos conformados principalmente por terpenos, fenilpropanos (fenoles simples, ácidos fenólicos, quinonas, flavonas, taninos y cumarinas), alcaloides, lectinas y polipéptidos (Hernández *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2004). Los componentes fenólicos presentes en el aceite esencial de orégano han demostrado actividad antimicrobiana y antifúngica (Basilico y Basilico, 1999).

En un estudio realizado por Tzakou *et al.* (2001) se mostró que el aceite esencial de *Salvia ringens*, compuesto por monoterpenoides  $\alpha$ -pineno, 1,8-cineol, acetato de bornilo y b-pineno ejerció un efecto antibacteriano (Gram positivas: *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*; Gram negativas: *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*), y antifúngico (*Candida albicans*, *Candida vaginalis*, *Torulopsis glabrata*). El timol (procedente de plantas *Thymus* y *Origanum*) y el extracto de *Salvia officinalis* y *Equisetum arvense* se han utilizado en rumiantes para controlar la metanogénesis ruminal (Broudiscou *et al.*, 2000; Evans y Martin, 2000).

### **2.4.3 Aditivos herbales**

El creciente interés en el uso de aditivos herbales en la alimentación animal radica en la resistencia bacteriana generada por el uso de antibióticos como promotores de crecimiento, los cuales repercuten en la salud del consumidor. En la alimentación animal, el uso de productos a base de hierbas ha reportado efectos positivos debido a los metabolitos secundarios presentes en las plantas, entre los cuales se tiene mejoras en producción, regulación del metabolismo y actividad del tracto digestivo (Bhatt *et al.*, 2009; Bombik *et al.*, 2012), también actividades antimicrobianas, antiinflamatorias, antiparasitarias, propiedades antioxidantes e inmunoestimulantes (Naidoo *et al.*, 2008; Frankič *et al.*, 2009; Stef *et al.*, 2009; Muanda *et al.*, 2011).

### **2.4.4 Mezcla polihierbal BioCholine**

El producto herbal, procedente de la India, se encuentra conformado por plantas utilizadas de manera tradicional en la medicina Ayurvédica, entre las cuales se encuentran *Citrullus colocynthis*, *Azadirachta indica*, *Achyranthes aspera*, *Trachyspermum ammi* y *Andrographis paniculate*. Este producto herbal contiene colina en forma de conjugados de colina principalmente fosfatidilcolina, se ha demostrado que posee propiedades antioxidantes y antimicrobianas debido a los metabolitos secundarios que las componen (Frankič *et al.*, 2009; Upadhaya y Kim, 2017).

#### **2.4.4.1 *Citrullus colocynthis***

Es una planta nativa de los países de medio oriente perteneciente a la familia *Cucurbitaciae*, contiene sustancias activas como glucósidos, saponinas, flavonoides (2-O-β-D-glucopiranosil-cucurbitacina I, 2-O-β-D-glucopiranosil-cucurbitacina L, isovitexina, quercetina, ácido gálico, ácido p-cumerico entre otros) (Delazar *et al.*, 2006; Gurudeeban *et al.*, 2010; Hussain *et al.*,

2013), alcaloides y colina (Sayed *et al.*, 1973; Ali *et al.*, 2013), componentes volátiles y terpenoides como: 4- (1-metil) etoxi-1-butanol, 5-metoxi, 2-metil, 2-pentanol, 2- metil, 4-heptanona y 3-metil (Gurudeeban *et al.*, 2011), ácidos grasos (ácido palmítico, ácido esteárico, ácido linoleico, ácido oleico) (Sadou *et al.*, 2007; Sebbagh *et al.*, 2009), tocoferoles y carotenos ( $\alpha$ -tocoferol,  $\gamma$ -tocoferol,  $\beta$ -caroteno) (Kalhor *et al.*, 2002), además de que se han aislado e identificado cucurbitacinas así como colocintósidos (Sturm y Stuppner, 2000; Adam *et al.*, 2001; Yoshikawa *et al.*, 2007).

La diversidad de compuestos secundarios de esta planta ha permitido su uso como tratamiento ante enfermedades en humanos contra desordenes de indigestión, disentería, gastroenteritis y cólico (Qureshi *et al.*, 2010; Gurudeeban *et al.*, 2011). En Pakistán e India las frutas de *Citrullus colocynthis* han sido ampliamente utilizadas para tratar desordenes intestinales, diabetes, y cáncer (Sharma, 1998; Upadhyay *et al.*, 2007; Sultan *et al.*, 2010; Sharma *et al.*, 2010), actúa contra bacterias Gram positivas y Gram negativas (Marzouk *et al.*, 2010a, 2010b), posee propiedades antiinflamatorias y actúa como antihelmíntico (Wasfi *et al.*, 1995; Adam *et al.*, 2001; Marzouk *et al.*, 2010a).

#### **2.4.4.2 *Azadirachta indica***

Comúnmente conocida como Neem, es perteneciente a la familia de las *Meliaceae* y al género de las *Azadirachta* (Hossain *et al.*, 2013). Es ampliamente utilizada en la medicina Ayurvédica y en la medicina homeopática (Subapriya y Nagini 2005), dentro de los principales constituyentes químicos encontrados en las hojas del Neem se encuentran: nimbin, nimbanene, 6-desacetylnimbinene, nimban-diol, nimbolide, ácido ascórbico, n-hexacosanol y aminoácido, 7-desacetyl-7-benzoylazadiradione, 7-desacetyl-7-benzoylgedunin, 17-hydroxyazadiradione y nimbiol (Subapriya y Nagini 2005; Kokate *et al.*, 2005; Hossain *et al.*, 2011).

Del mismo modo se han identificado más de 140 sustancias activas, las cuales se han aislado de diferentes partes del Neem. Estos componentes encontrados han sido divididos en dos principales clases: isoprenoides y nonisoprenoides, dentro de los isoprenoides se encuentran diterpenoides, triterpenoides, limonoides y sus derivados como C-secomeliacinas. Los nonisoprenoides incluyen proteínas, polisacáridos, componentes sulfurosos, polifenoles como flavonoides, glucósidos, cumarinas, taninos y componentes alifáticos. Por su parte Hossain *et al.* (2013) realizaron la identificación y caracterización de los componentes químicos del Neem empleando diferentes extractos crudos como hexano, acetato de etilo, cloroformo, butanol y metanol reportando que al realizar la extracción con hexano encontraron 16 diferentes compuestos, predominando ácido oxálico, 2-etilhexil tetradecil est, petroselinato de metilo y eicosano 7-hexil.

Al emplear acetato de etilo encontraron nueve compuestos, siendo principalmente fitol, a su vez al emplear cloroformo encontraron seis compuestos, entre los que se tiene 14-metilpentadecanoato de metilo y nonacosano, por otra parte al realizar la extracción con butanol encontraron ocho compuestos, tales como 14-metilpentadecanoato de metilo, cloruro de lineoleoilo y hentriacontano, finalmente al emplear metanol identificaron cuatro compuestos, 14-metilpentadecanoato de metilo, cloruro de lineoleoilo y m-toluilaldehído, principalmente.

Algunos estudios al emplear Neem han reportado ciertas propiedades farmacológicas tales como antivirales, presentando actividad contra el virus vaccinia, chikungunya, virus del sarampión y dengue (Rao *et al.*, 1969; Gogati y Marathe, 1989; Parida *et al.*, 2002). Se ha demostrado actividad antifúngica contra *Trichophyton*, *Epidermophyton*, *Microsporum*, *Trichosporon*, *Geotricum*, *Candida* y *Penicillium expansum* (Khan *et al.*, 1987; Aparecida Galerani Mossini *et al.*, 2004). El Neem posee acción antibacterial contra microorganismos

Gram negativos y Gram positivos, así como cepas resistentes a la estreptomicina (Chopra *et al.*, 1952). Se ha reportado que inhibe a *Vibrio cholerae*, *Klebsiella pneumoniae*, *M. tuberculosis* y *M. pyogenes* (Satyavati *et al.*, 1976), así mismo ha exhibido efecto antipirético al ser empleado en conejos y ha demostrado efecto antiinflamatorio en ratas (Okpanyi y Ezeukwu, 1981; Chattopadhyay, 1998).

En cuanto a su acción inmunomodulatoria, se reportó que el extracto de hojas de Neem administrado por vía oral indujo niveles altos de IgM e IgG junto con un mayor título de anticuerpos anti albúmina (Ray *et al.*, 1996), del mismo modo numerosos estudios han demostrado el efecto del extracto de hojas de Neem con efectos positivos sobre su actividad anticancerígena, tal es el caso de un estudio realizado por Dasgupta *et al.* (2004), quienes demostraron su potencial quimiopreventivo al reducir significativamente la carga tumoral y la incidencia de tumores.

Baral y Chattopadhyay (2004) reportaron una reducción significativa en el crecimiento de células de carcinoma de Ehrlich y melanoma B16. Estos efectos anticancerígenos observados por el Neem se deben, entre muchos, a la presencia de carotenos, ácido ascórbico, terpenoides, limonoides y flavonoides como quercetina y kaemferol (Makita *et al.*, 1996; Rice-Evans *et al.*, 1996; Akhila y Rani, 1999). En este sentido, la capacidad anticancerígena de la quercetina radica en su capacidad de inhibir el sistema de monooxigenasas dependientes del citocromo P-450 involucrado en la activación de carcinógenos químicos (Buening *et al.*, 1981).

#### **2.4.4.3 *Achyranthes aspera***

Es una planta medicinal autóctona perteneciente a regiones específicas de Asia, América del sur, Australia y África (Latha *et al.*, 2010). El extracto de *Achyranthes aspera* contiene

triterpenos, alcaloides y esteroides (Barua *et al.*, 2010b). Se han aislado saponinas a base de ácido oleanólico (Seshadri *et al.*, 1981; Dwivedi *et al.*, 2008), y aminoácidos en frutos y semillas (Borthakur y Goswami, 1995; Moura-Letts *et al.*, 2006). En hojas y raíces se han identificado ecdisterona y alcaloides del tipo betaína o betalaína y aquirantina (Neogi *et al.*, 1970; Bhom *et al.*, 1992), flavonoides hiperósidos (Kunert *et al.*, 2000), esteroides ( $\beta$ -sitosterol), ácido tianshico, ácido linoleico (Misra *et al.*, 1996), ácido trans-13-docasenoico, ácido N-hexacos-17-enoico, ácido N-hexacos-11-enoico y ácido N-hexacos-14-enoico (Sharma *et al.*, 2009). Su empleo en la medicina Ayurvédica considera partes de la planta como tallos, hojas y frutos para tratar problemas renales, neumonías, erupciones cutáneas, disentería, así como antídoto ante mordeduras de serpientes (Barua *et al.*, 2012), también se ha utilizado para tratar fiebre, específicamente la malaria, asma e hipertensión (Girach y Khan, 1992; Tang y Eisenbrand, 1992).

Se ha demostrado que esta planta presenta efectos con propiedades antibacterianas (Aziz *et al.*, 2005), anticoagulantes, antitumorales, antihepatocarcinogénicas (Chakraborty *et al.*, 2002; Kartik *et al.*, 2010), así como actividad antiinflamatoria (Vetrichelvan y Jegadeesan, 2003), antidepresiva y analgésica (Barua *et al.*, 2010a, c). Por otra parte, el extracto de esta planta ha mostrado poseer actividad hipoglucémica, estimula la tiroides y presenta actividad antiperoxidativa (Akhtar y Iqbal, 1991; Tahiliani y Kar, 2000) además de mostrar actividad antioxidante (Nehete *et al.*, 2009).

#### ***2.4.4.4 Trachyspermum ammi***

Es una planta distribuida ampliamente en Irán, Afganistán, Pakistán, India y África (Shojaaddini *et al.*, 2008). Se encuentra constituida principalmente por timol (17.41%),  $\gamma$ -terpineno (48.07%), p-cimeno (33.73%), carvona (46,2%), limoneno (38,1%) y dilapiole (8.9%) y carvacrol

(Choudhury *et al.*, 1998; Park *et al.*, 2007; Goudarzi *et al.*, 2011; Mahboubi y Kazempour, 2011; Aberoomand *et al.*, 2010; Gilani *et al.*, 2013; Nickavar *et al.*, 2014; Zarshenas *et al.*, 2014).

Estudios han demostrado la presencia de ácido oleico, linoleico, palmítico, petroselinico y ácido resínico (Qureshi y Kumar, 2010), además de carbohidratos, proteínas, vitaminas, taninos, glucósidos, carotenoides, alcaloides, esteroides, saponinas, flavonoides, calcio, fósforo, hierro, cobalto, cobre, yodo, manganeso, tiamina y riboflavina (Qureshi y Kumar, 2010; Ranjan *et al.*, 2011; Sonar *et al.*, 2016).

Se han encontrado, en *Trachyspermum ammi*, constituyentes glicósidos tales como el 6-hidroxicarvacrol 2-O- $\beta$ -D-glucopiranosido y el 3, 5-dihidroxitolueno 3-O- $\beta$ -D-galactopiranosido (Gang *et al.*, 1980), monoterpenoides como 3, 7-Dimethyloct-3, ene-1, 2, 6, 7-tetrol, glucósidos (2S, 6Z) -3,7-Dimethyloct-3, ene-1, 2, 6, 7-Tetrol 1-O- $\beta$ -D-Glucopyranoside y 6-Hydroxythymol 3-O- $\beta$ -D-glucopiranosido, compuestos aromáticos como 2-metil-3-buten-2-ol- $\beta$ -D-glucopiranosido bencil- $\beta$ -D-glucopiranosido y glucido (3R) -2-hidroximetilbutano-1,2,3,4-tetrol (Balbaa *et al.*, 1973; González *et al.*, 1988; Ishikawa *et al.*, 2001).

En estudios *in vitro* se ha demostrado que el aceite esencial de *T. ammi* suprime el crecimiento de bacterias Gram negativas, Gram positivas y hongos (Nevas *et al.*, 2004; Mahboubi y Kazempour, 2011). Su empleo en la medicina natural ha demostrado ser eficaz en trastornos estomacales como flatulencias, indigestión, cólicos y diarreas además de poseer actividad antioxidante, antiviral, antifúngica, nematicida, antiinflamatoria, analgésica, hepatoprotectora, antiepiléptica, antifebril y antitumoral (Dashti-Rahmatabadi *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2007; Rasooli *et al.*, 2008; Natanzian-Ghahfarkhi *et al.*, 2008; Zahin *et al.*, 2010; Paul *et al.*, 2011; Moazeni *et al.*, 2012; Nickavar *et al.*, 2014; Sonar *et al.*, 2016).

#### **2.4.4.5 *Andrographis paniculate***

Es una planta distribuida ampliamente en regiones tropicales y subtropicales; es utilizada en la medicina tradicional de la India, China, Tailandia y Escandinavia, en cuanto a sus constituyentes fitoquímicos se han aislado e identificado lactonas diterpénicas tales como andrografolida, isoandrografolida, neoandrografolida, 14-desoxi-11,12-didehidroandrografolida, 14-desoxiandrografisida, 14-desoxi-11,12-didehidroandrografisida, 3,14-didesoxiandrografólido, además de flavonas como andrographidina C, andrographidina A, 5-hidroxi-7,8-dimetoxiflavanona y esteroides (Reddy *et al.*, 2003; Rao *et al.*, 2004; Parichatikanond *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2019). Sus extractos han demostrado que exhiben un amplio rango de actividades terapéuticas con propiedades antimicrobianas, antivirales, antiinflamatorias, antipiréticas, analgésicas, inmunoestimulantes, anticoagulantes, hepatoprotectoras, antitumorales y antitrombóticas (Puri *et al.*, 1993; Chander *et al.*, 1995; Xia *et al.*, 2004; DerMarderosian y Beutler, 2002; Parichatikanond *et al.*, 2010).

#### **2.5 Compuestos volátiles del polihierbal**

En un estudio realizado por Roque-Jiménez *et al.* (2020) caracterizaron la composición del producto polihierbal BioCholine empleando cromatografía de gases acoplada a la espectrofotometría de masas identificando 22 compuestos (Cuadro 1). Por su parte Mendoza *et al.* (2020) al emplear cromatografía de gases de nariz electrónica identificaron 12 compuestos volátiles con efectos bacteriostáticos y bactericidas (Esatbeyoglu *et al.*, 2015; Widhalm *et al.*, 2016; Zhu *et al.*, 2017).



## 2.6 Colina

En 1850, Theodore Gobley aisló de la yema de huevo una sustancia a la cual denominó "lecitina" del griego "lekithos", es un componente principal de todas las membranas celulares (Gobley, 1850). Por su parte Adolph Strecker en 1862, caracterizó la composición de la bilis de cerdo y bovino demostrando que la lecitina de la bilis, al someterla a una alta temperatura generaba un compuesto químico al cual denominó 'colina' (Strecker, 1862).

La colina es un componente estructural de membranas celulares esencial para el neurotransmisor acetilcolina (Corbin y Zeisel, 2012), influye en diferentes procesos metabólicos, tales como metabolismo de lípidos (Zeisel, 2006), señalización a través de segundos mensajeros de lípidos (da Costa *et al.*, 1995), síntesis de acetilcolina, metabolismo de grupos metilo, participa en la biosíntesis de moléculas dependientes de metilación, incluyendo regulación epigenética y expresión génica (Niculescu *et al.*, 2004; 2006; Mehedint *et al.*, 2010), activación de receptores nucleares (Chakravarthy *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2011), circulación de bilis y colesterol (Dawson *et al.*, 2009), permeabilidad de la membrana plasmática y mitocondrial (Teodoro *et al.*, 2008; Caballero *et al.*, 2010).

Cuadro 1. Compuestos volátiles reportados en el polihierbal BioCholine

Autor	Compuestos volátiles
Mendoza <i>et al.</i> (2020)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Éter dietílico</li> <li>• 2-octenal</li> <li>• P-Cresol</li> <li>• 4-etilfenol</li> <li>• 4-vinilguayacol</li> <li>• Trans-2-undecenal</li> <li>• Trimetilamina</li> <li>• 1-propanol</li> <li>• Acetato de isopropilo</li> <li>• Beta pineno</li> <li>• Metilnonanodiona</li> <li>• P-menthadienhidroperóxido</li> <li>▪ 6-undecanol</li> <li>▪ 2-metil-2-octeno</li> <li>▪ 4H-Pyran-4-one</li> <li>▪ 2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metilo</li> <li>▪ 1-hexeno, 3,3,5-trimetil</li> <li>▪ Timol</li> <li>▪ Fenol, 4-metoxi-2,3,6-trimetil</li> <li>▪ 5-metil-1-nitro pirazol</li> <li>▪ 2,6,10-Dodecatrien-1-ol, 3,7,11-trimetil (E, E)</li> <li>▪ 2-naftalenometanol</li> </ul>
Roque-Jiménez <i>et al.</i> (2020)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Decahidro alfa 4a-trimetil-8-metileno -, [2R-(2.alpha., 4a.alpha., 8a.beta.)]</li> <li>▪ Ácido tetradecanoico</li> <li>▪ 2-pentadecanona, 6,10,14-trimetil</li> <li>▪ Ácido hexadecanoico</li> <li>▪ Éster metílico</li> <li>▪ Ácido n-hexadecanoico</li> <li>▪ Ácido 9,12-octadecadienoico</li> <li>▪ Ácido metil 8-octadecenoico</li> <li>▪ Ácido 9-octadecenoico (E)</li> <li>▪ Bíciclohexil-2,30-diona</li> <li>▪ 9,17-Octadecadienal (Z)</li> <li>▪ Cholest-4-en-3-one</li> </ul>

## **2.7 Metabolismo de colina**

La colina es un nutriente esencial requerido para un óptimo crecimiento y desarrollo de los animales la cual es transformada a nivel celular en distintos metabolitos, tales como fosfatidilcolina (PC), lisofosfatidilcolina (LPC) y esfingomiélinea (SM), los cuales son lípidos solubles (Zempleni *et al.*, 2013). Al ser oxidada a betaína, metila la homocisteína para la formación de metionina (Finkelstein, 2000), la cual es el precursor de la S-adenosilmetionina quien es el donante fisiológico del grupo metilo para la metilación de proteínas, ARN y ADN (Jeltsch, 2002; Zeisel, 2006). Entre las principales funciones de la colina están la síntesis de fosfolípidos y la oxidación para su uso como donador de grupos metilo. Un metabolito de la colina, la fosfatidilcolina (fosfolípido principal, aproximadamente el 70%), es la encargada del empaquetado y exportación de triglicéridos en lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) las cuales incluyen esfingomiélinea (11%), fosfatidilinositol (10%), fosfatidiletanolamina (4%) y liso-fosfatidilcolina (3%) (Noga y Vance, 2003) así como para la solubilización de sales biliares para su secreción (Li *et al.*, 2005). Es requerida para la síntesis de dipalmitoil-fosfatidilcolina el cual es el principal componente activo del surfactante pulmonar (Gutiérrez *et al.*, 2015), la PC también estimula la formación de IL-2 así como la expresión de CD25, CD28, CD71 en el bazo mejorando la respuesta inmune (Lewis *et al.*, 2015).

## **2.8 Función de colina en inmunidad y salud de la becerro**

La colina forma parte del factor activador de plaquetas (1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine), mejora la respuesta inmune (Prescott *et al.*, 2000), es un potente modificador epigenético (Niculescu *et al.*, 2006; Mehedint *et al.*, 2010), desempeñan un papel central en la fisiopatología de enfermedades metabólicas en la cual participa la leptina (Stöger, 2006) y el

PPAR-gamma (Fujiki *et al.*, 2009) los cuales se ha demostrado que son regulados epigenéticamente. En 1922, Frederick Banting demostró que la colina previene hígado graso en perros y ratas (Best y Huntsman, 1932; 1935), así mismo, se demostró que la inclusión de colina en dieta para pollos previene enfermedades de huesos como la perosis desarrollada durante el crecimiento de los pollos (Jukes, 1940). En ratas, se reportó que la deficiencia de colina fue asociada con cambios ateromatosos en las arterias de la aorta, carótida y coronaria (Hartroft *et al.*, 1952). En ratas jóvenes, la privación en la dieta de colina causó hemorragias en riñones (Griffith y Wade, 1939), así como intraoculares (Bellows y Chinn, 1943). Por otra parte, dietas deficientes en colina durante la gestación disminuyen las concentraciones de fosfocolina y fosfatidilcolina en el hipocampo de fetos de ratón (Craciunescu *et al.*, 2003). El déficit de colina aumenta la expresión en el cerebro fetal de marcadores y reguladores de la proliferación y diferenciación neural como TOAD-64 (marcador para la diferenciación neuronal), p27Kip1 (inhibidor de la cinasa dependiente de ciclina), TGFβ1 (factor de crecimiento) y calretinina (proteína de unión a calcio expresada en neuronas Gabaérgicas y un marcador para la diferenciación neuronal) (Albright *et al.*, 1998; 1999; 2001; 2003).

## **2.9 Mezclas herbales en producción de rumiantes**

El uso de aditivos herbales en producción animal han mostrado efectos positivos en determinadas variables productivas. Mendoza *et al.* (2020) emplearon un aditivo fitogénico en vacas Holstein a dosis de 15 g/d por un período de 90 días posteriores al parto reportando un aumento significativo del 3% en producción de leche, del mismo modo Cañada *et al.* (2018) emplearon un producto herbal a dosis de 0, 10 y 20 g/d en vacas Holstein, Jersey y cruza por 90 días reportando una respuesta lineal en producción de leche con un aumento del 5%. En un

estudio realizado por Gutiérrez *et al.* (2019) al emplear una mezcla herbal (17 g/d) en vacas lecheras reportaron efectos positivos al disminuir 8.3% los problemas de fertilidad durante la primera lactación, 4.8% en abortos, 3.4% y 5.4% de mastitis clínica y subclínica y 3.8% de problemas respiratorios. Crosby *et al.* (2017) al suplementar 4 g/d de una mezcla herbal 30 días antes y 30 días después del parto en ovejas reportaron incrementos en peso al nacimiento de los corderos, mayor producción de leche con un mayor contenido de ácido oleico. Rodríguez-Guerrero *et al.* (2018) al emplear 4 g/d de mezcla herbal en corderos en finalización observaron una alteración en la movilización de ácidos grasos no esterificados estimulando la síntesis de glucosa y de colesterol. Por su parte, Martínez-Aispuro *et al.* (2019) reportaron mejores ganancias diarias de peso, así como mayor eficiencia alimenticia en corderos en finalización.

- Aberoomand, A. P., Mottaghianpuor, Z., Sharifan, A., & Larijani, K. (2010). Studies on the effect of extraction method on chemical composition and antimicrobial activity of *Carum copticum* essential oil. *Journal of Food Technology and Nutrition*, 23:212-220.
- Adam, S. E. I., Al-Yahya, M. A., & Al-Farhan, A. H. (2001). Response of Najdi sheep to oral administration of *Citrullus colocynthis* fruits, *Nerium oleander* leaves or their mixture. *Small Ruminant Research*, 40(3), 239-244.
- Akhila, A., & Rani, K. (1999). Chemistry of the Neem tree (*Azadirachta indica* A. Juss.). *Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe/Progress in the chemistry of organic natural products*, 47-149.
- Akhtar, M. S., & Iqbal, J. (1991). Evaluation of the hypoglycaemic effect of *Achyranthes aspera* in normal and alloxan-diabetic rabbits. *Journal of Ethnopharmacology*, 31(1), 49-57.
- Albright, C. D., Tsai, A. Y., Mar, M. H., & Zeisel, S. H. (1998). Choline availability modulates the expression of TGF $\beta$ 1 and cytoskeletal proteins in the hippocampus of developing rat brain. *Neurochemical Research*, 23(5), 751-758.
- Albright, C. D., Friedrich, C. B., Brown, E. C., Mar, M. H., & Zeisel, S. H. (1999). Maternal dietary choline availability alters mitosis, apoptosis and the localization of TOAD-64 protein in the developing fetal rat septum. *Developmental Brain Research*, 115(2), 123-129.
- Albright, C. D., Mar, M. H., Friedrich, C. B., Brown, E. C., & Zeisel, S. H. (2001). Maternal choline availability alters the localization of p15Ink4B and p27Kip1 cyclin-dependent kinase inhibitors in the developing fetal rat brain hippocampus. *Developmental Neuroscience*, 23(2), 100-106.

- Albright, C. D., Siwek, D. F., Craciunescu, C. N., Mar, M. H., Kowall, N. W., Williams, C. L., & Zeisel, S. H. (2003). Choline availability during embryonic development alters the localization of calretinin in developing and aging mouse hippocampus. *Nutritional Neuroscience*, 6(2), 129-134.
- Ali, A. A., Alian, M. A., & Elmahi, H. A. (2013). Phytochemical analysis of some chemical metabolites of Colocynth plant (*Citrullus Colocynthis* L.) and its activities as antimicrobial and antiplasmodial. *Journal of Basic and Applied Scientific Research*, 3(5), 228-236.
- Aparecida Galerani Mossini, S., De Oliveira, K. P., & Kemmelmeier, C. (2004). Inhibition of patulin production by *Penicillium expansum* cultured with Neem (*Azadirachta indica*) leaf extracts. *Journal of Basic Microbiology*, 44(2), 106-113.
- Aziz, A., Rahman, M., Mondal, A. K., Muslim, T., Rahman, A., & Quader, A. (2005). 3-Acetoxy-6-benzoyloxyapagamide from *Achyranthes aspera*. *Dhaka University Journal of Pharmaceutical Sciences*, 4(2), 113-11.
- Bagchi, D. (2006). Nutraceuticals and functional foods regulations in the United States and around the world, *Toxicology*. 221 1–3.
- Baker, J. C., Werdin, R. E., Ames, T. R., Markham, R. J., & Larson, V. L. (1986). Study on the etiologic role of bovine respiratory syncytial virus in pneumonia of dairy calves. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 189(1), 66-70.
- Balbaa, S. I., Hilal, S. H., & Haggag, M. Y. (1973). The volatile oil from the herb and fruits of *Carum copticum* at different stages of growth. *Planta Medica*, 23(04), 312-320.
- Bampidis, V. A., Christodoulou, V., Florou-Paneri, P., & Christaki, E. (2006). Effect of dried oregano leaves versus neomycin in treating newborn calves with colibacillosis. *Journal of Veterinary Medicine Series*, 53(3), 154-156.

- Baral, R., & Chattopadhyay, U. (2004). Neem (*Azadirachta indica*) leaf mediated immune activation causes prophylactic growth inhibition of murine Ehrlich carcinoma and B16 melanoma. *International Immunopharmacology*, 4(3), 355-366.
- Bartels, C. J., Holzhauser, M., Jorritsma, R., Swart, W. A., & Lam, T. J. (2010). Prevalence, prediction and risk factors of enteropathogens in normal and non-normal faeces of young Dutch dairy calves. *Preventive Veterinary Medicine*, 93(2-3), 162-169.
- Barua, C. C., Begum, S. A., Talukdar, A., Pathak, D. C., Barua, A. G., Borah, P., & Lahkar, M. (2010a). Effect of *Achyranthes aspera* Linn on modified forced swimming in rats. *Pharmacologyonline*, 1, 183-91.
- Barua, C. C., Begum, S. A., Archana, T., Pathak, D. C., Sarma, D. K., & Bora, R. S. (2010b). Wound healing activity of methanolic extract of leaves of *Achyranthes aspera* Linn using *in vivo* and *in vitro* model-a preliminary study. *Indian Journal of Animal Sciences*, 80(10), 969-972.
- Barua, C. C., Talukdar, A., Begum, S. A., Lahon, L. C., Sarma, D. K., Pathak, D. C., & Borah, P. (2010c). Antinociceptive activity of methanolic extract of leaves of *Achyranthes aspera* Linn. (*Amaranthaceae*) in animal models of nociception. *Indian Journal of Experimental Biology*, 48, 817–821.
- Barua, C. C., Talukdar, A., Begum, S. A., Pathak, D. C., Sarma, D. K., Borah, R. S., & Gupta, A. (2012). *In vivo* wound-healing efficacy and antioxidant activity of *Achyranthes aspera* in experimental burns. *Pharmaceutical Biology*, 50(7), 892-899.
- Basilico, M. Z., & Basilico, J. C. (1999). Inhibitory effects of some spice essential oils on *Aspergillus ochraceus* NRRL 3174 growth and ochratoxin A production. *Letters in Applied Microbiology*, 29(4), 238-241.



- Bellows, J. G., & Chinn, H. (1943). Intraocular hemorrhages in choline deficiency. *Archives of Ophthalmology*, 30(1), 105-109.
- Benschop, D. L., & Cant, J. P. (2009). Developmental changes in clearance of intravenous doses of glucose, acetate and  $\beta$ -hydroxybutyrate from plasma of calves. *Livestock Science*, 122(2-3), 177-185.
- Bergman, E. N. (1990). Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiological Reviews*, 70(2), 567-590.
- Best, C. H., & Huntsman, M. E. (1932). The effects of the components of lecithine upon deposition of fat in the liver. *The Journal of Physiology*, 75(4), 405-412.
- Best, C. H., & Huntsman, M. E. (1935). The effect of choline on the liver fat of rats in various states of nutrition. *The Journal of Physiology*, 83(3), 255-274.
- Bhatt, N., Singh, M., & Ali, A. (2009). Effect of feeding herbal preparations on milk yield and rumen parameters in lactating crossbred cows. *International Journal of Agriculture and Biology*, 11(6), 721-726.
- Bhom, K. H., Liersch, R., Haensel, R., Keller, K., & Rimpler, H. S. (1992). *G, Hagers Handbchder Pharmazeutischen Praxis Springer Verlag. Berlin*, 5, 54-59.
- Bombik, T., Bombik, E., Frankowska, A., Trawińska, B., & Saba, L. (2012). Effect of herbal extracts on some haematological parameters of calves during rearing. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 56(4), 655-658.
- Borthakur, S. K., & Goswami, N. (1995). Herbal remedies from Dimoria of Kamrup district of Assam in northeastern India. *Fitoterapia (Milano)*, 66(4), 333-340.
- Broudiscou, L. P., Papon, Y., & Broudiscou, A. F. (2000). Effects of dry plant extracts on fermentation and methanogenesis in continuous culture of rumen microbes. *Animal Feed Science and Technology*, 87(3-4), 263-277.

- Buening, M. K., Chang, R. L., Huang, M. T., Fortner, J. G., Wood, A. W., & Conney, A. H. (1981). Activation and inhibition of benzo (a) pyrene and aflatoxin B1 metabolism in human liver microsomes by naturally occurring flavonoids. *Cancer Research*, 41(1), 67-72.
- Caballero, F., Fernández, A., Matías, N., Martínez, L., Fucho, R., Elena, M., & García-Ruiz, C. (2010). Specific contribution of methionine and choline in nutritional nonalcoholic steatohepatitis impact on mitochondrial S-adenosyl-L-methionine and glutathione. *Journal of Biological Chemistry*, 285(24), 18528-18536.
- Callan, R. J., & Garry, F. B. (2002). Biosecurity and bovine respiratory disease. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, 18(1), 57.
- Calsamiglia, S., Busquet, M., Cardozo, P. W., Castillejos, L., & Ferret, A. (2007). Invited review: essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *Journal of Dairy Science*, 90(6), 2580-2595.
- Cañada, L. M. G., E. Meraz, G. D. Mendoza, B. V. Villagrán & M. D. A. Castillo. (2018). Efecto del nivel de colina herbal en la producción y composición de leche en ganado lechero en pastoreo. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*. 26(Suppl 1): 82.
- Chakraborty, A., Brantner, A., Mukainaka, T., Nobukuni, Y., Kuchide, M., Konoshima, T., & Nishino, H. (2002). Cancer chemopreventive activity of *Achyranthes aspera* leaves on Epstein–Barr virus activation and two-stage mouse skin carcinogenesis. *Cancer Letters*, 177(1), 1-5.
- Chakravarthy, M. V., Lodhi, I. J., Yin, L., Malapaka, R. R., Xu, H. E., Turk, J., & Semenkovich, C. F. (2009). Identification of a physiologically relevant endogenous ligand for PPAR $\alpha$  in liver. *Cell*, 138(3), 476-488.

- Chander, R., Srivastava, V., Tandon And, J. S., & Kapoor, N. K. (1995). Antihepatotoxic activity of diterpenes of *Andrographis paniculata* (Kal-Megh) against Plasmodium berghei-induced hepatic damage in *Mastomys natalensis*. *International Journal of Pharmacognosy*, 33(2), 135-138.
- Chattopadhyay, R. R. (1998). Possible biochemical mode of anti-inflammatory action of *Azadirachta indica* A. Juss. in rats. *Indian Journal of Experimental Biology*, 36(4), 418-420.
- Chaucheyras-Durand, F., & Ossa, F. (2014). Review: the rumen microbiome: composition, abundance, diversity, and new investigative tools. *Professional Animal Scientist*, 30: 1–12.
- Chester-Jones, H., Steiner, T., Watkins, M., Taylor, D., Ziegler, D., Raeth-Knight, M., & Golombeski, G. (2010). Pre-and post-weaning performance and health of calves fed milk replacers and calf starters with or without essential oils. *Journal of Dairy Science*, 93, 421-421.
- Chopra, I. C., Gupta, K. C., & Nazir, B. N. (1952). Preliminary study of anti-bacterial substances from *Melia azidirachta*. *The Indian Journal of Medical Research*, 40(4), 511-515.
- Choudhury, S., Ahmed, R., Kanjilal, P. B., & Leclercq, P. A. (1998). Composition of the seed oil of *Trachyspermum ammi* (L.) Sprague from Northeast India. *Journal of Essential Oil Research*, 10(5), 588-590.
- Corbin, K. D., & Zeisel, S. H. (2012). Choline metabolism provides novel insights into non-alcoholic fatty liver disease and its progression. *Current Opinion in Gastroenterology*, 28(2), 159.

- Craciunescu, C. N., Albright, C. D., Mar, M. H., Song, J., & Zeisel, S. H. (2003). Choline availability during embryonic development alters progenitor cell mitosis in developing mouse hippocampus. *The Journal of Nutrition*, 133(11), 3614-3618.
- Crosby, M., Mendoza-Martinez, G. D., Relling, A., Vazquez, V. A., Lee-Rangel, H. A., Martinez, J. A., & Oviedo, M. (2017). Influence of supplemental choline on milk yield, fatty acid profile, and postpartum weight changes in suckling ewes. *Journal of Dairy Science*, 100(Suppl 2), 125.
- da Costa, K. A., Garner, S. C., Chang, J., & Zeisel, S. H. (1995). Effects of prolonged (1 year) choline deficiency and subsequent re-feeding of choline on 1, 2-sn-diradylglycerol, fatty acids and protein kinase C in rat liver. *Carcinogenesis*, 16(2), 327-334.
- Dasgupta, T., Banerjee, S., Yadava, P. K., & Rao, A. R. (2004). Chemopreventive potential of *Azadirachta indica* (Neem) leaf extract in murine carcinogenesis model systems. *Journal of Ethnopharmacology*, 92(1), 23-36.
- Dashti-Rahmatabadi, M. H., Hejazian, S. H., Morshedi, A., & Rafati, A. (2007). The analgesic effect of *Carum copticum* extract and morphine on phasic pain in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 109(2), 226-228.
- Dawson, P. A., Lan, T., & Rao, A. (2009). Bile acid transporters. *Journal of Lipid Research*, 50(12), 2340-2357.
- Delazar, A., Gibbons, S., Kosari, A. R., Nazemiyeh, H., Modarresi, M., Nahar, L., & Sarker, S. D. (2006). Flavone C-glycosides and cucurbitacin glycosides from *Citrullus colocynthis*. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 14(3), 109-114.
- DerMarderosian, A., & Beutler, J. A. (2002). The review of natural products: the most complete source of natural product information (No. Ed. 3). Facts and Comparisons.

- Donovan, G. A., Dohoo, I. R., Montgomery, D. M., & Bennett, F. L. (1998). Calf and disease factors affecting growth in female Holstein calves in Florida, USA. *Preventive Veterinary Medicine*, 33(1-4), 1-10.
- Drackley, J. K. (2008). Calf nutrition from birth to breeding. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 24(1), 55-86.
- Dwivedi, S., Dubey, R., & Mehta, K. (2008). *Achyranthes aspera* Linn. (Chirchira): a magic herb in folk medicine. *Ethnobotanical Leaflets*. (1), 89.
- Esatbeyoglu, T., Ulbrich, K., Rehberg, C., Rohn, S., & Rimbach, G. (2015). Thermal stability, antioxidant, and anti-inflammatory activity of curcumin and its degradation product 4-vinyl guaiacol. *Food & Function*, 6(3), 887-893.
- Escoto, F. C., Cortés, H. S., & Macías, A. A. (2001). Gestión de la calidad y desarrollo desigual en la cadena de lácteos en Los Altos de Jalisco. *Problemas del desarrollo*, 163-187.
- Espín, J. C., García-Conesa, M. T., & Tomás-Barberán, F. A. (2007). Nutraceuticals: facts and fiction. *Phytochemistry*, 68(22-24), 2986-3008.
- Evans, J. D., & Martin, S. A. (2000). Effects of thymol on ruminal microorganisms. *Current Microbiology*, 41(5), 336-340.
- Faubert, G. M., & Litvinsky, Y. (2000). Natural transmission of *Cryptosporidium parvum* between dams and calves on a dairy farm. *Journal of Parasitology*, 86(3), 495-500.
- Finkelstein, J. D. (2000). Pathways and regulation of homocysteine metabolism in mammals. In *Seminars in thrombosis and hemostasis*, 26(3), 219–226.
- Frankič, T., Voljč, M., Salobir, J., & Rezar, V. (2009). Use of herbs and spices and their extracts in animal nutrition. *Acta Agriculturae Slovenica*, 94(2), 95-102.

- Fujiki, K., Kano, F., Shiota, K., & Murata, M. (2009). Expression of the peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$  gene is repressed by DNA methylation in visceral adipose tissue of mouse models of diabetes. *BMC Biology*, 7(1), 1-14.
- Galfi, P., Neogrady, S., & Sakata, T. (1991). Effects of volatile fatty acids on the epithelial cell proliferation of the digestive tract and its hormonal mediation. In *Physiological Aspects of Digestion and Metabolism in Ruminants*, (pp. 49-59). Academic Press.
- García-Martínez, A., Albarrán-Portillo, B., & Avilés-Nova, F. (2015). Dinámicas y tendencias de la ganadería doble propósito en el sur del Estado de México. *Agrociencia*, 49(2), 125-139.
- Garg, S. K., Sharma, N. D., & Gupta, S. R. (1980). Phenolic glucoside from the seeds of *Carum copticum*. *Phytochemistry*, 9(10):2215–2216
- Gilani, G. R., Mahmood, Z., & Hussain, M. (2013). Preliminary evaluation of antimicrobial activity of cream formulated with essential oil of *Trachyspermum ammi*. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 26(5), 893-896.
- Girach, R. D., & Khan, S. A. (1992). Ethnomedicinal uses of *Achyranthes aspera* L. in Orissa (India). *International Journal of Pharmacognosy*, 30(2), 113-115.
- Gobley, T. (1850). Recherches chimiques sur les oeufs de carpe. *Journal de Pharmacie et de Chimie Paris*, 17: 401.
- Godden, S. (2008). Colostrum management for dairy calves. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 24(1), 19-39.
- Gogati, S. S., & Marathe, A. D. (1989). Anti-viral effect of Neem leaf (*Azadirachta indica*) extracts on chinkungunya and measles viruses.

- González, A. G., Barrera, J. B., Diaz, J. G., López, L. A., & De Paz, P. P. (1988). Distribution of secondary metabolites in two subspecies of *Todaroa aurea*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 16(7-8), 641-645.
- Goudarzi, G. R., Saharkhiz, M. J., Sattari, M., & Zomorodian, K. (2011). Antibacterial activity and chemical composition of Ajowan (*Carum copticum* Benth. & Hook) essential oil. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 13(2), 203-208.
- Griffith, W. H., & Wade, N. J. (1939). Choline metabolism. 1. The occurrence and prevention of hemorrhagic degeneration in young rats on a low choline diet. *Journal of Biological Chemistry*, 131, 567-577.
- Gurudeeban, S., Satyavani, K., & Ramanathan, T. (2010). Bitter apple (*Citrullus colocynthis*): An overview of chemical composition and biomedical potentials. *Asian Journal of Plant Sciences*, 9(7), 394-401.
- Gurudeeban, S., Ramanathan, T., & Satyavani, K. (2011). Characterization of volatile compounds from bitter apple (*Citrullus colocynthis*) using GC-MS. *International Journal of Chemical and Analytical Science*, 2, 108-110.
- Gutiérrez, D. B., Fahlman, A., Gardner, M., Kleinhenz, D., Piscitelli, M., Raverty, S., & Zimba, P. V. (2015). Phosphatidylcholine composition of pulmonary surfactant from terrestrial and marine diving mammals. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 211, 29-36.
- Gutiérrez, A., Gutiérrez, A., Sánchez, C., & Mendoza, G. D. (2019). Effect of including herbal choline in the diet of a dairy herd; a multiyear evaluation. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 477-481.
- Hartroft, W. S., Ridout, J. H., Sellers, E. A., & Best, C. H. (1952). Atheromatous changes in aorta, carotid and coronary arteries of choline-deficient rats. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 81(2), 384-393.

- Hernández, F., Madrid, J., Garcia, V., Orengo, J., & Megias, M. D. (2004). Influence of two plant extracts on broilers performance, digestibility, and digestive organ size. *Poultry Science*, 83(2), 169-174.
- Hill, T. M., Aldrich, J. M., Schlotterbeck, R. L., & Bateman II, H. G. (2007). Apex plant botanicals for neonatal calf milk replacers and starters. *The Professional Animal Scientist*, 23(5), 521-526.
- Hossain, M. A., Shah, M. D., & Sakari, M. (2011). Gas chromatography–mass spectrometry analysis of various organic extracts of *Merremia borneensis* from Sabah. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 4(8), 637-641.
- Hossain, M. A., Al-Toubi, W. A., Weli, A. M., Al-Riyami, Q. A., & Al-Sabahi, J. N. (2013). Identification and characterization of chemical compounds in different crude extracts from leaves of *Omani Neem*. *Journal of Taibah University for Science*, 7(4), 181-188.
- Hötzel, M. J., Longo, C., Balcao, L. F., Cardoso, C. S., & Costa, J. H. (2014). A survey of management practices that influence performance and welfare of dairy calves reared in southern Brazil. *PLoS One*, 9(12), e114995.
- Howes, M. J. R. (2018). Phytochemicals as anti-inflammatory nutraceuticals and phytopharmaceuticals. In *Immunity and Inflammation in Health and Disease* (pp. 363-388). Academic Press.
- Hussain, A. I., Rathore, H. A., Sattar, M. Z., Chatha, S. A., ud din Ahmad, F., Ahmad, A., & Johns, E. J. (2013). Phenolic profile and antioxidant activity of various extracts from *Citrullus colocynthis* (L.) from the Pakistani flora. *Industrial Crops and Products*, 45, 416-422.
- Ishikawa, T., Segal, Y., & Kitajima, J. (2001). Water-soluble constituents of ajowan. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 49(7), 840-844.



- Jami, E., Israel, A., Kotser, A., & Mizrahi, I. (2013). Exploring the bovine rumen bacterial community from birth to adulthood. *The ISME Journal*, 7(6), 1069-1079.
- Jeltsch, A. (2002). Beyond Watson and Crick: DNA methylation and molecular enzymology of DNA methyltransferases. *ChemBiochem*, 3(4), 274-293.
- Jukes, T. H. (1940). Prevention of perosis by choline. *Journal of Biological Chemistry*, 134, 789-790.
- Kalhor, M. A., Afza, N., Saleem, M., & Malik, A. (2002). Pharmacochemical studies of the oil, aerial parts, pulp and peel of *Citrullus colocynthis*. *Journal of the Chemical Society of Pakistan*, 24(4), 274-276.
- Kartik, R., Rao, C. V., Trivedi, S. P., Pushpangadan, P., & Reddy, G. D. (2010). Amelioration effects against N-nitrosodiethylamine and CCl<sub>4</sub>-induced hepatocarcinogenesis in Swiss albino rats by whole plant extract of *Achyranthes aspera*. *Indian Journal of Pharmacology*, 42(6), 370-375.
- Khan, M., Wassilew, S. W., Schmutterer, H., & Ascher, K. R. (1987). Natural pesticides from the Neem tree and other tropical plants. *GTZ, Eschborn, Germany*, 645-650.
- Kokate, C. K., Purohit, A. P., & Gokhale, S. B. (2005). *Pharmacognosy*, Nirali Prakashan. Page no, 6-19.
- Kunert, O., Haslinger, E., Schmid, M. G., Reiner, J., Bucar, F., Mulatu, E., & Debella, A. (2000). Three saponins, a steroid, and a flavanol glycoside from *Achyranthes aspera*. *Monatshefte für Chemie/Chemical Monthly*, 131(2), 195-204.
- Lago, A., McGuirk, S. M., Bennett, T. B., Cook, N. B., & Nordlund, K. V. (2006). Calf respiratory disease and pen microenvironments in naturally ventilated calf barns in winter. *Journal of Dairy Science*, 89(10), 4014-4025.

- Lanz Uhde, F., Kaufmann, T., Sager, H., Albini, S., Zanoni, R., Schelling, E., & Meylan, M. (2008). Prevalence of four enteropathogens in the faeces of young diarrhoeic dairy calves in Switzerland. *Veterinary Record*, 163(12), 362-366.
- Latha, B. P., Reddy, R. M., Ismail, S. M., & Vijaya, T. (2010). Medicinal plants and their derivatives as potential source in treatment of obesity. *Asian Journal of Experimental Biological Sciences*, 1(4), 719-727.
- Lee, K. W., Everts, H., Kappert, H. J., Wouterse, H., Frehner, M., & Beynen, A. C. (2004). Cinnamaldehyde, but not thymol, counteracts the carboxymethyl cellulose-induced growth depression in female broiler chickens. *International Journal of Poultry Science*, 3(9), 608-612.
- Lee, J. M., Lee, Y. K., Mamrosh, J. L., Busby, S. A., Griffin, P. R., Pathak, M. C., & Moore, D. D. (2011). A nuclear-receptor-dependent phosphatidylcholine pathway with antidiabetic effects. *Nature*, 474(7352), 506-510.
- Lewis, E. D., Richard, C., Goruk, S., Dellschaft, N. S., Curtis, J. M., Jacobs, R. L., & Field, C. J. (2015). The form of choline in the maternal diet affects immune development in suckled rat offspring. *The Journal of Nutrition*, 146(4), 823-830.
- Li, Z., Agellon, L. B., & Vance, D. E. (2005). Phosphatidylcholine homeostasis and liver failure. *Journal of Biological Chemistry*, 280(45), 37798-37802.
- Liu, J. H., Bian, G. R., Zhu, W. Y., & Mao, S. Y. (2015). High-grain feeding causes strong shifts in ruminal epithelial bacterial community and expression of Toll-like receptor genes in goats. *Frontiers in Microbiology*, 6, 167.
- Loera, J., & Banda, J. (2017). Industria lechera en México: parámetros de la producción de leche y abasto del mercado interno. *Revista de investigaciones altoandinas*, 19(4), 419-426.

- Lundborg, G. K., Oltenacu, P. A., Maizon, D. O., Svensson, E. C., & Liberg, P. G. A. (2003). Dam-related effects on heart girth at birth, morbidity and growth rate from birth to 90 days of age in Swedish dairy calves. *Preventive Veterinary Medicine*, 60(2), 175-190.
- Lundborg, G. K., Svensson, E. C., & Oltenacu, P. A. (2005). Herd-level risk factors for infectious diseases in Swedish dairy calves aged 0–90 days. *Preventive Veterinary Medicine*, 68(2-4), 123-143.
- Macheboeuf, D., Morgavi, D. P., Papon, Y., Mousset, J. L., & Arturo-Schaan, M. (2008). Dose–response effects of essential oils on *in vitro* fermentation activity of the rumen microbial population. *Animal Feed Science and Technology*, 145(1-4), 335-350.
- Mahboubi, M., & Kazempour, N. (2011). Chemical composition and antimicrobial activity of *Satureja hortensis* and *Trachyspermum copticum* essential oil. *Iranian Journal of Microbiology*, 3(4), 194.
- Makita, H., Tanaka, T., Fujitsuka, H., Tatematsu, N., Satoh, K., Hara, A., & Mori, H. (1996). Chemoprevention of 4-nitroquinoline 1-oxide-induced rat oral carcinogenesis by the dietary flavonoids chalcone, 2-hydroxychalcone, and quercetin. *Cancer Research*, 56(21), 4904-4909.
- Marcé, C., Guatteo, R., Bareille, N., & Fourichon, C. (2010). Dairy calf housing systems across Europe and risk for calf infectious diseases. *Animal*, 4(9), 1588-1596.
- Martínez-Aispuro, J. A., Mendoza, G. D., Cordero-Mora, J. L., Ayala-Monter, M. A., Sánchez-Torres, M. T., Figueroa-Velasco, J. L., Vázquez-Silva, G., & Gloria-Trujillo, A. (2019). Evaluation of an herbal choline feed plant additive in lamb feedlot rations. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 48, e20190020.

- Marzouk, B., Marzouk, Z., Haloui, E., Fenina, N., Bouraoui, A., & Aouni, M. (2010a). Screening of analgesic and anti-inflammatory activities of *Citrullus colocynthis* from southern Tunisia. *Journal of Ethnopharmacology*, 128(1), 15-19.
- Marzouk, Z., Marzouk, B., Mahjoub, M. A., Haloui, E., Mighri, Z., Aouni, M., & Fenina, N. (2010b). Screening of the antioxidant and the free radical scavenging potential of Tunisian *Citrullus colocynthis* Schrad. from Mednine. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 8(2), 261-265.
- Maunsell, F., & Donovan, G. A. (2008). Biosecurity and risk management for dairy replacements. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 24(1), 155-190.
- McGuirk, S. M. (2008). Disease management of dairy calves and heifers. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 24(1), 139-153.
- Medrano-Galarza, C., LeBlanc, S. J., Jones-Bitton, A., DeVries, T. J., Rushen, J., de Passillé, A. M., & Haley, D. B. (2017). Producer perceptions of manual and automated milk feeding systems for dairy calves in Canada. *Canadian Journal of Animal Science*, 98(2), 250-259.
- Mehedint, M. G., Niculescu, M. D., Craciunescu, C. N., & Zeisel, S. H. (2010). Choline deficiency alters global histone methylation and epigenetic marking at the Rel site of the calbindin 1 gene. *The FASEB Journal*, 24(1), 184-195.
- Mendoza, G. D., Oviedo, M. F., Pinos, J. M., Lee-Rangel, H. A., Vázquez, A., Flores, R., & Cifuentes, O. (2020). Milk production in dairy cows supplemented with herbal choline and methionine. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias UNCuyo*, 52(1), 332-343.
- Merchant, C., McNeill, J. R., & Krech III, S. (2004). *Encyclopedia of world environmental history*. Routledge.

- Misra, T. N., Singh, S., Pandey, H. S., & Prasad, C. (1996). Isolation and characterization of two new compounds from *Achyranthes aspera* Linn. *Indian Journal of Chemistry*, 35(6), 637-639.
- Moazeni, M., Saharkhiz, M. J., & Hosseini, A. A. (2012). *In vitro* lethal effect of ajowan (*Trachyspermum ammi* L.) essential oil on hydatid cyst protoscoleces. *Veterinary Parasitology*, 187(1-2), 203-208.
- Moura-Letts, G., Villegas, L. F., Marçalo, A., Vaisberg, A. J., & Hammond, G. B. (2006). *In vivo* wound-healing activity of oleanolic acid derived from the acid hydrolysis of *Anredera diffusa*. *Journal of Natural Products*, 69(6), 978-979.
- Muanda, F., Koné, D., Dicko, A., Soulimani, R., & Younos, C. (2011). Phytochemical composition and antioxidant capacity of three malian medicinal plant parts. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011.
- Naidoo, V., McGaw, L. J., Bisschop, S. P. R., Duncan, N., & Eloff, J. N. (2008). The value of plant extracts with antioxidant activity in attenuating coccidiosis in broiler chickens. *Veterinary Parasitology*, 153(3-4), 214-219.
- Natanzian Ghahfarkhi, M., Sattari, M., Yadegari, M. H., Goudarzi, G. R., & Saharkhiz, M. J. (2008). Antifungal activity of essential oil and alcoholic extract of *Carum copticum* against fluconazole-resistant and susceptible *Candida albicans* isolated. *Pathobiology Research*, 11, 91-98.
- Nehete, J. Y., Deshmukh, V. N., Shewale, V. V., Narkhede, M. R., & Aurangabadkar, V. M. (2009). *In vitro* antioxidant activity of *Achyranthes aspera* L. *Journal of Pharmacy Research*, 2(9), 1402–1403.
- Neogi, N. C., Garg, R. D., & Rathor, R. S. (1970). Preliminary pharmacological studies on achyranthine. *Indian Journal of Pharmacy*, 32(2), 43-46.

- Nevas, M., Korhonen, A. R., Lindström, M., Turkki, P., & Korkeala, H. (2004). Antibacterial efficiency of Finnish spice essential oils against pathogenic and spoilage bacteria. *Journal of Food Protection*, 67(1), 199-202.
- Nickavar, B., Adeli, A., & Nickavar, A. (2014). TLC-bioautography and GC-MS analyses for detection and identification of antioxidant constituents of *Trachyspermum copticum* essential oil. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 13(1), 127.
- Niculescu, M. D., Yamamuro, Y., & Zeisel, S. H. (2004). Choline availability modulates human neuroblastoma cell proliferation and alters the methylation of the promoter region of the cyclin-dependent kinase inhibitor 3 gene. *Journal of Neurochemistry*, 89(5), 1252-1259.
- Niculescu, M. D., Craciunescu, C. N., & Zeisel, S. H. (2006). Dietary choline deficiency alters global and gene-specific DNA methylation in the developing hippocampus of mouse fetal brains. *The FASEB Journal*, 20(1), 43-49.
- Noga, A. A., & Vance, D. E. (2003). A gender-specific role for phosphatidylethanolamine N-methyltransferase-derived phosphatidylcholine in the regulation of plasma high density and very low density lipoproteins in mice. *Journal of Biological Chemistry*, 278(24), 21851-21859.
- Okpanyi, S. N., & Ezeukwu, G. C. (1981). Anti-inflammatory and antipyretic activities of *Azadirachta indica*. *Planta Medica*, 41(01), 34-39.
- Ollivett, T. L., Nydam, D. V., Linden, T. C., Bowman, D. D., & Van Amburgh, M. E. (2012). Effect of nutritional plane on health and performance in dairy calves after experimental infection with *Cryptosporidium parvum*. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 241(11), 1514-1520.

- Overton, M. W., Corbett, R. B., Boomer, W. G., & Solutions-Dairy, E. K. (2013). An economic comparison of conventional vs. intensive heifer rearing. In Western Dairy Management Conference, Reno (pp. 122-129).
- Pacheco, L. F., Ávila, A. R. A., Ortega, A. E., Vera, E. S., & Jordán, C. M. A. (2014). Sustentabilidad de la producción de leche en pequeña escala y su contribución al desarrollo rural. Contribución de la producción animal en pequeña escala al desarrollo rural, 57-73.
- Parichatikanond, W., Suthisisang, C., Dhepakson, P., & Herunsalee, A. (2010). Study of anti-inflammatory activities of the pure compounds from *Andrographis paniculata* (burm. f.) Nees and their effects on gene expression. *International Immunopharmacology*, 10(11), 1361-1373.
- Parida, M. M., Upadhyay, C., Pandya, G., & Jana, A. M. (2002). Inhibitory potential of Neem (*Azadirachta indica* Juss) leaves on dengue virus type-2 replication. *Journal of Ethnopharmacology*, 79(2), 273-278.
- Park, I. K., Kim, J., Lee, S. G., & Shin, S. C. (2007). Nematicidal activity of plant essential oils and components from ajowan (*Trachyspermum ammi*), allspice (*Pimenta dioica*) and litsea (*Litsea cubeba*) essential oils against pine wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*). *Journal of Nematology*, 39(3), 275.
- Paul, S., Dubey, R. C., Maheswari, D. K., & Kang, S. C. (2011). *Trachyspermum ammi* (L.) fruit essential oil influencing on membrane permeability and surface characteristics in inhibiting food-borne pathogens. *Food Control*, 22(5), 725-731.
- Prescott, S. M., Zimmerman, G. A., Stafforini, D. M., & McIntyre, T. M. (2000). Platelet-activating factor and related lipid mediators. *Annual Review of Biochemistry*, 69(1), 419-445.

- Puri, A., Saxena, R., Saxena, R. P., Saxena, K. C., Srivastava, V., & Tandon, J. S. (1993). Immunostimulant agents from *Andrographis paniculata*. *Journal of Natural Products*, 56(7), 995-999.
- Qureshi, A. A., & Kumar, K. E. (2010). Phytochemical constituents and pharmacological activities of *Trachyspermum ammi*. *Plant Archives*, 10(2), 955-959.
- Qureshi, R., Bhatti, G. R., & Memon, R. A. (2010). Ethnomedicinal uses of herbs from northern part of Nara desert, Pakistan. *Pakistan Journal of Botany*, 42(2), 839-851.
- Ranjan, B., Manmohan, S., Singh, S. R., & Singh, R. B. (2011). Medicinal uses of *Trachyspermum ammi*: a review. *The Pharma Research*, 5(2), 247-258.
- Rao, A. R., Sukumar, S., Paramasivam, T. V., Kamalakshi, S., Parashuraman, A. R., & Shantha, M. (1969). Study of antiviral activity of tender leaves of Margosa tree (*Melia azadiricta*) on vaccinia and variola virus: a preliminary report. *Indian Journal of Medical Research*, 57(3), 495-502.
- Rao, Y. K., Vimalamma, G., Rao, C. V., & Tzeng, Y. M. (2004). Flavonoids and andrographolides from *Andrographis paniculata*. *Phytochemistry*, 65(16), 2317-2321.
- Rasooli, I., Fakoor, M. H., Yadegarinia, D., Gachkar, L., Allameh, A., & Rezaei, M. B. (2008). Antimycotoxigenic characteristics of *Rosmarinus officinalis* and *Trachyspermum copticum* L. essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, 122(1-2), 135-139.
- Ray, A., Banerjee, B. D., & Sen, P. (1996). Modulation of humoral and cell-mediated immune responses by *Azadirachta indica* (Neem) in mice. *Indian Journal of Experimental Biology*, 34(7), 698-701.



- Reddy, M. K., Reddy, M. V., Gunasekar, D., Murthy, M. M., Caux, C., & Bodo, B. (2003). A flavone and an unusual 23-carbon terpenoid from *Andrographis paniculata*. *Phytochemistry*, 62(8), 1271-1275.
- Rey, M., Enjalbert, F., Combes, S., Cauquil, L., Bouchez, O., & Monteils, V. (2014). Establishment of ruminal bacterial community in dairy calves from birth to weaning is sequential. *Journal of Applied Microbiology*, 116(2), 245-257.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(7), 933-956.
- Rodríguez-Guerrero, V., Lizarazo, A. C., Ferraro, S., Miranda, L. A., Mendoza, G. D., & Suárez, N. (2018). Effect of herbal choline and rumen-protected methionine on lamb performance and blood metabolites. *South African Journal of Animal Science*, 48(3), 427-434.
- Roque-Jiménez, J. A., Mendoza-Martínez, G. D., Vázquez-Valladolid, A., Guerrero-González, M. D. L. L., Flores-Ramírez, R., Pinos-Rodríguez, J. M., & Lee-Rangel, H. A. (2020). Supplemental herbal choline increases 5-hmC DNA on whole blood from pregnant ewes and offspring. *Animals*, 10(8), 1277.
- Rosadiuk, J. P., Bruinjé, T. C., Moslemipur, F., Fischer-Tlustos, A. J., Renaud, D. L., Ambrose, D. J., & Steele, M. A. (2021). Differing planes of pre-and postweaning phase nutrition in Holstein heifers: I. Effects on feed intake, growth efficiency, and metabolic and development indicators. *Journal of Dairy Science*, 104(1), 1136-1152.
- Ruíz, F. A., Sagarnaga, V. M. L., Salas, G. J. M., Mariscal, A. V., Estrella, Q. H., González, A. M., & Juárez, Z. A. (2004). Impacto del TLCAN en la cadena de valor de bovinos para carne. *Universidad Autónoma Chapingo, Enero, México*, 39.

- Sadou, H., Sabo, H., Alma, M. M., Saadou, M., & Leger, C. L. (2007). Chemical content of the seeds and physico-chemical characteristic of the seed oils from *Citrullus colocynthis*, *Coccinia grandis*, *Cucumis metuliferus* and *Cucumis prophetarum* of Niger. *Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia*, 21(3), 323-330.
- Santin, M., Trout, J. M., Xiao, L., Zhou, L., Greiner, E., & Fayer, R. (2004). Prevalence and age-related variation of *Cryptosporidium* species and genotypes in dairy calves. *Veterinary Parasitology*, 122(2), 103-117.
- Satyavati, G. V., Raina, M. K., & Sharma, M. (1976). Medicinal plants of India ICMR. New Delhi, 1, 278-281.
- Sayed, M. D., Balbaa, S. I., & Afifi, M. S. A. (1973). Nitrogenous bases of the different organs of *Citrullus colocynthis*. *Planta Medica*, 24(07), 260-265.
- Sebbagh, N., Cruciani-Guglielmacci, C., Ouali, F., Berthault, M. F., Rouch, C., Sari, D. C., & Magnan, C. (2009). Comparative effects of *Citrullus colocynthis*, sunflower and olive oil-enriched diet in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Diabetes & Metabolism*, 35(3), 178-184.
- Seshadri, V., Batta, A. K., & Rangaswami, S. (1981). Structure of 2 new saponins from *Achyranthes-aspera*. *Indian Journal of Chemistry*, 20(9), 773-775.
- Sharma, S. K. (1998). Medicinal Plants Used in Ayurveda National Academy of Ayurveda. Ministry of Health and Family Welfare, Govt. of India, New Delhi, India.
- Sharma, S. K., Vasudeva, N., & Ali, M. (2009). A new aliphatic acid from *Achyranthes aspera* Linn. roots. *Indian Journal of Chemistry*, B 48, 1164–1169.
- Sharma, A., Singh, S., & Nag, T. N. (2010). Antibacterial activity of *Citrullus colocynthis* and *Tribulus terrestris* against some pathogenic bacteria. *Asian Journal of Microbiology and Biotechnology and Environmental Sciences*, 12, 633-637.

- Shojaaddini, M., Moharramipour, S., & Sahaf, B. (2008). Fumigant toxicity of essential oil from *Carum copticum* against Indian meal moth, *Plodia interpunctella*. *Journal of Plant Protection Research*, 48(4), 411–419.
- Sivula, N. J., Ames, T. R., Marsh, W. E., & Werdin, R. E. (1996). Descriptive epidemiology of morbidity and mortality in Minnesota dairy heifer calves. *Preventive Veterinary Medicine*, 27(3-4), 155-171.
- Sonar, P. K., Singh, R., & Saraf, S. K. (2016). Phytochemical, chromatographic and spectroscopic investigation of *Carum copticum* seeds and their potential as immunomodulatory agents. *Pharmaceutical Biology*, 54(3), 494-502.
- Soto, S. C., & Reinoso, O. V. (2008). Suplementación del ganado carne en situaciones de sequía. *Revista de la Sociedad de Criadores de Braford y Cebú del Uruguay*, 15, 18-26.
- Stef, L., Dumitrescu, G., Drinceanu, D., Stef, D., Mot, D., Julean, C., & Corcionivoschi, N. (2009). The effect of medicinal plants and plant extracted oils on broiler duodenum morphology and immunological profile. *Romanian Biotechnological Letters*, 14(4), 4606-4614.
- Stöger, R. (2006). *In vivo* methylation patterns of the leptin promoter in human and mouse. *Epigenetics*, 1(4), 155-162.
- Strecker, A. (1862). Ueber einige neue Bestandtheile der Schweinegalle. *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, 123(3), 353-360.
- Stull, C., & Reynolds, J. (2008). Calf welfare. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 24(1), 191-203.
- Sturm, S., & Stuppner, H. (2000). Analysis of Cucurbitacins in medicinal plant by high-pressure liquid chromatography–mass spectrometry. *Phytochemical Analysis*, 11: 121-127.

- Subapriya, R., & Nagini, S. (2005). Medicinal properties of Neem leaves: a review. *Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents*, 5(2), 149-156.
- Sultan, A., Khan, F. U., Iqbal, H., Khan, M. A., & Khan, I. U. (2010). Evaluation of chemical analysis profile of *Citrullus colocynthis* growing in southern areas of Khyber Pukhtunkhwa Pakistan. *World Applied Sciences Journal*, 10(4), 402-405.
- Sun, X., Yan, H., Zhang, Y., Wang, X., Qin, D., & Yu, J. (2019). Preparative separation of diterpene lactones and flavones from *Andrographis paniculate* using off-line two-dimensional high-speed counter-current chromatography. *Molecules*, 24(3), 620.
- Svensson, C., Lundborg, K., Emanuelson, U., & Olsson, S. O. (2003). Morbidity in Swedish dairy calves from birth to 90 days of age and individual calf-level risk factors for infectious diseases. *Preventive Veterinary Medicine*, 58(3-4), 179-197.
- Svensson, C., Linder, A., & Olsson, S. O. (2006). Mortality in Swedish dairy calves and replacement heifers. *Journal of Dairy Science*, 89(12), 4769-4777.
- Tahiliani, P., & Kar, A. (2000). *Achyranthes aspera* elevates thyroid hormone levels and decreases hepatic lipid peroxidation in male rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 71(3), 527-532.
- Tang, W., & Eisenbrand, G. (1992). *Achyranthes bidentata* Bl. In Chinese drugs of plant origin (pp. 13-18). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Teodoro, J. S., Rolo, A. P., Duarte, F. V., Simões, A. M., & Palmeira, C. M. (2008). Differential alterations in mitochondrial function induced by a choline-deficient diet: understanding fatty liver disease progression. *Mitochondrion*, 8(5-6), 367-376.
- Tzakou, O., Pitarokili, D., Chinou, I. B., & Harvala, C. (2001). Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Salvia ringens*. *Planta Medica*, 67(01), 81-83.

- Upadhaya, S. D., & Kim, I. H. (2017). Efficacy of phytogenic feed additive on performance, production and health status of monogastric animals—a review. *Annals of Animal Science*, 17(4), 929-948.
- Upadhyay, B., Roy, S., & Kumar, A. (2007). Traditional uses of medicinal plants among the rural communities of Churu district in the Thar Desert, India. *Journal of Ethnopharmacology*, 113(3), 387-399.
- USDA. (2002). Part I: reference of dairy health and management in the United States, 2002. USDA:APHIS:VS: CEAH, National Animal Health Monitoring System, Fort Collins, CO. 2002. #N377.1202.
- USDA. (2016). Dairy cattle management practices in the United States, 2014. United States Department of Agriculture. Animal and Plant Health Inspection Service. Veterinary Services. National Animal Health Monitoring System (USDA-APHIS-VS-CEAH-NAHMS). Fort Collins, CO. Accessed Aug. 6, 2016. [https://www.aphis.usda.gov/animalhealth/nahms/dairy/downloads/dairy14/Dairy14\\_drPartI.pdf](https://www.aphis.usda.gov/animalhealth/nahms/dairy/downloads/dairy14/Dairy14_drPartI.pdf).
- Van der Fels-Klerx, H. J., Martin, S. W., Nielen, M., & Huirne, R. B. M. (2002). Effects on productivity and risk factors of bovine respiratory disease in dairy heifers; a review for the Netherlands. *NJAS-Wageningen Journal of Life Sciences*, 50(1), 27-45.
- Van Zijderveld, F. G., Moerman, A., de Leeuw, P. W., Overdijk, D., & Baanvinger, T. (1982). Epidemiological aspects of enterotoxigenic *E. coli* infections in calves. Proc. XII World Congr. Dis. Cattle. The Netherlands. Word Assoc. Buiatrics, 258-264.
- Vasseur, E., Borderas, F., Cue, R. I., Lefebvre, D., Pellerin, D., Rushen, J., & De Passillé, A. M. (2010). A survey of dairy calf management practices in Canada that affect animal welfare. *Journal of Dairy Science*, 93(3), 1307-1316.

- Vetrichelvan, T., & Jegadeesan, M. (2003). Effect of alcohol extract of *Achyranthes aspera* Linn. on acute and subacute inflammation. *Phytotherapy Research*, 17(1), 77-79.
- Vi, R. B., McLeod, K. R., Klotz, J. L., & Heitmann, R. N. (2004). Rumen development, intestinal growth and hepatic metabolism in the pre-and postweaning ruminant. *Journal of Dairy Science*, 87, E55-E65.
- Virtala, A. M., Mechor, G. D., Gröhn, Y. T., Erb, H. N., & Dubovi, E. J. (1996). Epidemiologic and pathologic characteristics of respiratory tract disease in dairy heifers during the first three months of life. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 208(12), 2035-2042.
- Waltner-Toews, D., Martin, S. W., & Meek, A. H. (1986). The effect of early calfhood health status on survivorship and age at first calving. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 50(3), 314.
- Warner, R. G., Flatt, W. P., & Loosli, J. K. (1956). Ruminant nutrition, dietary factors influencing development of ruminant stomach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 4(9), 788-792.
- Warnick, L. D., Erb, H. N., & White, M. E. (1997). The relationship of calfhood morbidity with survival after calving in 25 New York Holstein herds. *Preventive Veterinary Medicine*, 31(3-4), 263-273.
- Wasfi, I. A., Bashir, A. K., Abdalla, A. A., Banna, N. R., & Tanira, M. O. M. (1995). Antiinflammatory activity of some medicinal plants of the United Arab Emirates. *International Journal of Pharmacognosy*, 33(2), 124-128.
- Wells, S. J., Dargatz, D. A., & Ott, S. L. (1996). Factors associated with mortality to 21 days of life in dairy heifers in the United States. *Preventive Veterinary Medicine*, 29(1), 9-19.

- Widhalm, B., Ters, T., Srebotnik, E., & Rieder-Grading, C. (2016). Reduction of aldehydes and terpenes within pine wood by microbial activity. *Holzforschung*, 70(9), 895-900.
- Wieler, L. H., Sobjinski, G., Schlapp, T., Failing, K., Weiss, R., Menge, C., & Baljer, G. (2007). Longitudinal prevalence study of diarrheagenic *Escherichia coli* in dairy calves. *Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift*, 120(7-8), 296-306.
- Xia, Y. F., Ye, B. Q., Li, Y. D., Wang, J. G., He, X. J., Lin, X., & Geng, J. G. (2004). Andrographolide attenuates inflammation by inhibition of NF- $\kappa$ B activation through covalent modification of reduced cysteine 62 of p50. *The Journal of Immunology*, 173(6), 4207-4217.
- Yoshikawa, M., Morikawa, T., Kobayashi, H., Nakamura, A., Matsuhira, K., Nakamura, S., & Matsuda, H. (2007). Bioactive saponins and glycosides. XXVII. Structures of new cucurbitane-type triterpene glycosides and antiallergic constituents from *Citrullus colocynthis*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 55(3), 428-434.
- Zahin, M., Ahmad, I., & Aqil, F. (2010). Antioxidant and antimutagenic activity of *Carum copticum* fruit extracts. *Toxicology in Vitro*, 24(4), 1243-1249.
- Zarshenas, M. M., Samani, S. M., Petramfar, P., & Moein, M. (2014). Analysis of the essential oil components from different *Carum copticum* L. samples from Iran. *Pharmacognosy Research*, 6(1), 62-66.
- Zeisel, S. H. (1999). Regulation of "nutraceuticals". *Science*, 285(5435), 1853-1855.
- Zeisel, S. H. (2006). Choline: critical role during fetal development and dietary requirements in adults. *Annual Review of Nutrition*, 26, 229-250.
- Zempleni, J., Suttie, J.W., Gregory III, J.F., & Stover, P.J. (2013). *Handbook of Vitamins* (5th ed.), ed. CRC Press, Boca Raton. Pages 491–513.

Zhu, S., Yang, X., Xu, S., Zhao, Z., & Jiang, J. (2017). Synthesis and antibacterial activity of bis-alkanoyl-amines heterocyclic derivatives of cis-1, 8-p-Menthane Diamine. *Chemical Industry of Forest Products*, 37, 79-84.



### **3 Pregunta de investigación**

¿Podrá la suplementación con colina herbal en becerras pre-rumiantes reducir problemas de salud y mejorar su crecimiento?

### **4 Hipótesis**

La Biocolina mejorará el comportamiento productivo de becerras Holstein suplementadas en forma lineal a la dosis y reducirá la incidencia de enfermedades

### **5 Objetivo**

Evaluar el efecto de un producto polihierbal elaborado con plantas medicinales de la India (*Achyranthes aspera*, *Trachyspermum ammi*, *Citrullus colocynthis*, *Andrographis paniculata* y *Azadirachta indica*), en el comportamiento productivo y en cambios de expresión de genes indicadores de la respuesta inmune en becerras Holstein.

## **6 CAPÍTULO 2: INFLUENCIA DE UNA MEZCLA POLIHERBAL EN BECERRAS**

### **LECHERAS: COMPORTAMIENTO PRODUCTIVO Y EXPRESIÓN GÉNICA**

Cesar Díaz Galván<sup>1</sup>, Estela Teresita Méndez Olvera\*<sup>2</sup>, Daniel Martínez Gómez<sup>3</sup>, Adrián Gloria Trujillo<sup>4</sup>, Pedro Abel Hernández García<sup>5</sup>, Enrique Espinosa Ayala<sup>5</sup>, Monika Palacios Martínez<sup>4</sup>, Alejandro Lara Bueno<sup>6</sup>, Germán David Mendoza Martínez<sup>4</sup>, Lucero Abigail Velázquez Cruz<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Doctorado en Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco, Calz, del Hueso 1100, 04960, Ciudad de México.

<sup>2</sup>Laboratorio de Biología Molecular, Departamento de Producción Agrícola y Animal, Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco, Calz, del Hueso 1100, 04960, Ciudad de México.

<sup>3</sup>Laboratorio de Microbiología Agropecuaria, Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco, Calz. del Hueso 1100, 04960, Ciudad de México.

<sup>4</sup>Departamento de Producción Agrícola y Animal, Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco, Calz, del Hueso 1100, 04960, Ciudad de México.

<sup>5</sup>Centro Universitario UAEM Amecameca, Universidad Autónoma del Estado de México, km 2.5 Carr. Amecameca-Ayapango, 56900, Amecameca, México.

<sup>6</sup>Universidad Autónoma Chapingo, Km. 38.5 Carretera México-Texcoco, 56230 Chapingo, Estado de México, México.

\*Autor de correspondencia: Dra. Estela Teresita Méndez Olvera

email: [etmendez@correo.xoc.uam.mx](mailto:etmendez@correo.xoc.uam.mx)

## RESUMEN

Se evaluó una mezcla polihierbal alimenticia que contenía *Achyranthes aspera*, *Trachyspermum ammi*, *Citrullus colocynthis*, *Andrographis paniculata* y *Azadirachta indica* en becerras en crecimiento en química sanguínea, biometría hemática y expresión génica durante el período previo al rumiante hasta el destete. Cuarenta becerras Holstein (peso inicial  $45.6 \pm 3.2$  kg;  $22.8 \pm 0.9$  días posparto) de una granja lechera fueron asignados aleatoriamente a los siguientes tratamientos: 0, 3, 4 y 5 g/d de una mezcla polihierbal, dosificados en geles coloidales con gelatina. Las becerras se alojaron en jaulas individuales al aire libre con acceso *ad libitum* a un alimento iniciador para becerras al 21.5 % de PC y agua, y se alimentaron individualmente con una mezcla de leche y un sustituto de leche no medicado (22 % de PC). Se colectaron muestras de sangre el día 59 para química sanguínea, biometría sanguínea y análisis de expresión génica en leucocitos a través de ensayos de microarreglos de DNA. Las inmunoglobulinas se cuantificaron mediante ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas. Los animales tratados con la mezcla polihierbal mostraron un efecto cuadrático sobre el peso corporal final, la ganancia diaria de peso, la altura final de la cadera y el perímetro torácico final. Los mejores resultados de rendimiento se obtuvieron con una dosis de tratamiento de 4 g/d. La IgG sérica aumentó linealmente con las dosis de tratamiento. El análisis ontológico de los genes diferencialmente expresados a la baja reveló que los tres procesos biológicos con mayor enriquecimiento fueron proteínas de unión estrecha, la biosíntesis de mucinas tipo O-glicanos y la red inmune intestinal para la producción de IgA. Además, los genes diferencialmente expresados al alza influyeron en el metabolismo del ácido araquidónico y en la biosíntesis de pantotenato y CoA. El análisis de ontología génica indicó que las vías enriquecidas eran proteínas que interactúan con el receptor de estrógeno PELP1, receptores nucleares en el metabolismo y la toxicidad de los

lípidos, unión estrecha, interacción ECM-receptor, vías de señalización de la hormona tiroidea, contracción del músculo liso vascular, función de los ribosomas, vía de sinapsis glutamatérgica, vías de señalización de adhesión focal, Hippo, calcio y MAPK.

**Palabras clave:** comportamiento productivo, becerras Holstein, nutrición animal, nutrigenómica, aditivos alimenticios de plantas.

## INTRODUCCIÓN

En las explotaciones lecheras pueden presentarse enfermedades respiratorias y entéricas, provocando una alta tasa de mortalidad en animales jóvenes, importantes pérdidas económicas (1, 2) y menor resistencia al estrés calórico (3, 4). En estos animales, el consumo de alimento se ve afectado, lo que compromete seriamente el desarrollo del sistema inmunológico (5). Estas enfermedades requieren el uso de antibióticos que han sido prohibidos como promotores del crecimiento en varios países (6). Existe un aumento en la presión pública para el uso de estos medicamentos en animales y, por lo tanto, la evaluación de aditivos de plantas alimenticias con efectos beneficiosos en rumiantes adultos sobre indicadores de salud y producción es fundamental para la crianza de becerras (7–9). En rumiantes adultos, una mezcla polihierbal con fosfatidilcolina (PCho) y otros metabolitos nutracéuticos mejora el rendimiento y la salud, lo que sugiere que puede tener efectos benéficos en becerras (10–12). La PCho dietética estimula la formación de *IL-2* en el bazo y la expresión de CD25, CD28, CD71 (13), mejorando la respuesta inmune. La colina es parte de la 1-alquil-2-acetil-sn-glicero-3-fosfocolina (factor activador de plaquetas), un activador reconocido de la respuesta inmunitaria (14, 15), y la colina protegida del rumen puede mejorar la respuesta inmunitaria y la salud de las vacas (16–18); sin embargo, faltan evaluaciones en becerras antes del destete.

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de un producto herbolario, con PCho elaborado con plantas medicinales de la India (*Achyranthes aspera*, *Trachyspermum ammi*, *Citrullus colocynthis*, *Andrographis paniculata*, y *Azadirachta indica*), sobre el comportamiento productivo y respuesta inmune en becerras Holstein. Estas plantas ya han sido evaluadas por nuestro grupo de investigación (10-12) y los resultados obtenidos mostraron efectos

beneficiosos sobre la producción en animales adultos. Sin embargo, se desconoce la actividad de estas plantas en animales jóvenes.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Animales, dieta y diseño experimental**

Los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo con las recomendaciones del CIOMS (19), observando las normas de ética, bioseguridad y bienestar animal aprobadas por el comité institucional. El experimento se realizó en una finca comercial ubicada en la parte central de la región norte de México (25°39' 14.4" N 103°27' 27.8" W; elevación 1,139 m). El clima fue semiseco, con temperaturas extremas, con una precipitación anual de 250.6 mm. La temperatura media fue de 20.21 °C, con una máxima de 33.60 °C y una mínima de 5.59 °C. Cuarenta becerras Holstein (BW inicial  $45.6 \pm 3.2$  kg) recibieron dosis individuales de una mezcla polihierbal (BioCholine, Indian Herbs). Las dosis se definieron en función del peso metabólico utilizando los resultados de los experimentos con ovejas (10, 12) y fueron las siguientes: 0, 3, 4 y 5 gramos por día (g/d). Los productos herbolarios se prepararon en geles coloidales con gelatina para asegurar el consumo diario individual por la mañana durante los 90 días que duró el experimento. La mezcla de polihierbal-gelatina (PGM) se preparó 1 día antes de la administración. Las becerras estaban clínicamente sanas al inicio del experimento y tenían una edad de  $22.8 \pm 0.9$  días después del nacimiento. Las becerras fueron pesadas y medidas al inicio y al final del experimento (90 días de evaluación). Durante el pesaje se midió la altura de la cadera y la cruz, así como el perímetro torácico (20). Todas las becerras recibieron calostro después del nacimiento y las inmunoglobulinas en la sangre se midieron por refractometría.

Las becerras se colocaron individualmente en jaulas al aire libre ( $2.0 \times 1.25$  m), con agua *ad libitum*, y se alimentaron dos veces al día (7:00 am y 17:00 pm). Recibieron una mezcla de leche (56%) y un sustituto de leche no medicado (44% sustituto de leche Nu-3; alimento balanceado Grupo Nu-3, Guanajuato, México) con 4% de humedad, 22% de proteína cruda, 15% de grasa, 0.1 % fibra bruta, 6.0% cenizas y 52.9% extracto libre de nitrógeno (NFE), preparado con 130 g/L de agua. La leche en polvo (143 g/L) se reconstituyó en agua caliente (65 °C) y se alimentó a una temperatura de 39 °C en un recipiente; previo a la alimentación se mezcló con leche a razón de 130 g/L. Se ofreció sustituto de leche desde el día 4 de edad dos veces al día (4 L cada vez) y se redujo a una comida el día 25 a medida que se aumentaba la ingesta inicial. A partir del segundo día de vida se ofreció en un balde un concentrado comercial compuesto por grano de sorgo, maíz rolado, harina de soya y melaza de caña. El iniciador de leche utilizado fue Premium Iniciación Destete Prematuro (Nuplen, Durango, México) con 13.0% de humedad, 21.5% de proteína cruda, 3.0% de grasa, 8.0% de fibra cruda, 7.0% de cenizas y 47.0% de NFE. El concentrado iniciador se ofreció a partir del tercer día de edad y se fue incrementando gradualmente.

### **Muestras y recopilación de datos**

Se registró la ingesta diaria de leche y concentrado iniciador. Se evaluó la variación del consumo entre días como indicador de estabilidad. La conversión alimenticia se estimó como la relación de kg de ingesta de materia seca (MS)/kg de ganancia de peso corporal, incluida la MS del iniciador, el sustituto de leche y el iniciador de leche. Las becerras fueron evaluadas diariamente después de la toma de leche de la mañana entre las 06:00 y las 10:00 para detectar diarrea, neumonía, otitis y otras enfermedades. El día 59 del experimento, se tomaron muestras de sangre

de forma prepanial de todos los animales de la vena yugular utilizando tubos vacutainer con citrato de sodio, EDTA y sin anticoagulante. Estas muestras de sangre se mantuvieron en refrigeración (4 °C) hasta su uso. Los tubos sin anticoagulante se centrifugaron (Sigma 2-16 k, Alemania) a 3.500 x g durante 20 min para obtener suero sanguíneo, que se almacenó en tubos Eppendorf y se mantuvo en congelador a -20 °C hasta su análisis. El colesterol, la glucosa, la proteína total, la albúmina y la bilirrubina se determinaron con un autoanalizador Kontrolab 2017. La muestra de sangre recolectada en EDTA disódico se utilizó para el hemograma completo (CBC). El recuento diferencial de leucocitos CBC y el hematocrito se determinaron en el analizador de hematología QS Kontrolab EasyVet.

### **Análisis de inmunoglobulinas**

Las becerras fueron inmunizadas contra *Clostridium* spp. (vacuna Covexin 10) el día 40 del experimento y para evaluar los anticuerpos contra el antígeno (*Clostridium* spp) se obtuvo suero de las muestras de sangre recolectadas con citrato de sodio. El antígeno se unió a la placa de microtitulación y se incubó durante la noche a temperatura ambiente. Para la evaluación de anticuerpos, se agregaron 100 µL de la muestra de suero a cada pocillo y se incubaron (1 hora, 37 °C). Las placas se decantaron y se añadieron 100 µl de anticuerpo secundario específico de IgG bovina y se incubaron (1 hora, 37 °C). Luego se agregaron 100 µL de TMB (3,3', 5,5'-Tetrametilbencidina líquida) a cada pocillo de reacción y se detuvo con 100 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1%). Las placas se leyeron en un lector ELISA (Modelo 350, BioRad) a una longitud de onda de 540 nm.



### **Extracción de ARN de muestras de sangre**

Las muestras de sangre con citrato de sodio del grupo control y del grupo tratado con el polihierbal (4 g/d) se procesaron utilizando solución SRL (Tris-HCl 10 mM pH 8, MgCl<sub>2</sub> 5 mM y NaCl 10 mM) a partir de un volumen total de 24 mL de sangre por unidad experimental (becerra). El ARN total se extrajo del paquete de leucocitos usando Trizol (Invitrogen). El sedimento de ARN se suspendió en 20 µL de H<sub>2</sub>O DEPC 0.1% agua y se almacenó a -80°C hasta su procesamiento. La pureza del ARN se determinó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Las muestras de ARN se trataron con ADNasas (Promega). El ARN purificado se cuantificó por espectrometría usando A<sub>260</sub>-A<sub>280</sub> (21). Se prepararon dos pools de ARN (control y tratamiento) a partir de ocho repeticiones biológicas (30 µg de ARN) y se almacenaron a -70°C durante 24 h y posteriormente se centrifugaron durante 15 min a 4°C.

### **Análisis de microarreglos**

Los análisis de microarreglos se llevaron a cabo en la Unidad de Microarreglos del Instituto de Fisiología Celular (UNAM) en la Ciudad de México, utilizando un chip de ratón heterólogo M22K\_10\_16 para evaluar la expresión diferencial de los genes. El arreglo evaluó 24,341 genes y 10 µg de ARN total sintetizado en ADNc con la incorporación de los nucleótidos dUTP-Alexa555 y dUTP-Alexa647, utilizando el kit de etiquetado CyScribe First-Strand cDNA Amersham. La incorporación de fluoróforo se analizó a una absorbancia de 555 nm para Cy3 y 655 nm para Cy5. Se hibridaron cantidades iguales de ADNc usando la solución HyBIT2 (TeleChem International INC). Los arreglos se incubaron durante 14 h a 42 °C, con tres lavados consecutivos utilizando 1 x SCC, 0.05 % SDS a temperatura ambiente. Se utilizó el equipo y software ScanArray 4000 (Packard BioChips) para la adquisición y cuantificación de las

imágenes de los arreglos. El análisis de datos de microarreglos se realizó con el software genArise (<http://www.ifc.unam.mx/genarise/>). La lista de genes considerados upregulated (Up) y downregulated (Down) se analizó con la herramienta bioinformática DAVID [Functional Annotation Bioinformatics Microarray Analysis, (<https://david.ncifcrf.gov/>)], que permite agrupar genes en función de su similitud funcional.

### **Análisis de ontología génica**

Se aplicó un análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes usando ontología de genes para extraer el significado biológico de las transcripciones expresadas diferencialmente; los términos de ontología génica con un valor  $P < 0.05$  se consideraron enriquecidos. El recurso bioinformático 6.8 de la base de datos para anotación, visualización y descubrimiento integrado (DAVID) se utilizó para el enriquecimiento del conjunto de genes (22).

### **Validación del gen diferencial expresado mediante PCR cuantitativa en tiempo real**

La primera cadena de ADNc se sintetizó a partir de 1500 ng de ARN total usando Oligo (dT) y RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo Scientific). Se diseñaron cebadores específicos para PPAR $\beta$  y GAPDH con Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) (Cuadro 2). Los cebadores para PPAR $\alpha$  y ACOXI se tomaron de estudios previos (Cuadro 2) (23). La qPCR se realizó en un sistema de PCR en tiempo real Rotor-GeneQ (Qiagen), utilizando Sybr Green para la detección (Thermo Scientific). La amplificación para PPAR $\alpha$  y ACOXI se llevó a cabo en un ciclo a 95 °C durante 10 min, seguido de 45 ciclos a 95 °C durante 15 s, 60 °C durante 60 s y 70 °C durante 30 s. La amplificación para PPAR $\beta$  y Relb se llevó a cabo en un ciclo a 95 °C durante 2 min, seguido de 45 ciclos a 95 °C durante 30 s, 57 °C durante 30 s y

72 °C durante 30 s. Se utilizó gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) como control interno para la normalización. Se utilizó el método 2-11Ct para determinar la cuantificación relativa del ARNm (24).

Cuadro 2. Secuencias (5' a 3') de primers usados en qPCR

Primers			
Gen	Forward	Reverse	pb
PPARA	CAATGGAGATGGTGGACACA	TTGTAGGAAGTCTGCCGAGAG	95
ACOX	TCCTACTGTGACCTCCATCAA	GGGTCCCAAGTTCACGAATAG	143
PPARB	GTGGCTTCTGTTCACCGACA	GAAGTGAGTGCTCTGGTCCC	257
GAPDH	GCCATCACCATCTTCCAGG	GGTAGTGAAGACCCCAGTGG	96

### Análisis estadístico

Se utilizó la prueba de Shapiro-Wilk para probar la distribución normal de las variables. Los datos se analizaron utilizando el software R (25), y se utilizaron polinomios lineales y cuadráticos ortogonales para evaluar los efectos del aditivo polihierbal. El modelo utilizado fue:  $Y_{ij} = \mu + \tau_i + e_{ij}$ , en el que  $\mu$  es el valor medio,  $\tau_i$  es el efecto del tratamiento (fijo) y  $e_{ij}$  es el término de error. El peso corporal inicial se utilizó como covariable en la ganancia diaria y el peso corporal final (26). El número de casos de enfermedades y las dosis de antibióticos se analizaron mediante la prueba de Kruskal Wallis. Si el efecto cuadrático era significativo, la concentración óptima para la ganancia diaria se estimó utilizando la primera derivada de la ecuación cuadrática (27).

## **RESULTADOS**

### **Parámetros de rendimiento y salud en becerras**

Los animales tratados con la mezcla polihierbal mostraron una respuesta cuadrática en peso final, ganancia diaria de peso (GDP), altura final de la cadera y perímetro torácico final, con los mejores resultados de rendimiento numérico con una dosis de 4 g/d (Cuadro 3). Sin embargo, la dosis óptima estimada por regresión a la GDP máxima fue de  $2.47 \pm 0.87$  g/d de la mezcla polihierbal. El consumo de iniciador se estimuló con una dosis de 4 g ( $P$  cuadrática  $< 0.001$ ), mientras que la ingesta de líquidos mostró un aumento lineal ( $P < 0.001$ ), compensando la reducción del consumo de sólidos sin efecto sobre la conversión alimenticia (Cuadro 3). Todas las becerras recibieron calostro después del nacimiento, y se midieron las inmunoglobulinas en sangre por refractometría, los resultados obtenidos mostraron una concentración de  $654 \pm 0.525$  g/dl. Se observó una reducción de otitis (efecto cuadrático  $P < 0.10$ ) con dosis intermedias de polihierbal en las becerras (Cuadro 3), y un incremento lineal ( $P < 0.10$ ) de anti-*Clostridium* spp.

### **Bioquímica y biometría sanguínea**

Los cambios en la química sanguínea se muestran en el Cuadro 4. El tratamiento con la mezcla polihierbal provocó una reducción en los niveles de glucosa ( $P < 0.01$  lineal), con un aumento cuadrático en el butirato B-OH ( $P < 0.05$ ). Los niveles de globulina se redujeron ( $P < 0.10$  cuadrático) y los niveles de albúmina mostraron un incremento cuadrático ( $P < 0.05$ ), lo que resultó en una reducción en la proporción de albúmina:globulina ( $P$  cuadrático  $< 0.01$ ). La urea mostró una reducción ( $P < 0.10$ ), mientras que el ácido úrico no se vio afectado. El nivel de bilirrubina aumentó linealmente ( $P < 0.01$ ) con el tratamiento polihierbal; sin embargo, las enzimas hepáticas [fosfatasa alcalina, ALP; lactato deshidrogenasa, LDH; y aspartato

aminotransferasa, AST (GOT)] no se vieron afectadas. El calcio y el fósforo séricos permanecieron sin cambios. Los resultados de la biometría se presentan en el Cuadro 5. Hubo una reducción de neutrófilos en banda ( $P < 0.05$ ). Los linfocitos, los basófilos y las proteínas plasmáticas se redujeron con dosis más bajas o intermedias de BioCholine (efecto cuadrático,  $P < 0.10$ ).

Cuadro 3. Efectos de la mezcla polihierbal en el comportamiento productivo y estado de salud.

	Mezcla polihierbal (g/d)				EEM	P-value	
	0	3	4	5		Lineal	Cuadrático
Ganancia diaria de peso, g/d	0.672	0.763	0.772	0.653	0.0206	0.89	0.008
Peso final BW, kg	86.74	92.64	93.28	85.50	1.3904	0.78	0.008
Altura final a la cruz, cm	90.06	91.18	91.33	90.51	0.5281	0.72	0.30
Altura final de la cadera, cm	95.42	97.11	97.34	95.39	0.4268	0.53	0.05
Circunferencia torácica final, cm	101.56	105.01	105.35	103.57	0.6006	0.20	0.02
Consumo de alimento, g/d	829	948	889	677	31.4816	0.02	0.001
Variación del consumo de alimento entre individuos, %	107.38	108.13	112.66	113.71	1.4026	0.12	0.96
Consumo de leche + sustituto, litros/d	2.454	2.564	2.582	2.666	0.0188	0.0001	0.63
Conversión alimenticia	2.15	2.06	1.94	2.07	0.0501	0.32	0.19
No. diarreas	0.29	0.24	0.40	0.01	0.0595	0.81	0.70
No. neumonías	3.61	0.50	3.20	0.88	0.5535	0.34	0.80
No. otitis	5.66	1.20	2.40	4.77	1.0023	0.79	0.06
Dosis de antibióticos	5.35	1.54	4.32	2.33	0.9383	0.41	0.60
Inmunoglobulinas (IgG)	1.496	1.438	1.851	1.764	0.0766	0.07	0.62

EEM: error estándar de la media

Cuadro 4. Efecto de una mezcla polihierbal en parámetros sanguíneos.

	Mezcla polihierbal (g/d)				EEM	P-value	
	0	3	4	5		Lineal	Cuadrático
Glucosa, mmol/L	4.101	2.975	3.480	2.621	2.5144	0.0001	0.47
B-OH Butirato, mmol	0.329	0.250	0.300	0.355	0.0156	0.35	0.03
Urea, mmol/L	7.87	6.07	6.42	6.42	0.7066	0.08	0.09
Ácido úrico, mmol/L	30.09	36.87	33.90	36.34	0.0276	0.24	0.49
Creatinina, $\mu$ mol/L	89.46	91.05	93.70	94.23	0.0309	0.60	0.94
Proteína total, mmol/L	69.9	69.2	70.8	70	0.1547	0.14	0.70
Globulina, g/dL	3.04	2.76	2.76	2.90	0.0853	0.44	0.09
Albumina, g/dL	3.95	4.16	4.32	3.99	0.1030	0.59	0.02
Relación A/G	1.33	1.53	1.60	1.37	0.0563	0.59	0.01
Colesterol, mmol/L	24.26	22.91	22.85	23.72	2.7943	0.73	0.33
Bilirrubina, mmol/L	0.370	0.470	0.490	0.511	0.0211	0.01	0.34
ALP, U/L	25.71	28.60	25.60	26.11	0.9695	0.72	0.98
LDH, U/L	79.65	68.20	75.20	78.89	2.6029	0.85	0.21
AST (GOT), U/L	25.53	20.10	21.90	21.22	1.2873	0.45	0.49
Calcio, mmol/L	2.30	2.22	2.52	2.29	0.2478	0.43	0.36
Fosforo, mmol/L	1.66	1.52	1.62	1.53	0.1352	0.32	0.69

ALP: Fosfatasa Alcalina; LDH: lactato deshidrogenasa; AST (GOT): Aspartato aminotransferasa; EEM: error estándar de la media

Cuadro 5. Efectos de la mezcla polihierbal en los parámetros sanguíneos.

	Mezcla polihierbal (g/d)				EEM	P-value	
	0	3	4	5		Lineal	Cuadrático
Hematocrito, %	35.13	34.7	35.8	36.05	0.335	0.37	0.72
Hemoglobina, g/dl	11.91	11.7	12.15	12.08	0.116	0.48	0.82
Eritrocitos $\times 10^6$ /ml	5.39	5.16	5.35	5.39	0.072	0.77	0.38
Volumen corpuscular medio, fl	65.73	67.29	66.82	66.86	0.576	0.58	0.54
Hemoglobina corpuscular media, pg	22.27	22.71	22.68	22.4	0.209	0.85	0.41
Concentración de hemoglobina corpuscular media, g/dl	33.9	33.72	33.94	33.51	0.111	0.25	0.53
Plaquetas $\times 10^3$ /ml	407.22	376.20	449.1	458.22	13.912	0.09	0.52
Tasa de sedimentación de Wintrobe, ml/h	0.27	0	0	0.55	0.150	0.58	0.24
Leucocitos $\times 10^3$ /ml	11.4	11.57	12.4	11.05	0.391	0.96	0.49
Linfocitos $\times 10^3$ /ml	45.88	28.80	44.70	40.00	2.134	0.91	0.08
Monocitos $\times 10^3$ /ml	4.55	3.90	5.00	4.66	0.253	0.56	0.77
Neutrófilos segmentados $\times 10^3$ /ml	41.94	62.9	46.40	49.00	2.328	0.77	0.01
Neutrófilos en banda $\times 10^3$ /ml	4.33	1.70	1.60	2.44	0.381	0.02	0.003
Eosinófilos $\times 10^3$ /ml	3.0	2.6	2.3	3.66	0.280	0.53	0.16
Basófilos $\times 10^3$ /ml	0.27	0.10	0.00	0.22	0.055	0.59	0.09
Proteínas plasmáticas, g/dL	9.09	8.64	8.98	9.42	0.115	0.22	0.07

EEM: error estándar de la media

## Variaciones de la expresión génica

El microarreglo heterólogo representó ~22 000 transcritos, de los cuales 2442 se expresaron diferencialmente; un total de 1,093 y 1,349 transcripciones se regularon hacia arriba y hacia abajo, respectivamente. Se regularon al alza un total de 264 genes con valores de +2.0 a 5.5 y se regularon a la baja 401 genes con valores de -2.0 a -5.8. Los 30 transcritos diferencialmente expresados al alza y a la baja en leucocitos de becerras destetadas suplementadas con una mezcla polihierbal se presentan en los Cuadros 6 y 7. Los transcritos diferencialmente expresados al alza con mayor fuerza incluyen categorías funcionales como protooncogén (*Jun*, *Lck*, *Pdgfra*), proteína tirosina quinasa (*Tyro3*, *Lck*, *Pdgfra*), dominio de inmunoglobulina (*Tyro3*, *Lrn2*, *Pdgfra*, *Pdgfrl*) y unión a ATP (*Abcc8*, *Tyro3*, *Entpd2*, *Lck*, *Pdgfra*, *Plk1*) (Cuadro 6). Los



transcritos diferencialmente expresados a la baja más fuertemente incluyen categorías funcionales como fosfoproteína (*Erc1*, *Rab11fip2*, *Rpusd2*, *Sh3d19*, *Tal1*, *Baz1a*, *Cobl*, *Cry2*, *Dapk1*, *Glycam1*, *Grhpr*, *Hmg20b*, *Kif2c*, *Lig1*, *Polr3d*, *Ptpn6*, *Sell*, *Xirp2*), transporte de proteína (*Erc1*, *Rab11fip2*, *Xpo5*, *Serp1*) y conjugación de modificador similar a la ubiquitina (*Tal1*, *Cry2*, *Dapk1*, *Hmg20b*, *Kif2c*, *Polr3d*) (Cuadro 7).

Cuadro 6. Análisis de microarreglos del perfil de expresión génica diferencial en células de sangre periférica (genes regulados al alza).

Símbolo del gen	Descripción del gen	Fold change
		Bio vs Cc
Plk1	Polo-like kinase 1	5.5
Col11a1	Collagen, type XI, alpha 1	4.9
Tyro3	Protein tyrosine kinase 3	4.9
Klhdc9	Kelch domain containing 9	4.8
Casp2	Caspase 2	4.5
Entpd2	Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 2	4.2
Mcur1	Mitochondrial calcium uniporter regulator 1	4.1
Acox1	Acyl-Coenzyme A oxidase-like	4.0
Lrrn2	Leucine rich repeat protein 2, neuronal	4.0
Snrpe	U1 small nuclear ribonucleoprotein C	3.9
Klra20	Killer cell lectin-like receptor subfamily A, member 20	3.9
Pdgfra	Platelet derived growth factor receptor, alpha polypeptide	3.9
Etd	Embryonic testis differentiation	3.8
Zfp27	Zinc finger protein 27	3.6
Prdx6	Peroxiredoxin 6	3.6
Abcc8	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 8	3.6
Elov12	Elongation of very long chain fatty acids (FEN1/Elo2, SUR4/Elo3, yeast)-like 2	3.6
Jun	Jun proto-oncogene	3.5
Rab3gap1	RAB3 GTPase activating protein subunit 1	3.5
Ccser2	Coiled-coil serine rich 2	3.5
Dsc1	Desmocollin 1	3.5
Mrps5	Mitochondrial ribosomal protein S5	3.4
Mga	MAX gene associated	3.4
TGF- $\beta$	transforming growth factor, beta 1	3.4
Defa14	Defensin, alpha, 14	3.3
Cenpp	Centromere protein P	3.3
Rpl41	Ribosomal protein L41	3.3
Pdgfrl	Platelet-derived growth factor receptor-like	3.3
Lck	Lymphocyte protein tyrosine kinase	3.2
Vpreb3	Pre-B lymphocyte gene 3	3.2

Cuadro 7. Análisis de microarreglos del perfil de expresión génica diferencial en células de sangre periférica (genes regulados a la baja).

Símbolo del gen	Descripción del gen	Fold change
		Bio vs Cc
Hmg20b	High mobility group 20B	-5.8
Cyp21a1	Cytochrome P450, family 21, subfamily a, polypeptide 1	-4.5
Ptgdr	Prostaglandin D receptor	-4.3
Serp1	Stress-associated endoplasmic reticulum protein 1	-4.3
Baz1a	Bromodomain adjacent to zinc finger domain 1A	-4.2
Cry2	Cryptochrome 2 (photolyase-like)	-4.2
Psm8	Proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 8	-4.2
Slc22a15	Solute carrier family 22 (organic anion/cation transporter), member 15	-4.2
Grhr	Glyoxylate reductase/hydroxypyruvate reductase	-4.1
Kif2c	Kinesin family member 2C	-4.1
Rpsud2	RNA pseudouridylate synthase domain containing 2	-4.1
Cobl	Cordon-bleu WH2 repeat	-4.1
Glycam1	Glycosylation dependent cell adhesion molecule 1	-4.1
Xpo5	Exportin 5	-4.0
Dapk1	Death associated protein kinase 1	-4.0
Sel1l	Sel-1 suppressor of lin-12-like	-4.0
Xirp2	Xin actin-binding repeat containing 2	-4.0
Sh3d19	SH3 domain protein D19	-3.9
Lzic	Leucine zipper and CTNBP1 domain containing	-3.9
Rab11fip2	RAB11 family interacting protein 2 (class I)	-3.9
Erc1	ELKS/RAB6-interacting/CAST family member 1	-3.8
Lig1	Ligase I, DNA, ATP-dependent	-3.8
Wif1	Wnt inhibitory factor 1	-3.8
Tal1	T cell acute lymphocytic leukemia 1	-3.8
Gsc2	Goosecoid homeobox 2	-3.8
Mc5r	Melanocortin 5 receptor	-3.8
Ptpn6	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 6	-3.8
Polr3d	Polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide D	-3.8
Grpr	Gastrin releasing peptide receptor	-3.8
G6pc3	Glucose 6 phosphatase, catalytic, 3	-3.8

El análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes (GSEA) diferencialmente expresados al alza (Cuadro 8) reveló que los tres procesos biológicos con mayor enriquecimiento fueron proteínas de unión estrecha (Fc: 3.7; P = 0.00002), biosíntesis de O-glicanos de tipo mucina (Fc: 3.7; P = 0.044) y red inmunitaria intestinal para la producción de IgA (Fc: 3.4; P = 0.015). Observamos expresión reducida de genes relacionados con unión estrecha (*Rab13*, *Src*, *Afdn*, *Cdc42*, *Llgl2*, *Mpp5*, *Myh10*, *Myh9*, *Myl9*, *Pard6g*, *Prkci*, *Tjp1*); entre estos genes, había cuatro que codifican para claudinas (*Cldn-7*, *Cldn8*, *Cldn9*, *Cldn16*). La expresión del gen *gcnt3* se redujo (Fc = -1.6); este gen codifica para la enzima responsable de la síntesis de todas las  $\beta$ 6 N-acetilglucosaminidas conocidas. El tratamiento con mezcla polihierbal redujo la expresión de citoquinas necesarias para promover la diferenciación terminal y el cambio de inmunoglobulina clase A de células B, lo que explica la regulación a la baja de los genes involucrados en la red inmune intestinal para la producción de IgA (*Cd40lg*, *Cd86*, *H2-DMb1*, *Il10*, *Madcam1*, *Tgfb1*, *Tnfrsf13b*). El microarreglo no identificó transcritos diferencialmente expresados que codificaban para *Tnf- $\alpha$* , *Ifn*, *Il-6* e *Il8*, que expresan citoquinas inflamatorias. Por el contrario, se mostró una expresión reducida de *Tgfb1* (Fc: -3.4) e *Il-10* (Fc: -2.5).

El análisis del enriquecimiento génico con regulación positiva identificó la biosíntesis de pantotenato y CoA (P = 0.03), el metabolismo del ácido araquidónico (P = 0.01) y la diabetes mellitus tipo 2 (P = 0.01) (Cuadro 8). El tratamiento con mezcla polihierbal incrementó la expresión de cuatro genes cuya transcripción está relacionada con la biosíntesis de pantotenato y CoA (*Enpp1*, *Enpp3*, *Pank4* y *Vnn3*).

Cuadro 8. Análisis de enriquecimiento de ontología génica en células de sangre periférica.

GO proceso biológico	Count <sup>a</sup>	P-Value	Fold change <sup>b</sup>
Pantothenate and CoA biosynthesis	4	0.03	5.7
Tight junction	16	0.00002	3.7
Type II diabetes mellitus	7	0.031	3.6
Intestinal immune network for IgA production	7	0.015	3.4
Arachidonic acid metabolism	10	0.01	2.9
Neuroactive ligand-receptor interaction	23	0.019	1.7
Adherents junction	9	0.022	2.6
Ribosome	14	0.023	2.0
ECM-receptor interaction	10	0.025	2.3
Pathways in cancer	28	0.041	1.5
Focal adhesion	17	0.042	1.7
Mucin type O-Glycan biosynthesis	5	0.044	3.7
Endocytosis	20	0.047	1.6

<sup>a</sup>Número de genes asociados.

<sup>b</sup>Mezcla polihierbal animales tratados vs. no tratados

El análisis de las transcripciones totales reguladas al alza y a la baja (Figura 1) indica un efecto modulador importante del tratamiento con mezclas polihierbales en la modulación *Pelp1* de la actividad del receptor de estrógeno (cambio de pliegue, Fc = 4.4; *Src*, *Esr1* y *Mapk1*), receptores nucleares en el metabolismo de los lípidos y toxicidad (Fc = 2.4; *Abca1*, *Abcb1b*, *Cyp1a2*, *Cyp27b1*, *Nr1h3*, *Nr1i3*, *PPARa*, *PPARd*, *Rara* y *Rarg*) y proteínas de unión estrecha (Fc: 2.4).

### Biological processes enriched for DEGs

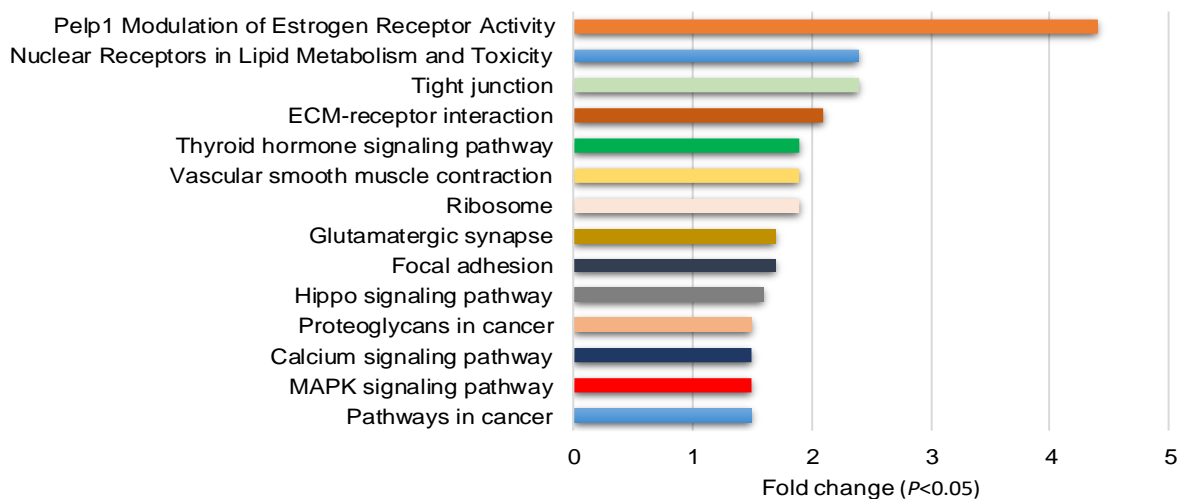


Figura 1. Procesos biológicos enriquecidos para genes expresados diferencialmente (DEG; transcritos regulados hacia arriba y hacia abajo)

El análisis de la expresión génica por qPCR (Cuadro 9) indica que la transcripción de los genes PPAR $\alpha$  y PPAR $\beta$  se reguló al alza (P = 0.15) y se reguló a la baja (P = 0.05), respectivamente.

Cuadro 9. Análisis de la expresión génica.

Gen	Mezcla polihierbal (g/d)				EEM	Lineal	Cuadrático
	0	3	4	5			
Ppara $\alpha$	1.24	21.57	14.84	42.49	6.35	0.53	0.15
Ppar $\beta$	3.33	2.99	0.82	0.81	0.59	0.84	0.05

Ppara $\alpha$ : Peroxisome Proliferator Activated Receptor  $\alpha$ , Ppar $\beta$ : Peroxisome Proliferator Activated Receptor  $\beta/\delta$ , EEM: error estándar de la media.

## **DISCUSIÓN**

### **Parámetros de las becerras**

La mezcla polihierbal proporciona conjugados de colina (principalmente PCho) y metabolitos secundarios que, en dosis bajas, tienen propiedades nutraceuticas (11), lo que explica la mejor respuesta en el crecimiento (efecto cuadrático). Las becerras en crecimiento tienen una alta síntesis proteica, y la colina participa como donante de metilo (vía betaína) necesario para la metilación del ADN, ARN y proteínas (28, 29), además de la síntesis de los fosfolípidos de las membranas celulares y lipoproteínas plasmáticas (30) con múltiples funciones en el organismo (31). Se han documentado pocas evaluaciones de colina en becerras desde que se reportaron deficiencias de este nutriente en la década de 1950 (29). Aunque se incluye en los sustitutos de leche y en los iniciadores, como sugiere el NRC (32), no se complementa después del destete. Sin embargo, los estudios con corderos en crecimiento muestran una respuesta cuadrática a la suplementación en forma de colina protegida en el rumen (RPC) o con la mezcla polihierbal evaluada aquí (11, 12, 30). La respuesta positiva a la colina se debe a la rápida tasa de crecimiento del ganado Holstein después del destete, y la selección genética puede conducir a un aumento de los requisitos de este nutriente. Se han realizado algunas evaluaciones de RPC en novillos en etapa de crecimiento y finalización. En estos estudios se demostró que cuando los animales se acercan a los pesos maduros, la respuesta al nutriente es menor. La respuesta a RPC también se redujo a medida que el animal se acercaba al peso maduro (33–35).

En becerras se han evaluado pocos aditivos alimentarios fitogénicos con aceites esenciales (36), los cuales reportan mayor consumo de iniciador y mejores eficiencias alimenticias y ganancia de peso, mientras que otros autores no encontraron respuestas de

consumo (37, 38). No está claro si los cambios en el consumo mostrados en esta investigación se debieron a algunos metabolitos secundarios de la mezcla del polihierbal o debido a los conjugados de colina. En corderos que respondieron a la misma mezcla polihierbal en GDP, el consumo no se vio afectado (12). Sin embargo, en un experimento con niveles graduados de RPC, la ingesta mostró una respuesta cuadrática a la ganancia de peso (39). Los cambios en el perímetro torácico en dosis intermedias indican un mayor desarrollo del rumen, pero hay pocos informes donde los nutrientes en la dieta afectaron estas variables y, en general, esos cambios no son perceptibles (40–42). En cuanto a los parámetros de salud evaluados, la reducción de la otitis puede explicarse por algunos metabolitos antibacterianos en la mezcla polihierbal (11), por la capacidad antioxidante de la colina (43) que puede tener un papel preventivo en la otitis (44), o por la mejora en la respuesta del sistema inmunológico (45); esto es importante ya que, en las becerras la otitis se relaciona comúnmente con la neumonía (46). Sin embargo, son necesarios más estudios para confirmar estos resultados. La mezcla polihierbal mejoró la respuesta inmune a la vacunación, como se observó en las cuantificaciones de inmunoglobulinas séricas en algunos aditivos de plantas de alimentos (8), y podría estar relacionado con la regulación positiva de algunos genes como *Tyro3*, *Lrn2*, *Pdgfra* y *Pdgfrl*.

### **Bioquímica y biometría sanguínea**

Los valores de química sanguínea estaban en el rango normal para las becerras (47, 48). Solo la glucosa mostró una ligera reducción en los animales suplementados con colina herbal. La mezcla polihierbal contiene *Azadirachta indica*, que ha mostrado efectos hipoglucemiantes (49). Sin embargo, estos efectos no afectan a los leucocitos, lo que fue indicado por la regulación a la baja de la expresión (-3.8 veces menor que en el grupo de control) del gen *g6pc3*, que codifica



para la glucosa-6-fosfatasa involucrada en la regulación homeostática de la glucosa en monocitos y neutrófilos. La función principal de la glucosa 6-fosfatasa-b es proporcionar glucosa reciclada al citoplasma de los neutrófilos para mantener la función normal (50).

El cambio en butirato puede ser un indicador del desarrollo ruminal. La glucosa se reduce porque a medida que las becerras crecen, dependen más de los ácidos grasos volátiles. El calcio y el fósforo séricos también indican que el aditivo alimentario no afectó el equilibrio mineral de estos elementos, independientemente de las diferencias en el consumo de alimento del iniciador (51, 52). Las becerras estaban sanas y se detectaron cambios menores en algunos metabolitos, que sin embargo no estaban asociados con agentes infecciosos o procesos inflamatorios crónicos. Las reducciones de urea en sangre indican una situación general adecuada del metabolismo proteico (53), confirmada por el ácido úrico, un producto metabólico del metabolismo proteico; los niveles de creatinina indican que la función renal no se vio afectada (54).

Los principales indicadores séricos utilizados para evaluar las alteraciones hepáticas incluyen AST (GOT), ALT, bilirrubina, proteína y albúmina totales (55) y no fueron alterados por el tratamiento con mezcla polihierbal, lo que confirma que el hígado no resultó dañado. Los cambios en los niveles de bilirrubina pueden explicarse por la reducción en la expresión de *ugt2b37* (UDP-glucuronosiltransferasa), que codifica la enzima involucrada en el metabolismo de la bilirrubina (56) y cataliza la transformación de la bilirrubina no conjugada o indirecta en bilirrubina conjugada o directa mediante la adición de ácido glucurónico. Algunos suplementos y extractos de hierbas con compuestos polifenólicos pueden tener efectos inhibitorios sobre el gen responsable de la glucuronidación de la bilirrubina (57). Dado que las becerras del estudio estaban sanas, presumiblemente las reacciones cruzadas de algunos metabolitos de la colina a

base de hierbas podrían ser responsables del aumento de la bilirrubina, en lugar de la lesión hepática. Según un estudio anterior, la concentración de bilirrubina sérica no se considera un indicador sensible de enfermedad hepática en becerras jóvenes (55).

En otros experimentos que han empleado aditivos alimentarios a base de plantas, los niveles de proteína sérica no se vieron afectados (36), y los resultados pueden variar según el mecanismo de acción de los fitobióticos, los metabolitos secundarios y las dosis. Las enzimas hepáticas como la ALT es la prueba más específica para detectar la disfunción hepática, así como la LDH (55), lo que sugiere que la mezcla polihierbal evaluada no tiene metabolitos hepatotóxicos y sus conjugados de colina podrían tener un efecto antioxidante (58) y otros efectos beneficiosos para la función del hígado con este nutriente (59). La mezcla polihierbal tiene varios compuestos químicos, y algunos de ellos ya han sido reportados con propiedades bactericidas (11, 12). Por lo tanto, esto podría afectar la estructura y composición del microbiota, afectando la fermentación ruminal. Esto podría explicar la falta de correlación entre la ingesta de iniciador y el BOH en sangre.

Los resultados de la biometría indican que las becerras estaban dentro de los valores informados (60, 61), similares a los mostrados para becerras de 1 mes (62). La reducción de neutrófilos en banda no se correlacionó con la presencia de enfermedad bacteriana (63). De hecho, el tratamiento con la mezcla polihierbal estimuló genes como *Defa14*, reconocidos como péptidos antimicrobianos (64). En un experimento, la aflatoxina B1 disminuyó los neutrófilos en las becerras y la administración de colina ayudó a reducir los efectos adversos tóxicos (65).

## Variaciones de la expresión génica

El análisis de microarreglos nos permitió detectar cambios significativos en la expresión génica inducida por metabolitos en la mezcla polihierbal. El análisis de cambios en la expresión génica mediante análisis bioinformático (GSEA) dio como resultado la identificación de procesos metabólicos específicos implicados en el metabolismo de las becerras. Aunque este trabajo solo evalúa la expresión génica en leucocitos, las variaciones en la expresión observadas en estas células indican variaciones producidas en otras células. Los cambios en la expresión génica podrían explicar algunas variaciones observadas en el rendimiento de las becerras y cambios en las variables sanguíneas. La posible implicación fisiológica de esta variación plantea preguntas importantes sobre los metabolitos de la planta. Por ejemplo, la reducción en la expresión del gen *gcnt3* y sus implicaciones pueden ser importantes ya que este gen codifica la enzima responsable de la síntesis de todas las  $\beta 6$  N-acetilglucosaminidas, que juegan un papel importante en la glicosilación ligada a la biosíntesis de mucina y, en consecuencia, tiene implicaciones sobre el estado funcional de la mucosa del tracto intestinal y respiratorio (66).

En becerras tratadas con mezcla polihierbal, se redujo la expresión de genes codificantes para claudinas en leucocitos. Las claudinas son las principales proteínas transmembrana que regulan la permeabilidad del epitelio intestinal, controlando la difusión de iones y productos microbianos a través de la capa de células epiteliales (67, 68). Malmuthuge *et al.* (69) han reportado que la dieta regula la expresión de claudina 4 y ocludina, alterando la absorción de macromoléculas. Considerando que la modificación en la expresión de estos genes fue inducida por metabolitos en la mezcla polihierbal, la misma respuesta podría estar presente en las células del tracto gastrointestinal, modificando así la permeabilidad intestinal y la absorción de macromoléculas.

El análisis de enriquecimiento genético proporcionó una perspectiva sobre los cambios inducidos por el tratamiento polihierbal en diferentes etapas metabólicas. El aumento de la biosíntesis de pantotenato y CoA (Cuadro 8) tiene consecuencias importantes en el metabolismo energético, que se manifestaron en el crecimiento de las becerras y la expresión de *Pank4*, que codifica pantotenato quinasa, una enzima reguladora en la biosíntesis de CoA. El gen *Pank4* fosforila el pantotenato de vitamina a 4'-fosfopantotenato, que se convierte en CoA y participa en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, el metabolismo de los ácidos grasos y muchas otras reacciones del metabolismo intermediario (70). El ARNm de *Pank4* se regula positivamente a altas concentraciones de glucosa para permitir un mayor flujo a través del ciclo del ácido tricarboxílico (71).

La biosíntesis de la coenzima A y el aumento de la expresión del gen PPAR $\alpha$  inducido por la colina tienen implicaciones importantes. Aquí destaca PPAR $\alpha$  porque el grupo de proteínas nucleares denominado PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor) juega un papel clave en la regulación de vías metabólicas como el metabolismo de los lípidos (72), y es posible que la sobreexpresión de los genes *Acox1* (acetil CoA-oxidasa) y el gen *Cpt2* (carnitina palmitoil transferasa 2) está mediado por la regulación positiva de PPAR $\alpha$  y por otros efectos de la colina, como efectos antioxidantes, efectos lipotrópicos o por la actividad de *GSH-Px* (43).

El tratamiento con la mezcla polihierbal también estimuló un grupo de genes asociados con receptores nucleares en el metabolismo y la toxicidad de los lípidos (Figura 1). Existen receptores PPAR para ácidos grasos y genes del *citocromo P450* involucrados en el metabolismo de los lípidos; algunos genes del *citocromo P450* están relacionados con la desintoxicación de toxinas ambientales y el metabolismo de xenobióticos y fármacos (73); esto explica los efectos beneficiosos de la colina en becerras con aflatoxinas (65). La vía de

interacción del receptor ECM está involucrada en los tejidos adiposos y es importante para la adipogénesis y las macromoléculas funcionales (glicosaminoglicanos, colágeno, elastina, fibronectina y lamin), pero existen interacciones complejas con otras células que deben abordarse (74).

La estimulación del gen ribosomal sugiere que el tratamiento polihierbal simula la síntesis de proteínas, lo que coincide con la respuesta de crecimiento observada en las becerras; los ribosomas son los orgánulos celulares responsables de la síntesis de proteínas en las células (75). Los efectos de la estimulación de la vía de la sinapsis glutamatérgica en las becerras no están claros, pero se sabe que el glutamato es un neurotransmisor importante en el sistema nervioso central y que su estimulación afecta a los receptores, canales y transportadores de neurotransmisores (76), con efectos potenciales sobre la respuesta al estrés. En su revisión, Musazzi *et al.* (77) presentan evidencia de que los glucocorticoides y el estrés agudo aumentan los niveles de glutamato extracelular, afectando la liberación de glutamato en el cerebro; los autores destacan que el estrés crónico puede reducir el metabolismo del glutamato. En este sentido, los animales en confinamiento pueden sufrir estrés crónico y las becerras que recibieron una dosis de 3 g/d mostraron una mejor salud y ganancia de peso, esto nos lleva a inferir que esta vía podría haber reducido el estrés.

Los procesos de adhesión focal pueden haber mejorado las condiciones de salud de las becerras ya que participaron en la migración e invasión celular (78). Liu *et al.* (79) han demostrado que el fitoestrógeno genisteína a altas concentraciones reduce el daño en las células cardiovasculares inducidas por estradiol, afectando la vía de adhesión focal. La vía del Hippo desempeña un papel en el control del tamaño y la morfogénesis de los órganos, así como en el

desarrollo del cáncer (80). El crecimiento es un parámetro importante en las becerras y en este estudio se observaron cambios en las medidas morfológicas.

Los efectos generales reflejan los efectos combinados de los conjugados de colina y metabolitos secundarios de la mezcla polihierbal (11) sobre el metabolismo de los lípidos y la glucosa (59, 81) y sobre la respuesta inmunitaria (13, 17, 18); esto está de acuerdo con los efectos beneficiosos demostrados de los productos naturales de plantas medicinales usadas tradicionalmente (72), y puede haber sido relativo en comparación con la expresión génica en experimentos con productos de colina sintética (82).

El tratamiento con mezcla polihierbal podría tener un efecto importante en la expresión del gen PPAR $\alpha$ . Es importante para la inmunidad en las becerras porque se expresa predominantemente en las células T y B (83). Además, PPAR $\alpha$  es un importante regulador de la expresión génica en el epitelio del rumen durante el período de prerrumiante a rumiante y puede participar en la mediación del metabolismo energético dentro del epitelio del rumen para apoyar el desarrollo del rumen y la diferenciación de las papilas ruminales durante el destete (84, 85). Metabólicamente, los receptores PPAR inducen la proliferación de peroxisomas en las células, proceso que genera la transcripción del gen de la acil-CoA oxidasa (*Acox1*) (86); sin embargo, la validación del gen *Acox1* por qPCR no confirmó los resultados del microarreglo en los que se incrementó *Acox1*. Por otro lado, el aumento de la transcripción del gen PPAR $\alpha$  (Cuadro 9) puede explicarse por el mecanismo de acción de los conjugados de colina, principalmente la fosfatidilcolina, que suponemos es el principal metabolito involucrado en la estimulación de la expresión génica de *Pla2g6*, *Pla2g4e* y *Pla2g2d*, que codifican las fosfolipasas A2, implicadas en la hidrólisis del ácido araquidónico en la posición C2 de la fosfatidilcolina (87). La liberación de ácido araquidónico estimula la expresión de los genes

*Ptgds* y *Ptgis*, que codifican enzimas implicadas en la vía de la ciclooxigenasa para la producción de prostaglandinas y prostaciclina. Los genes *Alox12* y *Alox15* codifican enzimas implicadas en la vía de la lipoxigenasa, sintetizando los ácidos 12-HPETE (ácido 12-hidroperoxieicosatetraenoico), 15-HPETE (ácido 15-hidroperoxieicosatetraenoico) y *Cyp4a10*, que codifican la monooxigenasa para sintetizar ácido 20-hidroperoxieicosatetraenoico (20-HETE). Estos ácidos grasos derivados del ácido araquidónico se incorporan al proceso de  $\beta$ -oxidación, pero también actúan como agonistas de la expresión del gen PPAR $\alpha$  (88), factor de transcripción que reduce la respuesta inflamatoria por subregulación de genes inducida por citocinas, efecto atribuido a la interacción directa de PPAR $\alpha$  con la subunidad p65 de NF- $\kappa$ B, reduciendo su vínculo con el ADN (89). Esto explicaría la reducción en la expresión de los genes *Rel* y *RelA* de NF- $\kappa$ B. La ausencia de genes expresados diferencialmente (*Tnfa*, *Ifn*, *Il2*, *Il6*, *Il8*) que codifican citoquinas proinflamatorias y la menor producción de factores profibróticos como *Tgf- $\beta$ 1* (Cuadro 6) también explicaría la reducción en la expresión de antiinflamatorios como el gen de la interleucina 10 en becerros (90).

Además, la activación del factor de transcripción PPAR $\alpha$  por el ácido araquidónico u otros metabolitos derivados del ácido araquidónico, como el 20-HETE, y la unión con su receptor cis-9 ácido retinoico redujo la expresión de *Scd1*, *Nr1h3*, *Gyk2* y genes *Aqp7*, implicados en la gluconeogénesis, lipogénesis y metabolismo del colesterol, y aumentaron la expresión de los genes *Acsl4*, *Cyp4a1*, *Acox1*, *Cpt2* y *Mmp10*, implicados en el transporte y oxidación de ácidos grasos y en la diferenciación de adipocitos (90, 91).

A diferencia de PPAR $\alpha$ , la regulación a la baja de la transcripción del gen PPAR $\beta$  se explica por un agonista específico. Todos los receptores PPAR tienen un dominio de unión a ligando (LBD), lo que permite la activación de PPAR por ligandos de estructura polar,

particularmente por ácidos grasos (91). El ácido araquidónico (AA) y los metabolitos de AA se conectan con LBD y actúan como activadores naturales de PPAR $\alpha$  (92). Sin embargo, Naruhn *et al.* (93) identificaron que 15-HETE induce fuertemente la expresión de PPAR $\beta$  y, por el contrario, la inhibición de la síntesis de 15-HETE reduce la actividad transcripcional de PPAR $\beta$ . En este sentido, los genes regulados al alza codifican lipooxigenasas que sintetizan 12-HPETE y 15-HPETE (araquidonato 12-lipoxigenasa y araquidonato 15-lipoxigenasa), pero el microarreglo no identificó genes expresados diferencialmente que codificaran para el glutatión peroxidasa (*Gpx*), responsable de la síntesis de 12-HETE y 15-HETE a partir de 12-HPETE y 15-HPETE.

En las becerras destetadas, el estrés desencadena respuestas inflamatorias (94). El estrés prolongado suprime las funciones inmunitarias para permitir la supervivencia y, en consecuencia, aumenta la susceptibilidad a las enfermedades (95). Lewis *et al.* (45) han demostrado que la fosfatidilcolina puede estimular la respuesta inmune, resultando en una activación del gen PPAR $\alpha$  regulada al alza, modulando la respuesta proinflamatoria y previniendo su activación excesiva (91). Optimizar la salud de las becerras desde el nacimiento hasta el destete tendrá un impacto en la salud y el bienestar animal a largo plazo (96), lo que permitirá que los animales se desempeñen mejor en su primer parto y lactancia (97).

## CONCLUSIONES

El tratamiento de la mezcla polihierbal, en dosis de 4 g/d, podría mejorar el crecimiento y el estado de salud durante el período previo al destete del rumiante a través de la modificación de la expresión génica. El análisis de la expresión génica confirmó que el tratamiento con la mezcla herbal podría mejorar el metabolismo de los lípidos, los carbohidratos, las proteínas y también



la respuesta inmunitaria. Sin embargo, son necesarios más estudios que aporten evidencia de este aspecto. Nuestros resultados confirman la utilidad de los compuestos de plantas en la alimentación animal.

## REFERENCIAS

1. NAHMS, National Animal Health Monitoring System. Dairy Herd Management Practices Focusing on Preweaned Heifers. Fort Collins, CO: USDA, Animal and Plant Health Inspection Service, Veterinary Services (1993).
2. USDA, -APHIS. (2012). Dairy Heifer Raiser 2011: A Study of Operations that Specialize in Raising Dairy Heifers. Fort Collins, CO: USDA-APHIS-VS, CEAH, National Animal Health Monitoring System (NAHMS).
3. Tao S, Dahl GE. Heat stress effects during late gestation on dry cows and their calves. *J. Dairy Sci.* (2013) 96:4079–93. doi: 10.3168/jds.2012-6278.
4. Roland L, Drillich M, Klein-Jöbstl D, Iwersen M. Influence of climatic conditions on the development, performance, and health of calves. *J. Dairy Sci.* (2016) 99:2438–52. doi: 10.3168/jds.2015-9901.
5. Obedat BS, Cobb CJ, Sellers MD, Pepper-Yowell AR, Earleywine TJ, Ballou MA. Plane nutrition during the preweaning period but not the grower phase influences the neutrophil activity of Holstein calves. *J. Dairy Sci.* (2013) 96:7155–66. doi: 10.3168/jds.2013-6699.
6. Jouany JP, Morgavi DP. Use of ‘natural’ products as alternatives to antibiotic feed additives in ruminant production. *Animal.* (2007) 1:1443–66. doi: 10.1017/S1751731107000742.
7. Dutil L, Irwin R, Finley R, Ng LK, Avery B, Boerlin P. Ceftiofur resistance in *Salmonella enterica* serovar Heidelberg from chicken meat and humans. *Can. Emerg. Infect. Dis.* (2010) 16:48–54. doi: 10.3201/eid1601.090729.

8. Frankic T, Voljc M, Salobir J, Rezar V. Use of herbs and spices and their extracts in animal nutrition. *Acta Agric. Slov.* (2009) 94:95–102. Available online at: <http://aas.bf.uni-lj.si/zootehnika/94-2009/PDF/94-2009-2-95-102.pdf>.
9. Greathead H. Plants and plant extracts for improving animal productivity. *Proc. Nutr. Soc.* (2003) 62:279–90. doi: 10.1079/PNS2002197.
10. Crosby M, Mendoza-Martínez GD, Relling A, Vázquez VA, Lee-Rangel HA, Martínez JA. Influence of supplemental choline on milk yield, fatty acid profile, and postpartum weight changes in suckling ewes. *J. Dairy Sci.* (2017) 100:125. doi: 10.1016/S0022-0302(20)30813-4.
11. Mendoza GD, Oviedo MF, Pinos JM, Lee-Rangel HA, Vázquez A, Flores R. Milk production in dairy cows supplemented with herbal choline and methionine. *Rev. Fac. Cien. Agrar. Univ. Nac. Cuyo.* (2019) 1:1853–8665. Available online at: <http://revistas.uncu.edu.ar/ojs/index.php/RFCA/article/view/3076>.
12. Martínez-Aispuro JA, Mendoza GD, Cordero-Mora JL, Ayala-Monter MA, Sánchez-Torres MT, Figueroa-Velasco JL, *et al.* Evaluation of an herbal choline feed plant additive in lamb feedlot rations. *R Bras. Zootec.* (2019) 48:1–7. doi: 10.1590/rbz4820190020.
13. Lewis ED, Richard C, Goruk S, Dellschaft NS, Curtis JM, Jacobs RL, *et al.* The form of choline in the maternal diet affects immune development in suckled rat offspring. *J. Nutr.* (2015) 146:823–30. doi: 10.3945/jn.115.225888.
14. Prescott SM, Zimmerman GA, Stafforini DM, McIntyre TM. Plateletactivating factor and related lipid mediators. *Annu. Rev. Biochem.* (2000) 69:419–45. doi: 10.1146/annurev.biochem.69.1.419.
15. McIntyre TM, Prescott SM, Stafforini DM. The emerging roles of PAF acetyl hydrolase. *J. Lipid Res.* (2009) 50:255–9. doi: 10.1194/jlr.R800024-JLR200.

16. Lima FS, Sa-Filho MF, Greco LF, Santos JEP. Effects of feeding rumen-protected choline on incidence of diseases and reproduction of dairy cows. *Vet. J.* (2012) 193:140–5. doi: 10.1016/j.tvjl.2011.09.019.
17. Sun F, Cao Y, Cai C, Li S, Yu C, Yao J. Regulation of nutritional metabolism in transition dairy cows: energy homeostasis and health in response to post-ruminal choline and methionine. *PloS ONE.* (2016) 11:e0160659. doi: 10.1371/journal.pone.0160659.
18. Vailati-Riboni M, Zhou Z, Jacometo CB, Minuti A, Trevisi E, Luchini DN, *et al.* Supplementation with rumen-protected methionine or choline during the transition period influences whole-blood immune response in periparturient dairy cows. *J. Dairy Sci.* (2017) 100:3958–68. doi: 10.3168/jds.2016-11812.
19. CIOMS. Council for International Organizations of Medical Sciences. International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals. (2012). Available Online at: <https://cioms.ch/wp-content/uploads/2017/01/ResarchInvolvingAnimals.pdf> (accessed December 31, 2020).
20. Parish AJ, Bourg MB, Marks LM, Simmons BN, Smith T. Evaluation of different methods of cattle hip height data collection. *Prof. Anim. Sci.* (2012) 28:292–9. doi: 10.15232/S1080-7446(15)30358-2.
21. Fleige S, Pfaf MW. RNA integrity and the effect on the realtime qRT-PCR performance. *Mol. Aspects Med.* (2006) 27:126–39. doi: 10.1016/j.mam.2005.12.003.
22. Sherman TB, Lempicki AR. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat. Protoc.* (2009) 4:44–57. doi: 10.1038/nprot.2008.211.
23. Oliveira DM, Chalfun-Junior A, ChizzottiML, Barreto HG, Coelho TC, Paiva LV, *et al.* Expression of genes involved in lipid metabolism in the muscle of beef cattle fed

- soybean or rumen-protected fat, with or without monensin supplementation. *J. Anim. Sci.* (2014) 92:5426–36. doi: 10.2527/jas.2014-7855.
24. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>11CT method. *Methods.* (2001) 25:402–8. doi: 10.1006/meth.2001.1262.
  25. Mirman D. Growth Curve Analysis and Visualization using R. The R Series. London: Chapman & Hall/CRC Press; Taylor & Francis Group (2016).
  26. Steel RGD, Torrie JH. Principles and Procedures of Statistics a Biometrical Approach. 2nd ed. New York, NY: McGraw-Hill Book Co. (1980).
  27. Draper NR, Smith H. Applied Regression Analysis. 3rd ed. New York, NY: Wiley (1998). doi: 10.1002/9781118625590.
  28. Hollenbeck CB. An introduction to the nutrition and metabolism of choline. *Cent. Nerv. Syst. Agents Med. Chem.* (2012) 12:100–13. doi: 10.2174/187152412800792689.
  29. Zeisel SH. A brief history of choline. *Ann. Nutr. Metab.* (2012) 61:254–8. doi: 10.1159/000343120.
  30. Li Z, Vance DE. Thematic review series: glycerolipids. Phosphatidylcholine and choline homeostasis. *J. Lipid Res.* (2008) 49:1187–94. doi: 10.1194/jlr.R700019-JLR200.
  31. Zeisel SH, Da Costa KA. Choline: an essential nutrient for public health. *Nutr. Rev.* (2009) 67:615–23. doi: 10.1111/j.1753-4887.2009.00246.x.
  32. NRC. Nutrient Requirements of Beef Cattle: Update 2000. 7th Revised ed. Washington, DC: National Academy of Sciences (2000).
  33. Pinotti L, Paltanin C, Campagnoli A, Cavassini P, Dell’Orto V. Rumen protected choline supplementation in beef cattle: effect on growth performance. *Ital. J. Anim. Sci.* (2009) 8:322–24. doi: 10.4081/ijas.2009.s2.322.

34. Bindel DJ, Drouillard JS, Titgemeyer EC, Wessels RH, Loest CA. Effects of ruminally protected choline and dietary fat on performance and blood metabolites of finishing heifers. *J. Anim. Sci.* (2000) 78:2497–503. doi: 10.2527/2000.78102497x.
35. Hajilou M, Dehghan-Banadaky M, Zali A, Rezayazdi K. The effects of dietary L-carnitine and rumen-protected choline on growth performance, carcass characteristics and blood and rumen metabolites of Holstein Young bulls. *J. Appl. Anim. Res.* (2014) 42:89–96. doi: 10.1080/09712119.2013.822807.
36. Hill TM, Aldrich JM, Schlotterbeck RL, Bateman H. Amino Acids, fatty acids, and fat sources for calf milk replacers. *Prof. Anim. Sci.* (2007) 23:401–8. doi: 10.15232/S1080-7446(15)30995-5.
37. Santos FHR, De Paula RM, Lezier D, Silva TJ, Santos G, Bittar CMM. Essential oils for dairy calves: effects on performance, scours rumen fermentation and intestinal fauna. *Animal.* (2015) 9:958–65. doi: 10.1017/S175173111500018X.
38. Froehlich AK, Abdelsalam WK, Chase C, Koppien-Fox J, Casper PD. Evaluation of essential oils and prebiotics for newborn dairy calves. *J. Anim. Sci.* (2017) 95:3772–82. doi: 10.2527/jas.2017.1601.
39. Li H, Wang H, Yu L, Wang M, Liu S, Sun L, *et al.* Effects of supplementation of rumen-protected choline on growth performance, meat quality and gene expression in longissimus dorsi muscle of lambs. *Arch. Anim. Nutr.* (2015) 69:340–50. doi: 10.1080/1745039X.2015.1073001.
40. Pino F, Urrutia NL, Gelsinger SL, Gehman AM, Heinrichs AJ. Longterm effect of organic trace minerals on growth, reproductive performance, and first lactation in dairy heifers. *Prof. Anim. Sci.* (2018) 34:51–8. doi: 10.15232/pas.2017-01680.

41. Jiang X, Liu X, Liu S, Li Y, Zhao HB, Zhang YG. Growth, rumen fermentation and plasma metabolites of Holstein male calves fed fermented corn gluten meal during the postweaning stage. *Anim. Feed Sci. Technol.* (2019) 249:1–9. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2019.01.012.
42. Saldana DJ, Jones CM, Gehman AM, Heinrichs AJ. Effects of once-versus twice-a-day feeding of pasteurized milk supplemented with yeast-derived feed additives on growth and health in female dairy calves. *J. Dairy Sci.* (2019) 102:3654–60. doi: 10.3168/jds.2018-15695.
43. Zhu J, Wu Y, Tang Q, Leng Y, Cai W. The effects of choline on hepatic lipid metabolism, mitochondrial function and antioxidative status in human hepatic C3A cells exposed to excessive energy substrates. *Nutrients.* (2014) 6:2552–71. doi: 10.3390/nu6072552.
44. Yilmaz T, Koçcan EG, Besler HT, Yilmaz G, Gürsel B. The role of oxidants and antioxidants in otitis media with effusion in children. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* (2004) 131:797–803. doi: 10.1016/j.otohns.2004.07.001.
45. Lewis ED, Goruk S, Richard C, Dellschaft NS, Curtis JM, Jacobs RL, *et al.* Feeding a diet devoid of choline to lactating rodents restricts growth and lymphocyte development in offspring. *Br. J. Nutr.* (2016) 116:1001–12. doi: 10.1017/S0007114516002919.
46. Teixeira AGV, Lima FS, Bicalho MLS, Kussler A, Lima SF, Felipe MJ, *et al.* Effect of an injectable trace mineral supplement containing selenium, copper, zinc, and manganese on immunity, health, and growth of dairy calves. *J. Dairy Sci.* (2014) 97:4216–26. doi: 10.3168/jds.2013-7625.
47. Lindholm-Perry AK, Kuehn LA, McDanel TG, Miles JR, Workman AM, Chitko-McKown CG, *et al.* Complete blood count data and leukocyte expression of cytokine genes and

- cytokine receptor genes associated with bovine respiratory disease in calves. *BMC Res. Notes.* (2018) 11:786. doi: 10.1186/s13104-018-3900-x.
48. Knowles GT, Edwards EJ, Bazeley JK, Brown NS, Butterworth A, Warriss P. Changes in blood biochemical and hematological profile of neonatal calves with age. *Vet. Rec.* (2000) 147:593–8. doi: 10.1136/vr.147.21.593.
49. Khosla P, Bhanwra S, Singh J, Seth S, Srivastava RK. A study of hypoglycemic effects of *Azadirachta indica* (Neem) in normal and alloxan diabetic rabbits. *Indian J. Physiol. Pharmacol.* (2000) 44:69–74. Available online at: [https://ijpp.com/IJPP%20archives/2000\\_44\\_1/69-74.pdf](https://ijpp.com/IJPP%20archives/2000_44_1/69-74.pdf).
50. Zhao H, Raines LN, Huang SC. Carbohydrate and amino acid metabolism as hallmarks for innate immune cell activation and function. *Cells.* (2020) 9:562. doi: 10.3390/cells9030562.
51. Jezek J, Klopčič M, Klinkon M. Influence of age on biochemical parameters in calves. *Bull. Vet. Inst. Pulawy.* (2006) 50:211–4. Available online at: <http://www.piwet.pulawy.pl/bulletin/images/stories/pdf/20062/20062211214.pdf>.
52. Nozad S, Ramin GA, Rezaie AS. Diurnal variations in milk macro-mineral concentrations in Holstein dairy cows in Urmia, Iran. *Vet. Res. Forum.* (2012) 3:281–5. doi: 10.2298/AVB1101003N.
53. Issi M, Gül Y, Başbuğ O. Evaluation of renal and hepatic functions in cattle with subclinical and clinical ketosis. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* (2016) 40:47–52. doi: 10.3906/vet-1505-16.
54. Eggum OB, Juliano OB, Maningat CC. Protein and energy utilization of rice milling fractions by rats. *Plant Food Hum. Nutr.* (1982) 31:371–6. doi: 10.1007/BF01094048.



55. Dufour DR, Lott JA, Nolte FS, Gretch DR, Koff RS, Seeff LB. Diagnosis and monitoring of hepatic injury. I. Performance characteristics of laboratory tests. *Clin. Chem.* (2000) 46:2027–49. doi: 10.1093/clinchem/46.12.2027.
56. Rowland A, Miners JO, Mackenzie PI. The UDP-glucuronosyltransferases: their role in drug metabolism and detoxification. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* (2013) 45:1121–32. doi: 10.1016/j.biocel.2013.02.019.
57. Mohamed MEF, Frye RF. Effects of herbal supplements on drug glucuronidation. Review of clinical, animal, and in vitro studies. *Planta Med.* (2011) 77:311–21. doi: 10.1055/s-0030-1250457.
58. Biswas S, Giri S. Importance of choline as essential nutrient and its role in prevention of various toxicities. *Prague Med. Rep.* (2015) 116:5–15. doi: 10.14712/23362936.2015.40.
59. Mehedint MG, Zeisel SH. Choline's role in maintaining liver function: new evidence for epigenetic mechanisms. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* (2013) 16:339–45. doi: 10.1097/MCO.0b013e3283600d46.
60. Leach RJ, Chitko-McKown CG, Bennett GL, Jones SA, Kachman SD, Keele JW, *et al.* The change in differing leukocyte populations during vaccination to bovine respiratory disease and their correlations with lung scores, health records, and average daily gain. *J. Anim. Sci.* (2013) 91:3564–73. doi: 10.2527/jas.2012-5911.
61. Roland L, Drillich M, Iwersen M. Hematology as a diagnostic tool in bovine medicine. *J. Vet. Diagn. Invest.* (2014) 26:592–8. doi: 10.1177/1040638714546490.
62. Benesi FJ, Teixeira C, Leal ML, Lisboa JA, Mirandola R, Shecaira CL, *et al.* Leukograms of healthy Holstein calves within the first month of life. *Pesq. Vet. Bras.* (2012) 32:352–6. doi: 10.1590/S0100-736X2012000400013.

63. Honda T, Uehara T, Matsumoto G, Arai S, Sugano M. Neutrophil left shift and white blood cell count as markers of bacterial infection. *Clin. Chim. Acta.* (2016) 457:46–53. doi: 10.1016/j.cca.2016.03.017.
64. Cunliffe RN. Alpha-defensins in the gastrointestinal tract. *Mol. Immunol.* (2003) 40:463–7. doi: 10.1016/S0161-5890(03)00157-3.
65. Naseer O, Khan JA, Khan MS, Omer MO, Chishti GA, Sohail ML, *et al.* Comparative efficacy of silymarin and choline chloride (liver tonics) in preventing the effects of aflatoxin B1 in bovine calves. *Pol. J. Vet. Sci.* (2016) 19:545–51. doi: 10.1515/pjvs-2016-0068.
66. Hansson GC. Mucus and mucins in diseases of the intestinal and respiratory tracts. *J. Intern Med.* (2019) 285:479–90. doi: 10.1111/joim.12910.
67. Ulluwishewa D, Anderson R, McNabb W, Moughan P, Wells J, Roy N. Regulation of tight junction permeability by intestinal bacteria and dietary components. *J. Nutr.* (2011) 141:769–76. doi: 10.3945/jn.110.135657.
68. Edward JH. Clinical laboratory evaluation of small intestinal function. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* (1999) 29:441–69. doi: 10.1016/S0195-5616(99)50030-2.
69. Malmuthuge N, Li M, Goonewardene AL, Oba M, Guan LL. Effect of calf starter feeding on gut microbial diversity and expression of genes involved in host immune responses and tight junctions in dairy calves during weaning transition. *J. Dairy Sci.* (2013) 96:3189–200. doi: 10.3168/jds.2012-6200.
70. Rock CO, Calder RB, KarimMA, Jackowski S. Pantothenate kinase regulation of the intracellular concentration of coenzyme A. *J. Biol. Chem.* (2000) 275:1377–83. doi: 10.1074/jbc.275.2.1377.

71. Li Y, Chang Y, Zhan L, Feng Q, Liu Z, Zhang Y, *et al.* High glucose upregulates pantothenate kinase 4 (PanK4) and thus affects M2-type pyruvate kinase (Pkm2). *Mol. Cell Biochem.* (2005) 277:117–25. doi: 10.1007/s11010-005-5535-1.
72. Wang L, Waltenberger B, Pferschy-Wenzig EM, Blunder M, Liu X, Malainer C, *et al.* Natural product agonists of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ): a review. *Biochem. Pharmacol.* (2014) 92:73–89. doi: 10.1016/j.bcp.2014.07.018.
73. Slenter DN, Kutmon M, Hanspers K, Riutta A, Windsor J, Nunes N, *et al.* WikiPathways: a multifaceted pathway database bridging metabolomics to other omics research. *Nucleic Acids Res.* (2017) 46:661–7. doi: 10.1093/nar/gkx1064.
74. Lee HJ, Jang M, Kim H, Kwak W, Park W, Hwang JY, *et al.* Comparative transcriptome analysis of adipose tissues reveals that ECM-receptor interaction is involved in the depot-specific adipogenesis in cattle. *PLoS ONE.* (2013) 8:e66267. doi: 10.1371/journal.pone.0066267.
75. Yoshihama M, Uechi T, Asakawa S, Kawasaki K, Kato S, Higa S, *et al.* The human ribosomal protein genes: sequencing and comparative analysis of 73 genes. *Genome Res.* (2002) 12:379–90. doi: 10.1101/gr.214202.
76. Korte M, Schmitz D. Cellular and system biology of memory: timing, molecules, and beyond. *Physiol. Rev.* (2016) 96:647–93. doi: 10.1152/physrev.00010.2015.
77. Musazzi L, Treccani G, Mallei A, Popoli M. The action of antidepressants on the glutamate system: regulation of glutamate release and glutamate receptors. *Biol. Psychiatry.* (2013) 73:1180–8. doi: 10.1016/j.biopsych.2012.11.009.
78. Zhang J, Hochwald SN. The role of FAK in tumor metabolism and therapy. *Pharmacol. Therapeut.* (2014) 142:154–63. doi: 10.1016/j.pharmthera.2013.12.003.

79. Liu B, Xu L, Yu X, Jiao X, Yan J, Li W, *et al.* Genistein inhibited estradiol-induced vascular endothelial cell injury by downregulating the FAK/Focal adhesion pathway. *Cell Physiol. Biochem.* (2018) 49:2277–92. doi: 10.1159/000493830.
80. Zhao B, Li L, Lei Q, Guan KL. The Hippo–YAP pathway in organ size control and tumorigenesis: an updated version. *Genes Dev.* (2010) 24:862–74. doi: 10.1101/gad.1909210.
81. Serviddio G, Giudetti AM, Bellanti F, Priore P, Rollo T, Tamborra R, *et al.* Oxidation of Hepatic Carnitine Palmitoyl Transferase-I (CPT-I) impairs fatty acid beta-oxidation in rats fed a methionine-choline deficient diet. *PLoS ONE.* (2011) 6:e24084. doi: 10.1371/journal.pone.0024084.
82. Goselink RMA, Van Baal J, Widjaja HCA, Dekker RA, ZomRLG, De VethMJ, *et al.* Effect of rumen-protected choline supplementation on liver and adipose gene expression during the transition period in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* (2013) 96:1102–16. doi: 10.3168/jds.2012-5396.
83. Fritsche K. Fatty acids as modulators of the immune response. *Annu. Rev. Nutr.* (2006) 26:45–73. doi: 10.1146/annurev.nutr.25.050304.092610.
84. Connor EE, Baldwin RL, Li CJ, Li RW, Chung H. Gene expression in bovine rumen epithelium during weaning identifies molecular regulators of rumen development and growth. *Funct. Integr. Genomics.* (2013) 13:133–42. doi: 10.1007/s10142-012-0308-x.
85. Naeem A, Drackley JK, Stamey J, Loor JJ. Role of metabolic and cellular proliferation genes in ruminal development in response to enhanced plane of nutrition in neonatal Holstein calves. *J. Dairy Sci.* (2012) 95:1807–20. doi: 10.3168/jds.2011-4709.

86. Bionaz M, Chen S, Khan JM, Loor JJ. Functional role of PPARs in ruminants: potential targets for fine-tuning metabolism during growth and lactation. *PPAR Res.* (2013) 684159:28. doi: 10.1155/2013/684159.
87. Varga T, Czimmerer Z, Nagy L. PPARs are a unique set of fatty acid regulated transcription factors controlling both lipid metabolism and inflammation. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* (2011) 1812:1007–22. doi: 10.1016/j.bbadis.2011.02.014.
88. Chinetti G, Fruchart CJ, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation. *Inflamm. Res.* (2000) 49:497–505. doi: 10.1007/s000110050622.
89. Zuñiga J, Cancino M, Medina F, Varela P, Vargas R, Tapia G, *et al.* N-3 PUFA supplementation triggers PPAR- $\alpha$  activation and PPAR- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B interaction: anti-inflammatory implications in liver ischemia-reperfusion injury. *PloS ONE.* (2011) 6:e28502. doi: 10.1371/journal.pone.0028502.
90. Subramanian V, Seemann I, Merl-Pham J, Hauck MS, Stewart AF, Atkinson JM, *et al.* Role of TGF Beta and PPAR alpha signaling pathways in radiation response of locally exposed heart: integrated global transcriptomics and proteomics analysis. *J. Proteome Res.* (2017) 16:307–18. doi: 10.1021/acs.jproteome.6b00795.
91. Korbecki J, Bobiński R, Dutka M. Self regulation of the inflammatory response by peroxisome proliferator activated receptors. *Inflamm. Res.* (2019) 68:443–58. doi: 10.1007/s00011-019-01231-1.
92. Barry OP, Kazanietz MG, Praticò D, FitzGerald GA. Arachidonic acid in platelet microparticles up-regulates cyclooxygenase-2-dependent prostaglandin formation via a protein kinase C/mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* (1999) 274:7545–56. doi: 10.1074/jbc.274.11.7545.

93. Naruhn S, Maissner W, Adhikary T, Kaddatz K, Klein T, Watzer B, *et al.* 15-hydroxyeicosatetraenoic acid is a preferential peroxisome proliferator-activated receptor b/d agonist. *Mol. Pharmacol.* (2010) 77:171–84. doi: 10.1124/mol.109.060541.
94. Martin LB. Stress and immunity in wild vertebrates: timing is everything. *Gen. Comp. Endocrinol.* (2009) 163:70–6. doi: 10.1016/j.ygcen.2009.03.008.
95. Salak-Johnson JL, McGlone JJ. Making sense of apparently conflicting data: stress and immunity in swine and cattle. *J. Anim. Sci.* (2007) 85:E81–8. doi: 10.2527/jas.2006-538.
96. Hulbert LE, Moisés SJ. Stress, immunity, and the management of calves. *J. Dairy Sci.* (2016) 99:3199–216. doi: 10.3168/jds.2015-10198.
97. Heinrichs AJ, Heinrichs BS. A prospective study of calf factors affecting firstlactation and lifetime milk production and age of cows when removed from the herd. *J. Dairy Sci.* (2011) 94:336–41. doi: 10.3168/jds.2010-3170.

## **7 CAPÍTULO 3. EFECTO DE BIOCOLINA EN GENES IMPLICADOS EN EL METABOLISMO DE LÍPIDOS E INMUNIDAD EN BECERRAS HOLSTEIN EN CRECIMIENTO**

### **INTRODUCCIÓN**

La evolución de la genética molecular, secuenciación, así como las técnicas moleculares de amplificación de regiones específicas han aumentado las posibilidades de poder detectar cambios en genes que ejercen un efecto significativo en el comportamiento productivo de los animales (Blasco y Toro, 2014), la mayoría de las investigaciones realizadas orientadas a estudios genéticos en animales de producción se han enfocado principalmente en la identificación de genes que influyen económicamente en los sistemas de producción (carne o leche) encaminándose a eficiencia reproductiva, longevidad y salud (Komisarek y Dorynek, 2009).

En los sistemas de producción lechera, las becerras constituyen la base primordial como futuros reemplazos, por lo cual al nacimiento necesitan adaptarse y suplir la alimentación y nutrientes vía placenta por medio de calostro o sustitutos de leche (Hammon *et al.*, 2012), por medio del calostro las becerras obtienen las inmunoglobulinas necesarias para estimular el crecimiento, fortaleciendo la funcionalidad del tracto gastrointestinal (Blum y Hammon, 2000; Hernández-Castellano *et al.*, 2015), promoviendo la proliferación de bacterias benéficas (Malmuthuge *et al.*, 2015; Ma *et al.*, 2019) que mejoran el estatus de absorción de glucosa mediante el desarrollo del epitelio intestinal de las becerras (Steinhoff-Wagner *et al.*, 2014; Gruse *et al.*, 2015) reduciendo de esta manera la susceptibilidad de diarreas y neumonías (Kargar

*et al.*, 2020). Por lo cual el objetivo de este estudio fue analizar los genes implicados en el metabolismo de lípidos e inmunidad en becerras en crecimiento.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Derivado del análisis de microarreglos llevado a cabo en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM empleando el chip heterólogo de ratón M22K\_10\_16, previamente descrito (Capítulo 2) y del cual se elaboró el artículo “Influence of a Polyherbal Mixture in Dairy Calves: Growth Performance and Gene Expression”; DOI: 10.3389/fvets.2020.623710, se empleó la base de genes que mostró el microarreglo para la identificación de aquellos genes que participaron en el metabolismo de ácidos grasos e inmunidad y que presentaron efectos en el crecimiento de las becerras.

### **Análisis de enriquecimiento de genes**

Para el análisis de enriquecimiento funcional de genes se utilizó la Base de Datos para la Anotación, Visualización y Descubrimiento Integrado (DAVID; <https://david.ncifcrf.gov/>), así como la base de datos GO (<http://www.geneontology.org>), la cual contiene términos para la clasificación funcional de los datos genómicos visualizándolos en tres categorías principales: procesos biológicos, componentes celulares y función molecular (Dennis *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2007).

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### *Genes implicados en el metabolismo de lípidos*

En el Cuadro 10 se muestran los genes identificados en el metabolismo de lípidos, en donde se observa que el producto herbal Biocolina estimuló los genes *Acadm*, *Nr3c1*, *Cpt1a* y *Ppara*, los



cuales están involucrados en procesos de metabolismo y transporte de lípidos (oxidación de ácidos grasos), y como reguladores de la transcripción (Mandard *et al.*, 2004; Schäff *et al.*, 2014). La expresión del gen *Bckdhb*, se ha asociado con un óptimo consumo de calostro en la becerria, lo cual beneficia el desarrollo del epitelio intestinal incluyendo síntesis de proteínas en el intestino delgado (Steinhoff-Wagner *et al.*, 2014).

Cuadro 10. Genes implicados en el metabolismo de lípidos en becerras lecheras.

Accesión del Genbank	Símbolo	Gen
<b>Metabolismo de lípidos</b>		
NM_007382	Acadm	Acil-Coenzima A deshidrogenasa, cadena media
L16992	Bckdhb	Deshidrogenasa de cetoácidos de cadena ramificada E1, polipéptido beta
NM_009995	Cyp21a1	Citocromo P450, familia 21, subfamilia a, polipéptido 1
AF017175	Cpt1a	Carnitina palmitoiltransferasa 1a, hígado
NM_019423	Elovl2	Elongación de ácidos grasos de cadena larga
NM_007453	Prdx6	Peroxiredoxina 6

Por otra parte, la expresión del gen *Cyp21a1* (Cytochrome P450) se ha demostrado que codifica enzimas clave en la producción de esteroides y glucocorticoides en tejidos de íleon y colon en becerras recién nacidas (Hromádková *et al.*, 2020). De la misma forma se observó una expresión del gen *Elovl2*, el cual está involucrado en la biosíntesis y metabolismo de lípidos siendo esencial para la síntesis de omega-3, ácido docosahexaenoico (Gregory *et al.*, 2013), homeostasis de la glucosa (Bellini *et al.*, 2018). También controla la elongación de ácidos grasos

polinsaturados de 22 carbonos para dar formación a ácidos grasos de 24 carbonos para la producción de DHA y DPA (Pauter *et al.*, 2014). Se ha reportado que la sobreexpresión del gen Prdx6 es un factor clave en la eliminación de especies reactivas de oxígeno y regula la expresión génica limitando sus niveles para el mantenimiento de la homeostasis celular (Fatma *et al.*, 2005), y en la transducción de señales intra e intercelulares (Fisher, 2018). La expresión de estos genes por efecto del producto herbal explican los cambios observados en el crecimiento de las becerras confiriendo funciones como reguladores de la transcripción, control de la homeostasis, síntesis de glucosa, además de beneficiar el desarrollo del epitelio intestinal de la becerria.

#### *Genes identificados en inmunidad de becerras en crecimiento*

La inclusión de Biocolina estimuló la expresión de genes relacionados en procesos de inmunidad de becerras en crecimiento (Cuadro 11), tales como el gen Gapdh, el cual se ha demostrado que participa en procesos como apoptosis, glucólisis, inmunidad innata y regulador de la traducción, así mismo se ha relacionado en la adipogénesis en ovinos aumentando la actividad del gen glicerol 3-fosfato deshidrogenasa (Soret *et al.*, 1999), del mismo modo se observó una expresión del gen Pglyrp1 implicado en procesos de inmunidad innata, desempeñando funciones de defensa antimicrobiana reconociendo y eliminando patógenos (Dziarski y Gupta, 2006; Osanai *et al.*, 2011).

Cuadro 11. Genes en inmunidad de becerras lecheras.

Accesión del Genbank	Símbolo	Gen
<b>Inmunidad</b>		
NM_008084	Gapdh	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
NM_009402	Pglyrp1	Proteína de reconocimiento del peptidoglicano 1
NM_008173	Nr3c1	Subfamilia de receptores nucleares 3, grupo C, miembro 1
NM_011144	Ppara $\alpha$	Receptor alfa activado por el proliferador de peroxisomas
L28116	Ppara $\delta$	Receptor del activador del peroxisoma delta
NM_008904	Ppargc1a	Receptor proliferativo activado de peroxisomas, gamma, coactivador 1 alfa
NM_011905	Tlr2	Receptor tipo Toll 2
NM_011604	Tlr6	Receptor tipo Toll 6
NM_011346	Sell	Selectina, linfocitos

La caracterización de los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs) es poco conocida en rumiantes, la inclusión de BioCholine mostró una expresión del gen Ppara $\alpha$ , su activación aumenta la oxidación de ácidos grasos en el hígado (Capon *et al.*, 2002), además de incrementar la gluconeogénesis activando el gen piruvato carboxilasa, el cual es una enzima clave para la gluconeogénesis (Mandard *et al.*, 2004; White *et al.*, 2011), así mismo se observó una expresión del gen Ppara $\delta$  el cual controla el catabolismo de ácidos grasos en músculo esquelético y corazón (Desvergne *et al.*, 2006), del mismo modo se observó una expresión del gen Ppargc1a involucrado en ritmos biológicos y como regulador de la

transcripción, se ha demostrado su participación en procesos metabólicos tales como homeostasis, energética celular, incluida la termogénesis adaptativa, adipogénesis, así como la gluconeogénesis, su expresión es inducida y coordinada a través de la interacción específica de una variedad de factores de transcripción (Puigserver, 2005; Liang y Ward, 2006). Del mismo modo, el producto herbal estimulo la expresión de genes relacionados al reconocimiento de patógenos, la interacción entre el microbiota del intestino y los receptores TLRs, pueden ayudar a mantener la homeostasis de la inmunidad intestinal (Yiu *et al.*, 2017), influir en las funciones de barrera de la mucosa (Abreu, 2010), así como la integridad intestinal (Rakoff-Nahoum *et al.*, 2004). Los genes Tlr2 y Tlr6 están implicados en procesos de inmunidad, respuesta inflamatoria e inmunidad innata, se ha demostrado su importancia en el reconocimiento de los componentes de la pared celular de bacterias gram positivas (Melmed *et al.*, 2003); por su parte Mucha *et al.* (2009), demostraron que al existir una mutación del gen Tlr2 origina mayor susceptibilidad a infecciones por *Mycobacterium avium paratuberculosis* en vacas. Así mismo se observó una expresión del gen Sell (I-selectina), glicoproteína que ejerce una función en la adhesión de leucocitos y células endoteliales (Abdelrahman *et al.*, 2005), su expresión refleja el potencial de las proteínas presentes en el calostro para desencadenar procesos de inflamación, además de preparar una respuesta inmunitaria innata (Osorio *et al.*, 2013). El proporcionar el producto herbal BioCholine a becerras en crecimiento mostró efectos positivos en la expresión de genes relacionados a inmunidad, estimulando la inmunidad innata, ejerciendo funciones de defensa antimicrobiana reconociendo y eliminando patógenos, manteniendo la homeostasis de la inmunidad intestinal y actuando como barrera de la mucosa; confiriendo de este modo un sistema inmune fortalecido disminuyendo la incidencia de las principales enfermedades en becerras en crecimiento.

Por otra parte, en la Figura 2 se muestra la agrupación por componente celular y función molecular de los genes previamente descritos, en donde se puede observar que los genes Cyp21a1, Cpt1a, Elovl2, Prdx6, Pglyrp1, Ppargc1a, Tlr2 y Tlr6 forman parte del citoplasma de la célula, los genes Acadm, Bckdhb y Nr3c1 se encuentran en mitocondrias, mientras que los genes Gapdh, Para y Ppar $\delta$  forman parte del núcleo celular. Así mismo desempeñan funciones específicas tales como transferasas, encargados de transferir un grupo químico, por ejemplo, un grupo metilo o un grupo glucósido de un compuesto donante a otro aceptor (Gao *et al.*, 2013), otros genes presentan unión específica al DNA actuando como proteína que se une al DNA, normalmente para empaquetar, modificarlo o para regular la expresión génica, entre las proteínas que reconocen secuencias específicas de DNA, hay una serie de motivos conservados característicos que se cree que son esenciales para la especificidad (Kim *et al.*, 2018). Del mismo modo se observan genes que ejercen funciones de oxidorreductasa, catalizando la oxidación de un compuesto con la reducción de otro (Samson *et al.*, 2014). Algunos otros presentan unión al RNA, como proteínas de unión, mientras que otros su función principal es la de receptores que se unen o responden a un ligando con gran especificidad (Rørvig *et al.*, 2013). Así mismo se observaron genes con acción antimicrobiana ejerciendo función de antibióticos.

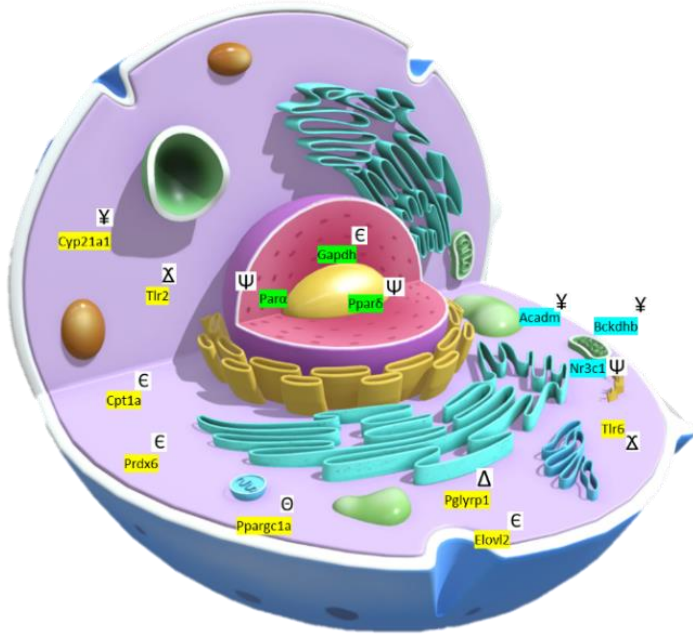


Figura 2. Componente celular de genes en el metabolismo de lípidos e inmunidad y función molecular; X: receptor; θ: unión RNA; Ψ: unión DNA; Δ: antimicrobiano; E: transferasa; ¥: oxidoreductasa.

## CONCLUSIÓN

El análisis de los genes que cambiaron su expresión en las becerras al recibir el polihierbal en metabolismo de ácidos grasos e inmunidad, permiten identificar posibles procesos biológicos que ayudan a entender parte de los cambios observados en el crecimiento de las becerras, así como en los indicadores de salud.

## REFERENCIAS

- Abdelrahman, M., Sivarajah, A., & Thiemermann, C. (2005). Beneficial effects of PPAR- $\gamma$  ligands in ischemia–reperfusion injury, inflammation, and shock. *Cardiovascular Research*, 65(4), 772-781.
- Abreu, M. T. (2010). Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. *Nature Reviews Immunology*, 10(2), 131-144.
- Bellini, L., Campana, M., Rouch, C., Chacinska, M., Bugliani, M., Meneyrol, K., & Le Stunff, H. (2018). Protective role of the ELOVL2/docosahexaenoic acid axis in glucolipotoxicity-induced apoptosis in rodent beta cells and human islets. *Diabetologia*, 61(8), 1780-1793.
- Blasco, A., & Toro, M. A. (2014). A short critical history of the application of genomics to animal breeding. *Livestock Science*, 166, 4-9.
- Blum, J. W., & Hammon, H. (2000). Colostrum effects on the gastrointestinal tract, and on nutritional, endocrine and metabolic parameters in neonatal calves. *Livestock Production Science*, 66(2), 151-159.
- Cappon, G. D., Liu, R. C. M., Frame, S. R., & Hurtt, M. E. (2002). Effects of the rat hepatic peroxisome proliferator, Wyeth 14,643, on the lactating goat. *Drug and Chemical Toxicology*, 25(3), 255-266.
- Dennis, G., Sherman, B. T., Hosack, D. A., Yang, J., Gao, W., Lane, H. C., & Lempicki, R. A. (2003). DAVID: database for annotation, visualization, and integrated discovery. *Genome Biology*, 4(9), 1-11.
- Desvergne, B., Michalik, L., & Wahli, W. (2006). Transcriptional regulation of metabolism. *Physiological Reviews*, 86(2), 465-514.

- Dziarski, R., & Gupta, D. (2006). The peptidoglycan recognition proteins (PGRPs). *Genome Biology*, 7(8), 1-13.
- Fatma, N., Kubo, E., Sharma, P., Beier, D. R., & Singh, D. P. (2005). Impaired homeostasis and phenotypic abnormalities in Prdx6<sup>-/-</sup> mice lens epithelial cells by reactive oxygen species: increased expression and activation of TGF  $\beta$ . *Cell Death & Differentiation*, 12(7), 734-750.
- Fisher, A. B. (2018). The phospholipase A2 activity of peroxiredoxin 6 [S]. *Journal of Lipid Research*, 59(7), 1132-1147.
- Gao, X., Wang, X., Pham, T. H., Feuerbacher, L. A., Lubos, M. L., Huang, M., & Hardwidge, P. R. (2013). NleB, a bacterial effector with glycosyltransferase activity, targets GAPDH function to inhibit NF- $\kappa$ B activation. *Cell Host & Microbe*, 13(1), 87-99.
- Gregory, M. K., Cleland, L. G., & James, M. J. (2013). Molecular basis for differential elongation of omega-3 docosapentaenoic acid by the rat Elovl5 and Elovl2 [S]. *Journal of Lipid Research*, 54(10), 2851-2857.
- Gruse, J., Görs, S., Tuchscherer, A., Otten, W., Weitzel, J. M., Metges, C. C., & Hammon, H. M. (2015). The effects of oral quercetin supplementation on splanchnic glucose metabolism in 1-week-old calves depend on diet after birth. *The Journal of Nutrition*, 145(11), 2486-2495.
- Hammon, H. M., Steinhoff-Wagner, J., Schönhusen, U., Metges, C. C., & Blum, J. W. (2012). Energy metabolism in the newborn farm animal with emphasis on the calf: endocrine changes and responses to milk-borne and systemic hormones. *Domestic Animal Endocrinology*, 43(2), 171-185.
- Hernández-Castellano, L. E., Argüello, A., Almeida, A. M., Castro, N., & Bendixen, E. (2015). Colostrum protein uptake in neonatal lambs examined by descriptive and quantitative



- liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Dairy Science*, 98(1), 135-147.
- Hromádková, J., Suzuki, Y., Pletts, S., Pyo, J., Ma, T., Chen, Y., & Steele, M. A. (2020). Effect of colostrum feeding strategies on the expression of neuroendocrine genes and active gut mucosa-attached bacterial populations in neonatal calves. *Journal of Dairy Science*, 103(9), 8629-8642.
- Huang, D. W., Sherman, B. T., Tan, Q., Collins, J. R., Alvord, W. G., Roayaei, J., & Lempicki, R. A. (2007). The DAVID Gene Functional Classification Tool: a novel biological module-centric algorithm to functionally analyze large gene lists. *Genome Biology*, 8(9), 1-16.
- Kargar, S., Roshan, M., Ghoreishi, S. M., Akhlaghi, A., Kanani, M., Shams-Abadi, A. A., & Ghaffari, M. H. (2020). Extended colostrum feeding for 2 weeks improves growth performance and reduces the susceptibility to diarrhea and pneumonia in neonatal Holstein dairy calves. *Journal of Dairy Science*, 103(9), 8130-8142.
- Kim, K. H., Son, J. M., Benayoun, B. A., & Lee, C. (2018). The mitochondrial-encoded peptide MOTS-c translocates to the nucleus to regulate nuclear gene expression in response to metabolic stress. *Cell Metabolism*, 28(3), 516-524.
- Komisarek, J., & Dorynek, Z. (2009). Effect of ABCG2, PPARGC1A, OLR1 and SCD1 gene polymorphism on estimated breeding values for functional and production traits in Polish Holstein-Friesian bulls. *Journal of Applied Genetics*, 50(2), 125-132.
- Lee-Rangel, H. A., Mendoza-Martínez, G. D., Martínez-García, J. A., Espinosa-Ayala, E., Hernández-García, P. A., Cifuentes-López, R. O., & Roque-Jiménez, J. A. (2022). An Indian polyherbal phytogetic source improved blood serum biochemistry and immune response of dairy calves. *Food and Agricultural Immunology*, 33(1), 97-112.

- Liang, H., & Ward, W. F. (2006). PGC-1 $\alpha$ : a key regulator of energy metabolism. *Advances in Physiology Education*, 30:145-151.
- Ma, T., O'hara, E., Song, Y., Fischer, A. J., He, Z., Steele, M. A., & Guan, L. L. (2019). Altered mucosa-associated microbiota in the ileum and colon of neonatal calves in response to delayed first colostrum feeding. *Journal of Dairy Science*, 102(8), 7073-7086.
- Malmuthuge, N., Chen, Y., Liang, G., & Goonewardene, L. A. (2015). Heat-treated colostrum feeding promotes beneficial bacteria colonization in the small intestine of neonatal calves. *Journal of Dairy Science*, 98(11), 8044-8053.
- Mandard, S., Müller, M., & Kersten, S. (2004). Peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  target genes. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61(4), 393-416.
- Melmed, G., Thomas, L. S., Lee, N., Tesfay, S. Y., Lukasek, K., Michelsen, K. S., & Abreu, M. T. (2003). Human intestinal epithelial cells are broadly unresponsive to Toll-like receptor 2-dependent bacterial ligands: implications for host-microbial interactions in the gut. *The Journal of Immunology*, 170(3), 1406-1415.
- Mucha, R., Bhide, M. R., Chakurkar, E. B., Novak, M., & Mikula Sr, I. (2009). Toll-like receptors TLR1, TLR2 and TLR4 gene mutations and natural resistance to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 128(4), 381-388.
- Nowroozinia, F., Kargar, S., Akhlaghi, A., Fard, F. R., Bahadori-Moghaddam, M., Kanani, M., & Zamiri, M. J. (2022). Feeding fennel (*Foeniculum vulgare*) seed as a potential appetite stimulant for Holstein dairy calves: Effects on growth performance and health. *Journal of Dairy Science*, 105(1), 654-664.
- Osanai, A., Sashinami, H., Asano, K., Li, S. J., Hu, D. L., & Nakane, A. (2011). Mouse peptidoglycan recognition protein PGLYRP-1 plays a role in the host innate immune

- response against *Listeria monocytogenes* infection. *Infection and Immunity*, 79(2), 858-866.
- Osorio, J. S., Trevisi, E., Ballou, M. A., Bertoni, G., Drackley, J. K., & Loor, J. J. (2013). Effect of the level of maternal energy intake prepartum on immunometabolic markers, polymorphonuclear leukocyte function, and neutrophil gene network expression in neonatal Holstein heifer calves. *Journal of Dairy Science*, 96(6), 3573-3587.
- Pauter, A. M., Olsson, P., Asadi, A., Herslöf, B., Csikasz, R. I., Zadavec, D., & Jacobsson, A. (2014). Elov12 ablation demonstrates that systemic DHA is endogenously produced and is essential for lipid homeostasis in mice [S]. *Journal of Lipid Research*, 55(4), 718-728.
- Puigserver, P. (2005). Tissue-specific regulation of metabolic pathways through the transcriptional coactivator PGC1- $\alpha$ . *International Journal of Obesity*, 29(1), S5-S9.
- Rakoff-Nahoum, S., Paglino, J., Eslami-Varzaneh, F., Edberg, S., & Medzhitov, R. (2004). Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell*, 118(2), 229-241.
- Rørvig, S., Østergaard, O., Heegaard, N. H., & Borregaard, N. (2013). Proteome profiling of human neutrophil granule subsets, secretory vesicles, and cell membrane: correlation with transcriptome profiling of neutrophil precursors. *Journal of Leukocyte Biology*, 94(4), 711-721.
- Samson, A. L., Knaupp, A. S., Kass, I., Kleifeld, O., Marijanovic, E. M., Hughes, V. A., & Medcalf, R. L. (2014). Oxidation of an exposed methionine instigates the aggregation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry*, 289(39), 26922-26936.
- Sánchez, N., Lee-Rangel, H. A., Martínez-Cortés, I., Mendoza, G. D., Hernández, P. A., Espinoza, E., & Relling, A. E. (2021). A polyherbal phyto-genic additive improved

- growth performance, health, and immune response in dairy calves. *Food and Agricultural Immunology*, 32(1), 482-498.
- Schäff, C. T., Rohrbeck, D., Steinhoff-Wagner, J., Kanitz, E., Sauerwein, H., Bruckmaier, R. M., & Hammon, H. M. (2014). Effects of colostrum versus formula feeding on hepatic glucocorticoid and  $\alpha$ 1- and  $\beta$ 2-adrenergic receptors in neonatal calves and their effect on glucose and lipid metabolism. *Journal of Dairy Science*, 97(10), 6344-6357.
- Soret, B., Lee, H. J., Finley, E., Lee, S. C., & Vernon, R. G. (1999). Regulation of differentiation of sheep subcutaneous and abdominal preadipocytes in culture. *Journal of Endocrinology*, 161, 517-524.
- Steinhoff-Wagner, J., Zitnan, R., Schönhusen, U., Pfannkuche, H., Hudakova, M., Metges, C. C., & Hammon, H. M. (2014). Diet effects on glucose absorption in the small intestine of neonatal calves: Importance of intestinal mucosal growth, lactase activity, and glucose transporters. *Journal of Dairy Science*, 97(10), 6358-6369.
- Urie, N. J., Lombard, J. E., Shivley, C. B., Koprak, C. A., Adams, A. E., Earleywine, T. J., & Garry, F. B. (2018). Preweaned heifer management on US dairy operations: Part V. Factors associated with morbidity and mortality in preweaned dairy heifer calves. *Journal of Dairy Science*, 101(10), 9229-9244.
- White, H. M., Koser, S. L., & Donkin, S. S. (2011). Differential regulation of bovine pyruvate carboxylase promoters by fatty acids and peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  agonist. *Journal of Dairy Science*, 94(7), 3428-3436.
- Yiu, J. H., Dorweiler, B., & Woo, C. W. (2017). Interaction between gut microbiota and toll-like receptor: from immunity to metabolism. *Journal of Molecular Medicine*, 95(1), 13-20.