



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO**

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

**EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE COLINA HERBAL Y
METIONINA PROTEGIDAS DE LA DEGRADACIÓN RUMINAL EN
EL CRECIMIENTO DE CORDEROS Y EN LA CONCENTRACIÓN DE
METABOLITOS SANGUÍNEOS**

T E S I S

**Como requisito para la obtener el grado de:
DOCTORA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**

PRESENTA

VERÓNICA RODRÍGUEZ GUERRERO

COMITÉ TUTORAL

DIRECTOR

DR. GERMÁN DAVID MENDOZA MARTÍNEZ

CO-DIRECTORA

DRA. MARÍA EUGENIA DE LA TORRE HERNÁNDEZ

ASESOR

DR. AUGUSTO CÉSAR LIZARAZO CHAPARRO

Ciudad de México, 2018



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO**

DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

**EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE COLINA HERBAL Y METIONINA
PROTEGIDAS DE LA DEGRADACIÓN RUMINAL EN EL CRECIMIENTO DE
CORDEROS Y EN LA CONCENTRACIÓN DE METABOLITOS SANGUÍNEOS**

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 de grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

COMITÉ TUTORAL

Director




Dr. Germán David Mendoza Martínez

Co-Directora



Dra. María Eugenia De La Torre Hernández

Asesor



Dr. Augusto César Lizarazo Chaparro

El programa de Doctorado en Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma Metropolitana- Xochimilco pertenece al Programa Nacional de Posgrado de Calidad (PNPC) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y cuenta con el apoyo del mismo consejo. El financiamiento de esta tesis fue otorgado por el CONACyT por la beca No. 38153.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE CUADROS	6
ÍNDICE DE FIGURAS	7
ABREVIATURAS	8
RESUMEN	1
. MARCO TEÓRICO.....	3
1.1. Aditivos alimenticios.....	3
1.2. Aditivos alimenticios en rumiantes	3
1.1.2. Metionina como aditivo alimenticio.....	4
1.3. Aditivos herbales en rumiantes	8
1.3.1. Colina y fosfatidilcolina	9
1.3.2. BioCholine	14
2. JUSTIFICACIÓN.....	15
3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	15
4. HIPÓTESIS.....	15
5. OBJETIVO GENERAL.....	15
6. MATERIALES Y MÉTODOS	16
6.1. Lugar de realización	16
6.2. Modelo experimental.....	16
6.3. Tratamientos y manejo	16
6.4. Comportamiento productivo	18
6.4.1. Ganancia diaria de peso (GDP).....	18
6.4.2. Consumo y digestibilidad.....	18
6.5. Análisis sanguíneo	21
6.5.1. Toma de muestras sanguíneas	21
6.6. Matanza	23
6.6.1. Toma de muestra de hígado	23
6.6.2. Peso de canal caliente.....	23
6.7. Procesamiento de las muestras de hígado	24
6.7.1. Extracción y cuantificación de proteína total	24
6.7.2. Determinación cuantitativa de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico	24
7. Resultados y Discusión	24

7.1. Comportamiento productivo	24
7.1.1. Efectos en la suplementación con <i>BioCholine</i> y <i>Mepron</i> en el comportamiento productivo de corderos	24
7.1.2. Composición química de la dieta basal	25
7.1.3. Composición química de <i>BioCholine</i> y parámetros de producción de gas <i>in vitro</i>	27
7.3. Metabolitos sanguíneos relacionados con el balance energético	28
7.3.1. Efectos de la suplementación con <i>BioCholine</i> y <i>Mepron</i> en los metabolitos sanguíneos	28
7.4. Cuantificación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico	31
8. Conclusiones.....	32
9. Bibliografía.....	33
10. ANEXOS	46
11. ARTÍCULO	

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Porcentaje de inclusión de ingredientes de la dieta para crecimiento.....	16
Cuadro 2. Efectos principales en la suplementación con BioCholine y Mepron en el comportamiento productivo de corderos.....	25
Cuadro 3. Composición química de la dieta basal (base seca).....	26
Cuadro 4. Composición química de BioCholine y parámetros de producción de gas in vitro.....	28
Cuadro 5. Efectos de la suplementación con BioCholine y Mepron en los metabolitos sanguíneos en corderos en crecimiento	29

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la metionina	4
Figura 2. Metabolismo de la metionina.....	6
Figura 3. Estructura química de la fosfatidilcolina	10
Figura 4. Síntesis de fosfatidilcolina, vía CDP-colina	12
Figura 5. Síntesis de fosfatidilcolina, vía PEMT.....	13
Figura 6. BioCholine (izquierda) Mepron (derecha).....	17
Figura 7. Administración oral del tratamiento	17
Figura 8. Cuantificación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico de Biocholine y RPM.....	32

ABREVIATURAS

Acrónimo	Significado
4-AF	4- aminofenazona
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Adenosina-5-difosfato
AOAC	Official methods of analysis
ATP	Adenosín trifosfato
CDP-colina	Citidina-difosfolina
CHOD	Colesterol oxidasa
CIA	Cenizas insolubles en ácido
CK	Colina kinasa
CCT	CTP-fosfocolina citidiltransferasa
CTP	Citidina trifosfato
DAG	Diacilglicerol
DAP	Dihidroxiacetona fosfato
EE	Extracto etéreo
FDA	Fibra detergente ácido
FDN	Fibra detergente neutro
GDP	Ganancia diaria de peso
GK	Glicerol quinasa
GOD	Glucosa oxidasa
GPO	Glicerol fosfato deshidrogenasa
G3P	Glicerol-3-fosfato
HCy	Homocisteína
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
K _{0.5}	Tiempo requerido para obtener la mitad del volumen máximo
LDH	Lactato deshidrogenasa
LPL	Lipoproteinlipasa
Lys	Lisina
MAT	Metionina adenosiltransferasa
MDA	Malondialdehído
MDH	Malato deshidrogenasa
Met	Metionina
MS	Materia seca

NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
NEFA	Ácidos grasos no esterificados
PC	Proteína Cruda
POD	Peroxidasa
PCho	Fosfocolina
PtdCho	Fosfatidilcolina
PDME	Fosfatidildimetiletanolamina
PE	Fosfatidiletanolamina
PMME	Fosfatidilmonometiletanolamina
PEMT	Fosfatidiletanolamina N-metiltransferasa
PVC	Policloruro de vinilo
RPB	Betaína protegida de la degradación ruminal
RPC	Colina protegida de la degradación ruminal
RPM	Metionina protegida de la degradación ruminal
SAH	S-adenosil-homocisteína
SAM	S-adenosilmetionina
SEM	Error estándar de la media
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS:	Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
TG	Triglicéridos
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad
Vmax	Volumen máximo de producción de gas

RESUMEN

Veinticuatro corderos (Pelibuey x East Friesian), que pesaban $22,7 \pm 3,2$ kg, fueron alimentados con una dieta basal de ensilado de maíz, heno de avena, heno de alfalfa y concentrado (60% de forraje y 40% de concentrado). Los tratamientos consistieron en dosis orales de metionina protegida contra el rumen (*Mepron*) (0 y 1.5 g / día) y colina de origen polihierbal (*BioCholine*) (0 y 4 g / día) en un diseño de bloques completamente al azar con arreglo factorial 2 x 2 con 6 repeticiones, donde los corderos fueron bloqueados por sexo.

El experimento se realizó durante 60 días y se obtuvieron mediciones del peso vivo y consumo de materia seca. No se observaron efectos de los tratamientos en las variables de rendimiento (crecimiento del cordero, consumo y conversión alimenticia).

En los resultados del análisis de los metabolitos sanguíneos se observó que los ácidos grasos no esterificados (NEFA) aumentaron con *BioCholine* y no se vieron afectados por *Mepron* (Met). *BioCholine* incrementó la glucosa y el colesterol, mientras que *Mepron* incrementó los triglicéridos, la albúmina y la proteína plasmática. La suplementación dietética con *BioCholine* y *Mepron* no mejoró el crecimiento de los corderos; sin embargo, *BioCholine* y *Mepron* mostraron un efecto lipotrópico movilizándolo NEFA y estimulando la síntesis de glucosa y colesterol.

ABSTRACT

Twenty-four lambs (Pelibuey x East Friesian), weighing 22.7 ± 3.2 kg, were fed a basal diet of corn silage, oat hay, alfalfa hay, and concentrate (60% forage and 40% concentrate). Treatments consisted of oral doses of rumen-protected methionine (*Mepron*[®]) (0 and 1.5 g/day) and herbal choline (*BioCholine*[®]) (0 and 4 g/day) in a completely random block design with factorial arrangement of treatments, where lambs were blocked by sex.

The experiment was conducted for 60 days, and measurements of live weight and dry matter intake were obtained. No effects of the treatments were observed on performance variables (lamb growth, consumption and feed conversion). In the results of the analysis of the blood metabolites non-esterified fatty acids (NEFA) were increased by *BioCholine* and unaffected by *Mepron* (Met). *BioCholine* increased glucose and cholesterol, whereas *Mepron* increased triglycerides, albumin and plasma protein. The dietary supplementation with *BioCholine* and *Mepron* did not improve lambs' growth; however, *BioCholine* and *Mepron* showed a lipotropic effect by mobilizing NEFA and stimulating glucose and cholesterol synthesis.

. MARCO TEÓRICO

1.1. Aditivos alimenticios

Los aditivos son productos utilizados en la nutrición animal para mejorar la calidad de los alimentos de origen animal, o para aumentar el rendimiento y la salud de los animales (Hashemi y Davoodi, 2011). Hay mucha controversia en cuanto al uso de aditivos en animales, ello se debe a que, por la naturaleza de algunos compuestos de origen químico, se generan residuos en los tejidos, los cuales podrían afectar al humano al momento de consumir estos productos. Es por ello por lo que en algunos países han sido prohibidos, Como, por ejemplo, en Europa, los antimicrobianos ya no son aceptados como aditivos en el alimento para animales por sus efectos sobre los humanos. En México, varias de estas sustancias (clembuterol, salbutamol, nitrofurazona, dimetridazol, cloranfenicol, metronidazol, entre otras) también han sido prohibidas (Rochfort, *et al.*, 2008; SENASICA, 2018).

Actualmente existe una demanda real entre los productores por el uso de aditivos alimentarios alternativos y, entre los consumidores, por productos inocuos y seguros, entre los que se pueden incluir, probióticos, prebióticos, enzimas, ácidos orgánicos y metabolitos secundarios de plantas o sus sustancias químicas naturales, algunos aditivos utilizados por la industria lechera en Estados Unidos son: levaduras, monesina, niacina, sales aniónicas, secuestrantes de micotoxinas, entre otras (Hutjens, 2013; Jouany y Morgavi, 2007; Wallace, 2004).

1.2. Aditivos alimenticios en rumiantes

Como todo rumiante, los ovinos son animales forrajeros por naturaleza, esto quiere decir que las pasturas o forrajes son los alimentos con los que tendría que cubrir todos sus requerimientos (crecimiento, mantenimiento, desarrollo corporal y preñez) (Gasque, 2008). Sin embargo, existe la posibilidad de que los ovinos puedan presentar deficiencias en nutrientes como proteínas, vitaminas, minerales, etc., por lo que se hace evidente la necesidad de buscar alternativas para suplir estas soluciones (Quiñonez, 2012). El uso de aditivos alimenticios en las dietas de crecimiento-finalización es una práctica común en los corrales de engorda. Su utilización tiene varios propósitos, entre ellos, la mejora del comportamiento

productivo, la salud, o la mejora de las características del producto final. Pero las regulaciones son cada vez más estrictas por lo que se han implementado nuevas alternativas que ha impulsado últimamente el uso de levaduras, de minerales quelados y de extractos vegetales en la industria de la engorda para satisfacer las deficiencias que se podrían tener, (André y De Lima, 2011; Gasque, 2008; Jorquera, 2015).

1.1.2. Metionina como aditivo alimenticio

La metionina (Met) es un aminoácido hidrofóbico, que contiene un grupo metilo unido covalentemente a un átomo de azufre (Figura 1) y, tanto el grupo metilo como el azufre, son cruciales para sus funciones estructurales y metabólicas (Banskalieva *et al.*, 2005; Brosnan *et al.*, 2007).

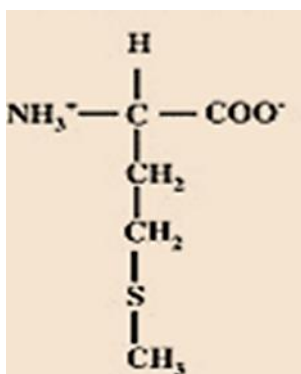


Figura 1. Estructura de la metionina (Brosnan, *et al.*, 2007)

Es además un aminoácido esencial que limita el crecimiento y desarrollo de los rumiantes jóvenes, así como el rendimiento y calidad de la leche en vacas de alta producción además de la producción de lana en borregos (Bach y Stern, 2000; Banskalieva *et al.*, 2005; Lara *et al.*, 2003; Südekuma *et al.*, 2004). Al igual que otros aminoácidos es rápidamente degradada y utilizada para la síntesis de proteína de los microorganismos del rumen. Por lo que, cuando es ofrecida a través del alimento, la respuesta en la producción es variable debido a que su disponibilidad en el intestino está limitada por la actividad de los microorganismos del rumen (Lara *et al.*, 2003).

Una manera de mejorar el suministro de Met del rumiante es utilizar productos que la protejan de la degradación ruminal. Se han desarrollado varias formulaciones con Met de origen sintético para evitar su degradación en el rumen y que se absorba posteriormente en el intestino delgado (Ardalan *et al.*, 2009; Südekuma *et al.*, 2004). La suplementación en la dieta con RPM (Rumen Protected Methionine) por sus siglas en inglés, tiene el potencial de aumentar la producción de leche, así como un efecto positivo en la síntesis de proteínas de esta (Abbasi *et al.*, 2017; Acosta *et al.*, 2016; Bach y Stern, 2000; Lima *et al.*, 2011; Tsiplakou *et al.*, 2017).

1.1.2.1. Metabolismo

El metabolismo de la metionina (Figura 2) puede ser subdividido en: **transmetilación**, **remetilación** y **transulfuración**.

La **transmetilación** implica la formación de S-adenosilmetionina (SAM) a partir de ATP y Met, mediante la acción de la enzima metionina adenosiltransferasa (MAT) en la primera reacción del metabolismo de la metionina, seguida de la transferencia del grupo metilo de SAM por una metiltransferasa a algún aceptor de metilos (Brosnan *et al.*, 2007; Pinotti *et al.*, 2002). El grupo metilo de SAM se usa principalmente para formar creatina, pero también se puede transferir a fosfatidiletanolamina (PE), transformándose en fosfatidilcolina (PtdCho), o a carnitina y a otros compuestos metilados (Davidson *et al.* 2008; Pinotti *et al.*, 2002). Cuando SAM transfiere su grupo metilo a un aceptor, el producto es S-adenosil-homocisteína (SAH), el cual posteriormente es hidrolizado a adenosina y luego a homocisteína (HCy).

La adenosina es rápidamente transformada en inosina, mientras que la HCy participa en la vía de la **transulfuración** mediante una secuencia de dos reacciones catalizadas por enzimas dependientes de la vitamina B₆ y que producen cisteína y otros derivados como glutatión y taurina (Abbasi *et al.*, 2017; Brosnan *et al.*, 2007; Pinotti *et al.*, 2002).

Por último, la **remetilación** está regulada principalmente por la necesidad de grupos metilo. La HCy puede ser remetilada para sintetizar Met a partir de grupos metilos proporcionados tanto por el metil- tetrahidrofolato en donde la metilcobalamina actúa como coenzima, o

también por la betaína que a su vez proviene de la colina. En cada caso participan la Metionina sintasa y la betaína homocisteína metiltransferasa respectivamente (Brosnan *et al.*, 2007; Medici *et al.*, 2014; Pinotti *et al.*, 2002).

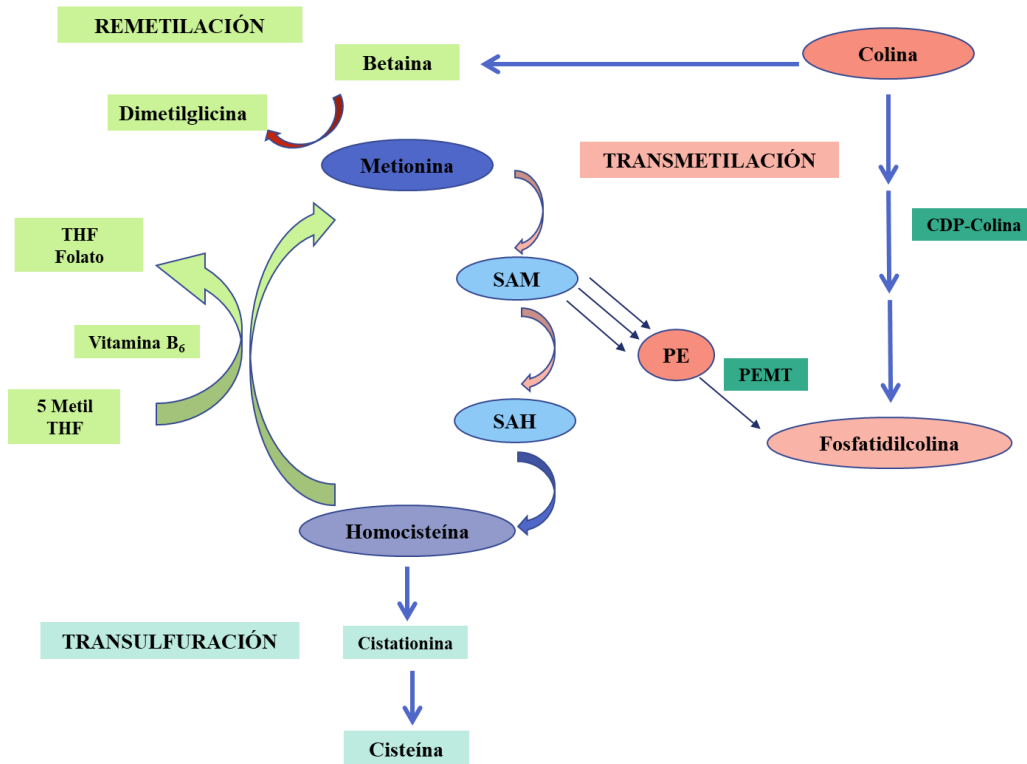


Figura 2. Metabolismo de la metionina
Adaptado de (Chandler and White, 2017)

El control del metabolismo de la Met es complejo y la partición de la HCy entre la remetilación y la transulfuración es crucial y está determinado por la disponibilidad de los grupos metilo. Tras la ingestión de una dieta pobre en grupos metilos lábiles, es más probable que la HCy sea remetilada que catabolizada a cisteína; por el contrario, cuando la ingestión de una dieta en la que los grupos metilo están en exceso disminuye la tasa de remetilación y es probable que la homocisteína se catabolice (Brosnan *et al.*, 2007; Löest *et al.*, 2002; Pinotti *et al.*, 2002).

1.1.1.2. Funciones

La metionina tiene un papel crucial en el metabolismo que se deriva de la participación de este aminoácido, o sus derivados, en varios procesos biológicos fundamentales:

- Síntesis de proteínas
- Reacciones de transmetilación dependientes de SAM
- Formación de las poliaminas
- Síntesis de cistationina, cisteína y otros metabolitos de la vía de la transulfuración
- Suministro de H₂Cy, que es necesaria tanto para el metabolismo de los folatos como para el catabolismo de la colina (Ardalant *et al.*, 2009; Finkelstein, 1990; Lobley *et al.*, 1996).

La Met Funciona como un precursor de la síntesis de proteínas por lo que una deficiencia, puede dar como resultado un uso ineficiente de la proteína de la dieta (Löest *et al.*, 2002).

La Met junto con la colina son los dos principales donadores de grupos metilo en el metabolismo animal, debido a esto, sus metabolismos están estrechamente relacionados (Abbasi *et al.*, 2017; Pinotti *et al.*, 2002). La Met es la fuente del metabolito SAM, el cual juega un papel importante como proveedor de metilos para muchas reacciones de transmetilación, incluyendo la síntesis *de novo* de colina a partir de PE (Chandler y White, 2017; Davison *et al.*, 2008; Löest *et al.*, 2002; Tsiplakou *et al.*, 2017 y Zhou *et al.*, 2016). Adicionalmente, la colina contribuye a través de la betaina como donador de metilo para generar Met *de novo* (Abbasi *et al.*, 2017; Pinotti *et al.*, 2002). En el ganado ovino, la Met también es importante dado que puede ser convertida en cisteína a través de la homocisteína, que es el principal aminoácido en la lana (Frey *et al.*, 2003).

Conjuntamente, como agente lipotrópico, está directamente involucrada en la síntesis de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) por medio de la generación de SAM, que, a su vez, puede ser usada para metilar a la PE y generar PtdCho, la cual es esencial para la síntesis de VLDL (Strzetelski *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2016).

Por su parte, el estatus del estrés oxidativo durante el periodo periparto puede ser influenciado por el aumento en la disponibilidad de la Met debido a que sirve como sustrato para la síntesis de cisteína y, a su vez, de glutatión. El glutatión es una molécula clave para la reducción de peróxidos. El estrés oxidativo aumenta el flujo de transulfuración y la síntesis de glutatión (Brosnan *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2016).

1.3. Aditivos herbales en rumiantes

El uso de especias, hierbas y sus extractos en la producción animal no es nuevo, se empleaban hace miles de años en Mesopotamia, Egipto, India, China y la antigua Grecia, donde fueron apreciados por su aroma específico y varias propiedades medicinales (Akerreta *et al.*, 2010; Frankic *et al.*, 2009). Los primeros registros de sistemas de medicina tradicional basados en plantas datan de alrededor del 2600 A.C. (Greathead, 2003). Hashemi y Davoodi, 2011 demostraron que las hierbas y las especias generalmente se consideran seguras y efectivas contra ciertas dolencias.

Durante la última década, aumentó el interés por el uso de aditivos de origen natural en la nutrición animal y, diversas investigaciones se centraron en la explicación de las funciones fisiológicas y bioquímicas de diversos aditivos, como probióticos, prebióticos, plantas y sus extractos, con la finalidad de asegurar una buena salud y un buen desempeño de los animales para impactar de manera positiva en su rendimiento (Frankic *et al.*, 2009; Greathead, 2003).

Todas las plantas producen compuestos químicos como parte de sus actividades metabólicas normales. Algunas sintetizan y almacenan metabolitos secundarios que no están directamente implicados en su crecimiento, desarrollo o reproducción, pero que son los responsables de su sabor u olor y pueden servir como mensajeros químicos entre las plantas y el medio ambiente (por ejemplo, los responsables de atraer a insectos polinizadores), además de servir como protección frente a otras plantas, herbívoros y procesos abióticos causantes de estrés; algunos sólo se encuentran en un género o especie particular (Carro *et al.*, 2010; Hashemi y Davoodi, 2011; Jouany y Morgavi, 2007 y Wallace, 2004).

Para obtener efectos ventajosos de hierbas y especias, pueden agregarse en el alimento como plantas secas y como extractos. Las plantas contienen principalmente una o varias moléculas

activas predominantes (metabolitos secundarios), que son responsables de ciertos efectos biológicos (Frankic *et al.*, 2009). Las concentraciones de los principios activos pueden ser muy variables dependiendo, entre otros factores, de la variedad de la planta, las condiciones de cultivo, la época del año, el método de cosecha, etc. Adicionalmente, el método de extracción de estos compuestos y el almacenamiento hasta su uso son complicados y también afectan a la concentración de las sustancias activas. Por ello, la información existente en la actualidad sobre los efectos de estos compuestos refleja una gran variabilidad (Carro *et al.*, 2010; Frankic *et al.*, 2009 y Jouany y Morgavi, 2007). Teniendo en cuenta la cantidad de principios activos, así como la magnitud de la respuesta de cada uno de los aditivos, es mucho más eficiente usar una molécula purificada aislada, que una planta seca o un extracto no purificado (Frankic *et al.*, 2009).

El uso de aditivos herbales depende de diferentes factores, como el estado nutricional de los animales, la edad, la composición de la dieta, el fin productivo, las diferentes dosis utilizadas, y la posible interacción con los otros ingredientes de la dieta (Wallace, 2004). Aunque son aditivos naturales, es necesario investigar sus mecanismos de acción, la calidad y cantidad de sustancias químicas activas en el extracto de las plantas, y la evaluación de la seguridad antes de que puedan ser más extensivos en la alimentación de los animales (Hashemi y Davoodi, 2011)

Existe un gran número de compuestos secundarios que pueden utilizarse en los aditivos en la alimentación de los rumiantes, entre ellos destacan las saponinas, los taninos y los aceites esenciales (Carro *et al.*, 2010; Jouany y Morgavi, 2007; Wallace, 2004).

1.3.1. Colina y fosfatidilcolina

La colina es una amina cuaternaria considerada nutriente importante en la dieta de los mamíferos cuyo principal destino es la síntesis de PdtCho, que representa hasta el 95% de la colina total en la mayoría de los tejidos animales. El porcentaje restante incluye colina libre, fosfocolina (PCho), glicerofosfocolina, esfingomielina, CDP-colina, acetilcolina, etc. (Abbasi *et al.*, 2017; Gibellini y Smith, 2010; Habeeb *et al.*, 2018; Li y Vance, 2008; Pawar *et al.*, 2015).

La colina o sus metabolitos son necesarios para mantener funciones fisiológicas importantes, como la estructural y la de señalización de la membrana celular (fosfolípidos y esfingomielina), la síntesis de neurotransmisores y el desarrollo cerebral (acetilcolina), el transporte de lípidos (lipoproteínas) y como donador de grupos metilo en las reacciones de transmetilación (a través de la betaína para sintetizar metionina, con la cual posee una estrecha relación metabólica) (Waite y Vance, 2004; Fernández, 2012; Abbasi *et al.*, 2017, Church *et al.*, 2017; Habeeb *et al.*, 2018).

La PtdCho fue descrita 1847 por Theodore Gobley la cual nombró lecitina (del griego *lekitos*) que significa yema de huevo. Poco después se demostró que contenía dos ácidos grasos esterificados unidos a una cadena de glicerol y un tercer hidroxilo contenía fosfocolina, (Figura 3) (Cole *et al.*, 2011; Vance, 2014).

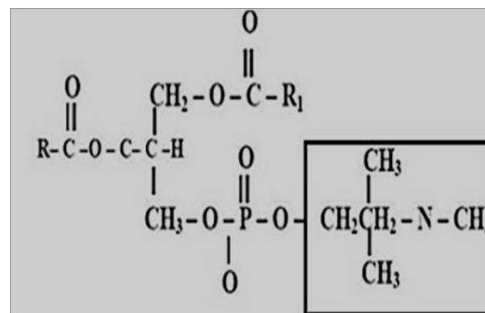


Figura 3. Estructura química de la fosfatidilcolina (Donkin, 2002)

La PtdCho es el principal metabolito de la colina, es un fosfolípido esencial en células y tejidos de mamíferos y tiene varias funciones: es un componente fundamental de las membranas celulares (representa entre el 40-60% de los fosfolípidos), es precursor de moléculas de señalización, así como, un elemento clave de la síntesis de lipoproteínas, la bilis y también es un surfactante pulmonar (Cole *et al.*, 2011; Farina *et al.*, 2017; Kent, 2005; Medici *et al.* 2014; Vance, 2008).

Dos de los principales tipos de lipoproteínas involucradas en el transporte de triglicéridos (TG) en el plasma son los quilomicrones y las VLDL. La PtdCho es el fosfolípido más importante para la síntesis y secreción de las VLDL y no puede ser sustituido por otro

fosfolípido, por lo que se le reconoce por su efecto lipotrópico. Por este motivo, ante una deficiencia de colina se reduce la síntesis de PtdCho en las células hepáticas y la formación de VLDL. La principal consecuencia es una acumulación de TG en el hígado, que da lugar al hígado graso (Ardalant *et al.*, 2009; Davidson *et al.*, 2008; Farina *et al.*, 2017; Fernández, 2012; Pinotti *et al.*, 2002; Zom *et al.*, 2011).

Cuando la PtdCho es limitante, la suplementación con colina puede mejorar la tasa de síntesis de VLDL y prevenir así el exceso de TG que se acumulan en el hígado (Goselink *et al.*, 2013). La PtdCho sintetizada en el hígado también se secreta en la bilis donde actúa como surfactante para facilitar la digestión lipídica, parte de esta PtdCho es reabsorbida por el intestino delgado y retorna al hígado (Fernández, 2012).

La suplementación con colina protegida ha ayudado a reducir la acumulación de grasa en el hígado en vacas en transición y acelerar su remoción en este órgano, así como un efecto positivo en la reproducción y la producción de leche (Sales *et al.*, 2010).

1.3.1.1. Síntesis de fosfatidilcolina

Todos los tejidos disponen de colina, pero su asimilación es más importante en hígado, cerebro, riñón, glándula mamaria y placenta. No existe un sistema de almacenamiento de colina en las células, de modo que su homeostasis se consigue ya sea mediante la dieta, o procedente de producción endógena (Fernández, 2012).

Existen dos vías para la síntesis de PtdCho; la primera utiliza colina dietética y es a través de la vía CDP-colina, y la segunda utiliza PE que experimenta tres metilaciones secuenciales para convertirse así en PtdCho (Jackowski y Fagone, 2005; Kent, 2005).

Vía CDP-colina

La vía citidina-difosfolina (CDP-colina) es la principal vía que ocurre en todas las células nucleadas, fue descrita por primera vez en 1957 por Eugene P. Kennedy indicando que la síntesis de PtdCho se realiza mediante un intermediario de colina, la CDP-colina también se le conoce como el ciclo de Kennedy o de síntesis de fosfatidilcolina, Figura 4 (Álvarez, 2013; Cole *et al.*, 2011; Gibellini y Smith, 2010; Waite y Vance, 2004).

La vía CDP requiere colina y consiste en tres reacciones:

1. La fosforilación de colina en PCho mediante la enzima Colina cinasa (CK) usando ATP,
2. CTP:fosfocolina citidiltransferasa (CCT) cataliza la reacción entre PCho y citidinatrifosfato (CTP) para formar CDP-colina, está considerada como la etapa limitante del ciclo de Kennedy,
3. CDP-colina:1,2-diacilglicerol colinafosfotransferasa cataliza el intercambio de CMP por diacilglicerol (DAG) para formar PtdCho. (Álvarez, 2013; Cole *et al.*, 2011; Gibellini and Smith, 2010; Jackowski and Fagone, 2005).

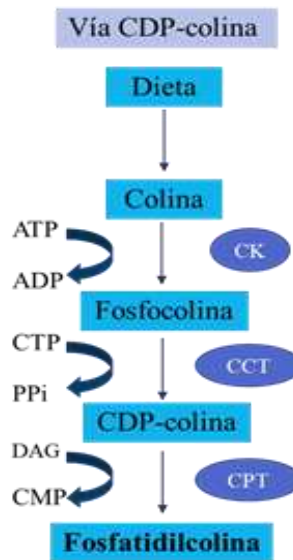


Figura 4. Síntesis de fosfatidilcolina, vía CDP-colina
Adaptado de Cole *et al.*, 2012

Vía de la Fosfatidiletanolamina-N-metiltransferasa (PEMT)

La PtdCho también puede ser generada endógenamente por una segunda vía, Figura 5. La PEMT cataliza la conversión de PE a PtdCho por la transferencia de tres grupos metilos suministrados por SAM a la PE. La PEMT es la única enzima en la ruta, y realiza los tres pasos de metilación, los intermediarios en esta ruta son fosfatidilmonometiletanolamina (PMME) y fosfatidildimetiletanolamina (PDME) (Calderano *et al.*, 2015; Cole *et al.*, 2011; Jackowski y Fagone, 2005; Mahmoud *et al.* 2012; Pinotti *et al.*, 2002 y Vance, 2014).

La vía de la PEMT es cuantitativamente significativa sólo en el hígado, donde su contribución es aproximadamente un 30% del total de la síntesis de PtdCho hepática (Cole *et al.*, 2011; Jackowski y Fagone, 2005 y Vance, 2014).

La actividad PEMT es imprescindible cuando la ingesta de colina es limitada o nula pero no es suficiente para cubrir los requerimientos del organismo (Fernández, 2012). Por ejemplo, la administración de una dieta deficiente en colina en ratones mutados en la ruta (PEMT^{-/-}) ocasionó una disminución del 50% de la cantidad de PtdCho hepática y el desarrollo de falla hepática irreversible (Waite y Vance, 2004).

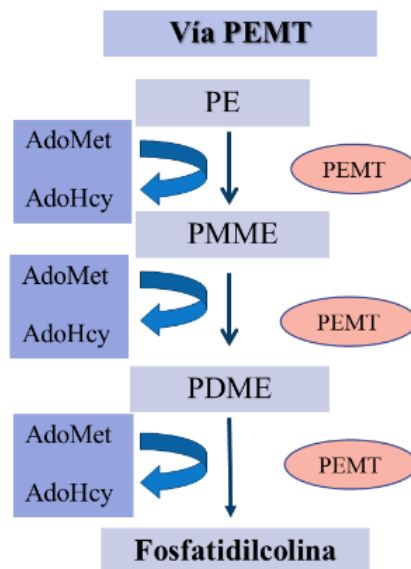


Figura 5. Síntesis de fosfatidilcolina, vía PEMT
Adaptado de Cole et al., 2012

1.3.2. BioCholine

Es un producto polihierbal usado como aditivo derivado de plantas de la India que incluyen: *Achyranthes aspera*, *Azadirachta indica*, *Citrullus colocynthis*, *Trachyspermum ammi*, y *Andrographis paniculata*, que contienen conjugados de colina (fosfatidilcolina, fosfatidilinositol, fosfatidilserina, entre otros) los cuales actúan eficientemente en diferentes actividades metabólicas, como la estructural y funciones de señalización de la membrana celular así como la movilización de grasa del hígado (Calderano *et al.*, 2015; Khose, 2017; Koujalagi *et al.*, 2018; Mendoza *et al.*, 2018; Mojica, 2011; Sharma y Ranjan, 2015).

La *BioCholine* al no ser un extracto purificados tiene varias moléculas con una o más sustancias activas predominantes que son las responsables de los efectos biológicos. La cantidad de estas moléculas puede variar dependiendo de ciertas circunstancias, como las condiciones de cultivo, tiempo de la cosecha, el clima, el agua, la variedad de la planta, etc., sin embargo, la compañía estandariza las muestras enviando lotes certificados (Mendoza *et al.*, 2018).

La inclusión de *BioCholine* en la dieta de los rumiantes puede ser una alternativa al uso de productos sintéticos con colina debido a que proporciona una fuente de colina natural estable en su forma esterificada (PtdCho), el estudio de toxicidad aguda del polvo de BioCholine demostró que es un producto seguro. (Calderano *et al.*, 2015; Farina *et al.*, 2017; Koujalagi *et al.*, 2018; Kumar *et al.*, 2010; Mojica, 2011).

2. JUSTIFICACIÓN

En rumiantes, diversos estudios han demostrado el beneficio del uso de RPC y RPM, mejorando la producción de vacas lecheras y la ganancia de peso de vaquillas y novillos, pero aún existen muy pocos trabajos en pequeños rumiantes que demuestren que también pueden funcionar como promotores de crecimiento y de producción, por lo que el presente trabajo se enfoca en el estudio del uso de *BioCholine* como RPC y *Mepron* como una fuente de RPM en corderos en crecimiento y como una alternativa más segura de aditivos alimenticios que cubran las demandas de un sistema de producción de pequeños rumiantes como el ovino.

3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Existe una variación en el crecimiento de corderos y en la concentración de metabolitos sanguíneos indicadores de buen funcionamiento hepático al suplementar metionina y colina polihierbal protegida de la degradación ruminal?

4. HIPÓTESIS

La administración de la combinación de colina polihierbal y metionina protegidas de la degradación ruminal tendrá un efecto positivo en la ganancia de peso en los ovinos en comparación con nutrientes separados.

5. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la suplementación de colina polihierbal y metionina protegidas de la degradación ruminal, y su combinación, en la concentración de metabolitos sanguíneos en corderos en crecimiento.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Lugar de realización

El experimento se llevó a cabo en el Centro de Enseñanza Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal (CEPIPSA), de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, ubicado en el Km. 28, San Miguel Topilejo, Tlalpan, Ciudad de México.

6.2. Modelo experimental

Se utilizaron 24 borregos (12 hembras y 12 machos) cruce de Pelibuey x East Friesian con un peso inicial promedio de 22.7 ± 3.2 kg. Se distribuyeron de acuerdo a un diseño de bloques generalizado completamente al azar con arreglo factorial 2 x 2 con 6 repeticiones. (Los bloques fueron por sexo). Los corderos tuvieron un periodo de adaptación de 15 días a la dieta y al manejo, previo al inicio del experimento que duró 60 días.

6.3. Tratamientos y manejo

La dieta se formuló de acuerdo con los requerimientos del NRC (2007) para corderos en crecimiento (2.6 Mcal EM, 14% PC), en la que todos los ingredientes son mezclados. Los porcentajes de inclusión de cada ingrediente se muestran en el cuadro 1.

Cuadro 1. Porcentaje de inclusión de ingredientes de la dieta para crecimiento

Ingrediente	% de inclusión
Concentrado Comercial (Ovina Engorda MP)	40
Heno de alfalfa	30
Ensilado	15
Heno de avena	8
Melaza de caña	6
Sales Minerales	1
Total	100

Los corderos fueron alimentados en corrales individuales a las 9:00 y 14:00 horas, teniendo acceso *ad libitum* a agua limpia. Los productos utilizados para los tratamientos fueron, colina de origen vegetal (BioCholine Indian Herbs[®], India) y Metionina protegida de la degradación ruminal (Mepron[®] Evonik Industries México Co.) (Figura 6). Las dosis de *Mepron* y *BioCholine* se prepararon semanalmente. Se pesó y embolsó la cantidad correspondiente para cada tratamiento.

1. Testigo
2. *BioCholine* (4 g/d)
3. *BioCholine* + *Mepron* (4 g/d + 1.5 g/d)
4. *Mepron* (1.5 g/d)



Figura 6. BioCholine (izquierda) Mepron (derecha)

La administración de los tratamientos fue por vía oral antes de la primera comida para garantizar el consumo, se empleó un tubo de PVC de aproximadamente 12 cm de largo y 2 cm de diámetro (Figura 5), en el cual se le adicionó el producto correspondiente al tratamiento y se le ofreció directamente a la boca del cordero, esto para facilitar y asegurar su completa administración.



Figura 7. Administración oral del tratamiento

6.4. Comportamiento productivo

6.4.1. Ganancia diaria de peso (GDP)

Los corderos se pesaron de manera individual al iniciar el experimento y, posteriormente, a los cuarenta y sesenta días, utilizando una báscula electrónica portátil.

6.4.2. Consumo y digestibilidad

La medición del consumo de materia seca (MS) se realizó los últimos días del experimento (del día 55 al 60), en los que se recolectaron muestras de alimento (ofrecido y rechazado) y heces, que posteriormente se utilizaron para estimar la digestibilidad de la MS (Van Keulen and Young, 1977).

6.4.2.1. Recolección de muestras y procesamiento del alimento

Cada mañana se colectó el alimento del comedero (rechazo del día anterior) y se ofreció la ración del alimento correspondiente, de la cual, se tomó una muestra de 100 g aproximadamente. En la tarde se ofreció el alimento de la misma manera.

Las muestras fueron empacadas, debidamente identificadas (Fecha y nombre de la muestra) y congeladas a -20°C para su posterior procesamiento y análisis.

6.4.2.1.1. Análisis bromatológico del alimento

Los análisis de laboratorio se realizaron en los laboratorios de Ensayos Metabólicos, Bromatología y Ecología Molecular de la Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. Se realizaron de acuerdo con *Official Methods of Analysis* (AOAC), 1995.

6.4.2.1.1.1. Determinación de materia seca y humedad (método 925.10)

Permite determinar la cantidad de materia seca de un alimento cuando se ha extraído al menos el 95% de agua de él. El secado de la muestra se hace entre 55-60 °C durante 24 horas (Anexo A, sección i).

6.4.2.1.1.2. Determinación de extracto etéreo o grasa cruda (método 920.35)

Se basa en la extracción continua mediante calor de todas las sustancias solubles en éter de petróleo o éter etílico provenientes de una muestra seca para evaluar el contenido de grasa total en los alimentos, considerando otras sustancias solubles en estos disolventes como vitaminas, esteroides, pigmentos, etc (Anexo A, sección ii).

6.4.2.1.1.3. Determinación de nitrógeno total y proteína cruda (método 920.35)

Este método determina el nitrógeno total en forma de amonio de los alimentos, sin diferenciar la fuente de la cual proviene la proteína. En el proceso se digiere toda la materia orgánica obteniendo el nitrógeno como sulfato de amonio, el cual se hace reaccionar con una solución de hidróxido de sodio para formar amoniaco, que es el gas que se destila por arrastre de vapor y se recibe en una solución de ácido bórico. Por cada átomo de nitrógeno se forma un ion borato que se neutraliza con una solución valorada de ácido clorhídrico y así, de forma indirecta, se conoce el contenido de nitrógeno. Para estimar el contenido de proteína en base al contenido de nitrógeno, se multiplica por el factor de nitrógeno, el cual se calcula con base en el contenido de nitrógeno en las proteínas. Se asume que todas las proteínas tienen 16 % de nitrógeno o 6.25 como factor de conversión (100/16) (Anexo A, sección iii).

6.4.2.1.1.4. Fibra cruda (Van Soest *et al.* 1991)

Esta técnica sirve para determinar la cantidad de pared celular insoluble en una muestra de forraje mediante una solución de detergente neutro (FDN) y otra solución de detergente ácido (FDA) (Anexo A, sección iv).

6.4.2.1.1.5. Determinación de cenizas insolubles en ácido (Keulen and Young, 1977)

Este método permite determinar la cantidad de cenizas residuales en una muestra después de tratarla con ácido, estas cenizas son utilizadas como un marcador interno para la determinación de la digestibilidad aparente de un alimento, cenizas insolubles en ácido (CIA) (Anexo A, sección v).

6.4.2.1.1.6. Perfil de aminoácidos

El contenido de aminoácidos del alimento fue analizado por Evonik, Industrias mediante Amino Lab. (AOAC, 1995; European Commission, 2009) (Anexo A, sección vi).

6.4.2.2. Recolección y procesamiento de heces

Las muestras de heces se recolectaron durante cinco días (del día 55 al 60, los últimos del estudio), para estimar la digestión aparente de la materia seca (Stock *et al.* 1987); fueron tomadas directamente vía rectal de cada cordero (Van Cleff *et al.*, 2016), se almacenaron en bolsas de papel estraza previamente identificadas; se congelaron para su posterior procesamiento.

6.4.2.2.1. Análisis bromatológico de heces

Se realizaron de acuerdo con los métodos de la AOAC (1995).

6.4.2.2.1.1. Determinación de materia seca y humedad (método 925.10)

Fueron analizados de acuerdo con los procedimientos descritos previamente (sección 6.4.2.1.1.1).

6.4.2.2.1.2. Determinación de cenizas insolubles en ácido

Analizados de acuerdo con los procedimientos descritos previamente (sección 6.4.2.1.1.5).

6.4.2.3. Análisis bromatológico de *BioCholine*

Las muestras de *BioCholine*, fueron analizados para caracterizar el producto de acuerdo con los métodos de la AOAC (1995).

6.4.2.3.1. Determinación de materia seca (método 925.10)

Fueron analizados de acuerdo con los procedimientos descritos anteriormente (sección 6.4.2.1.1.1).

6.4.2.3.2. Determinación de nitrógeno total y proteína cruda (método 920.35)

Fueron analizados de acuerdo con los procedimientos descritos previamente (sección 6.4.2.1.1.3).

6.4.2.3.3. Determinación de cenizas totales y materia orgánica

Fueron analizados de acuerdo con los procedimientos descritos anteriormente (sección 6.4.2.1.1.5).

6.4.2.3.4. Fibra cruda (Van Soest *et al.* 1991)

Analizados de acuerdo con los procedimientos descritos previamente (sección 6.4.2.1.1.4).

6.4.2.3.5. Producción de gas *in vitro* con *BioCholine*

Se estimó la degradación de *BioCholine* según (Blümmel y Lebzien, 2001; Goering y Van Soest, 1970; Mendoza *et al.*, 1995 y Menke y Steingass, 1988).

6.5. Análisis sanguíneo

6.5.1. Toma de muestras sanguíneas

A final del experimento (día 60), previo ayuno, se tomaron muestras de sangre mediante venopunción yugular empleando tubos al vacío sin anticoagulante (BD Vacutainer® tapa roja), para determinar algunos metabolitos sanguíneos relacionados con el balance energético. Las muestras fueron centrifugadas (Centrifuga Modelo, Hermle®) a 3000 rpm por 30 minutos para separar el suero, el cual fue almacenado y congelado a -20°C en tubos debidamente rotulados hasta su posterior análisis.

6.5.1.1. Determinación de metabolitos sanguíneos

Se cuantificaron glucosa, proteínas totales, albumina, colesterol, triglicéridos, utilizando kits SPINREACT, así como ácidos grasos no esterificados (NEFA) con el kit de RANDOX, mediante un espectrofotómetro Cary 100 UV/Visible.

6.5.1.1.1. Glucosa

Determinación cuantitativa de glucosa

La glucosa oxidasa (GOD) cataliza la oxidación de glucosa de la muestra a ácido glucónico. El peróxido de hidrógeno (H₂O₂) producido se detecta mediante un aceptor cromogénico de oxígeno, 4-aminofenazona (4-AF) y fenol en presencia de la peroxidasa (POD), formando

una quinonimida. La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de glucosa presente en la muestra analizada (Anexo C, sección i).

6.5.1.1.2. Proteínas totales

Determinación cuantitativa de proteínas totales por el método colorimétrico de Biuret. En medio alcalino, las proteínas dan un intenso color violeta azulado en presencia de sales de cobre; contiene yoduro como antioxidante. La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de proteína total en la muestra ensayada (Anexo C, sección ii).

6.5.1.1.3. Albúmina

Determinación cuantitativa de albúmina

La albúmina se combina con el verde de bromocresol a pH ligeramente ácido, produciéndose un cambio de color del indicador, de amarillo verdoso a verde azulado; este cambio de coloración es proporcional a la concentración de albúmina presente en la muestra analizada (Anexo C, sección iii).

6.5.1.1.4. Colesterol

Determinación cuantitativa de colesterol

Los ésteres de colesterol de la muestra son hidrolizados por la colesterol esterasa a colesterol, para después ser oxidado por la enzima colesterol oxidasa (CHOD) a 4-colestenona y peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el cual en presencia de la peroxidasa (POD), la 4-aminofenazona (4-AF) y fenol forman una quinonimida con un pico de absorción de 505 nm. La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de colesterol presente en la muestra (Anexo C, sección iv).

6.5.1.1.5. Triglicéridos

Determinación cuantitativa de triglicéridos

Los triglicéridos de la muestra son hidrolizados por la lipoproteinlipasa (LPL) a glicerol para posteriormente ser fosforilado por la enzima glicerol cinasa (GK) para producir glicerol-3-fosfato (G3P) y adenosina-5-difosfato (ADP), el G3P es entonces convertido a dihidroxiacetona fosfato (DAP) y peróxido de hidrogeno (H_2O_2) por la enzima glicerol

fosfato deshidrogenasa (GPO). Al final, el H₂O₂ reacciona con 4- aminofenazona (4-AF) y p-clorofenol para formar una quinona, reacción catalizada por la peroxidasa (POD) la cual da una coloración roja.

La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de triglicéridos presentes en la muestra ensayada (Anexo C, sección v).

6.5.1.1.6. Ácidos grasos no esterificados (NEFA)

Determinación cuantitativa mediante kit RANDOX (Anexo C, sección vi).

6.6. Matanza

La matanza de los animales se realizó de acuerdo con la Norma Mexicana NOM-033-ZOO-1995: “*Sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres*”, utilizando una pistola de perno cautivo.

6.6.1. Toma de muestra de hígado

Se tomaron fragmentos de hígado de cada animal inmediatamente después del sacrificio; algunos se almacenaron en tubos para microcentrífuga de 1.5 ml y otros fragmentos en tubos Falcon de 50 ml. Todas las muestras se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido (-195°C) para su conservación. Posteriormente se transportaron en hielo seco hasta el laboratorio de Ensayos Metabólicos donde se conservaron a aproximadamente a -40°C.

6.6.2. Peso de canal caliente

Es el peso que se registró posterior al sangrado, desollado, eviscerado y lavado de la canal y se realizó en la báscula de riel en la línea de sacrificio.

6.7. Procesamiento de las muestras de hígado

6.7.1. Extracción y cuantificación de proteína total

Se realizó mediante el uso de un macerador de tejidos Potter, utilizando 1 gramo de hígado más 2 ml de PBS 1X suplementado con coctel de inhibidores de proteasas, todo se mantuvo en hielo para evitar degradación del tejido. Una vez obtenido el extracto crudo se realizaron alícuotas de 250 µl y se conservaron a -20 °C para su posterior análisis. La cuantificación se llevó a cabo mediante el método de Lowry modificado (Lowry *et al.*, 1951) para determinar la concentración de proteínas totales

6.7.2. Determinación cuantitativa de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

Las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) son productos finales de bajo peso molecular (mayormente malondialdehído, MDA) que se forman durante la descomposición de lípidos, como producto de la peroxidación.

El ensayo está basado en la relación de MDA con el ácido tiobarbitúrico (TBA) para formar un producto de color rosa. La intensidad del color a 535 nm es directamente proporcional a la concentración de TBARS de la muestra. Se determinó mediante el kit QuantiChrom™ TBARS, BioAssay System.

7. Resultados y Discusión

7.1. Comportamiento productivo

7.1.1. Efectos en la suplementación con *BioCholine* y *Mepron* en el comportamiento productivo de corderos

En el presente estudio con respecto al desempeño de los corderos (Cuadro 2), no se observaron efectos de los tratamientos sobre el peso corporal, la ingesta de materia seca y la digestibilidad. Resultados que coinciden con los de Davison *et al.* (2008) y Elek *et al.* (2008) quienes no observaron diferencia en el consumo de MS, ganancia de peso y condición corporal en vacas; y con los de Li *et al.* (2015) en los que no hubo un efecto significativo en el consumo en los tratamientos con RPC en corderos

En este sentido, Brusemeister y Sudekum (2006) sugirieron, que la respuesta a RPM y RPC puede ser positiva en ganado lechero debido a sus altos requisitos de metilación, pero sus efectos sobre la eficiencia de producción no fueron consistentes (Davidson *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2016).

En el presente estudio con respecto al desempeño de los corderos (Cuadro 2), no se observaron efectos de los tratamientos sobre el peso corporal, la ingesta de materia seca y la digestibilidad. Resultados que coinciden con los de Davison *et al.* (2008) y Elek *et al.* (2008) quienes no observaron diferencia en el consumo de MS, ganancia de peso y condición corporal en vacas; y con los de Li *et al.* (2015) en los que no hubo un efecto significativo en el consumo en los tratamientos con RPC en corderos

Cuadro 2. Efectos principales en la suplementación con BioCholine y Mepron en el comportamiento productivo de corderos

Parámetros	<i>BioCholine</i>		<i>Mepron</i>		SEM	Valor-P		
	0	4	0	1.5		Biochol	<i>Mepron</i>	<i>BioChol+Mepron</i>
Peso Inicial (kg)	21.61	21.55	21.82	21.34	1.184	0.97	0.77	0.8
Peso final (kg)	28.63	28.68	28.98	28.33	1.257	0.98	0.71	0.76
GDP (g)	106.44	107.98	108.52	105.96	5.527	0.84	0.74	0.07
Digestibilidad MS (%)	67.85	65.09	66.48	66.46	0.944	0.05	0.99	0.98
Consumo MS (kg/d)	530.8	534.8	545.3	520.4	18.92	0.88	0.36	0.05
Consumo MS (% BW)	2.18	2.15	2.21	2.12	0.131	0.91	0.34	0.05
Conversión alimenticia	5.2	5.30	5.21	5.09	0.318	0.82	0.79	0.05
Peso de la canal (kg)	13.91	12.16	13.16	12.91	0.593	0.06	0.76	0.49

GDP: Ganancia diaria de peso

MS: Materia seca

SEM: Error estándar de la media

Biochol: *BioCholine*

Mepron: Metionina protegida de la degradación ruminal

7.1.2. Composición química de la dieta basal

En este experimento, la falta de respuesta en el crecimiento de los corderos a Mepron puede deberse al bajo contenido de lisina (Lys) en la dieta basal (Cuadro 3).

La dieta basal en este experimento tenía un flujo duodenal teórico de Lys metabolizable de 0.2 g/d para tratamientos sin Mepron y 0.05 g /d de Met. Por lo tanto, cuando se agregó Mepron, la relación Lys: Met disminuyó a 0.13, con lo que se sugiere que Lys limitó la

respuesta de crecimiento en ambos grupos. Experimentos como el de Sánchez et al. (2012) evaluaron 5 g /d de RPM en corderos en crecimiento alimentados con raciones basadas en rastrojo de maíz y no encontraron ningún efecto de la metionina en el crecimiento, la ingesta o la eficiencia alimenticia. Por el contrario, Gómez et al. (2011) demostraron que vaquillas en pastoreo tuvieron una mejor respuesta en el crecimiento gracias a la adición dietética de RPM cuando una fuente de Lys de sobrepaso fue incluida en el suplemento. Madsen et al. (2005) encontraron un efecto positivo en las cabras lecheras respecto a la producción de leche, pero solo cuando la Met se combinó con Lys protegida de la degradación ruminal, con una relación de Lys:Met de 2.55:1.

Baldwin et al. (1993) realizaron experimentos con corderos y ovejas, demostrando que ni las ovejas lactantes ni los corderos respondieron a la suplementación de RPM en dietas con una extensiva degradación proteica, lo que resultó en un suministro limitado de Lys.

Cuadro 3. Composición química de la dieta basal (base seca)

	Contenido
MS (%)	49.4
PC (%)	9.9
FDN (%)	49.7
FDA (%)	34.8
EE (%)	2.2
<i>Aminoácidos</i>	
Metionina	0.157
Lisina	0.366
Lys:Met (proporción)	2.365
Cistina	
Met +Cis	0.130
Treonina	0.287
Arginina	0.380
Isoleucina	0.434
Leucina	0.362
Valina	0.734
Histidina	0.487
Fenilalanina	0.199
Glicina	0.444
Serina	0.473
Prolina	0.414
Alanina	0.586

Ácido Aspártico	0.584
Ácido Glutámico	0.847

MS: Materia seca
PC: Proteína Cruda
FDN: Fibra detergente neutro
FDA: Fibra detergente ácido
EE: Extracto etéreo

7.1.3. Composición química de *BioCholine* y parámetros de producción de gas *in vitro*

En el cuadro 4 se presenta la composición química de la *BioCholine*, destacando el alto contenido de lípidos en el producto y los parámetros de producción de gas *in vitro* con microorganismos ruminales.

La producción de gas *in vitro* indicó que la mitad de la *BioCholine* se fermentó en 18 horas lo que, potencialmente, permitiría el paso de una fracción importante de ésta al tracto inferior. Sin embargo, las incubaciones *in vitro* reflejan sólo la actividad bacteriana y, dado que los protozoos ruminales *in vivo* pueden ser responsables de engullir la fosfatidilcolina en el rumen (Mohamed y Chaudhry 2008), la actividad de los ciliados debe evaluarse en estudios futuros; debe también confirmarse el flujo duodenal de la *BioCholine* para garantizar el suministro adecuado de este nutriente en los rumiantes en crecimiento. Sin embargo, la información sobre la *BioCholine* en corderos es escasa.

De acuerdo con los parámetros de producción de gas y los resultados de Godinez-Cruz et al. (2015) se esperaba una respuesta positiva en el crecimiento del cordero. Sin embargo, no se observó ningún efecto con la suplementación con *BioCholine*, *Mepron* o la combinación con *BioCholine-Mepron* en las variables de producción del cordero debido principalmente a la inadecuada relación de Lys: Met en la dieta.

Los resultados obtenidos en la producción de gas durante el tiempo medio ($K_{0.5}$) para llegar a V_{max} sugieren que la *BioCholine* contiene fracciones de colina protegidas de la degradación ruminal. Una evaluación de fuentes comerciales de RPC indicó que la degradación *in situ* en el rumen de productos encapsulados varía de 40 a 80% (Brusemeister y Sudekum, 2006; Jayaprakash et al., 2016). Los resultados de Godinez-Cruz et al. (2015), que compararon *BioCholine* y cloruro de colina microencapsulado, indicaron que las dos

fuentes dieron como resultado la misma degradación final, proporcionando un mayor paso de colina que la observada para el control que no estaba protegido de la degradación en el rumen.

Cuadro 4. Composición química de BioCholine y parámetros de producción de gas in vitro

Componente	Contenido
MS (%)	92.3
Cenizas (%)	14.3
PC (%)	6.02
FDN (%)	17.4
FDA (%)	4.3
EE (%)	6.4
<i>Parámetros de producción de gas</i>	
Volumen máximo de producción de gas (mL)	225
Tasa de fermentación (%/h)	3.9
Fase Lag (h)	-2.2
K _{0.5} (h)	18.3

MS: Materia seca,

PC: Proteína cruda

FDN: Fibra detergente neutro

FDA: Fibra detergente ácido

EE: Extracto etéreo

Vmax: Volumen máximo de producción de gas (mL)

K_{0.5}: Tiempo requerido para obtener la mitad del volumen máximo

7.3. Metabolitos sanguíneos relacionados con el balance energético

7.3.1. Efectos de la suplementación con *BioCholine* y *Mepron* en los metabolitos sanguíneos

En el Cuadro 5 se muestran los resultados de los metabolitos sanguíneos de los corderos. Se observa que los NEFA se incrementaron con *BioCholine* ($P < 0.01$) y no se vieron afectados por *Mepron*. Otros metabolitos sanguíneos como los triglicéridos, mostraron una interacción de *Mepron* y *BioCholine* ($P < 0.01$). *BioCholine* favoreció el aumento de la glucosa y del

colesterol ($P < 0.01$), mientras que *Mepron* provocó el aumento de los triglicéridos, la albúmina y la proteína plasmática.

Cuadro 5. Efectos de la suplementación con BioCholine y Mepron en los metabolitos sanguíneos en corderos en crecimiento

	Control	<i>BioCholine</i>	RPM	Biochol+ RPM	SEM	<i>P</i> -value		
						Biochol	RPM	Biochol + RPM
Glucosa (mg/dL)	46.6 ^b	66.9 ^a	54.5 ^{ab}	47.9 ^b	3.405	0.05	0.11	0.003
Colesterol (mg/dL)	117.2 ^c	138.4 ^a	122.2 ^b	124.4 ^{bc}	1.601	<0.001	0.007	<0.001
Triglicéridos (mg/dL)	128.4 ^b	125.8 ^b	141.5 ^a	130.2 ^b	1.455	<0.001	<0.001	0.0048
NEFA (mmol/L)	0.310 ^b	0.399 ^a	0.348 ^{ab}	0.384 ^a	0.0133	0.019	0.53	0.17
Albumina (g/dL)	2.130 ^b	2.665 ^b	3.342 ^a	2.638 ^b	0.131	0.59	0.005	0.003
Proteína total (g/dL)	6.13 ^b	6.57 ^b	7.23 ^a	6.60 ^b	0.149	0.53	0.004	0.008

^{a,b} Letras diferentes entre filas difieren significativamente ($P < 0.01$).

NEFA Ácidos grasos no esterificados (por sus siglas en inglés)

SEM Error estándar de la media

Biochol *BioCholine*

RPM Mepron, Metionina protegida de la degradación ruminal

Los resultados de los metabolitos sanguíneos son inconstantes de acuerdo con la literatura, y las dosis estimadas por peso metabólico de la colina disponible en el intestino, parecen no ser el factor determinante. En esta investigación, algunos metabolitos (triglicéridos y NEFA) se vieron afectados a una dosis de solo 6.42 mg /kg BW^{0.75}, de *BioCholine*, a diferencia de Li *et al.* (2015) que no encontraron ningún efecto significativo con RPM en las concentraciones de triglicéridos y colesterol en sangre de corderos, que recibieron dosis estimada de 37 a 116 mg /kg BW^{0.75}.

Así también se observó un efecto en colesterol y glucosa que coincide con Pinotti *et al.* (2004) en ganado lechero quien usando RPM encontró un aumento significativo un aumento

significativo del colesterol plasmático y una disminución de NEFA con una tendencia de aumento de la glucosa con una dosis duodenal efectiva estimada de 75 mg / kg BW^{0.75}. Por el contrario, Chung *et al.* (2009) no encontraron un efecto sobre los NEFA y glucosa en plasma de vacas lecheras con una dosificación estimada de 73 o 147 mg /kg BW^{0.75}. Zhou y colaboradores (2016), observaron cambios en la glucosa y en los ácidos grasos con flujos estimados de 72 o 80 mg /kg BW^{0.75}. La administración de otros donadores de metilo como folatos y betaína (Maio *et al.*, 2000), y los requerimientos de grupos metilos en las etapas fisiológicas (Pinotti *et al.*, 2005) deben considerarse en futuros estudios donde se administre colina y metionina para adquirir una mejor comprensión de las respuestas a esos nutrientes en los rumiantes.

Las altas concentraciones de triglicéridos y NEFA observadas en el presente estudio se pueden explicar por el papel lipotrópico de la colina. Este efecto lipotrópico ayuda a optimizar el balance entre las síntesis de proteínas y grasas en vacas lecheras (Sales *et al.*, 2010). Se ha demostrado que la administración de RPC en vacas lecheras antes del parto disminuyó la acumulación de NEFA en el hígado y aumentó el glucógeno hepático (Pinotti *et al.*, 2005).

La colina también es necesaria para el transporte y el metabolismo del colesterol lipídico (Zeisel y Da Costa, 2009), lo que explicaría las mayores concentraciones de colesterol en la sangre. El mecanismo por el cual la colina estimula la síntesis de colesterol hepático en los rumiantes no se entiende completamente, pero, en otras especies, se requiere colina para sintetizar fosfatidilcolina y las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) (Yao y Vance, 1988). Brüsemeister y Südekum (2006) reportaron que la suplementación con colina puede mejorar el rendimiento en vacas lecheras, por el aumento en la exportación de TG del hígado y por el ahorro de metionina como donador de metilos.

De otra parte, algunos estudios de nutrigenómica han demostrado que la RPM altera las enzimas clave del hígado relacionadas con el metabolismo de las proteínas y la energía. Algunas de estas enzimas involucradas en el ciclo de la Met son metionina adenosiltransferasa 1A (MAT1A), y fosfatidiletanolamina metiltransferasa (PEMT), las

cuales aumentaron su expresión con la suplementación de metionina. La suplementación con RPC en vacas ha demostrado que la expresión génica hepática está asociada con la síntesis de antioxidantes, mejorando la metilación del ADN. (Osorio *et al.*, 2014). La relación entre los factores gluconeogénicos y la metilación, se ven afectados por los niveles de la nutrición (Rattanatray *et al.*, 2014), por lo que este aspecto merece más atención en futuros estudios en rumiantes.

Cuando se administró RPC a dosis más bajas (0.25%) (Li *et al.*, 2015), se estimuló la expresión de los genes de la lipoproteína lipasa y el ácido graso sintasa en el músculo, pero a dosis más altas (0.75%) mostró efectos adversos sobre la expresión de genes de acetil-CoA carboxilasa.

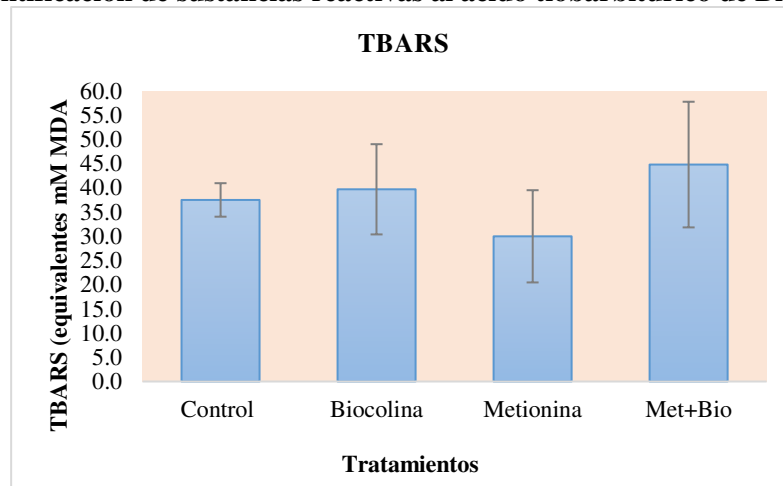
Se requieren futuros estudios con colina y Met que consideren la expresión génica de las enzimas hepáticas clave y sus factores de regulación para comprender mejor la relación de estas vías y sus efectos lipotrópicos en los rumiantes (Viturro *et al.*, 2009).

7.4. Cuantificación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

En la Figura 6 se muestran los resultados de la formación de malondialdehído (MDA), los cuales se cuantifican colorimétricamente tras su reacción con ácido tiobarbitúrico (Mendoza *et al.*, 2017). En cuanto al grado de peroxidación lipídica, se puede apreciar que no hubo cambio en el efecto antioxidante con los tratamientos (*BoCholine*), evidenciado por el aumento de los equivalentes de MDA respecto al control. Pero podríamos considerar que con el *mepron* si existe un efecto, pero debido a que las desviaciones son muy grandes no podemos concluir nada contundente. Aunque esta técnica tiene sus limitaciones con respecto a la especificidad, ya que pueden reaccionar otros aldehídos con el ácido tiobarbitúrico y ser cuantificados como MDA, constituye una herramienta útil para la valoración de la peroxidación lipídica y del estrés oxidativo en cualquier sistema biológico.

Habbeeb *et al.* (2017) determinaron que la colina y la metionina protege a las células del daño oxidativo, a su vez, la metionina participa en la síntesis de glutatión, el cual protege al organismo del daño oxidativo (Tsiplakou *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2016).

Figura 8. Cuantificación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico de Biocholine y RPM



TBARS; Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

MDA: Malondialdehído

8. Conclusiones

Los suplementos de RPM y BioCholine no mejoraron el rendimiento del cordero en la fase de crecimiento. Sin embargo, ambos suplementos mostraron efectos beneficiosos en el metabolismo hepático, como se refleja en los niveles sanguíneos de NEFA, glucosa, triglicéridos y colesterol, lo que demuestra que existe movilización de lípidos.

Los cambios en metabolitos sanguíneos son un indicador que los productos evaluados tienen propiedades de sobrepeso.

9. Bibliografía

Abbasi, I.H. R., Abbasi, F., Soomro, R.N., El-Hack, M.E.A., Abdel-Latif, M.A., Li, W., Hao, R., Sun, F., Bodinga, B.M., Hayat, K., Yao, J. and Cao, Y. 2017. Considering choline as methionine precursor, lipoproteins transporter, hepatic promoter and antioxidant agent in dairy cows. *AMB Express*, 7(1): 214.

Acosta, D.A.V. Denicol, A.C. Tribulo, P. Rivelli, M.I. Skenandore, C. Zhou, Z. Luchini, D. Corrêa, M.N. Hansen, P.J. and Cardoso F.C. 2016. Effects of rumen-protected methionine and choline supplementation on the preimplantation embryo in Holstein cows. *Theriogenology*, 85(9): 1669-1679.

Akerreta, S., Calvo, M.I. and Cavero, E.Y. 2010. Ethoveterinary Knowledge in Navarra (Iberian Peninsula). *Journal. of Ethnopharmacology*, 130: 369-378.

Álvarez, A. N. 2013. Mecanismo acción de inhibidores de colina quinasa en cáncer de mama. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Madrid, España.

André, M.J. y De Lima, F.C. 2011. Aspectos nutricionales del búfalo. *Tecnología en Marcha*, 24(5): 105-120.

AOAC, 1995. Official methods of analysis (15th ed.). Association of Official Analytical Chemists, Inc., Arlington, Virginia, USA.

Ardalan, M. Rezayazdi, K. and Dehghan-Banadaky, M. 2009. Investigation on the effect of supplementing rumen-protected forms of methionine and choline on health situation and reproductive performance of Holstein dairy cows. *Pakistan Journal of Biological Science*, 12 (1): 69-73.

Bach, A. and Stern, M.D. 2000. Measuring resistance to ruminal degradation and bioavailability of ruminally protected methionine. *Animal Feed Science and Technology*, 84: 23-32.

Baldwin, J.A., Horton, G.M.J., Wohlt, J.E., Palatini, D.D. and Emanuele, S.M. 1993. Rumen-protected methionine for lactation, wool and growth in sheep. *Small Ruminant Research*, 12: 125-132.

Banskalieva, V., Puchala, R., Goetsch, A.L., Lou, J. and Sahlu, T. 2005. Effects of ruminally protected betaine and choline on net flux of nutrients across the portal-drained viscera and liver of meat goat wethers consuming diets differing in protein concentration. *Small Ruminant Research*, 57: 193-202.

Brosnan, J.T., Brosnan, M.E. Bertolo, R.F.P. Brunton, J.A. 2007. Methionine: A metabolically unique amino acid. *Livestock Science*, 112: 2-7.

Brusemeister, F. and Sudekum, K.H. 2006. Rumen-protected choline for dairy cows: the *in situ* evaluation of a commercial source and literature evaluation of effects on performance and interactions between methionine and choline metabolism. *Animal Research* 55: 93-104.

Calderano, A. A., Nunes, R. V., Rodrigueiro, R. J. B., & César, R. A. 2015. Replacement of choline chloride by a vegetal source of choline in diets for broilers. *Ciência Animal Brasileira*, 16(1): 37-44.

Carro, M.D., Saro, C., Mateos, I., Díaz, A., y Ranilla, M.J. 2014. Perspectivas y retos de los extractos vegetales como aditivos alimentarios en rumiantes. *Albèitar*, 179: 4-6.

Chandler, T.L. and White, H.M. 2017. Choline and methionine differentially alter methyl carbon metabolism in bovine neonatal hepatocytes. *PloS one*, 12(2): e0171080. doi:10.1371/journal.pone.0171080.

Chung, Y.H., Brown, N.E., Martinez, C.M., Cassidy, T.W. and Varga, G.A. 2009. Effects of rumen-protected choline and dry propylene glycol on feed intake and blood parameters for Holstein dairy cows in early lactation. *Journal of Dairy Science*, 92: 2729–2736.

Church, D.C., Pond, W.G. y Pond, K.R. 2017. *Fundamentos de nutrición y alimentación de animales*. 2ª Ed. Limusa. México. 636 p.

Cole, L.K., Vance, J.E. and Vance, D.E. 2011. Phosphatidylcholine biosynthesis and lipoprotein metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1821:754-761.

Davidson S, Hopkins BA, Odle J, Brownie C, Fellner V, and Whitlow L. W 2008 Supplementing limited methionine diets with rumen-protected methionine, betaine, and choline in early lactation Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 91: 1552–1559. doi:10.3168/jds.2007-0721.

Donkin, S. S. 2002. Rumen-protected choline: potential for improving health and production in dairy cows. In *Tristate Dairy Nutrition. Conference*, Ft. Wayne, Indiana, 55-65 pp.

Elek, P., Newbold, J. R., Gaal, T., Wagner, L., & Husveth, F. 2008. Effects of rumen-protected choline supplementation on milk production and choline supply of periparturient dairy cows. *Animal*, 2(11): 1595-1601.

Emmanuel, B., and Kelly, J.J. 1984. Kinetics of methionine and choline and their incorporation into plasma lipids and milk components in lactating goats. *Journal of Dairy Science*, 67: 1912-1918.

European Commission, 2009. 2009/150/EC Commission regulation laying down the methods of sampling and analysis for the official control of feed. *Off. J. Eur. Union L 54*,1-130.

Farina, G., Kessler, A. D. M., Ebling, P. D., Marx, F. R., César, R., and Ribeiro, A. M. L. (2017). Performance of broilers fed different dietary choline sources and levels. *Ciência Animal Brasileira*, 18:1-14. e-37633, 2017

Fernández, R.S. 2012. Contribución de la colina y la betaína al metabolismo de la homocisteína durante la gestación. Tesis doctoral. Universitat Rovira i Virgili, España.

Finkelstein, J.D. 1990. Methionine metabolism in mammals. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 1: 228-237.

Frankič, T., Voljč, M., Salobir, J. and Rezar, Vida. 2009. Use of herbs and spices and their extracts in animal nutrition. *Acta Agriculturae Slovenica*, 94(2): 95-102.

Frey, A., Vitezica, A.C. y Melzner, G. 2003. Efecto de la administración oral de DL-metionina protegida sobre la producción y calidad de lana de borregas Merino preñadas en la patagonia Argentina. *Archivos latinoamericanos de producción animal*, 11 (2):138-142.

Gasque, G.R. 2008. Alimentación de bovinos. En enciclopedia bovina. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de veterinaria y zootecnia. México. pp 7-29.

Gibellini, F., and Smith, T. K. 2010. The Kennedy pathway—de novo synthesis of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine. *IUBMB life*, 62(6): 414-428.

Godinez-Cruz, J., Cifuentes-López, O., Cayetano, J., Lee-Rangel, H., Mendoza, G., Vázquez, A. and Roque, A. 2015. Effect of choline inclusion on lamb performance and meat characteristics. *Journal of Animal Science*, 93: 766, Suppl. 3.

Goering, H.K. and Van Soest, P.J., 1970. Forage fiber analysis apparatus, reagents, procedures, and some applications. In H.K. Goering, and P.J. Van Soest (eds). *Agriculture handbook*, 379. Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture. Washington DC, USA.

Gómez, A., Mendoza, G.D., García-Bojali, C., Barcena, R., Ramos, J.A., Crosby, M.M., Pinos, J.M. and Lara, A. 2011. Effect of supplementation with urea, blood meal, and rumen-protected methionine on growth performance of Holstein heifers grazing kikuyu pasture. *Tropical Animal Health and Production*, 43(3): 721-724.

Goselink, R. M. A., Van Baal, J., Widjaja, H. C. A., Dekker, R. A., Zom, R. L. G., De Veth, M. J., & Van Vuuren, A. M. 2013. Effect of rumen-protected choline supplementation on liver and adipose gene expression during the transition period in dairy cattle. *Journal of dairy science*, 96(2); 1102-1116.

Greathead, H. 2003. Plants and plant extracts for improving animal productivity. *Proceedings of the Nutrition Society*, 62: 279-290.

Habeeb, A. A., Gad, A. E., Atta, M. A., and Mustafa, M. M. 2018. Effect of adding different levels of rumen protected choline to the diet on productive and reproductive performance of female goats and growth of their kids from birthing to weaning. *Animal Science Journal*, 89(2): 348-358.

Habeeb, A. A. M., Gad, A. E., Atta, M. A. A., and Abdel-Hafez, M. A. M. 2017. Evaluation of rumen-protected choline additive to diet on productive performance of male Zaraibi growing goats during hot summer season in Egypt. *Tropical animal health and production*, 49(6): 1107-1115.

Hashemi, S.R. and Daavoodi, H. 2011. Herbal plants and their derivatives as growth and health promoters in animal nutrition. *Veterinary Research Communications*, 35: 169-180.

Hutjens, M. F. 2013. *Fisiologia Digestiva y Uso de Aditivos Alimenticios Rumiantes*. Urbana: University of Illions, 17-31.

Jackowski, S., and Fagone, P. 2005. CTP: phosphocholine cytidyltransferase: paving the way from gene to membrane. *Journal of Biological Chemistry*, 280(2): 853-856.

Jayaprakash, G., Sathiyabarathi, M., Robert, M.A. and Tamilmani, T. 2016. Rumen-protected choline: a significance effect on dairy cattle nutrition. *Veterinary World*, 9: 837-841.

Jorquera, A. P. 2015. Evaluación de aditivos alimenticios sobre la respuesta productiva de rumiantes finalizados en corral bajo condiciones de alta temperatura ambiental. XXV Reunión Internacional sobre la producción de carne y leche en climas áridos: 1-27

Jouany, J.P. and Morgavi, D.P. 2007. Use of natural products as alternatives to antibiotic feed additives in ruminants production. *Animal*. 1:10; 1443-1466.

Kent, C. 2005. Regulatory enzymes of phosphatidylcholine biosynthesis: a personal perspective. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1733: 53– 66.

Khose, K. K. 2017. Influence of herbal choline as a replacement of synthetic choline Chloride in broiler diets on serum biochemical profile. *Chemical Science Review and Letters*, 6(24): 2387-2392.

Koujalagi, S., Chhabra, S., Randhawa, S. N. S., and Singh, R. 2018. Effect of herbal biocholine supplementation on oxidative stress and biochemical parameters in transition dairy cows. *The Pharma Innovation Journal*, 7(4): 842-847.

Kumar, V., Das, S.N., Rao, A.T. and Chatterjee, S. 2010. Sub-acute toxicity study of herbal biocholine powder. *Phytomedica*, 11:85-89.

Lara, B.A., Mendoza, M.G.D., Bárcena, G.J.R., Landois, P.L.L, Sánchez-Torres, E.MT., García, B.CM., y Ayala, O.J. 2003. Degradabilidad ruminal *in situ* e *in vitro* de la metionina protegida. *Técnica Pecuaria en México*, 41(1):91-103.

Lara, A., Mendoza, G.D., Landois, L.A., Bárcena, R., Sanchez, T., Rojo, R., Ayala, J. and Vega, S. 2006. Milk production in Holstein cows supplemented with different levels of ruminally protected methionine. *Livestock Science*, 105: 105-108.

Li, H., Wang, H., Yu, L., Wang, M., Liu, S., Sun, L., and Chen, Q. 2015. Effects of supplementation of rumen-protected choline on growth performance, meat quality and gene expression in *longissimus dorsi* muscle of lambs. *Archives of Animal Nutrition*, 69(5): 340-350.

Li, Z., and Vance, D. E. 2008. Thematic review series: glycerolipids. Phosphatidylcholine and choline homeostasis. *Journal of lipid research*, 49(6): 1187-1194.

Lima, F.S., Sá Filho, M.F., Greco, L.F. and Santos, J.E.P. 2012. Effects of feeding rumen-protected choline on incidence of diseases and reproduction of dairy cows. *The Veterinary Journal*, 193: 140–145.

Lobley, G.E., Connell, A. and Revell, D. 1996. The importance of transmethylation reactions to methionine metabolism in sheep: effects of supplementation with creatine and choline. *British Journal of Nutrition*, 75: 47-56.

Loëst, C.A., Titgemeyer, E.C., St-Jean, G., Van Metre, D.C., and Smith, J.S. 2002. Methionine as a methyl group donor in growing cattle. *Journal Animal Science*, 80: 2197–2206.

Madsen, T.G., Nielsen, L. and Nielsen, M.O. 2005. Mammary nutrient uptake in response to dietary supplementation of rumen protected lysine and methionine in late and early lactating dairy goats. *Small Ruminant Research*, 56: 151-164.

Mahmoud E. El-Gendy, Kotob F. El-Riedy, Hanaa S. Sakr, Hamed M. Gaafar. 2012. Effect of rumen protected methionine and/or choline additives on productive performance of Zaraibi goats. *Nature and Science*, 10(10): 35-41.

Maio, R., Dichi, J.B. and Burini, R.C. 2000. Implicações do alcoolismo e da doença hepática crônica sobre o metabolismo de micronutrientes. *Arquivos de Gastroenterologia*, 37: 120-124.

Medici, V., Shibata, N.M., Kharbanda, K.K., Islam, M.S., Keen, C.L., Kim, K., Tillman, B., French, S.W., Halsted, C.H. and LaSalle, J.M. 2014. Maternal choline modifies fetal liver copper, gene expression, DNA methylation, and neonatal growth in the tx-j mouse model of Wilson disease. *Epigenetics*, 9:2. 286–296.

Mendoza, C., Márquez, A., Matheus, N., Sosa, S. M., and López-Ortega, A. 2017. Acción protectora del ácido kaurénico en el estrés oxidativo hepático, *Revista veterinaria*, 28(1): 27-30.

Mendoza, M.G.D., Britton, R.A. and Stock, R.A., 1995. Effect of protozoa and urea level on in vitro starch disappearance and amylolytic activity of ruminal microorganisms. *Animal Feed Science and Technology*, 54: 315-325.

Mendoza-Martínez, G. D., Martínez-García, J. A., Hernández-García, P. A., and Lee-Rangel, H. A. 2018. Uso de productos herbales nutracéuticos en la alimentación de ruminantes. En *Avances de la investigación sobre producción animal y seguridad alimentaria en México*, 69.

Menke, K. and Steingass, H., 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid. *Animal Research and Development*, 28: 7-55.

Mohamed, R. and Chaudhry, A.S. 2008. Methods to study degradation of ruminant feeds. *Nutrition Research Reviews*, 21: 68-81.

Mojica, E. M.C. 2011. BioCholine Powder® Colina Natural Esterificada Altamente Biodisponible. TECHNOFEED.

<http://www.cartasa.net/downloads/sitio/catalogo/pdfs/Biocholine%20Powder%20clientes.pdf>. Consultado en agosto 2018.

NRC, 2007. Nutrient Requirements of Small Ruminants: Sheep, Goats, Cervids, and New World Camelids. National Academic Press, Washington D.C., USA.

Osorio, J.S., Ji, P., Drackley, J.K., Luchini, D. and Looor, J.J. 2014. Smartamine M and MetaSmart supplementation during the periparturient period alter hepatic expression of gene networks in 1-carbon metabolism, inflammation, oxidative stress, and the growth hormone–insulin-like growth factor 1 axis pathways. *Journal of Dairy Science*, 97: 7451-7464.

Pawar, S.P., Neelam, K., Thakur, S.S. y Kaur, J. 2015. Effect of dietary Rumen Protected Choline supplementation on milk choline content in crossbred cows. *Indian Journal Animal Nutrition*. 32(1):30-35.

Pérez Gastell, P. L., de Alejo, P., and Luis, J. 2000. Métodos para medir el daño oxidativo. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 29(3): 192-198.

Pinotti, L., Baldi, A. and Dell'Orto, V. 2002. Comparative mammalian choline metabolism with emphasis on the high-yielding dairy cow. *Nutrition Research Reviews*, 15: 315–331.

Pinotti, L., Campagnoli, A., Sangalli, L., Rebucci, R., Dell'Orto, V. and Baldi, A. 2004. Metabolism of periparturient dairy cows fed rumen-protected choline. *Journal of Animal and Feed Science*, 13: 551-554.

Pinotti, L., Campagnoli, A., Dell'Orto, V. and Baldi, A. 2005. Choline: Is there a need in the lactating dairy cow? *Livestock Production Science*, 98: 149-152.

Quiñonez, L. 2012. Suplementación de la dieta de becerros destetados con correctores multitrinutricionales sueltos y compactos. *Investigación y Saberes*, 1(2): 25-28.

Rattanatray, L., Muhlhausler, B.S., Nicholas, L.M., Morrison, J.L., and McMillen, I.C., 2014. Impact of maternal overnutrition on gluconeogenic factors and methylation of the phosphoenolpyruvate carboxykinase promoter in the fetal and postnatal liver. *Pediatric Research*, 75(1), 14-21.

Rochfort, S., Parker, A.J. and Dunshea, F.R. 2008. Plant bioactives for ruminant health and productivity. *Phytochemistry*, 69: 299-322.

Sales, J., Homolka, P. and Koukolová, V. 2010. Effect of dietary rumen-protected choline on milk production of dairy cows: a meta-analysis. *Journal of Dairy Science*, 93: 3746-54. doi: 10.3168/jds.2010-3106.

Sanchez, A.E., Ortega, C.M.E., Mendoza, M.G., Montañez, V.O.D. y Buntinx, D.S.E. 2012. Rastrojo de maíz tratado con urea y metionina protegida en dietas para ovinos en crecimiento. *Interciencia*, 37: 395-399.

Serrano, L. E. A. 2012. Indicadores de la peroxidación de lípidos y proteínas en vacas y vaquillas lecheras en periodo de transición. Tesis Licenciatura. Chile.

Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. 2018. Listado de sustancias prohibidas para consumo animal. <https://www.gob.mx/senasica/prensa/emite-sagarpa-listado-de-sustancias-prohibidas-para-consumo-animal-167119?state=published>. Consultado en septiembre 2018.

Sharma, A., & Ranjan, S. 2015. Effect of herbal and chemically synthetic choline on physio-biochemical characteristics of chicks. *Journal of Global Biosciences*, 4(6): 2537-2542.

Strzetelski, J.A., Kowalski Z.M., Kowalczyk, J.F. Borowiec, F., Osieglowski, S. and Ślusarczyk, K. 2009. Protected methionine as a methyl-group donor for dairy cows fed diets with different starch sources in the transition period. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 18: 28–41.

Sun, F., Cao, Y., Cai, C., Li, S., Yu, C. and Yao, J. 2016. Regulation of nutritional metabolism in transition dairy cows: Energy homeostasis and health in response to post-ruminal choline and methionine. *PloS one*, 11(8): e0160659.

Südekuma, K.H., Wolfram, S., Ader, P., and Robert, J.C. 2004. Bioavailability of three ruminally protected methionine sources in cattle. *Animal Feed Science and Technology*, 113: 17-25.

Tavares, C. D.J, Sharabi, K., Dominy, J. E., Lee, Y., Isasa, M., Orozco, J. M., Jedrychowski, M.P., Kamenecka, T. M., Griffin, P.R., Gygi, S.P. and Puigserver, P. 2016. The methionine transamination pathway controls hepatic glucose metabolism through regulation of the GCN5 acetyl transferase and the PGC-1 α transcriptional coactivator. *Journal of Biological Chemistry*, 291(20): 10635-10645. DOI: 10.1074/jbc.M115.706200

Tsiplakou, E., Mavrommatis, A., Kalogeropoulos, T., Chatzikonstantinou M., Koutsouli, P., Sotirakoglou, K., Labrou, N. and Zervas, G. 2017. The effect of dietary supplementation with rumen-protected methionine alone or in combination with rumen-protected choline and betaine on sheep milk and antioxidant capacity. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 101(5): 1004-1013.

Van Cleef, F.O.S., Ezequiel, J.M.B., D'Aurea, A.P., Almeida, M.T.C., Perez, H.L., and Van Cleef, E.H.C.B., 2017. Feeding behavior, nutrient digestibility, feedlot performance, carcass traits, and meat characteristics of crossbred lambs fed high levels of yellow grease or soybean oil. *Small Ruminant Research*, 137: 151-156.

Van Keulen, J.V. and Young, B.A. 1977. Evaluation of acid-insoluble ash as a natural marker in ruminant digestibility studies. *Journal of Animal Science*, 44: 282-287.

Van Soest, P.J., Robertson, J.B. and Lewis, B.A. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, 74: 3583-3597.

Vance, D. E. 2014. Phospholipid methylation in mammals: from biochemistry to physiological function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1838(6): 1477-1487.

Vituro, E., Koenning, M., Kroemer, A., Schlamberger, G., Wiedemann, S., Kaske, M. and Meyer, H.H., 2009. Cholesterol synthesis in the lactating cow: Induced expression of candidate genes *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 115: 62-67.

Wallace, R.J. 2004. Antimicrobial properties of plant secondary metabolites. *Proceedings of the Nutrition Society*, 63: 621-629.

Yao, Z. and Vance, D.E. 1988. The active synthesis of phosphatidylcholine is required for very low-density lipoprotein secretion from rat hepatocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 263: 2998-3004.

Zeisel, S.H. and Da Costa, K.A. 2009. Choline: an essential nutrient for public health. *Nutrition Reviews*, 67: 615–623.

Zhou, Z., Vailati-Riboni, M., Trevisi, E. Drackley, J.K. Luchini, D.N. and Loor, J.J. 2016. Better postpartal performance in dairy cows supplemented with rumen-protected methionine compared with choline during the peripartal period. *Journal of Dairy Science*, 99:1-17.

Zom, R.L.G., Van Baal, J., Goselink, R.M.A. Bakker, J.A., Veth, M.J. and Van Vuuren, A.M. 2011. Effect of rumen-protected choline on performance, blood metabolites, and hepatic triacylglycerols of periparturient dairy cattle. *Journal Dairy Science*, 94:4016-4027.

10. ANEXOS

ANEXO A. Análisis bromatológicos del alimento

i. Determinación de materia seca y humedad, (método 925.10, AOAC)

Procedimiento

1. Se utilizaron charolas que previamente estuvieran a peso constante, se identificaron y pesaron en una balanza de precisión
2. El forraje se cortó en pedazos pequeños y se pesó en la charola
3. Las muestras se deshidrataron en la estufa a 60 °C durante 24 horas
4. Se retiraron de la estufa y se dejaron enfriar en un desecador
5. Se pesaron en la misma balanza que se utilizó inicialmente
6. Posteriormente se molieron en un Molino Thomas-Wiley Modelo 4, (Thomas-Scientific, USA) en una malla de 2 mm; se guardaron en bolsas de plástico, se sellaron e identificaron (con fecha, nombre de la muestra y nombre de propietario) para su posterior análisis.

Fórmula:

$$\% MS = \frac{PMI - PMF}{PMI} * 100$$

PMI= Peso de la muestra inicial menos peso de la charola

PMF= Peso de la muestra final menos peso de la charola

ii. Determinación de extracto etéreo o grasa cruda (método 920.35, AOAC)

Procedimiento:

1. En papel filtro, se pesaron aproximadamente 2 g de muestra seca y molida, formando un paquete
2. Se pesaron los vasos para grasa en una balanza analítica, y se regresaron a un desecador (los vasos se manipulan con pinzas, teniendo cuidado de que no se resbalen).
3. Se colocó el paquete de la muestra en cada cartucho y éste dentro del portacartucho (manipular el cartucho y el portacartucho con guantes o con papel).

4. Se instaló el portacartucho con la muestra en la abrazadera del aparato de Goldfish
5. Se sacaron los vasos del desecador y se les adicionó éter de petróleo aproximadamente un octavo de su capacidad, se colocaron en el equipo.
6. Se tomó el tiempo de extracción (durante 4 horas), iniciando éste en el momento en que se observó la ebullición o cayera la primera gota del condensado. Se revisó que el éter mantuviera aproximadamente al mismo nivel del principio en cada vaso, de lo contrario se adicionó más.
7. Transcurrido el tiempo, se retiró el portacartucho de cada vaso y se colocó en su lugar el dedal recuperador de éter, guardando el paquete con las muestras desgrasadas.
8. Se colocaron de nuevo los vasos en el aparato y, cuidándolos hasta que casi se haya evaporado todo el éter, se retiraron de la placa de calentamiento para evitar que se quemara la grasa.
9. Posteriormente se pusieron los vasos en el horno a 100 °C por 5 minutos para estabilizarlos, transcurrido el tiempo se retiraron con pinzas y se colocaron en un desecador hasta que se enfriaron (20 minutos).
10. Cada vaso se pesó en la misma balanza analítica utilizada al principio.
11. Se lavaron los vasos con un poco de éter recuperado y jabón, así como el portacartucho para eliminar todo rastro de grasa.

Fórmula

$$PG = PVG - PV V$$

Dónde:

PVG: Peso del vaso con grasa (g)

PV V: Peso del vaso vacío (g)

PG: Peso de la grasa (g)

$$\% GCbs = \frac{\text{Peso de grasa (g)} \times 100}{\text{Peso de la muestra (g)}}$$

$$\% GCbh = \frac{\% GCbs \times \% MS}{100}$$

% GCbs: Grasa cruda base seca

% GCbh: Grasa cruda base húmeda

% MS: % Materia seca

iii. Determinación de nitrógeno total y proteína cruda (método 920.35, AOAC)

Procedimiento:

Digestión ácida

1. En una balanza analítica se pesaron aproximadamente 0.3 g de muestra seca y molida,
2. La muestra se depositó en el tubo FOSS de digestión (se identificó la muestra con relación al número del tubo FOSS),
3. Se añadieron los reactivos para la digestión ácida en el orden indicado: dos tabletas kjeltec (con pinzas), seguido de 12.5 ml de ácido sulfúrico concentrado,
4. Se colocó el rack sobre el digestor del equipo Kjendahl,
5. Transcurrido el tiempo, se retiró el rack de digestor con mucho cuidado pues se encontraba a una temperatura muy alta. Se dejó enfriar en la campana de extracción de 15 a 20 minutos.

Destilación

6. En un matraz Erlenmeyer de 250 ml se midieron 30 ml de ácido bórico al 4% y se agregaron 3 gotas de indicador de proteínas para proseguir con la destilación.

Titulación

7. Se tituló el destilado con HCl al 0.1 N hasta que la solución viró a color rosa.

Fórmula:

$$\% N = \frac{\% (Vm - Vb)(N)(meq. N)(100)}{PM}$$

Dónde:

% N: Porcentaje de nitrógeno

PM. Peso de la muestra (g)

Vm: Volumen inicial gastado de HCl en la titulación de la muestra.

Vb: Volumen (ml) gastado de HCl en la titulación del blanco

N: Normalidad real de HCl (anotada en frasco)

Meq N: miliequivalente del nitrógeno (0.014)

$$\% PCbs = \frac{(Vm - Vb) (N)(meq.N)(factor)(100)}{PM}$$

% PCbs: Porcentaje de proteína cruda a base seca

Factor de nitrógeno para convertir a proteínas: 6.25 para la mayoría de los alimentos, 6.37 para leche, 5.70 para trigo.

iv. Fibra cruda (Van Soest *et al.* 1991)

Procedimiento:

Fibra Detergente Neutro:

1. Las bolsas de poliseda o Ankom se identificaron previamente y se mantuvieron a peso constante y libres de humedad, posteriormente se registró su peso.
2. Se pesaron 0.5 g de las muestras del alimento por duplicado y se vertieron a las bolsas de Akom; se sellaron térmicamente.
3. Selladas las bolsas, se introdujeron en un recipiente con solución de detergente neutro y se mantuvieron en ebullición durante 60 minutos. Las bolsas tenían que sumergirse constantemente.
4. Transcurrido el tiempo, se lavaron las bolsas con abundante agua de la llave, sin exprimir ni hacer movimientos bruscos hasta eliminar la mayor cantidad posible del detergente.
5. Posteriormente se repitió la ebullición, pero ahora con agua de la llave, con la finalidad de eliminar todo el detergente de las bolsas.
6. Finalmente, las bolsas se escurrieron y se pusieron a secar en la estufa a aproximadamente 80 °C durante 24 horas; una vez secas, se pesaron y se hicieron los cálculos correspondientes.

* El método recomienda que si el sustrato contiene altas cantidades de almidón (alimento integral) se adicionen 3 ml de termoamilasa por cada litro de solución detergente neutro.

Fórmula:

$$\% FDN = \frac{\text{Peso FDN}}{\text{Peso de la muestra inicial}} \times 100$$

Fibra Detergente Ácido:

Para la determinación de FDA se repitió el procedimiento desde el paso dos, empleando ahora la solución ácida pH 4 y las muestras (bolsas) previamente secas.

Fórmula:

$$\% FDA = \frac{\text{Peso FDA}}{\text{Peso de la muestra inicial}} \times 100$$

v. Determinación de cenizas insolubles en ácido

Procedimiento:

Determinación de digestibilidad con marcadores internos, cenizas insolubles en ácido (CIA)

1. Se utilizaron crisoles que estuvieron previamente a peso constante en la estufa, se manipularon con pinzas y se dejaron enfriar en el desecador aproximadamente 15 minutos.
2. Se pesaron los crisoles en la balanza analítica (Mettler Toledo AL210) y se anotó el peso exacto y la identificación de cada crisol.
3. En cada crisol se pesaron por triplicado 5 gramos de la muestra seca y molida y se calcinaron a 550 °C durante 12 horas.
4. Se retiraron los crisoles de la mufla (las muestras no debían estar negras, si lo estaban, se tenían que incinerar por más tiempo). Se dejaron enfriar los crisoles en el desecador por unos 20 minutos aproximadamente.
5. Se pesaron los crisoles con las cenizas en la misma balanza que se utilizó inicialmente, y se registró el peso.

6. Se colocaron las cenizas en un vaso de precipitados de 250 ml y se agregaron 100 ml de ácido clorhídrico 2 N, se taparon los vasos con papel aluminio dejando una pequeña abertura, posteriormente se pusieron a hervir durante 5 minutos.

7. Se filtraron las cenizas al vacío con papel filtro libre de cenizas (Whatman 541), se lavó el vaso varias veces con agua caliente (hasta que no quedaran residuos) así como las cenizas en el papel filtro hasta que hayan quedado lo más libre de ácido clorhídrico.

8. Se dobló el papel filtro formando un paquete y se colocaron en el mismo crisol para volver a calcinarlas a 550 °C durante 5 horas. Después se sacaron de la mufla y se dejaron enfriar en un desecador y finalmente se pesaron nuevamente para poder calcular el porcentaje de CIA.

Fórmula:

$$\% \text{ Cenizas insolubles en ácido} = \frac{(\text{Peso del crisol} + \text{cenizas} - \text{Peso crisol})}{\text{Peso de la muestra seca}} \times 100$$

vi. Perfil de aminoácidos

El contenido de aminoácidos del alimento fue analizado por Evonik, Industrias mediante Amino Lab. (AOAC, 1995; European Commission, 2009).

ANEXO B. Preparación de soluciones para fibra cruda

i. Solución neutra de detergente (FDN)

Pesar:

- 30 g de Lauril sulfato de sodio
- 18.61 g de Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)
- 6.81 g de Tetraborato de sodio decahidratado ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$)
- 4.56 g de Fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4)

Se disuelven en aproximadamente 800 mL de agua destilada, se mantiene en agitación constante y posteriormente se adicionan 10 ml de etilenglicol y se afora con agua destilada a un litro. Finalmente se ajusta el pH a 7.0.

ii. Solución ácida de detergente (FDA)

- Preparar solución de ácido sulfúrico 1N: medir 27 ml de ácido sulfúrico concentrado y aforara a un litro con agua destilada.
- Posteriormente se adicionan 20 g de bromuro de cetiltrimetilamonio (CETAB) y se ajusta el pH a 4.

ANEXO C. Determinación de metabolitos sanguíneos

i. Glucosa

Determinación cuantitativa, mediante Kit SPINREACT

Reactivos:

R	TRIS pH 7.4
	Fenol
	Glucosa oxidasa (GOD)
	Peroxidasa (POD)
4-Aminofenazona (4-AF)	
Glucosa CAL	Patrón primario acuoso de glucosa

Reactivos listos para usarse

Procedimiento:

Longitud de onda 505 nm

Temperatura 37 °C

Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada

Pipetear:

	Blanco	Patrón	Muestra
R (mL)	1.0	1.0	1.0
Patrón (µl)	---	10	---
Muestra (µl)	---	---	10

Mezclar e incubar 10 minutos a 37 °C o 20 minutos a temperatura ambiente (15-25 °C)

Leer absorbancia (A) del patrón y la muestra frente a blanco de reactivo. El color es estable como mínimo 30 minutos.

Fórmula:

$$\frac{(A) \text{ Muestra} - (A) \text{ Blanco}}{(A) \text{ Patrón} - (A) \text{ Blanco}} \times 100 (\text{conc patrón}) = \frac{\text{mg}}{\text{dL}} \text{ de glucosa en la muestra}$$

ii. Proteínas totales

Determinación cuantitativa, mediante Kit SPINREACT

Reactivos:

R Biuret	Tartrato de sodio y potasio
	Yoduro de sodio
	Yoduro de potasio
	Sulfato de cobre (II)
Proteína total CAL	Patrón primario de albúmina bovina 7 g/dL

Reactivos listos para su uso

Procedimiento:

Longitud de onda 540 nm

Temperatura 37 °C

Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada

Pipetear:

	Blanco	Patrón	Muestra
R (mL)	1.0	1.0	1.0
Patrón (µl)	----	25	---
Muestra (µl)	---	---	25

Mezclar e incubar 5 minutos a 37 °C o 10 minutos a temperatura ambiente

Leer absorbancia (A) del patrón y la muestra frente a blanco de reactivo. El color es estable como mínimo 30 minutos. Color intenso violeta-azulado.

Fórmula:

$$\frac{(A) \text{ Muestra}}{(A) \text{ Patrón}} \times 7 (\text{Conc patrón}) = \frac{g}{dL} \text{ de proteínas totales}$$

iii. Albúmina

Determinación cuantitativa, mediante Kit SPINREACT

Reactivos:

R	Verde bromocresol pH 4.2
Albumina CAL	Calibrador primario de albumina

Reactivos listos para su uso

Procedimiento:

Longitud de onda 630 nm

Temperatura 37 °C

Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada

Pipetear:

	Blanco	Patrón	Muestra
R (mL)	1.0	1.0	1.0
Patrón (µl)	----	5	---
Muestra (µl)	---	---	5

Mezclar e incubar 5 minutos a 37 °C o 10 minutos a temperatura ambiente

Leer absorbancia (A) del patrón y la muestra frente a blanco de reactivo. El color es estable una hora a temperatura ambiente. Color verde-azulado.

Fórmula:

$$\frac{(A) \text{ Muestra} - (A) \text{ Blanco}}{(A) \text{ Patrón} - (A) \text{ Blanco}} \times 5 (\text{conc patrón}) = \frac{g}{dL} \text{ de albúmina en la muestra}$$

iv. Colesterol

Determinación cuantitativa, Kit SPINREACT

Reactivos:

R	PIPES pH 6.9
	Fenol
	Colesterol esterasa (CHE)
	Colesterol oxidasa (CHOD)
	Peroxidasa (POD)
4-Aminofenazona (4-AF)	
Colesterol CAL	Patrón primario acuoso de colesterol

Reactivos listos para usarse, protegerse de la luz

Procedimiento:

Longitud de onda 505 nm

Temperatura 37 °C

Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada

Pipetear:

	Blanco	Patrón	Muestra
R (mL)	1.0	1.0	1.0
Patrón (µl)	----	10	---
Muestra (µl)	---	---	10

Mezclar e incubar 5 minutos a 37 °C o 10 minutos a temperatura ambiente (15-25 °C)

Leer absorbancia (A) del patrón y la muestra frente a blanco de reactivo. El color es estable como mínimo 60 minutos.

Fórmula:

$$\frac{(A) \text{ Muestra}}{(A) \text{ Patrón}} \times 200 (\text{Conc patrón}) = \frac{mg}{dL} \text{ de colesterol de la muestra}$$

v. Triglicéridos

Determinación cuantitativa, mediante Kit SPINREACT

Reactivos:

R	GOOD pH 6.3
	p-Clorofenol
	Lipoproteína lipasa (LPL)
	Glicerol quinasa (GK)
	Glicerol-3-oxidasa (GPO)
	Peroxidasa (POD)
	4-Aminofenazona (4-AF)
	ATP
Triglicéridos CAL	Patrón primario de triglicéridos

Reactivos listos para usarse

Procedimiento:

Longitud de onda 505 nm

Temperatura 37 °C

Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada

Pipetear:

	Blanco	Patrón	Muestra
R (mL)	1.0	1.0	1.0
Patrón (µl)	----	10	---
Muestra (µl)	---	---	10

Mezclar e incubar 5 minutos a 37 °C o 10 minutos a temperatura ambiente (15-25 °C)

Leer absorbancia (A) del patrón y la muestra frente a blanco de reactivo. El color es estable como mínimo 30 minutos. Color rojo.

Fórmula:

$$\frac{(A) \text{ Muestra}}{(A) \text{ Patrón}} \times 200 (\text{Conc patrón}) = \frac{mg}{dL} \text{ de triglicéridos en la muestra}$$

vi. Ácidos grasos no esterificados

Determinación cuantitativa mediante Kit RANDOX

Reactivos:

R1a	Buffer
R1b	Enzima/coenzima
R2a	Diluyente de enzima
R2b	Maleimida
R2c	Reactivo de enzima
CAL	Patrón

Preparación de reactivos:

R1a. Buffer

Listo para su uso, estable hasta la fecha de caducidad cuando se conserva entre 2 y 8 °C.

R1b. Enzima/coenzima

Reconstituir un vial de R1b (enzima/coenzima) con 10 mL de R1a (buffer). Estable durante 5 días 2 y 8 °C, no congelar y proteger de la luz.

R2a. Diluyente de enzima

Listo para su uso. Estable hasta la fecha de caducidad conservarse entre 2 y 8 °C.

R2b. Maleimida

Reconstituir el contenido de una botella de R2b (maleimida) con el contenido de una botella de R2a (diluyente de enzima), asegurar completa disolución y usar inmediatamente para reconstituir la botella de R2c (reactivo de enzima).

R2c. Reactivo de enzima

Reconstituir el contenido de un vial de R2c (reactivo de enzima) con una botella de solución R2b reconstituida. Estable durante 5 días entre 2 y 8 °C, no congelar y proteger de la luz.

CAL Patrón

Listo para su uso, estable hasta la fecha de caducidad cuando se conserva entre 2 y 8 °C.

R1: Buffer/Enzima/coenzima

R2: Diluyente de enzima/Maleimida/reactivo de enzima

CAL

Procedimiento:

Longitud de onda 550 nm

Temperatura constante 37 °C

Leer la absorbancia frente al blanco de reactivo

Pipetear:

	Blanco de reactivo	Patrón CAL	Muestra	Muestra blanco
Agua destilada (μL)	50	-----	-----	-----
Patrón (μL)	-----	50	-----	-----
Muestra (μL)	-----	-----	50	-----
Sol R1 (mL)	1	1	1	1
Mezclar e incubar a 37 °C durante 10 minutos				
Sol R2 (mL)	2	2	2	2
Muestra (μL)	-----	-----	-----	50

Mezclar e incubar a 37 °C durante 10 minutos.

Tiempo de lectura 10 minutos

Fórmula:

$$\frac{(A) \text{ Muestra}}{(A) \text{ Patrón}} \times \text{concentración de patrón} = \text{mmol/L}$$

Effect of herbal choline and rumen-protected methionine on lamb performance and blood metabolites

V. Rodríguez-Guerrero¹, A. C. Lizarazo^{2#}, S. Ferraro¹, N. Suárez³, L. A. Miranda⁴ & G. D. Mendoza¹

¹ Doctorado en Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco, México

² Centro de Enseñanza Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal (CEIPSA), Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México

³ Maestría en Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, México

⁴ Universidad Autónoma Chapingo, Departamento de Zootecnia, México

(Received 4 August 2017; Accepted 3 January 2018; First published online 30 January 2018)

Copyright resides with the authors in terms of the Creative Commons Attribution 4.0 South African License.

See: <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/za>

Condition of use: The user may copy, distribute, transmit and adapt the work, but must recognize the authors and the South African Journal of Animal Science.

Abstract

Twenty-four lambs (Pelibuey x East Friesian), weighing 22.7 ± 3.2 kg, were fed a basal diet of corn silage, oat hay, alfalfa hay, and concentrate (60% forage and 40% concentrate). Treatments consisted of oral doses of rumen-protected methionine (RPM) (0 and 1.5 g/day) and herbal choline (biocholine) (0 and 4 g/day) in a completely random block design with factorial arrangement of treatments, where lambs were blocked by sex. The experiment was conducted for 60 days, and measurements of live weight and dry matter intake were obtained. No effects of the treatments were observed on performance variables (lamb growth, consumption and feed conversion). Non-esterified fatty acids (NEFA) were increased by biocholine and unaffected by methionine (Met). Biocholine increased glucose and cholesterol, whereas methionine increased triglycerides, albumin and plasma protein. The dietary supplementation with biocholine and RPM did not improve lambs' growth; however, biocholine and Met showed a lipotropic effect by mobilizing NEFA and stimulating glucose and cholesterol synthesis.

Keywords: Feed additives, growing sheep, lipid metabolism

Corresponding author: lizarazo@unam.mx

Introduction

Methionine (Met) has been recognized as one of the limiting amino acids for growth and milk production in goats and sheep (NRC, 2007). However, its optimal intake for various physiological states is unknown. Previous experiments using rumen-protected methionine (RPM) in growing lambs have not been successful, presumably because the diets were based on low-quality forage with inadequate lysine (Lys) and Met flows (Sanchez *et al.*, 2012). In contrast, grazing heifers supplemented with RPM and complemented with sources of bypass Lys improved average daily gain (ADG) (Gomez *et al.*, 2011). The NRC (2007) indicated that choline requirements have not been established for sheep, but suggested that production could be improved by using it as a supplement. In previous experiments, finishing lambs increased their ADG when they were provided with rumen-protected choline (RPC) during the first stages of growth (Bryant *et al.*, 1999). Recently, the addition of herbal choline improved the final live weight in lambs fed with high grain rations (Godinez-Cruz *et al.*, 2015).

There is a known relationship between the metabolisms of choline and Met. The two are metabolically interchangeable as sources of methyl groups, and play key roles in the energy and protein metabolism in ruminants (Pinotti *et al.*, 2002). Methionine can provide methyl groups for the *de novo* synthesis of choline (via S-adenosylmethionine). Choline can be oxidized to betaine, with methyl transfer from homocysteine and then Met (Zeisel & Da Costa 2009; Ardalan *et al.*, 2011). Maskařová *et al.* (2014) suggest the importance of evaluating RPM and choline in ruminants and experiments in various physiological statuses. Previous experiments with dairy cows showed that dietary supplementation with RPM and RPC alleviated negative

energy balance, thereby improving feed intake and modulating hepatic lipid metabolism (Sun *et al.*, 2016). Another study showed that the combination of RPM and RPC did not improve milk production, but it did result in a moderate interaction in the energy balance, reducing the megacalories (Mcal) lost per day (Zhou *et al.*, 2016). The results obtained in rats ingesting a choline-deficient diet had lower tissue concentrations of Met and S-adenosylmethionine (Zeisel *et al.*, 1989), suggesting that there could be advantages in using both nutrients in growing ruminants. It is thus possible to hypothesize that lamb growth can be improved by the supplementation of Met and choline. Therefore, the objective of this experiment was to evaluate the dietary supplementation of a combination of RPM and biocholine on lambs' growth and their blood metabolites as an indicator of lipid metabolism. Both nutrients have liver functions that affect the lipid and carbohydrate metabolism. Met and choline play important roles in methyl group transfer (Niculesco & Zeisel, 2000) and methyl groups are required for carnitine synthesis essential for fatty acid oxidation (Vaz & Wanders, 2002). Phosphatidylcholine participates in the synthesis and export of triglycerides in very low density lipoproteins (Zeisel, 2006) and this has affected plasma NEFA and cholesterol (Pinotti *et al.*, 2003). Choline has increased liver glycogen (Piepenbrink & Overton, 2003) and Met transamination pathways promote the activation of the transcriptional coactivator PGC-1 α , which is involved in the control of hepatic gluconeogenesis (Tavares *et al.*, 2016); PGC-1 α plays a central role in the regulation of cellular energy metabolism, (Liang & Ward, 2006).

Materials and Methods

The experiment was conducted in the Centro de Enseñanza Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal (CEPIPSA) Veterinary Faculty of the Universidad Nacional Autónoma de México (19° N, 99° W, 2760 m above sea level) with a mean temperature of 19 °C.

Twenty-four lambs (Pelibuey x East Friesian: 22.7 \pm 3.2 kg LW; 12 males and 12 females) were assigned to four treatments, which consisted of two oral doses of RPM (Mepron, Evonik Industries México Co) at 0 and 1.5 g/day and biocholine (Indian Herbs and Technofeed México) at 0 and 4 g/day in a completely random block design with factorial arrangement (2 x 2) where lambs were blocked by sex. The doses of RPM and biocholine were weighed daily and administered orally to each animal before the first meal to ensure consumption. The diet was formulated according to NRC (2007) requirements for growing lambs. After an adaptation period of 15 days, lambs were fed with a basal diet of alfalfa hay (30%), corn stover (15.0%), oat hay (8.0%), cane molasses (5.0%), commercial concentrate (40.0% Ovina Engorda MP) and minerals (1.0%) (Each kg contained Ca 115 g, P 80 g, Mg 20 g, Na 150 g, Cl 230, K 5 g, S 40 g, Mn 2000 mg, Fe 5500 mg, Zn 6000 mg, Se 30 mg, Co 50 mg, I 100 mg, Cu 1000 mg, vitamin A 500,000 IU, vitamin D 150,000 IU and vitamin E 1000 IU.) Lambs were fed in individual pens at 9:00 and 14:00 h, ensuring 100 g of feed refusals per day, and they had access to clean water *ad libitum*. The experiment lasted 60 days.

Dry matter intake (DMI) was measured on five consecutive days from day 55 to 60. Bodyweight was recorded at 1, 40, and 60 days. Samples of feed and feed refusals were collected daily during the collection period. All samples were frozen at -20 °C until analyses. Feed samples were analysed according to the AOAC (1995) methods for dry matter (DM) and crude protein. Neutral detergent fibre (NDF) and acid detergent fibre (ADF) analyses were conducted according to Van Soest *et al.* (1991). Faecal samples were collected directly from the rectum every four hours for five consecutive days (Van Cleff *et al.* (2016), starting on day 50 of the experimental period, to estimate the apparent dry matter digestion. Feed andorts were collected daily during the same period, and those samples were used to determine acid insoluble ash as an internal marker to estimate dry matter digestibility (DMD) (Van Keulen & Young, 1977). Samples of biocholine, containing choline in the form of phosphatidylcholine, were also analysed according to the procedures described previously (ADF, NDF, DM and crude protein). The amino acid content of feed was analysed at Amino Lab, Evonik Industries (AOAC International, 1995) (European Commission, 2009).

Blood samples were collected via jugular venipuncture with vacutainer tubes without anticoagulant at the end of the experiment (day 60) to determine the changes in serum metabolites. The serum was separated by centrifugation (3000 rpm for 30 min) and refrigerated until analysis. Glucose, cholesterol, triglycerides, albumin, total protein and NEFA were determined with a spectrophotometer Cary-100 UV-visible with these methods, namely glucose oxidase-peroxidase (GOD-POD), cholesterol-peroxidase (CHOD-POD), glycerol phosphate dehydrogenase-peroxidase (GPO-POD), Bromocresol green, Biuret method according to Spinreact (Spain) kits, and NEFA by Randox Kit, respectively.

To estimate the *in vitro* degradation of the biocholine and to demonstrate the protection against the microbial activity, samples of biocholine (500 mg) were incubated in 100 mL amber flasks to estimate the kinetics of gas production with ruminal fluid. The inoculum consisted of rumen liquor obtained as described by Mendoza *et al.* (1995), using an oesophageal probe from two sheep (34 \pm 1.6 kg BW) fed a 50: 50 forage to concentrate ratio. The inoculum was obtained before the morning feeding, and was mixed and strained

through eight layers of cheesecloth into a flask flushed with CO₂. Then, 10 mL of particle-free ruminal fluid was added to each glass bottle (120 mL capacity), and 80 mL of buffer solution (35 g sodium bicarbonate and 4 g ammonium bicarbonate for 1 L distilled water) (Goering & Van Soest, 1970) was added under a continuous flow of carbon dioxide to maintain anaerobic conditions. Each flask was closed tightly with a rubber stopper and an iron sealing ring and incubated in a water bath at 38 °C. The gas pressure was measured with a pressure gauge (Metron, Model 63100, México) at 0, 2, 4, 6, 8, 10, 14, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 60, and 72 hours of incubation (Blümmel & Lebzien, 2001). Pressure values were transformed to gas volumes with the following linear regression equation:

$$V = (P + 0.0186) (0.0237)^{-1}$$

Using the gas volumes at each time fraction, parameters of kinetics of gas production were estimated as follows: lag phase (h), maximal volume (V_m; mL g⁻¹ DM of substrate), and rate (S; h⁻¹) of gas production, from the model proposed by Menke & Steingass (1988):

$$V_0 = V_m / (1 + e^{(2 - 4 * s * (t - L))})$$

The fermentation residues were dried at 65 °C overnight before recording. The half time (K_{0.5} h) required to obtain the V_{max} was estimated using the 0.639/k of a first-order kinetics relationship.

Data were analysed as a completely randomized block design using sex as a blocking criterion and the interaction block x treatment as an error term. If the response variable was measured more than once, the data were analysed using repeated analyses (Herrera & Garcia, 2010) with JMP[®] SAS institute Inc., Cary N.C. (Sall *et al.*, 2012).

Results and Discussion

The chemical composition of basal rations is presented in Table 1, highlighting the low content of Lys and Met and their relationship. Table 2 presents the biocholine chemical composition and the parameters of *in vitro* gas production with ruminal microorganism, highlighting the high lipid content. Regarding lamb performance (Table 3), no treatment effects were observed on bodyweight, DM intake or digestibility. Table 4 shows the blood metabolites. The NEFAs were increased by biocholine (*P* < 0.01) and unaffected by Met. Other blood metabolites, such as triglycerides, showed the interactions of Met and biocholine (*P* < 0.01). Biocholine increased glucose and cholesterol (*P* < 0.01), whereas Met increased triglycerides, albumin and plasma protein.

It has been suggested that the response to RPM and RPC may be positive in dairy cattle because of their high methylation requirements (Brusemeister & Sudekum, 2006), but their effects on production have not been consistent (Davidson *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2016). In this experiment, the lack of response in lamb growth to RPM may have been owing to the low Lys content in the basal diet (Table 1). The basal diet in this experiment had a theoretical duodenal flow of metabolizable Lys of 0.2 g/d for treatments without RPM and 0.05 g/d of Met without amino acid. Therefore, when RPM was added, the Lys : Met ratio decreased to 0.13, and Lys limited the growth response in both groups. Sanchez *et al.* (2012) evaluated 5 g/d of RPM in growing lambs fed with rations based on corn stover and did not find any effects of the amino acid on growth, intake or feed efficiency. In contrast, Gomez *et al.* (2011) demonstrated that grazing heifers exhibited improved growth in response to the dietary addition of RPM when a source of bypass Lys was included in the supplement. Madsen *et al.* (2005) found a positive effect in dairy goats in milk production, but only when Met was combined with rumen-protected Lys at a Lys to Met ratio of 2.55 : 1. Baldwin *et al.* (1993), in experiments with lambs and ewes, demonstrated that neither lactating ewes nor lambs responded to RPM supplementation in diets with extensive protein degradation, which resulted in a limited Lys supply.

The *in vitro* gas production indicates that half of herbal choline is fermented at 18 hours (Table 2), which would potentially allow an important fraction in the lower tract. However, *in vitro* incubations reflect only bacterial activity and since *in vivo* rumen protozoa may be responsible for the engulfment of phosphatidylcholine in the rumen (Mohamed & Chaudhry 2008), ciliates should be evaluated in future studies and confirm the duodenal flow of the herbal choline and ensure the adequate supply of this nutrient in growing ruminants. The ruminal degradation of RPM (Mepron) *in vitro* and *in situ* was reported by Lara *et al.* (2003), whose results for lactating cows confirm the protection (Lara *et al.*, 2006). However, information for herbal choline is scarce. According to the parameters of gas production (Table 3) and the results of Godinez-Cruz *et al.* (2015), a positive response in lamb growth was expected. However, no effects of

Table 1 Experimental diet and chemical composition of basal diet (dry matter basis)

Component	Mean
DM (%)	49.40
CP (%)	9.90
NDF (%)	49.72
ADF (%)	34.82
EE (%)	2.20
<i>Amino acids</i>	
Methionine	0.157
Lysine	0.366
Lys : Met ratio cysteine	2.365
Met + Cys	0.130
Threonine	0.287
Arginine	0.380
Isoleucine	0.434
Leucine	0.362
Valine	0.734
Histidine	0.487
Phenylalanine	0.199
Glycine	0.444
Serine	0.473
Proline	0.414
Alanine	0.586
Aspartic acid	0.584
Glutamic acid	0.847

DM: dry matter; CP: crude protein; NDF: neutral detergent fibre; ADF: acid detergent fibre; EE: ether extract

Table 2 Chemical composition of biocholine and *in vitro* parameters of gas production of ruminal fermentation

Item	Mean
DM (%)	92.3
Ash (%)	14.3
CP (%)	6.02
NDF(%)	17.4
ADF (%)	4.3
EE (%)	6.4
<i>Fermentation gas parameters</i>	
Maximum volume of gas production (mL)	225
Rate of fermentation (%/h)	3.9
Lag time (h)	2.2
K _{0.5} (h)	18.3

DM: dry matter; CP: crude protein; NDF: neutral detergent fibre; ADF: acid detergent fibre; EE: ether extract; K_{0.5}: time required to obtain the half of the maximum volume

biocholine or biocholine-Met supplementation were observed in the lamb performance variables mainly because of the inadequate Lys : Met ratio in the diet.

The results obtained for the half time to reach Vmax suggest that the biocholine source contains fractions of rumen-protected choline. An evaluation of commercial sources of RPC indicated that *in vitro* or *in situ* degradation in rumen from encapsulated products varied from 40 to 80% (Brusemeister & Sudekum, 2006; Jayaprakash *et al.*, 2016). The results of Godinez-Cruz *et al.* (2015), who compared biocholine and an encapsulated choline chloride, indicated that the two sources resulted in the same final degradation, providing more bypass choline than that observed for the unsupplemented control.

The responses in blood metabolites have been varied according to the literature, and the estimated dose per metabolic weight of intestinally available choline appears not to be the determining factor. In this research, some metabolites (triglycerides and NEFA) were affected at a dose of just 6.42 mg/kg BW^{0.75}, but Li *et al.* (2015) did not find any such effects in blood cholesterol and triglycerides in lambs receiving an estimated dose from 37 to 116 mg/kg BW^{0.75}. In dairy cattle, Pinotti *et al.* (2004) observed a significant increase of plasma cholesterol and a NEFA decrease with a tendency for increased glucose with an estimated effective duodenal dose of 75 mg/kg BW^{0.75}. In contrast, Chung *et al.* (2009) did not find an effect on plasma NEFA and glucose in dairy cows dosed with an estimated effective 73 or 147 mg/kg BW^{0.75}. Nor did Zhou *et al.* (2016), who observed changes in glucose or fatty acids with estimated flows from 72 or 80 mg/kg BW^{0.75}. The supply of other methyl donors such as folate and betaine (Maio *et al.*, 2000) and the methyl requirements of the physiological stage (Pinotti *et al.*, 2005) must be considered in future studies of choline and Met to obtain better understanding of ruminants' responses to those nutrients.

Table 3 Main effects of supplementation with biocholine and rumen protected methionine on lamb performance

Parameters	Biocholine		Methionine		SEM	P-value		
	0	4	0	1.5		Biochol	Met	Biochol x Met
Initial BW (kg)	21.61	21.55	21.82	21.34	1.184	0.97	0.77	0.80
Final BW (kg)	28.63	28.68	28.98	28.33	1.257	0.98	0.71	0.76
ADG (g)	106.44	107.98	108.52	105.96	5.527	0.84	0.74	0.07
DM digestibility (%)	67.85	65.09	66.48	66.46	0.944	0.05	0.99	0.98
DM intake (kg/d)	530.8	534.8	545.3	520.4	18.92	0.88	0.36	0.05
DM intake (% BW)	2.18	2.15	2.21	2.12	0.131	0.91	0.34	0.05
Feed conversion	5.20	5.30	5.21	5.09	0.318	0.82	0.79	0.05
Carcass weight (kg)	13.91	12.16	13.16	12.91	0.593	0.06	0.76	0.49

BW: body weight; ADG: average daily gain; DM: dry matter; SEM: standard error of mean; Biochol: biocholine; Met: methionine

The higher concentrations of triglycerides and NEFA observed in the present study can be explained by the lipotropic role of choline. Choline is a lipotropic factor and helps optimize the balance between fat protein syntheses in dairy cattle (Sales *et al.*, 2010). It has been demonstrated that RPC supplementation in dairy cows before parturition decreased liver NEFA accumulation and increased liver glycogen (Pinotti *et al.*, 2005). Choline is also necessary for the transport and metabolism of lipid cholesterol (Zeisel & Da Costa, 2009), which would explain the higher blood cholesterol concentrations. The mechanism by which hepatic cholesterol synthesis is stimulated by choline in ruminants is not fully understood, but in other species, choline is required to synthesize the phosphatidylcholine portion in the very low density lipoprotein (VLDL) (Yao & Vance, 1988). However, the lack of an effect on cholesterol in treatments with both choline and Met was unexpected because choline can be used for cholesterol synthesis, as shown in goats (Emmanuel & Kennelly, 1984), and because RPC may spare Met for milk.

Nutrigenomic studies have shown that RPM alters liver key enzymes related to protein and energy metabolism. Some of these enzymes involved in the Met cycle are Met adenosyltransferase (1A MAT1a), and phosphatidylethanolamine methyltransferase (PEMT). Supplementation with RPC in cows has demonstrated that hepatic gene expression associated with antioxidant synthesis and DNA methylation

status were improved (Osorio *et al.*, 2014) and studies with liver hepatocytes from rodents show the relationship among the Met and hepatic glucose synthesis through PGC-1 α (Tavares *et al.*, 2016). The relationship between gluconeogenic factors and methylation affected by nutrition levels (Rattanaray *et al.*, 2014) deserves more attention in ruminant studies.

Table 4 Effects of supplementation with biocholine and rumen-protected methionine on blood metabolites in growing lambs

	Control	Biocholine	Methionine	Biochol + Met	SEM	P-value		
						Biochol	Met	Biochol x Met
Glucose (mg/dL)	46.6 ^b	66.9 ^a	54.5 ^{ab}	47.9 ^b	3.405	0.05	0.11	0.003
Cholesterol (mg/dL)	117.2 ^c	138.4 ^a	122.2 ^b	124.4 ^{bc}	1.601	<0.001	0.007	<0.001
Triglycerides (mg/dL)	128.4 ^b	125.8 ^b	141.5 ^a	130.2 ^b	1.455	<0.001	<0.001	0.0048
NEFA (mmol/L)	0.310 ^b	0.399 ^a	0.348 ^{ab}	0.384 ^a	0.0133	0.019	0.53	0.17
Albumin (g/dL)	2.130 ^b	2.665 ^b	3.342 ^a	2.638 ^b	0.131	0.59	0.005	0.003
Total protein (g/dL)	6.13 ^b	6.57 ^b	7.23 ^a	6.60 ^b	0.149	0.53	0.004	0.008

^{a,b}Different superscripts within a row differ significantly ($P < 0.01$); Met: methionine; NEFA: non-esterified fatty acids; SEM: standard error of mean; Biochol: biocholine

The RPC, when given at lower doses (Li *et al.*, 2015), stimulated the expression of lipoprotein lipase and fatty-acid synthase genes in muscle, but at higher doses, it showed adverse effects on the expression of some acetyl-CoA carboxylase genes. Future studies with both choline and Met that consider the gene expression of key liver enzymes and their regulating factors are required to understand the regulation of cholesterol in ruminants (Viturro *et al.*, 2009).

Conclusions

The RPM and biocholine supplementation did not improve lamb performance in the growing phase. However, both supplements showed beneficial effects in liver metabolism, as reflected in the blood levels of NEFA, glucose and cholesterol, demonstrating that mobilization of lipids exists. More experiments are required to establish the doses of biocholine or RPM to improve lamb growth.

Acknowledgments

The authors thank TechnoFeed, México, Nuproxa, Switzerland, and Indian Herbs Co for donating herbal products and Evonik Industries, México Co. for supplying the rumen-protected methionine. This research was partially supported by Grant no. 38153 CONACYT.

Authors' contributions

GDM, ACL, and VRG conceived and designed the experiments. VRG, ACL, SF, NS and LM performed the experiment and supervised the experimental part related to *in vitro* gas production. VRG, ACL, and GDM analysed the data. GDM, ACL, SF, and LM contributed reagents, materials and analysis tools. VRG, ACL, GM contributed to the writing of the manuscript. GDM, ACL, and VRG carried out critical reading and drafting of the manuscript. All the authors agreed with the final version to be submitted. They wish to thank MSc Nayelly Sánchez for technical assistance.

Conflict of interest declaration

The authors certify that they have no affiliations with any organization or entity with any financial or non-financial interest in the subject matter or materials discussed in this manuscript.

References

- AOAC, 1995. Official methods of analysis. 15th edition. Association of Official Analytical Chemists, Inc., Arlington, Virginia, USA.
- Ardalan, M., Dehghan-Banadaky, V., Rezayazdi, K. & Hossein-Zadeh, N.G., 2011 The effect of rumen-protected methionine and choline on plasma metabolites of Holstein dairy cows. *J. Agr. Sci.* 149, 639–646. doi:10.1017/S0021859610001292.
- Baldwin, J.A., Horton, G.M.J., Wohlt, J.E., Palatini, D.D. & Emanuele, S.M., 1993. Rumen-protected methionine for lactation, wool and growth in sheep. *Small Rumin. Res.* 12, 125-132.

- Blümmel, M. & Lebzien, P., 2001. Predicting ruminal microbial efficiencies of dairy ration by in vitro techniques. *Livest. Prod. Sci.* 68, 107-117.
- Brusemeister, F. & Sudekum, K.H., 2006. Rumen-protected choline for dairy cows: The in situ evaluation of a commercial source and literature evaluation of effects on performance and interactions between methionine and choline metabolism. *Anim. Res.* 55, 93-104. doi.org/10.1051/animres:2006002.
- Bryant, T.C., Rivera, J.D., Galyean, M.L., Duff, G.C., Hallford, D.M. & Montgomery, T.H., 1999. Effects of dietary level of ruminally protected choline on performance and carcass characteristics of finishing beef steers and on growth and serum metabolites in lambs. *J. Anim. Sci.* 77, 2893-2903.
- Chung, Y.H., Brown, N.E., Martinez, C.M., Cassidy, T.W. & Varga, G.A., 2009. Effects of rumen-protected choline and dry propylene glycol on feed intake and blood parameters for Holstein dairy cows in early lactation. *J. Dairy. Sci.* 92, 2729-2736. doi:10.3168/jds.2008-1299.
- Davidson, S., Hopkins, B.A., Odle, J., Brownie, C., Felleiner, V. & Whitlow, W., 2008. Supplementing Limited methionine diets with rumen-protected methionine, betaine and choline in early lactation Holstein cows. *J. Dairy. Sci.* 91, 1552-1559.
- Emmanuel, B., & Kelly, J.J., 1984. Kinetics of methionine and choline and their incorporation into plasma lipids and milk components in lactating goats. *J. Dairy Sci.* 67, 1912-1918. doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(84)81524-6.
- European Commission, 2009. 2009/150/EC Commission regulation laying down the methods of sampling and analysis for the official control of feed. *Off. J. Eur. Union L* 54, 1-130.
- Godínez-Cruz, J., Cifuentes-López, O., Cayetano, J., Lee-Rangel, H., Mendoza, G., Vázquez, A. & Roque, A., 2015. Effect of choline inclusion on lamb performance and meat characteristics. *J. Anim. Sci.* 93, 766, Suppl 3.
- Goering, H.K. & Van Soest, P.J., 1970. Forage fiber analysis apparatus, reagents, procedures, and some applications. In H.K. Goering, & P.J. Van Soest (eds). *Agriculture handbook*, 379. Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture. Washington DC, USA.
- Gomez, A., Mendoza, G.D., García-Bojali, C., Barcena, R., R, J.A., Crosby, M.M., Pinos, J.M. & Lara, A., 2011. Effect of supplementation with urea, blood meal, and rumen-protected methionine on growth performance of Holstein heifers grazing kikuyu pasture. *Trop. Anim. Health. Prod.* 43(3), 721-724.
- Herrera, A.J.G. & Garcia, C., 2010. *Bioestadística en Ciencias Veterinarias, Procedimientos de Análisis de datos en SAS*. Edn. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España (in Spanish).
- Jayaprakash, G., Sathiyabarathi, M., Robert, M.A. & Tamilmani, T., 2016. Rumen-protected choline: a significance effect on dairy cattle nutrition. *Vet. World.* 9, 837-841. doi:10.14202/vetworld.2016.837-841.
- Lara, B.A., Mendoza, G.D., Bárcena, M.R. & Landois, L.P., 2003. Degradabilidad ruminal in situ e in vitro de la metionina protegida. *Tec. Pecu. Mex.* 41, 91-103 (in Spanish).
- Lara, B.A., Mendoza, G.D., Landois, L.A., Bárcena, R., Sanchez, T., Rojo, R., Ayala, J. & Vega, S., 2006. Milk production in Holstein cows supplemented with different levels of ruminally protected methionine. *Livest. Sci.* 105, 105-108.
- Li, H., Wang, H., Yu, L., Wang, M., Liu, S., Sun, L. & Chen, Q., 2015. Effects of supplementation of rumen-protected choline on growth performance, meat quality and gene expression in longissimus dorsi muscle of lambs. *Arch. Anim. Nutr.* 69, 340-350.
- Liang, H. & Ward, W.F., 2006. PGC-1alpha: a key regulator of energy metabolism. *Adv Physiol Educ.* Dec: 30(4), 145-51.
- Madsen, T.G., Nielsen, L. & Nielsen, M.O., 2005. Mammary nutrient uptake in response to dietary supplementation of rumen protected lysine and methionine in late and early lactating dairy goats. *Small. Rumin. Res.* 56, 151-164.
- Maio, R., Dichi, J.B. & Burini, R.C., 2000. Implicações do alcoolismo e da doença hepática crônica sobre o metabolismo de micronutrientes. *Arq. Gastroenterol.* 37, 120-124 (in Portuguese).
- Maskařová, I., Vajda, V., Krempaský, M. & Bujňák, L., 2014. Rumen degradability and ileal digestibility of proteins and amino acids of feedstuffs for cows. *Acta. Vet. Brno.* 83, 225-231. doi:10.2754/avb201483030225.
- Mendoza, M.G.D., Britton, R.A. & Stock, R.A., 1995. Effect of protozoa and urea level on in vitro starch disappearance and amylolytic activity of ruminal microorganisms. *Anim. Feed. Sci. Tech.* 54, 315-325.
- Menke, K. & Steingass, H., 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid. *Anim. Res Dev.* 28, 9-52.
- Mohamed, R. & Chaudhry, A.S., 2008. Methods to study degradation of ruminant feeds. *Nutr. Res. Rev.* 21, 68-81. doi:10.1017/S0954422408960674.
- Niculescu, M.D., Zeisel, S.H., 2002. Diet methyl donors and DNA methylation: Interactions between dietary folate methionine and choline. *J. Nutr.* 132, 2333S-2335S.
- NRC, 2007. *Nutrient requirements of small ruminants: Sheep, goats, cervids, and New World camelids*. National Academic Press, Washington DC, USA.
- Osorio, J.S., Ji, P., Drackley, J.K., Luchini, D. & Looor, J.J. 2014. Smartamine M and MetaSmart supplementation during the periparturient period alter hepatic expression of gene networks in 1-carbon metabolism, inflammation, oxidative stress, and the growth hormone–insulin-like growth factor 1 axis pathways. *J. Dairy Sci.* 97, 7451-7464. doi: 10.3168/jds.2014-8680.
- Piepenbrink, M.S., Overton T.R., 2003. Liver metabolism and production of cows fed increasing amounts of rumen-protected choline during the periparturient period. *J. Dairy. Sci.* 86, 1722-1733.
- Pinotti, L., Baldi, A., Dell'Orto, V., 2002. Comparative mammalian choline metabolism with emphasis on the high yielding dairy cow. *Nutr Res Rev* 15: 315-332. doi: 10.1079/NRR200247.
- Pinotti, L., Baldi A., Politis I., Rebutti R., Sangalli L., Dell'Orto V., 2003. Rumen-protected choline administration to transition cows: Effects on milk production and vitamin E status. *J. Vet. Med. A Physiol. Pathol. Clin. Med.* 50, 18-21.

- Pinotti, L., Campagnoli, A., Sangalli, L., Rebucci, R., Dell'Orto, V. & Baldi, A., 2004. Metabolism of periparturient dairy cows fed rumen-protected choline. *J. Anim. Feed. Sci.* 13, 551-554.
- Pinotti, L., Campagnoli, A., Dell'Orto, V. & Baldi, A., 2005. Choline: Is there a need in the lactating dairy cow? *Livest. Prod. Sci.* 98, 149-152.
- Rattanatrak, L., Muhlhausler, B.S., Nicholas, L.M., Morrison, J.L., & McMillen, I.C., 2014. Impact of maternal overnutrition on gluconeogenic factors and methylation of the phosphoenolpyruvate carboxykinase promoter in the fetal and postnatal liver. *Pediatric. Res.* 75(1), 14-21.
- Sales, J., Homolka, P. & Koukolová, V., 2010. Effect of dietary rumen-protected choline on milk production of dairy cows: A meta-analysis. *J. Dairy. Sci.* 93, 3746-54. doi: 10.3168/jds.2010-3106.
- Sall, J., Lehman, A., Stephens, M. & Creighton, L. 2012. JMP® start statistics: A guide to statistics and data analysis (5th ed.). SAS Institute Inc: Cary, NC, USA.
- Sanchez, A.E., Ortega, C.M.E., Mendoza, M.G., Montañez, V.O.D. & Buntinx, D.S.E., 2012. Rastrojo de maíz tratado con urea y metionina protegida en dietas para ovinos en crecimiento. *Interciencia.* 37, 395-399 (in Spanish).
- Sun, F., Cao, Y., Cai, C., Li, S., Yu, C. & Yao, J., 2016. Regulation of nutritional metabolism in transition dairy cows: Energy homeostasis and health in response to post-ruminal choline and methionine. *PLOS ONE* 11,8, e0160659 doi:10.1371/journal.pone.0160659.
- Tavares, C.D.J., Sharabi, K., Dominy, J.E., Lee, Y., Isasa, M., Orozco, J. M. & Puigserver, P., 2016. The Methionine transamination pathway controls hepatic glucose metabolism through regulation of the GCN5 acetyltransferase and the PGC-1 α transcriptional coactivator. *J. Biol. Chem.* 291(20), 10635-10645. doi: 10.1074/jbc.M115.706200.
- Van Cleef, F.O.S., Ezequiel, J.M.B., D'Aurea, A.P., Almeida, M.T.C., Perez, H.L., & Van Cleef, E.H.C.B., 2017. Feeding behavior, nutrient digestibility, feedlot performance, carcass traits, and meat characteristics of crossbred lambs fed high levels of yellow grease or soybean oil. *Small. Rumin. Res.* 137, 151-156.
- Van Keulen, J.V. & Young, B.A., 1977. Evaluation of acid-insoluble ash as a natural marker in ruminant digestibility studies. *J. Anim. Sci.* 44, 282-287.
- Van Soest, P.J., Robertson, J.B. & Lewis, B.A., 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74, 3583-3597.
- Vaz, M.F & Wanders, R.J.A., 2002. Carnitine biosynthesis in mammals. *Biochem. J.* 361, 417-429.
- Vituro, E., Koenning, M., Kroemer, A., Schlamberger, G., Wiedemann, S., Kaske, M. & Meyer, H.H., 2009. Cholesterol synthesis in the lactating cow: Induced expression of candidate genes. *J. Steroid. Biochem.* 115, 62-67.
- Yao, Z. & Vance, D.E., 1988. The active synthesis of phosphatidylcholine is required for very low density lipoprotein secretion from rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 263, 2998-3004.
- Zeisel, S.H., Zola, T., Da Costa, K., & Pomfret, E.A., 1989. Effect of choline deficiency on S-adenosylmethionine and methionine concentrations in rat liver. *Biochem. J.* 259, 725-729.
- Zeisel, S.H., 2006. Choline: Critical role during fetal development and dietary requirements in adults. *Annual Review of Nutrition* 2,1, 229-250.
- Zeisel, S.H. & Da Costa, K.A., 2009. Choline: An essential nutrient for public health. *Nutr. Rev.* 67, 615-623. doi:10.1111/j.1753-4887.2009.00246.x
- Zhou, Z., Vailati-Riboni, M., Trevisi, E., Drackley, J.K., Luchini, D.N. & Looor, J.J., 2016. Better postpartal performance in dairy cows supplemented with rumen protected methionine compared with choline during the peripartal period. *J. Dairy Sci.* 99, 1-17. doi: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2015-10525>.