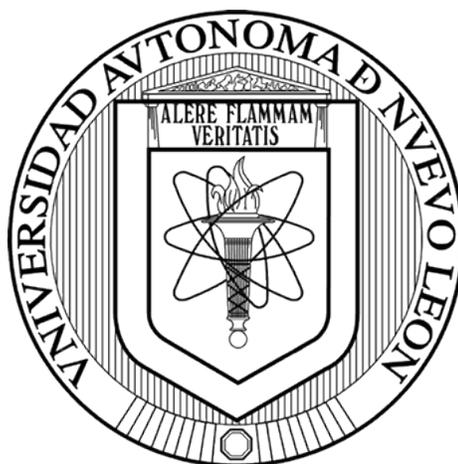


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
POSGRADO CONJUNTO AGRONOMÍA-VETERINARIA



EVALUACIÓN DE UN ALIMENTO INICIADOR
EXTRUIDO Y LA INCLUSIÓN DE CRINA® EN EL
DESARROLLO RUMINAL DE BECERROS MEDIANTE
BIOPSIAS ENDOSCÓPICAS

Por

SAÚL ADRIÁN CANTÚ REYES

Como requisito parcial para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIA ANIMAL

Marzo, 2021

EVALUACIÓN DE UN ALIMENTO INICIADOR EXTRUIDO Y LA INCLUSIÓN
DE CRINA® EN EL DESARROLLO RUMINAL DE BECERROS MEDIANTE
BIOPSIAS ENDOSCÓPICAS



Dr. Jorge Ramsy Kawas Garza

Director de tesis



Dra. Daniela Rico Costilla

Codirectora



Dr. Gerardo Méndez Zamora

Codirector



Dr. Gustavo Moreno Degollado

Codirector



Dra. Yarellys Ramos Zayas

Codirectora

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, quisiera agradecer a mi familia, a mis padres José Saúl Cantú Rodríguez y Consuelo Reyes González, así como mis hermanos Alonso y Joel los cuales me han apoyado en esta etapa de mi vida así por su invaluable contribución a la realización de la etapa experimental de este trabajo la cual no hubiera podido realizar sin su ayuda.

Agradezco también al personal docente del posgrado conjunto, en especial a mi asesor principal al Dr. Jorge Kawas Garza, por su consejo y asesoría tanto en lo profesional como en lo personal, y por el haberme dado la oportunidad de trabajar con su equipo. Agradezco igual al Dr. Héctor Fimbres Durazo, por todo el apoyo y el aliento para sacar adelante este trabajo, además de introducirme al Cuerpo Académico de Nutrición Animal. A la Dra. Daniela Rico Costilla, por apoyarme con la concepción de la metodología de este trabajo, así como al doctor Gerardo Méndez Zamora, por su invaluable aporte para la formulación de este trabajo.

A MNA de México quiero agradecerle infinitamente por todo el apoyo material y logístico empleado en este trabajo. Desde el uso de equipo e instalaciones, así como el proporcionarme el alimento necesario para la realización del experimento. Dentro de la empresa estaré eternamente agradecido con mi asesora la Dra. Yareellys Ramos Zayas, quien me apoyó en todo momento con cualquier pormenor de la investigación y quien, junto con la Dra. Sara Hernández Martínez, venían cada 15 días a apoyarme en la medición de los animales y a constatar el avance de mi trabajo. Quiero agradecer igualmente a AQUA laboratorios, por su ayuda en los análisis nutricionales realizados a los alimentos.

Quiero agradecer a mi alma mater, la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UANL, y a su director, el Dr. Gustavo Moreno Degollado, por haberme prestado sus instalaciones y equipo para la realización de las diversas etapas de este trabajo. Con el personal del Hospital Veterinario de Pequeñas Especies estaré siempre en gratitud por haberme ayudado en la parte más crítica del experimento.

A CONACYT le debo un agradecimiento por todo el apoyo económico que me ofrecieron a lo largo de dos años para la realización de todo este trabajo.

Al final, pero no de manera menos importante, quiero agradecer al Centro de Biotecnología Reproductiva de la Unión Ganadera Regional de Nuevo León, presidido por el Dr. Juan Francisco Villareal, por haberme apoyado con el transporte de un becerro para la estandarización de una técnica de biopsia en el mes de noviembre de 2019.

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a todos los maestros y demás personas que me dijeron que no lograría nada en esta vida.

“Debe de haber opuestos; oscuridad y luz, luz y oscuridad en la pintura. Es igual en la vida. Debes de tener un poco de tristeza de vez en cuando para así saber que mejores tiempos vendrán. Ahora mismo estoy esperando esos tiempos mejores.”

-Bob Ross (1942-1995)

“La muerte no es la mayor pérdida en esta vida. La mayor pérdida es lo que muere dentro de nosotros cuando estamos vivos. Nunca hay que rendirse.”

-Tupac Shakur (1971-1996)

“No soy un perfeccionista, pero me gusta sentir que las cosas se hacen bien. Más que eso, siento una necesidad interminable de aprender, de mejorar, de involucrarme, no solo para agradar al entrenador y a los aficionados, sino para sentirme satisfecho conmigo mismo.”

-Cristiano Ronaldo (1985-)

NOMECLATURAS

AGV	Ácidos grasos volátiles
°C	Grados centígrados
NH ₃	Amoníaco
IGF-1	Factor de crecimiento insulínico tipo 1
pH	Potencial de hidrógeno
AE	Aceites esenciales
NaB	Butirato de sodio
HSC	Harina sin CRINA [®]
HCC	Harina con CRINA [®]
ESC	Extruido sin CRINA [®]
ECC	Extruido con CRINA [®]
kg	Kilogramos
cm	Centímetros
cm ²	Centímetros cuadrados
ml	Mililitros
μm	Micrómetros
H ₂ O	Agua
mM	Milimoles
HPO ₃	Ácido metafosfórico
μl	Microlitros

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Página
Resumen.....	1
Summary.....	2
1. Introducción.....	3
2. Revisión bibliográfica.....	5
2.1 Anatomía y fisiología ruminal.....	5
2.2 Desarrollo ruminal.....	6
2.2.1 Proliferación y adaptación epitelial en rumen.....	7
2.2.2 Fermentación ruminal.....	8
2.2.3 Forma física del alimento.....	11
2.2.4 Aceites esenciales.....	15
2.3 Biopsias de tejido ruminal.....	16
3. Justificación.....	17
4. Hipótesis.....	18
5. Objetivo general.....	19
5.1 Objetivos específicos.....	19
6. Materiales y métodos.....	20
6.1 Área de estudio.....	20
6.2 Animales y tratamientos.....	20
6.3 Descripción del alimento.....	21
6.4 Instalaciones.....	22
6.5 Pesaje y obtención de medidas corporales.....	24
6.6 Estandarización del procedimiento de endoscopia y biopsia.....	25
6.7 Biopsia de tejido ruminal.....	26
6.8 Colecta de líquido ruminal.....	27
6.9 Análisis histopatológico.....	27
6.10 Determinación de ácidos grasos volátiles.....	30

6.11 Análisis estadístico.....	32
7. Resultados.....	33
7.1 Desempeño productivo y medidas corporales.....	33
7.2 Desarrollo y fermentación ruminal.....	34
8. Discusión.....	38
8.1 Desempeño productivo y medidas corporales.....	38
8.2 Desarrollo y fermentación ruminal.....	38
9. Conclusiones.....	40
10. Bibliografía.....	41

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Análisis nutricional del alimento iniciador.	22
Tabla 2. Proceso de tinción con la técnica de hematoxilina y eosina.....	29
Tabla 3. Variables de desempeño y medidas corporales.	33
Tabla 4. Variables de desarrollo ruminal.	34
Tabla 5. Variables de fermentación ruminal.	37

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Localización del área de estudio.....	20
Figura 2. Becerros utilizados en el experimento durante la adaptación.....	21
Figura 3. Alimentos usados en el estudio.....	21
Figura 4. Corraletas para manejo de los becerros.....	23
Figura 5. Ubicación de las corraletas durante el experimento.....	23
Figura 6. Becerro consumiendo el suplemento extruido.....	23
Figura 7. Báscula de pesaje individual.....	24
Figura 8. Becerra amantando con su madre.....	24
Figura 9. Pesaje de los becerros y determinación de altura a la cruz.....	25
Figura 10. Colocación de la sonda endoscópica y vista de la pared ruminal.....	25
Figura 11. Inmovilización de los becerros para el procedimiento de toma de muestras....	26
Figura 12. Procesamiento de las muestras de líquido ruminal para medir pH.....	27
Figura 13. Cassettes utilizados para el proceso de inclusión en parafina.....	28
Figura 14. Microtomo utilizado para cortar los bloques de parafina.....	28
Figura 15. Fotografía de una papila ruminal y medición en el software ImageJ.....	29
Figura 16. Centrifuga utilizada en el procesamiento de líquido ruminal.....	30
Figura 17. Adición del ácido metafosfórico al líquido ruminal.....	30
Figura 18. Vista del cromatógrafo de gases Star 3400 CX y su columna.....	31
Figura 19. Jeringa Hamilton, proceso de llenado e inyección en el cromatógrafo.....	31
Figura 20. Cortes histológicos de las papilas ruminales de los becerros.....	34
Figura 21. Medias de tratamiento para la altura de papilas ruminales (μm).....	35
Figura 22. Medias de tratamiento para la anchura de papilas ruminales (μm).....	35
Figura 23. Medias de tratamiento para la superficie de papilas ruminales (μm).....	36
Figura 24. Medias de tratamiento en la producción de ácido acético (mM).....	37

RESUMEN

La implementación de un procedimiento menos invasivo para la obtención de muestras de tejido ruminal en becerros, y la evaluación de un alimento iniciador extruido, fueron los principales objetivos de este trabajo. Veinticuatro becerros de cruce Brangus con Charbray de aproximadamente 2 a 4 semanas de edad, fueron asignados a uno de cuatro tratamientos: iniciador en harina sin CRINA[®] (AE; aceites esenciales), iniciador en harina con CRINA[®], iniciador extruido sin CRINA[®], e iniciador extruido con CRINA[®]. Variables de desempeño y medidas corporales fueron obtenidas. Al final del estudio, biopsias de tejido ruminal se realizaron mediante endoscopia para medir la altura, anchura y superficie de las papilas ruminales. Muestras del líquido ruminal fueron colectadas con una sonda estomacal para determinar el pH y las concentraciones de ácidos grasos volátiles (AGV). No se obtuvo una diferencia ($P > 0.05$) en el consumo entre los iniciadores en harina y extruido, sin embargo, se pudo observar una disminución ($P = 0.053$) del consumo de leche con la adición de CRINA[®]. La inclusión de CRINA[®] redujo el peso final ($P = 0.03$), la ganancia diaria de peso ($P = 0.024$), la circunferencia torácica ($P = 0.004$), y empeoró la conversión alimenticia ($P = 0.047$). La extrusión del alimento iniciador aumentó la altura ($P = 0.005$), anchura ($P = 0.036$), y superficie ($P = 0.02$) de las papilas ruminales. Sin embargo, la inclusión de CRINA[®] en los alimentos iniciadores redujo estas variables. El proceso de extrusión del alimento iniciador redujo ($P = 0.025$) el pH del líquido ruminal de los becerros en comparación con el iniciador en harina, mientras que la inclusión de CRINA[®] no afectó el pH ruminal. No se encontró un efecto ($P > 0.05$) de la forma física o de la inclusión de CRINA[®] en la concentración o el porcentaje molar de los AGV. En conclusión, la extrusión del alimento iniciador mejoró el desarrollo ruminal de los becerros, sin embargo, no se observó un beneficio de la inclusión de AE. En este estudio, la efectividad de los AE pudo haber sido afectada por el proceso de extrusión, por lo que más estudios deben realizarse para determinar si la adición de AE después de este proceso, pudiera mejorar el desarrollo ruminal y desempeño productivo de becerros pre-rumiantes.

SUMMARY

The implementation of a less invasive procedure to obtain samples of ruminal tissue in calves, and the evaluation of the extrusion process of a starter feed, were the main objectives of this work. Twenty-four Brangus Charbray crossbred calves, approximately 2 to 4 weeks of age, were assigned to one of four treatments: meal starter without CRINA[®] (EO; essential oils), meal starter with CRINA[®], extruded starter without CRINA[®], and extruded starter with CRINA[®]. Performance variables and body measurements were obtained. At the end of the study, rumen biopsies were performed by endoscopy to measure the height, width, and surface of rumen papillae. Samples of the ruminal fluid were collected using a stomach probe to determine rumen pH and concentrations of volatile fatty acids (VFA). No difference ($P > 0.05$) was observed in feed consumption between the meal and extruded starters, however, a decrease ($P = 0.053$) in the milk intake was observed with the addition of CRINA[®]. The inclusion of CRINA[®] reduced final weight ($P = 0.03$), daily weight gain ($P = 0.024$), thoracic circumference ($P = 0.004$), and worsened feed conversion efficiency ($P = 0.047$). With the extruded starter feeds, increases in height ($P = 0.005$), width ($P = 0.036$), and surface ($P = 0.02$) of the ruminal papillae were observed. However, the inclusion of CRINA[®] in the starter feeds reduced these variables. Calves fed the extruded starters had lower ($P = 0.025$) rumen fluid pH compared to calves supplemented the meal starter treatment. However, the inclusion of CRINA[®] did not affect ruminal pH of the calves. No effect ($P > 0.05$) of the physical form or the inclusion of CRINA[®] was found on VFA concentrations or molar percentages. In conclusion, the extrusion of the starter feed improved ruminal development of calves, however, no benefit was observed with the inclusion of EO. In this study, the effectiveness of the EO could have been affected by the extrusion process, therefore, more studies should be conducted to determine if the addition of EO after this process could improve ruminal development and productive performance of pre-ruminant calves.

1. INTRODUCCIÓN

Los becerros nacen con un rumen metabólica y fisiológicamente subdesarrollado, e inicialmente dependen casi de manera exclusiva de la leche materna para subsistir y así cumplir con sus requerimientos para su crecimiento y mantenimiento (Khan *et al.*, 2016). El tracto gastrointestinal del recién nacido pasa por diversos cambios anatómicos y fisiológicos hasta que el rumen es totalmente funcional. Los diversos tipos de dieta y el manejo son los factores que actúan sobre el desarrollo ruminal (Suarez *et al.*, 2006; Chaves *et al.*, 2014). El desarrollo ruminal depende en gran medida de factores nutricionales y puede ser significativamente acelerado por la introducción del alimento sólido, que puede ser muy importante si se desea un destete temprano. El consumo de alimento sólido desde los primeros días de vida incrementa de manera positiva la microbiota, la fermentación y el desarrollo del epitelio ruminal (Gorka *et al.*, 2009).

La etapa pre-destete es la más costosa y delicada por el cual pasará el animal durante su vida. Dentro de las instalaciones lecheras, es una práctica común la restricción del consumo de leche para promover el consumo temprano de iniciadores que disminuyen la edad a la que los becerros puedan ser destetados (Hulbert *et al.*, 2011).

El proceso de transición de los becerros desde su necesidad de nutrientes provenientes de la leche a los proporcionados por el alimento sólido es de gran importancia económica para el productor (Baldwin *et al.*, 2004). La transición resulta en un aumento de la tasa de crecimiento ya que los tejidos cambian de una dependencia de la glucosa contenida en leche al metabolismo de AGV de cadena corta como su principal sustrato energético (Khan *et al.*, 2008).

Diversos tratamientos físicos tales como la extrusión o el peletizado son utilizados en el procesamiento de ingredientes con el objetivo de incrementar la eficiencia de la utilización de nutrientes (Amaral *et al.*, 2007). Los alimentos extruidos a base de granos pueden jugar un papel importante en el desarrollo ruminal y acelerar el destete de becerros durante los primeros meses de vida. Esta técnica de procesamiento mejora la utilización de ingredientes de calidad al aumentar la proteína indegradable en el rumen, la cual puede llegar al intestino delgado, incrementando la absorción de aminoácidos, y la gelatinización del almidón incrementa la utilización de la energía de los granos (Chaves *et al.*, 2014). El

almidón es el principal carbohidrato encontrado en el alimento iniciador para becerros, y actúa como una fuente importante de energía (Rokey *et al.*, 2010).

Los AE son una mezcla de diversos compuestos químicos, principalmente terpenos y derivados, con diversas propiedades benéficas (Salazar *et al.*, 2019). En años recientes ha habido investigaciones sobre su influencia en la fermentación ruminal para mejorar la eficiencia alimenticia y la utilización de nutrientes en los rumiantes (Benchaar *et al.*, 2008). Se ha observado que los AE mejoran la microbiota ruminal, y se ha reportado que tienen efectos positivos en el rendimiento y la salud de los becerros (Santos *et al.*, 2015), así como también aumentan el consumo de materia seca y la ganancia diaria (Jeshari *et al.*, 2016; Salazar *et al.*, 2019).

La presencia de los AGV, en especial el ácido butírico, estimulan el desarrollo de las papilas ruminales en becerros jóvenes. El consumo de forraje promueve el desarrollo muscular, estimula la rumia y el flujo de saliva hacia el rumen, pero no deja suficiente cantidad de AGV para el desarrollo de las papilas. Por esta razón, no se recomienda la utilización de forraje en la alimentación temprana del becerro, si se desea un mayor desarrollo ruminal (Nocek y Kesler, 1980; Khan *et al.*, 2016).

La fermentación de concentrados proporciona el suficiente ácido butírico requerido para el desarrollo papilar. Además, una expansión del rumen en volumen, el desarrollo de las vías de absorción y metabolismo, junto con la maduración de las glándulas salivares, son necesarias al mismo tiempo que el becerro realiza su transición de la dependencia láctea al consumo del alimento seco (Khan *et al.*, 2016).

En este estudio se compararon dos iniciadores, uno en harina y otro extruido, sin y con la adición de aceites esenciales (CRINA[®]; DSM), para determinar sus efectos en el desarrollo y fermentación ruminal de becerros en la etapa de pre-destete. Además, se implementó la técnica de endoscopia, un procedimiento menos invasivo en la obtención de muestras de tejido ruminal de los becerros.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

El tracto gastrointestinal de los rumiantes se caracteriza por adaptaciones funcionales y anatómicas que le permiten el acceso a la energía alimenticia del material fibroso vegetal, a diferencia de otros animales que no pueden degradarlas, principalmente la celulosa y otros carbohidratos. Una característica importante del sistema digestivo del rumiante es la fermentación microbiana anterior a las actividades digestivas gástricas e intestinales. Su sistema digestivo único integra una gran población bacteriana que convive con el animal en una relación simbiótica. La fermentación se lleva a cabo principalmente en el rumen, el primero de los compartimentos estomacales, de los cuales también se incluye el retículo, omaso y finalmente el abomaso que funge como el “verdadero estómago” glandular del animal (Niwińska, 2012).

2.1 Anatomía y fisiología del rumen

Los herbívoros rumiantes tienen la distintiva característica de poseer un estómago dividido en cuatro compartimentos, pero todas las partes de su tracto digestivo poseen cierto grado de especialización y adaptación. El estómago de los bovinos está compuesto del retículo, rumen, omaso y abomaso. El tracto digestivo equivale a una mayor parte del peso vivo de los rumiantes que en otros mamíferos. Los rumiantes tienen un tracto digestivo que permite la digestión de la biomasa de la pared celular de plantas, como forrajes y subproductos fibrosos. Por sí mismos, los rumiantes no producen las enzimas necesarias para la degradación de los polisacáridos complejos de la pared celular de las plantas. Estos han desarrollado una relación simbiótica con microorganismos anaeróbicos que se establecen en el tracto digestivo del animal después de su nacimiento. La rumia es un mecanismo distintivo de los rumiantes. Esta les permite consumir rápido el alimento disponible, y luego regurgitarlo y volverlo a masticar, disminuyendo el tamaño de partícula e incrementando el área de superficie, lo cual es necesario para la digestión microbiana y su paso por el rumen (NRC, 2016).

Desde su nacimiento hasta las tres semanas de edad, los rumiantes jóvenes son descritos como pre-rumiantes, debido a que su rumen no está considerado anatómicamente ni

fisiológicamente maduro, con un volumen relativamente pequeño con respecto al resto del tracto digestivo, en comparación con los rumiantes adultos, y con una mucosa poco desarrollada. En estos animales, el primer compartimento digestivo funcional de manera total es el abomaso, el cual juega un papel importante en la digestión de la leche. El establecimiento de la actividad digestiva en el rumen requiere de agua, sustratos alimenticios y el efecto de la actividad microbiana (Rey *et al.*, 2012).

Al momento de su nacimiento, el rumen de un becerro es un órgano prácticamente estéril. La colonización bacteriana se habrá completado cuando el animal tenga aproximadamente 36-48 horas de vida y promoverán la subsecuente colonización por parte de hongos y protozoos que resultara en el establecimiento de una red de microorganismos que se desarrollará en las partículas de alimento, líquido y pared ruminales. La capacidad digestiva bacteriana del rumen depende de su volumen entre otros factores. El rumen presenta bandas musculares gruesas, denominadas pilares, que dividen el espacio ruminal en sacos como: el saco dorsal, ventral, ciego dorsal y ciego ventral. El compartimento ruminal está cubierto de papilas que se desarrollan de mayor manera en la porción ventral. Por lo regular las papilas de mayor tamaño se localizan en los sacos ciegos del rumen y pueden llegar a medir 1.5 cm de altura, y se encuentran altamente vascularizadas (Domingues *et al.*, 2016).

2.2 Desarrollo ruminal

El becerro al momento de su nacimiento es funcionalmente un animal no-rumiante, con el abomaso como principal sitio de digestión. El desarrollo del rumen hacia un órgano funcional en el neonato requiere un periodo de crecimiento y desarrollo que involucra cambios transicionales desde este órgano subdesarrollado al rumen propiamente funcional. Este desarrollo es caracterizado por una serie de cambios en la anatomía, fisiología, y microbiología del rumen (Domingues *et al.*, 2016).

2.2.1 Proliferación y adaptación epitelial en rumen

Las adaptaciones epiteliales comprenden un acondicionamiento morfológico asociado con la proliferación de tejido y cambio en la función individual de las células del rumen. Se ha estudiado con anterioridad la respuesta proliferativa como parte del desarrollo ruminal del becerro durante su función como pre-rumiantes a rumiantes íntegros. La duración del tiempo necesario para un máximo desarrollo en las papilas ruminales se había reportado en 6 a 8 semanas después de un incremento en la energía de la dieta. Un aumento en la fermentación de la dieta cambia la tasa de producción de ciertos AGV, principalmente el acetato, butirato y propionato. Los AGV son considerados como promotores del crecimiento en el tracto gastrointestinal tanto en modelos de rumiantes como no-rumiantes (Penner *et al.*, 2011).

La introducción del butirato en la dieta ha mostrado ser un potente promotor de la proliferación celular en tejido epitelial del colon, así mismo, su infusión intraruminal es efectiva como estimulador en el crecimiento epitelial del rumen. El ácido butírico tiene efecto sobre la regulación de la diferenciación celular y apoptosis en el intestino, de acuerdo con estas afirmaciones se ha podido medir el efecto positivo que el butirato tiene sobre el desarrollo ruminal en becerros en cuanto a la altura, anchura y superficie de las papilas (Gorka *et al.*, 2009).

Se ha observado que los AGV no podrían tener un efecto directo sobre la proliferación epitelial en el rumen, si no que actúan en conjunto con la liberación de factores hormonales específicos. Los principales en este proceso son el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1), hormona del crecimiento, insulina y glucagón, debido a que se ha observado que sus concentraciones aumentan en respuesta a una infusión de AGV que incluye un 10% de butirato (Zhao y Sun, 2010). En becerros suplementados oralmente con butirato, las concentraciones plasmáticas de IGF-1 han sido correlacionadas con el crecimiento papilar (Shen *et al.*, 2004).

2.2.2 Fermentación ruminal

El rumen o retículo-rumen es un compartimento grande en donde el alimento ingerido es primeramente sujeto a una digestión microbiana. El rumen contiene una población diversa de microorganismos que convierten la biomasa ingerida en proteína microbiana y AGV, y sus productos finales proveen al hospedero nutrientes esenciales para el metabolismo. Se puede decir que los microorganismos ruminales juegan un papel importante en la productividad y salud del animal (Ji *et al.*, 2017).

El rumen es un hábitat ideal para los microorganismos debido a las condiciones existentes, ya que son propicias en la supervivencia y crecimiento de estos. El ecosistema ruminal, muchas veces llamado como un sistema de cultivo continuo, opera como una unidad de fermentación bajo condiciones bien definidas que son importantes reguladores de los tipos, números y actividades bioquímicas de los microorganismos (Domingues *et al.*, 2016).

Los microorganismos del rumen hidrolizan las celulosas de las plantas, hemicelulosas, pectinas, fructosanos, almidón y otros polisacáridos, a azúcares (dímeros o monómeros) que son fermentados, junto con otros azúcares simples, para dar origen a otros productos, algunos de los cuales serán sujetos a mucha más actividad microbiana. El producto final de estas acciones microbianas, producidas por un grupo de bacterias, protozoarios y hongos, son ácido acético, propiónico, butírico, metano y dióxido de carbono. Los gases serán eructados por el animal, convirtiéndose básicamente en desechos, sin embargo, los ácidos son absorbidos a través de la pared ruminal hacia el sistema circulatorio y convertidos en azúcares y lípidos requeridos por el rumiante para procesos energéticos y de crecimiento de tejidos (Hobson y Stuart, 1989).

El rumen está habitado por una multitud de microorganismos. Varios de estos microorganismos colonizan, crecen y son considerados nativos, por lo cual se les conoce como microbiota normal. La población microbiana incluye a miembros que pertenecen a tres dominios, Eubacteria (bacteria), Archea (metanógenos) y Eucariota (protozoa y fungi). El ecosistema ruminal contiene los siguientes tipos de microorganismos: bacterias, protozoos, hongos y bacteriófagos (Domingues *et al.*, 2016).

Los carbohidratos en la dieta son los principales sustratos energéticos en el rumen. La proliferación microbiana está relacionada principalmente con la tasa de crecimiento que los carbohidratos permiten. Los carbohidratos se caracterizan por una degradación ruminal más rápida, y por esta razón, se da una proliferación más acentuada. Los carbohidratos del alimento incluyen polisacáridos y azúcares simples. Los polisacáridos se dividen en: celulosa, hemicelulosa, y pectina; y no-estructurales como el almidón. Las bacterias, protozoos y hongos producen una variedad de glucosil hidrolasas que tienen como función la destrucción de las uniones glucosídicas para crear oligosacáridos y posteriormente di y monosacáridos (Niwińska, 2012).

Lo primero que se debe considerar en el proceso de digestión, es la unión de los microorganismos con las partículas del alimento. Esta unión es mediada por la cápsula microbiana y en algunas ocasiones por proteínas de unión estrecha. Varias especies de bacterias y protozoos ciliados en rumiantes tienen capacidades celulíticas al igual que todas las especies de hongos presentes. Las tres bacterias más comunes en el rumen del bovino son: *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* y *Ruminococcus flavefaciens* (Domingues *et al.*, 2016).

El almidón es un complejo formado de dos polímeros estructuralmente distintos: amilosa y amilopectina. La amilosa está formada de polímeros unidos de alfa-1, 4 glucosa. La amilosa es degradada por alfa-amilasas que liberan oligosacáridos, maltodextrinas y beta-amilasas que remueven las unidades de maltosa. La amilopectina es degradada a maltosa por beta-amilasas, glucanohidrolasas e isoamilasas. La maltosa y maltodextrinas son degradadas a glucosa por alfa-glucosidasas. El almidón puede ser degradado por enzimas microbianas ruminales al igual que en el intestino delgado de pequeños rumiantes (Deckhardt *et al.*, 2013).

De la fracción proteica de la dieta, el almidón ocupa una gran proporción, y los granos de cereal son la principal fuente de almidón en la dieta del ganado. Los granos de cereal tienen diferentes contenidos de almidón: trigo, 77%, maíz, 72%, y avena y cebada, de 57 a 58%. Las bacterias *Ruminobacter amylophilus*, *Prevotella ruminicola*, *Streptococcus bovis*, son ejemplos de microorganismos amilolíticos en el rumen. Las dietas concentradas altas en almidón favorecen el desarrollo de microorganismos productores de

ácido propiónico. La fermentación de almidón en el rumen es dependiente de factores como la estructura, la planta, alteraciones mecánicas, la cantidad de alimento consumido y la capacidad de adaptación del mismo animal (Niwińska, 2012).

La proteína de la dieta que es directamente disponible para el rumiante es proteína indegradable, y cualquier proteína degradable en el rumen que ha escapado la digestión microbiana. Esta proteína se digiere en el abomaso y el intestino delgado. La proteína indegradable (y la proteína degradable que escapa el rumen) proveen una mayor diversidad de aminoácidos que aquellas proteínas degradadas en el rumen, que es restringido a esas proteínas, y sus aminoácidos que las componen, encontrados en los microorganismos. y las proteínas degradables del rumen que escapan la degradabilidad en el rumen (Moran, 2005).

La proteína al ser digerida es degradada en péptidos, que son cadenas cortas de aminoácidos. La digestión de estos péptidos da origen a la producción de aminoácidos individuales y amoníaco (NH_3). La proteína usada por el bovino puede provenir del alimento consumido o de los microorganismos regurgitados desde el rumen. Los microorganismos del rumen son una gran fuente de proteína en la dieta de bovinos. Estos degradan la proteína degradable del rumen en aminoácidos y NH_3 , siendo este último una gran fuente de nitrógeno para el crecimiento microbiano. Los microorganismos también convierten nitrógeno no-proteico en NH_3 . Los microorganismos son expulsados por el rumen a través del omaso hacia el abomaso donde son digeridos por el animal. Los aminoácidos producidos de la digestión microbiana son después absorbidos por el epitelio del intestino delgado. La cantidad de proteína microbiana en circulación hacia intestinos dependerá de la disponibilidad de energía y NH_3 en la dieta (Moran, 2005).

Si se presenta una deficiencia de energía, los microorganismos se vuelven cada vez menos eficientes en la utilización de NH_3 . En lugar de convertirlo en proteína microbiana, el NH_3 es transformado en urea. La mayoría de esta urea será secretada en la orina, pero alguna volverá hacia el rumen. Por el contrario, cuando se presenta un exceso de energía, la tasa de la síntesis de proteínas microbianas se reduce y el exceso se deposita como un aumento de condición corporal (Domingues *et al.*, 2016).

Los AGV, NH_3 y ácido láctico, son los productos finales de la fermentación microbiana en rumen. Estos consisten principalmente de acetato, propionato y butirato, y en cantidades menores, valerato, capronato, isobutirato e isovalerato. Los AGV, se derivan de los carbohidratos de la dieta. Después de la hidrólisis de los carbohidratos de la dieta, los monómeros son fermentados en el citoplasma y convertidos en AGV vía glucólisis y piruvato. El acetato y el piruvato son formados principalmente de acetil-CoA, mientras que el propionato es formado por medio del succinato y en menor medida el ácido láctico (Noziere *et al.*, 2010). La administración de AGV ha demostrado ser efectiva en fomentar el desarrollo ruminal en becerros, pero la tasa de inclusión de los AGV sigue siendo tema de debate (Diao *et al.*, 2019).

La composición de los AGV y la pérdida de carbono en gases están ligados a la composición de la población microbiana ruminal. Por lo general una gran existencia de organismos fibrolíticos inducen un aumento en la producción de acetato, y el hecho de que existiesen más microorganismos amilolíticos, traerá consigo niveles mayores de propionato (Noziere *et al.*, 2010).

2.2.3 Forma física del alimento

Los carbohidratos no-estructurales son la principal fuente energética para el ganado bovino. El sitio de digestión de estos carbohidratos puede ser manipulado a través del procesamiento de los granos y otras estrategias de alimentación. Técnicas como el hojuelado al vapor incrementan la degradabilidad en rumen de granos de sorgo y maíz (Shabi *et al.*, 1999).

La forma y el tamaño de partícula de la dieta tiene una influencia significativa sobre el desarrollo anatómico y microbiano del rumen. Un ejemplo es como becerros alimentados con una dieta molida tuvieron un desarrollo papilar menor y menor superficie de absorción que los alimentados con una dieta sin moler. El efecto de la forma física del alimento en becerros está relacionado con la tasa de inclusión, el origen y el procesamiento de cada uno de los ingredientes (Diao *et al.*, 2019).

El grano entero es más resistente a la digestión en rumiantes por el hecho de que los granos son resistentes a las bacterias ruminales gracias a su endospermo. Por esta razón los granos requieren de un procesamiento para romper esta capa protectora y el casco fibroso en el caso de cebada y avena, con el fin de mejorar la digestibilidad. El grano puede ser procesado mediante la aplicación de combinaciones de acciones como calor, humedad, tiempo y procesos mecánicos. Un proceso no térmico como el extruido puede ser usado para manipular la tasa de degradación y por ende la disponibilidad ruminal. Estos procesos alteran la estructura del grano, mejorando así la liberación de gránulos de almidón de la matriz proteínica y alterando su estructura durante la gelatinización. Esto provoca que el almidón se encuentre más disponible para los microorganismos ruminales e incrementa su capacidad de ser susceptible a actividad enzimática (Safaei y Yang, 2017).

La extrusión es una técnica mecánica y termal para el procesamiento de alimentos. La palabra “extrusión” proviene del vocablo latino *exfrudere*, *ex* significa hacia afuera y *frudere* significa empujar. El extrusor es un equipo en forma de tornillo que funciona a presión. Los ingredientes son calentados a altas temperaturas que pueden llegar hasta los 200 °C, sin embargo, el periodo de extrusión es corto de hasta 10 segundos. El proceso de extrusión es llevado a cabo usando ingredientes a base de granos con un contenido de fibra de 4 a 20%, en base seca. Los granos son mezclados a una temperatura de 100 °C, hidratados y extruidos para que el producto salga a través de unos dados en su forma final (Ciganas *et al.*, 2016).

El proceso de extrusión de granos involucra el uso de humedad, altas temperaturas y presión para alcanzar un nivel alto de gelatinización del almidón. Con la inclusión de alimento extruido, no se han observado efectos adversos en la digestibilidad, mostrando una tendencia de alta digestibilidad del total de ración y de los carbohidratos no-estructurales conformados en su mayoría por almidón (Alvarado *et al.*, 2009).

El incremento de la disponibilidad del almidón es el principal objetivo del procesamiento de los granos. Este procesamiento también puede destruir micotoxinas, lo que mejoraría el desempeño productivo del animal. La gelatinización del almidón, un proceso en el cual las cadenas desagregadas de amilosa y amilopectina encontradas dentro de una pasta gelatinizada, se vuelven a asociar para formar estructuras más ordenadas, y

la dextrinización, y formación de dextrinas (fragmentos moleculares de amilosa y amilopectina formadas por el proceso de calentamiento en presencia de humedad y ácidos) durante el procesamiento de granos, mejoran la accesibilidad de las enzimas a los gránulos de almidón (Safaei y Yang, 2017).

En el primer artículo sobre becerros, publicado en la edición de mayo de 1919, en el *Journal of Dairy Science*, se describían los factores que afectaban el peso al nacimiento de diferentes razas de becerros (Caldwell, 1919). Varios conceptos para el entendimiento de la digestión, formulación de sustitutos lácteos y el desarrollo ruminal que siguen vigentes fueron desarrollados en el periodo comprendido entre las décadas de los 30 a los 50 (Kertz *et al.*, 2017).

Durante las décadas de los 60 a los 90, uno de los principales propósitos de investigación en becerros fue el cómo lograr un destete temprano en menos de 30 días de una manera adecuada y saludable logrando un mayor desarrollo ruminal y mejor desempeño productivo (Kertz *et al.*, 2017). En las décadas de los 50 a 70 se experimentó con el uso de material inerte tales como sogas de nylon, aserrín, esponjas de plástico, cubos de plástico, entre otros, para simular el estímulo de alimento en el rumen, sin embargo, no se demostró resultados significativos en el desarrollo papilar (Baldwin *et al.*, 2004).

Las investigaciones realizadas en los años 80 llevaron al desarrollo de un programa de destete temprano que involucraba el uso de un iniciador para estimular el consumo de materia seca (Morrill *et al.*, 1984). El programa desarrollado permitía un destete de 2 a 4 semanas de edad sin la presencia de efectos adversos en el desarrollo fisiológico e inmunológico. Sin embargo, la investigación sobre el desarrollo ruminal asociada a este destete temprano era escasa (Anderson *et al.*, 1987).

Con el propósito de promover un mayor desarrollo ruminal, diversos estudios han evaluado la suplementación de alimentos concentrados altos en granos que difieren en la composición de sus carbohidratos (Suarez *et al.*, 2006), la forma física del alimento y la fuente de almidón en el desarrollo ruminal en becerras de reemplazo en sistemas de producción lechera (Nocek y Kesler, 1980; Khan *et al.*, 2008). Estas investigaciones hacen énfasis en la importancia del crecimiento post-destete de los becerros, el cual depende de

la capacidad que estos tienen para consumir y digerir alimentos sólidos, lo que enfatiza la importancia que tiene el desarrollo ruminal en cualquier sistema productivo de becerros (Beharka *et al.*, 1998).

Gorka *et al.* (2009) determinaron la efectividad de la administración de butirato de sodio (NaB) en sustituto de leche y en un iniciador para becerros lactantes para determinar su efecto en el desarrollo ruminal. Se encontró que becerros de 5 días de edad que comenzaron el experimento con una dosis de 0.3% de NaB en la dieta, tuvieron una mayor tasa de crecimiento y peso corporal que el grupo control y, además, un mayor peso del compartimento ruminal y tamaño en comparación con el resto del estómago. Los hallazgos histológicos mostraron una mayor longitud de las papilas ruminales, pero no se encontró diferencia significativa en el grueso de la capa muscular. Se llegó a la conclusión que la administración de NaB en la dieta de becerros neonatales podía ayudar a mejorar el desarrollo ruminal.

Castro y Elizondo (2012) estudiaron el efecto que tenía el procesamiento del alimento (extruido, harina y pellet) sobre el crecimiento de los animales y el desarrollo ruminal. En este experimento no se encontró diferencias entre los alimentos peletizado o extruido en cuanto al crecimiento corporal de los becerros Holstein. Con respecto al desarrollo papilar, se encontró que los tratamientos en harina y peletizado tenían mayores valores de altura de las papilas que el tratamiento extruido.

Chaves *et al.* (2014) pusieron a prueba la eficacia del iniciador Ruter[®] de la Asociación de Cooperativas Argentinas, en un experimento donde se comparó el desempeño productivo y de desarrollo ruminal en comparación con un iniciador convencional a base de granos. Tras ser sacrificados a los veintiún días, se encontró que no hubo una diferencia significativa entre el peso de los compartimentos ruminales y el peso corporal, pero se observó que los becerros alimentados con el iniciador extruido (Ruter[®]) tuvieron un mayor índice mitótico proliferativo en las células epiteliales del rumen. Aunque en su experimento lograron registrar un cierto grado de desarrollo ruminal, no se llegó al objetivo de poder asegurar un destete temprano como lo indicaba el fabricante del iniciador.

2.2.4 Aceites esenciales

Los aceites esenciales, conocidos también como aceites etéreos o volátiles, se encuentran en plantas comestibles, medicinales y herbales. Estos pueden ser extraídos de cualquier parte de la planta, incluyendo las hojas, flores, tallo, semillas y raíces. Contrario a su nombre, los AE no son aceites verdaderos (lípidos) sino que provienen de componentes aromáticos (*Quinta essentia*) de las plantas (Benchaar *et al.*, 2008).

Los AE son una mezcla de diversos compuestos químicos principalmente terpenos y derivados que poseen una buena actividad antimicrobiana (Salazar *et al.*, 2019). Generalmente los AE son más efectivos contra las bacterias gram positivas que contra las gram negativas, debido a que la estructura de la pared celular de las gram positivas permite a moléculas hidrofóbicas penetrar de forma más fácil en la célula y actuar tanto en la pared como en el citoplasma, mientras que las gram negativas son más resistentes por lipopolisacáridos en su membrana externa (Nazzaro *et al.*, 2013).

El uso de los AE como antimicrobianos ha propiciado investigaciones con el propósito de conocer que influencia podrían tener sobre la fermentación ruminal para mejorar la eficiencia alimenticia y la utilización de nutrientes en los rumiantes (Benchaar *et al.*, 2008). Según varios estudios, la adición de AE o compuestos de AE en la dieta de rumiantes han contribuido al aumento de la concentración de AGV en el rumen. En estudios realizados *in vitro*, se notó un aumento de la concentración de AGV, pero no se observó una mejora en la digestibilidad. Mientras que en modelos *in vivo*, no se encontró un efecto positivo en la proporción de AGV cuando se suministró 110 mg/día y 1 g/día de una mezcla de AE en ovinos y bovinos respectivamente (Newbold *et al.*, 2004; Beauchemin y McGinn, 2006).

El hecho de que las concentraciones de AGV disminuyan o no cambien puede ser dependiente de la dosis usada. La falta de cambio en la concentración total de AGV puede ser visto como algo positivo si se da también una disminución entre la concentración de NH₃ y nitrógeno, disminuyendo así la producción de metano. Sin embargo, la disminución de la proporción de los AGV por acción de los AE o sus componentes puede ser mal visto desde un punto de vista nutricional, debido a la función que cumplen estos ácidos como sustratos energéticos en los rumiantes (Benchaar *et al.*, 2008).

Se ha observado que la suplementación con AE de alcaravea y de ajo en alimento concentrado, mejora los niveles de fermentación ruminal al elevar la proporción total de AGV, incrementando el pH ruminal y disminuyendo el NH_3 en becerros de búfalo en desarrollo (Wang *et al.*, 2018). Por su parte los AE de timol y canela han demostrado su capacidad para disminuir la proporción molar de acetato, y su relación con el propionato, al incrementar los niveles de este en becerros Holstein que consumen una dieta alta en concentrado, y el potencial del AE de canela para aumentar la concentración molar de butirato en el rumen (Vakili *et al.*, 2013).

2.3 Biopsias de tejido ruminal

Históricamente, en los estudios sobre el desarrollo ruminal, los becerros eran sacrificados con el objetivo de obtener tejido ruminal, y así determinar su desarrollo morfológico, por lo cual se consideró buscar un método menos invasivo mediante el cual se pudieran medir variables como la altura, anchura y superficie de área de las papilas ruminales, evitando el sacrificio de los animales. La endoscopía es una técnica que puede ser usada para la obtención de biopsias ruminales. En rumiantes, pocas veces se ha planteado una metodología para la obtención de tejido ruminal por biopsia. Entre los pocos intentos se destaca la obtención de tejido ruminal mediante el uso de una cánula ruminal en becerros (van Niekerk *et al.*, 2018), lo cual podría ser muy invasivo.

Una técnica menos invasiva para el animal fue realizada por McRae *et al.* (2016), donde se proponía un protocolo para la obtención de muestras de tejido ruminal usando ovejas como modelo de experimentación. A diferencia de otros estudios, las muestras no fueron utilizadas para determinar el desarrollo ruminal, sino para realizárseles pruebas de ADN con la técnica de reacción en cadena de polimerasa (PCR). Una combinación de ambas técnicas podría ser utilizada para la obtención de tejido ruminal en becerros como un proceso menos invasivo, y así determinar variables de desarrollo ruminal.

3. JUSTIFICACIÓN

En los sistemas de producción vaca-becerro, el objetivo principal es la producción de becerros y el desempeño productivo de estos. Consecuentemente, un destete temprano es deseable, y para lograrlo, se requiere de un mayor desarrollo ruminal. Esto puede lograrse con el consumo de un alimento iniciador a temprana edad, lo que mejoraría los índices reproductivos de las vacas y el período entre partos. El proceso de extrusión aumenta la gelatinización y fermentación del almidón, y la indegradabilidad de la proteína, lo que puede mejorar el desempeño productivo de los becerros.

4. HIPÓTESIS

El proceso de extrusión o la adición de CRINA[®] en un iniciador para becerros mejorará el desarrollo ruminal y parámetros productivos en comparación con un alimento en harina o sin CRINA[®].

5. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el proceso de extrusión de una harina y la adición de CRINA[®] en el desarrollo ruminal y desempeño de becerros para un destete temprano, en un sistema de producción vaca-becerro.

5.1 Objetivos específicos

- I. Implementar un procedimiento menos invasivo para la obtención de muestras de tejido ruminal en becerros pre-destete.
- II. Determinar el desempeño productivo de becerros pre-destete, y variables de tamaño corporal (altura a la cruz, circunferencia torácica, longitud corporal).
- III. Medir las variables de desarrollo ruminal (altura, anchura y superficie) de papilas ruminales.
- IV. Medir variables de la fermentación ruminal (pH y AGV).

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Área de estudio

El presente trabajo experimental se realizó en el rancho San Francisco de Almandres en el municipio de China, Nuevo León, México (25°34'36.0"N 99°05'44.7"W). El estudio inició el día 21 de mayo de 2020 cuando los becerros fueron traídos al rancho y se desarrolló en un periodo de 11 semanas que abarcó del día 1 de junio al 14 de agosto de ese año (Figura 1).



Figura 1. Localización del área de estudio.

6.2 Animales y tratamientos

En el presente estudio se utilizaron veinticuatro becerros de cruza de Brangus y Charbray, 13 machos y 11 hembras, que tenían una edad aproximada de 2 a 4 semanas, con un peso promedio de 71.6 kg (Figura 2). Los becerros fueron identificados con un arete del 1 al 24, y distribuidos completamente al azar en cuatro tratamientos: (1) alimento iniciador en harina (HSC); (2) alimento iniciador en harina con la mezcla de aceites esenciales (CRINA[®]; DSM) (HCC); (3) alimento iniciador extruido (REWS[®]; MNA de México) (ESC); y (4) alimento iniciador extruido con CRINA[®] (ECC).



Figura 2. Becerros utilizados en el experimento durante la adaptación.

Los becerros tuvieron una semana para adaptarse al consumo del iniciador. Durante las once semanas que se realizó el experimento, el alimento ofrecido a los becerros se aumentó de forma escalonada, comenzando con una porción equivalente al 0.3% del peso vivo, y finalizando con un consumo del 0.9%. El alimento sobrante fue pesado para determinar el consumo diario, y se preparaba el alimento del día siguiente, el cual era puesto en bolsas de plástico, identificadas con el número de cada animal. Para el pesaje del alimento se utilizó una báscula Torrey® (Guadalupe, Nuevo León, México), la cual tenía una capacidad de 100 kilogramos (Figura 3).



Figura 3. Alimentos usados en el estudio.

6.3 Descripción del alimento

En la Tabla 1, se muestra el análisis garantizado del alimento. REWS® es un concentrado energético-proteico para becerros diseñado para acelerar el desarrollo ruminal, con el propósito de lograr un destete temprano. El concentrado es expuesto a un proceso de extrusión que gelatiniza el almidón, aumentando su digestibilidad y la energía metabolizable disponible. Este proceso reduce también la degradabilidad de las proteínas en el rumen, mejorando el perfil de aminoácidos que se absorben en el intestino delgado.

Tabla 1. Análisis garantizado del iniciador REWS®



Análisis garantizado

Composición	Contenido
Proteína cruda	25.0 % Min.
Grasa	8.0 % Min.
Fibra cruda	5.0 % Máx.
Cenizas	7.0 % Máx.
Humedad	12.0 % Máx.
ELN	40.5 % Min.
Calcio	1.4 % Min.
Fósforo	1.1 % Min.

6.4 Instalaciones

La metodología de este experimento fue aprobada por el Comité de ética de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia bajo el dictamen 19/2019. Los becerros fueron confinados en corraletas de madera de 1.20 x 2.40 metros (Figura 4 y 5). Cada una de las corraletas estaba equipada con un comedero y un bebedero (Figura 6).



Figura 4. Corraletas para manejo de los becerros.

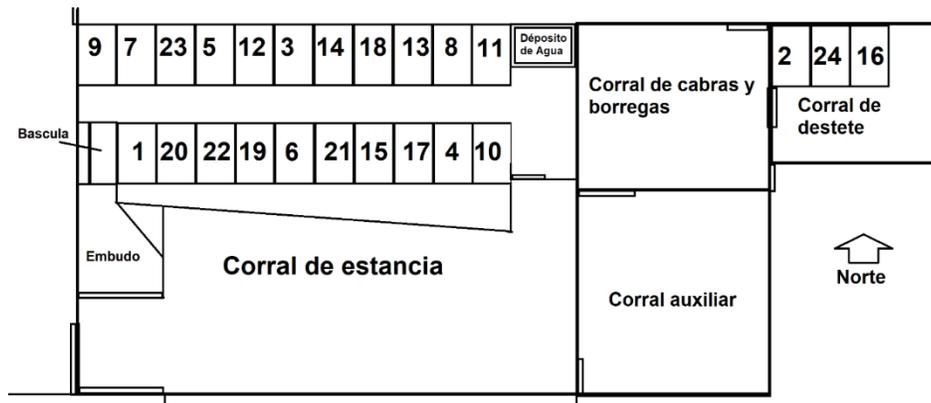


Figura 5. Ubicación de las corraletas durante el experimento.



Figura 6. Becerro consumiendo el suplemento extruido.

6.5 Pesaje y obtención de medidas corporales

Diariamente, los becerros fueron pesados en una báscula de barras ganadera Tru-Test[®] (Auckland, Nueva Zelanda), la cual fue instalada al final de un pasillo (Figura 7). Después de pesarlos, los becerros se pasaban a otro corral de manejo para que sus madres los amamantaran durante un periodo de aproximadamente media hora (Figura 8).



Figura 7. Báscula de pesaje individual.



Figura 8. Becerra amamantando con su madre.

Después de amamantar, los becerros fueron pesados inmediatamente para determinar el consumo de leche. El consumo de materia seca diaria de los becerros fue calculado considerando los consumos de leche y alimento iniciador, en base seca. Muestras de leche de las vacas fueron obtenidas para determinar su composición química. En promedio, la leche contenía la siguiente composición: sólidos totales, 11.92%; grasa, 3.5%; proteína, 3.36%; cenizas, 0.78%; y lactosa, 4.37%.

Durante las semanas 1, 3, 5, 7, 9 y 11 del estudio, mediciones de crecimiento (altura a la cruz, circunferencia torácica y longitud corporal) fueron obtenidas. Estas medidas se obtuvieron con el uso de una cinta métrica y con una tabla graduada de 130 cm, que fue colocada verticalmente en la entrada de la báscula, en el área de las corraletas (Figura 19). La medición de la circunferencia y de la longitud corporal se llevó a cabo en una manga de manejo de mayor tamaño.



Figura 9. Pesaje de los becerros (izquierda) y determinación de altura a la cruz.

6.6 Estandarización del procedimiento de endoscopía y biopsias

El día 21 de noviembre del 2019, se llevó a cabo una prueba para estandarizar y determinar la factibilidad de usar una técnica de endoscopía menos invasiva. Generalmente, los estudios de desarrollo ruminal se llevan a cabo en becerros sacrificados. Todo este procedimiento se realizó en el departamento de Imagenología del Hospital Veterinario de Pequeñas Especies de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UANL (Figura 10).



Figura 10. Colocación de la sonda endoscópica y vista de la pared ruminal.

6.7 Biopsias de tejido ruminal

Al final del experimento, se obtuvieron biopsias del retículo-rumen de cada uno de los becerros con el objetivo de medir el desarrollo de las papilas ruminales (altura, ancho, y superficie; μm). Los becerros fueron pasados a la prensa e inmovilizados. Posteriormente, se les administró 0.25 ml de xilacina vía IM, y dejó pasar 10 minutos antes del procedimiento, para que el tranquilizante hiciera efecto. Mientras una persona sostenía la cabeza del animal, otra introducía un tubo de PVC de 2 pulgadas de diámetro, por donde se introducía el endoscopio Olympus® (Tokio, Japón) para la obtención de muestras de tejido ruminal (Figura 11). La endoscopia consistía en introducir el endoscopio a través del esófago, atravesando el cardias, hasta entrar a la cavidad ruminal. Una vez que se apreciaba claramente la pared ruminal, se proseguía a insertar un cable equipado con un fórceps para realizar la colecta de tejido. El fórceps permanecía cerrado dentro de la sonda y se abría al salir de esta al llegar a la pared del rumen. Una vez que se daba este contacto, se cerraba el fórceps y se jalaba hacia atrás para obtener la muestra de tejido de aproximadamente 0.5 cm^2 . Las muestras de tejido fueron almacenadas en tubos con formaldehído para su posterior procesamiento.



Figura 11. Inmovilización de los becerros para el procedimiento de toma de muestras de la pared ruminal.

6.8 Colecta de líquido ruminal

Posteriormente a la obtención de la biopsia, se colectó una muestra del líquido ruminal, utilizando una sonda esofágica de plástico de 1.50 m de longitud. Para evitar que el becerro masticara la sonda, esta se introdujo a través de un tubo de PVC. El líquido fue puesto en tubos cónicos de 50 ml, midiéndose pH inmediatamente con un potenciómetro Beckman. Posteriormente el líquido ruminal fue filtrado a través de una gasa quirúrgica, para obtener cuando menos 30 ml de líquido ruminal, al que se le añadió 1 ml de ácido clorhídrico para detener la fermentación. Las muestras del líquido ruminal se conservaron a -20 °C para posteriormente determinar AGV, mediante cromatografía de gases (Figura 12).



Figura 12. Procesamiento de las muestras de líquido ruminal para medir pH.

6.9 Análisis histopatológico

Las muestras de tejido ruminal obtenidas de la biopsia fueron enviadas al Servicio de Anatomía, Patología y Citopatología del Hospital Universitario de la UANL. Ahí las muestras fueron fijadas en formaldehído para evitar daño celular y sometidas a un proceso de inclusión, donde el tejido fue lavado con agua para retirar el exceso de fijador, y posteriormente, fueron introducidas en diferentes diluciones de etanol, iniciando con una concentración del 70, y subsecuentemente, en concentraciones de 90, 96 y 100%. Posteriormente, se les aplicó una solución de xilol, y se sumergieron en parafina líquida durante dos horas, para después colocar las muestras en cassettes de inclusión (Simport[®]), inmersas en bloques, y se dejaron secar (Figura 13).



Figura 13. Cassettes utilizados para el proceso de inclusión en parafina.

Previo al corte, los bloques de parafina fueron adelgazados para que pudieran obtenerse cortes más uniformes de las muestras. El corte de los bloques fue llevado a cabo en un microtomo, el cual tiene la capacidad de obtener cortes de un grosor de $5\ \mu\text{m}$, los cuales se obtienen de forma seriada en forma de cinta (Figura 14).



Figura 14. Microtomo utilizado para cortar los bloques de parafina.

Después los cortes fueron colocados en un baño de flotación para expandirlos, y posteriormente, colocarlos sobre un portaobjetos, para luego colocarlos sobre una platina para evaporar el agua, y para que los cortes queden adheridos. Posteriormente, las muestras fueron desparafinadas para su tinción con hematoxilina y eosina, siendo el proceso el siguiente:

Tabla 2. Proceso de tinción con la técnica de H&E.

Desparafinado	Xileno 2 x10 minutos
Hidratación	Etanol 100° 2 x10 minutos Etanol 96° 10 minutos Etanol 80° 10 minutos H ₂ O destilada 10 minutos
Tinción	Hematoxilina 3 minutos Agua 15 minutos Agua destilada 2 x10 minutos Eosina 30 segundos H ₂ O destilada 10 minutos
Deshidratación	Etanol 80° 10 minutos Etanol 96° 10 minutos Etanol 100° 2 x10 minutos

Del proceso anterior se obtuvieron tres laminillas por cada uno de los becerros. Las laminillas fueron observadas en un microscopio Eagle[®] (Pennsylvania, Estados Unidos), con un aumento de 10x. Posteriormente se seleccionó una laminilla representativa de cada tratamiento y se fotografió. Las fotografías fueron remitidas al software de medición médica Image J (NIH), donde después de ser calibrado, se realizaron mediciones (μm) de la altura y anchura de las papilas ruminales. Para dichas mediciones se tomaba un promedio de 3 repeticiones (Imagen 15). Finalmente, se calculó la superficie de las papilas ruminales multiplicando la altura por la anchura.

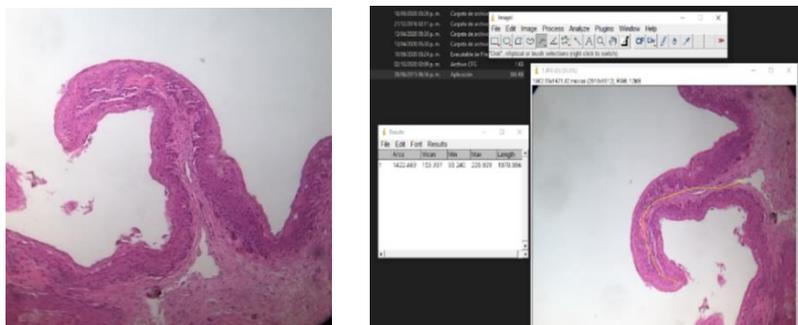


Figura 15. Fotografía de una papila ruminal (10x) y su medición en el software Image J.

6.10 Determinación de ácidos grasos volátiles mediante cromatografía de gases

Las concentraciones de AGV en milimoles (mM) de las muestras de líquido ruminal se determinaron mediante cromatografía de gases. Previo al análisis cromatográfico, las muestras de líquido ruminal se descongelaron a temperatura ambiente. Por cada muestra de líquido se prepararon 2 tubos de 5 ml debidamente identificados, los cuales fueron centrifugados (Hettich® Universal 220R, Baden-Wurtemberg, Alemania) a 5,000 rpm, durante un periodo de 20 minutos a 4 °C (Figura 16). Posteriormente, se recuperaron 5 ml de sobrenadante de cada una de las muestras en un tubo nuevo, añadiendo 1 ml de ácido metafosfórico (HPO_3), para después reposar en hielo durante 30 minutos (Figura 17). Una vez transcurrido este tiempo, se centrifugaron nuevamente bajo las mismas condiciones. Las muestras de líquido fueron posteriormente decantadas para ser almacenadas en refrigeración a 3 °C, hasta el análisis cromatográfico.



Figura 16. Centrifuga utilizada en el procesamiento de líquido ruminal.



Figura 17. Adición de HPO_3 al líquido ruminal.

Las concentraciones de AGV fueron determinadas usando un cromatógrafo Varian® Star 3400 CX (California, Estados Unidos). El cromatógrafo era previamente calibrado mediante las especificaciones dadas por el fabricante y por el protocolo vigente del Laboratorio de Nutrición (Figura 18).



Figura 18. Vista del cromatógrafo de gases Star 3400 CX y su columna.

De cada muestra de líquido ruminal, se analizaron dos repeticiones para obtener un promedio de la concentración (mM) y calcular el porcentaje molar. El procedimiento comenzaba al insertar una muestra de 1 μ l de líquido ruminal junto a 2 μ l de aire dentro de una jeringa Hamilton® (Bonaduz, Suiza) con una capacidad de 10 μ l. La jeringa era puesta dentro del inyector donde se aplicaba la muestra de líquido ruminal, para comenzar la detección de AGV (Figura 19). Después de 10 minutos, el software mostraba un cromatograma donde se podían apreciar los picos de los AGV, junto al estándar del cromatógrafo, así como su superficie total de estos.



Figura 19. Jeringa Hamilton, proceso de llenado e inyección en el cromatógrafo.

6.11 Análisis estadístico

Los datos se analizaron usando un diseño completamente al azar. El peso inicial de los becerros fue considerado como covariable en este modelo estadístico. Para la comparación de medias de las variables se usó la prueba Tukey. Se utilizó el programa estadístico Statistix[®].

7. RESULTADOS

7.1 Desempeño productivo y medidas corporales

No se obtuvo una diferencia ($P > 0.05$) en el consumo entre los iniciadores en harina y extruido, sin embargo, se pudo observar una disminución ($P = 0.053$) del consumo de leche con la adición de CRINA[®] (Tabla 3). La inclusión de CRINA[®] redujo el peso final ($P=0.03$), la ganancia diaria de peso ($P = 0.024$), la circunferencia torácica ($P = 0.004$), y empeoró la conversión alimenticia ($P = 0.047$). Los consumos diarios de leche fueron de 4.971, 4.003, 4.721, y 4.058 kg para HSC, HCC, ESC y ECC, respectivamente.

Tabla 3. Variables de desempeño y medidas corporales.

Variable	Forma		EE	CRINA [®]		EE	Valor P		
	Harina	Extruido		Sin	Con		Forma	CRINA [®]	F*C ²
Peso inicial (kg)	70.4	72.8	4.68	72.1	71.1	6.6	0.714	0.876	0.714
Peso final (kg)	126.2	128.2	4.10	133.9 ^a	120.4 ^b	4.09	0.737	0.030	0.710
Consumo de MS (kg/d) ¹									
Iniciador	0.396	0.402	0.022	0.397	0.402	0.022	0.853	0.876	0.589
Leche	0.479	0.469	0.027	0.518 ^a	0.431 ^b	0.027	0.813	0.053	0.690
Total	0.877	0.870	0.036	0.915	0.831	0.036	0.899	0.118	0.999
Ganancia de peso (kg/d)	0.781	0.838	0.046	0.889 ^a	0.730 ^b	0.046	0.397	0.024	0.963
Conversión alimenticia (kg)	1.147	1.055	0.047	1.031 ^b	1.171 ^a	0.047	0.181	0.047	0.819
Medidas corporales (cm)									
Altura a la cruz	98.0	98.8	1.07	99.2	97.6	1.07	0.611	0.320	0.352
Circunferencia torácica	117.3	117.4	1.29	120.3 ^a	114.4 ^b	1.29	0.962	0.004	0.895
Longitud corporal	62.2	63.3	0.71	63.7	61.8	0.71	0.287	0.067	0.669

¹MS, materia seca

²F*C, interacción entre forma y CRINA[®]

*Letras diferentes indican diferencia significativa ($P < 0.05$).

7.2 Desarrollo y fermentación ruminal

En la Figura 20, se presentan las imágenes representativas de cortes histológicos obtenidos durante el estudio.



Figura 20. Cortes histológicos de las papilas ruminales de los becerros.

La extrusión del alimento iniciador aumentó la altura ($P = 0.005$), anchura ($P = 0.036$), y superficie ($P = 0.02$) de las papilas ruminales. Sin embargo, la inclusión de CRINA en los alimentos iniciadores redujo estas variables (Tabla 4).

Tabla 4. Variables de desarrollo ruminal

Variable (μm)	Forma		EE	CRINA [®]			Valor P		
	Harina	Extruido		Sin	Con	EE	Forma	CRINA [®]	F*C ¹
Anchura	328 ^b	368 ^a	16.8	376 ^a	320 ^b	16.3	0.036	0.005	0.009
Altura	1,110 ^b	1,400 ^a	83.2	1,398 ^a	1,111 ^b	80.5	0.005	0.004	0.075
Superficie	398,778 ^b	504,156 ^a	27,855	515,173 ^a	387,760 ^b	27,855	0.020	0.007	0.234

¹F*C, interacción entre forma y CRINA[®]

*Letras diferentes indican diferencia significativa ($P < 0.05$).

Para la altura, anchura y superficie de las papilas ruminales se obtuvo una interacción entre la forma y la inclusión de CRINA®. En las Figuras 21, 22 y 23 se presentan las medias de los tratamientos para altura ($P = 0.009$), anchura ($P = 0.075$), y superficie ($P = 0.234$), de las papilas ruminales.

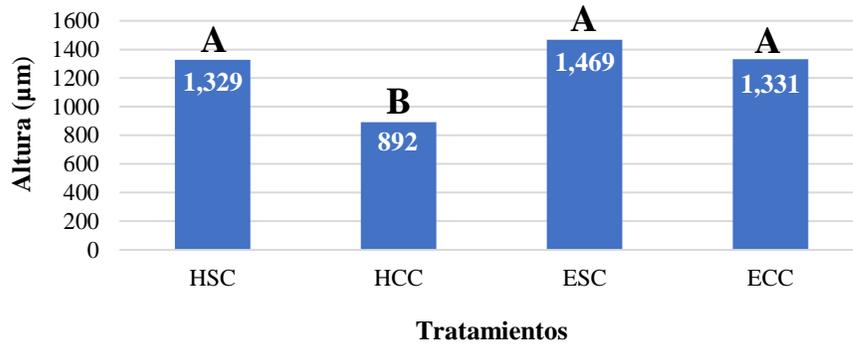


Figura 21. Medias de tratamiento para la altura de las papilas ruminales (µm).

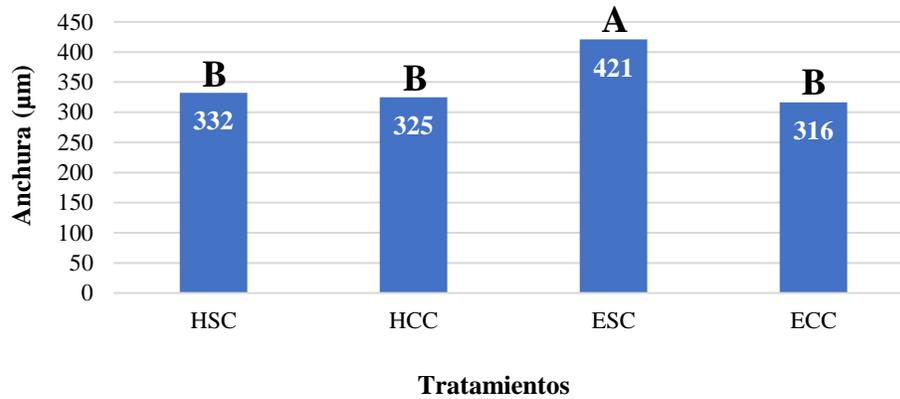


Figura 22. Medias de tratamiento para la anchura de las papilas ruminales (µm).

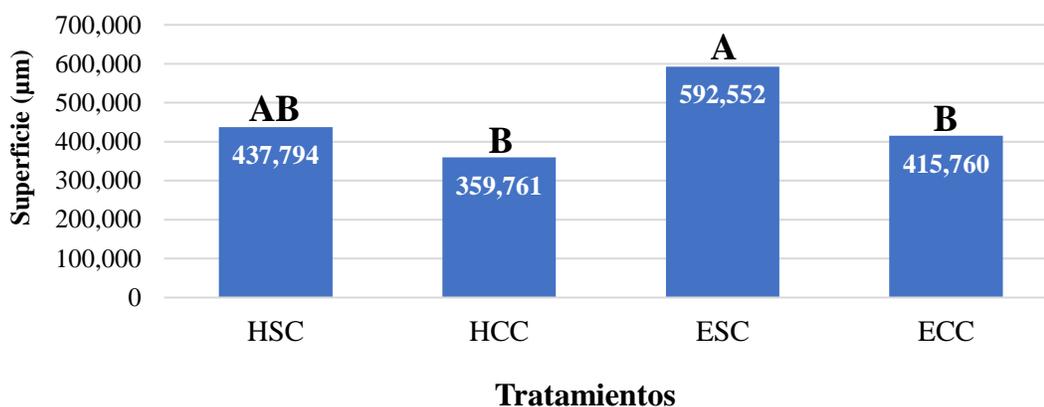


Figura 23. Medias de tratamiento para la superficie de papilas ruminales (µm).

El proceso de extrusión del alimento iniciador redujo ($P = 0.025$) el pH del líquido ruminal de los becerros en comparación con el iniciador en harina. Las medias del pH ruminal fueron de 5.73, 5.54, 5.28, y 5.26 para HSC, HCC, ESC, y ECC, respectivamente. Sin embargo, la inclusión de CRINA no afectó el pH ruminal de los becerros.

No se encontró un efecto ($P > 0.05$) de la forma física o de la inclusión de CRINA[®] en la concentración o el porcentaje molar de los AGV (Tabla 5), sin embargo, se obtuvo una interacción entre estas dos variables. Las medias de la concentración (mM) de ácido acético fueron de 39.6, 66.4, 86.9, y 50.0 para HSC, HCC, ESC y ECC, respectivamente. Una diferencia significativa ($P = 0.005$) se observó solamente entre los tratamientos sin CRINA (HSC y ESC) (Figura 24).

Tabla 5. Variables de fermentación ruminal.

Variables	Forma		CRINA®				Valor P		F*C ¹
	Harina	Extruido	EE	Sin	Con	EE	Forma	CRINA®	
pH	5.5 ^a	5.2 ^b	0.08	5.5	5.3	0.08	0.025	0.291	0.263
AGV ² (mM)									
Acético	53.0	68.4	10.2	63.2	58.1	10.2	0.149	0.628	0.005
Propiónico	27.6	31.5	6.0	28.1	31.0	6.0	0.523	0.639	0.017
Butírico	15.6	15.4	3.9	15.2	15.9	3.9	0.949	0.856	0.214
AGV ² (% molar)									
Acético	55.2	59.2	2.5	59.1	55.2	2.5	0.113	0.135	0.374
Propiónico	29.6	27.3	3.3	26.6	30.3	3.3	0.489	0.286	0.840
Butírico	15.3	13.5	1.9	14.2	14.5	1.9	0.357	0.884	0.418
Acético:propiónico	2.0	2.4	0.2	2.4	2.0	0.2	0.221	0.274	0.520

¹F*C, interacción entre forma y CRINA®

²AGV, ácidos grasos volátiles.

*Letras diferentes indican diferencia significativa (P < 0.05).

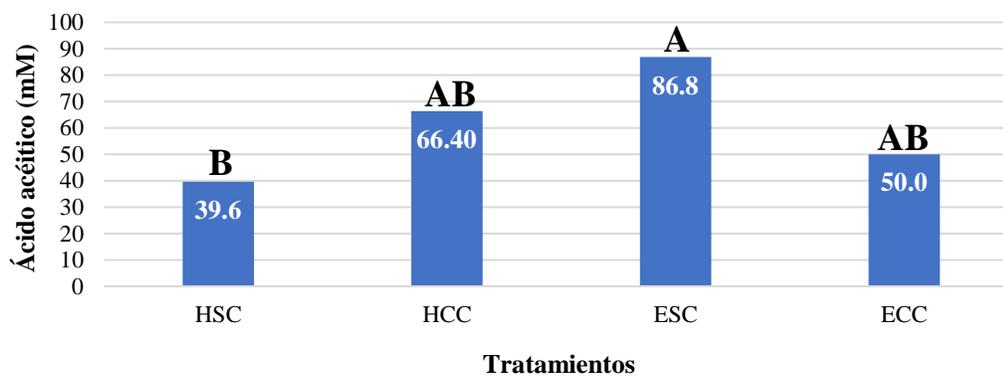


Figura 24. Medias de tratamiento en la producción de ácido acético (mM).

8. DISCUSIÓN

8.1 Desempeño productivo y medidas corporales

En este estudio no se observó una ventaja de extruir un alimento iniciador para becerros pre-destete con respecto a las variables de desempeño y las medidas corporales. Estos resultados concuerdan con otros estudios (Chaves *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2010) en los que no se obtuvo un beneficio de extruir un iniciador en el desempeño y medidas corporales. El tamaño de partícula y el proceso pueden tener un efecto positivo en la eficiencia alimenticia. En un estudio, Bach *et al.* (2007) reportaron una mejor conversión alimenticia con un alimento iniciador molido y peletizado, que con un alimento multipartícula (avena entera, maíz quebrado y otros ingredientes molidos).

En este estudio, la circunferencia torácica de becerros alimentados con un iniciador extruido fue similar a la de becerros alimentados con un iniciador en harina. En investigaciones previas (Zhang *et al.*, 2010; ZeidAli-Nejad *et al.*, 2017), tampoco se encontraron diferencias significativas en la circunferencia torácica entre becerros alimentados con iniciadores en harina y extruidos.

La inclusión de CRINA[®] redujo el peso final, la ganancia diaria de peso, la circunferencia torácica, y empeoró la conversión alimenticia. No se obtuvo una diferencia en el consumo entre los iniciadores en harina y extruido, sin embargo, se pudo observar una disminución del consumo de leche con la adición de CRINA[®]. Una reducción del consumo de leche en los tratamientos con CRINA[®] pudo ser la causa de un deterioro en el crecimiento de los becerros. Sin embargo, pocos estudios se han realizado con la inclusión de AE (extractos de plantas) en el desarrollo ruminal y desempeño de becerros pre-rumiantes (Diao *et al.*, 2019).

8.2 Desarrollo y fermentación ruminal

La introducción del alimento sólido a base de granos de cereal puede incrementar la fermentación y el desarrollo ruminal del becerro pre-rumiante (Gorka *et al.*, 2009). La extrusión del alimento iniciador aumentó la altura, anchura y superficie de las papilas ruminales. Chaves *et al.* (2014) no encontraron diferencias en la longitud de las papilas ruminales (μm) entre el grupo control de becerros (iniciador molido) y el grupo

consumiendo un alimento iniciador extruido (Ruter[®]), sin embargo, los becerros con el iniciador extruido tuvieron una mayor área papilar que aquellos con el iniciador en harina. Es importante enfatizar que los ingredientes y la composición química de ambos productos era muy diferente. Beharka *et al.* (1998) reportaron un efecto significativo del desarrollo anatómico y microbiano en becerros que consumieron un iniciador con un mayor tamaño de partícula que en becerros que consumieron la misma dieta molida. Estos autores reportaron una mayor área y altura de las papilas en el saco dorsal del rumen. En contraste, Castro y Elizondo (2012) reportaron una mayor altura de las papilas ruminales en becerros Holstein alimentados con un iniciador en harina en comparación con aquellos consumiendo un iniciador extruido.

La media del pH ruminal fue menor para los tratamientos con iniciadores extruidos (5.2) en comparación con los tratamientos de iniciador en harina (5.5), sin embargo, no hubo una influencia en las concentraciones y porcentaje molar de los AGV. Leão *et al.* (2020) no encontraron diferencias en el pH ruminal, la concentración y el porcentaje molar de los AGV. Beharka *et al.* (1998) reportaron un menor pH ruminal en becerros consumiendo un alimento en harina en comparación con un alimento a base de granos rolados al vapor.

Por otro lado, la inclusión de CRINA[®] en los alimentos iniciadores redujo altura, anchura y superficie de las papilas ruminales. En la literatura científica hay pocos estudios en los que se ha incluido AE en el desarrollo ruminal de becerros pre-rumiantes (Diao *et al.*, 2019). Sin embargo, la inclusión de CRINA[®] no afectó el pH ruminal, o las concentraciones y porcentaje molar de los AGV. En el estudio de Beharka *et al.* (1998), no se reportaron cambios en las concentraciones molares o la relación acetato:propionato debido a la forma física de la dieta.

9. CONCLUSIONES

En esta investigación, la forma física del alimento iniciador no afectó el desempeño de los becerros, sin embargo, el iniciador extruido aumentó la altura, anchura y la superficie de las papilas ruminales, en comparación con becerros que consumieron el alimento en harina. Aunque el pH ruminal fue menor para becerros consumiendo el iniciador extruido, no se obtuvieron diferencias en las concentraciones y porcentaje molar de los AGV entre los iniciadores en harina y extruido. La inclusión de AE afectó negativamente el desempeño productivo y desarrollo papilar de los becerros. Más estudios deben realizarse para determinar si la adición de AE después de la extrusión puedan mejorar el desarrollo y desempeño de becerros pre-rumiantes. Uno de los logros más importantes de este estudio fue la implementación de un procedimiento endoscópico poco invasivo para la obtención de muestras de tejido ruminal en becerros pre-destete.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Alvarado, C., Anrique, R., Navarrete, S., 2009. Effect of including extruded, rolled or ground corn in dairy cow diets based on direct cut crass silage. *Chil J Agr Res.* 69, 356-365.
- Amaral, C., Pelicano, E., Yañez, E., Souza, H., Machado, M., Sugohara, Y., Resende, K., 2007. Carcass characteristics and meat quality of Saanen kids fed ground, pelleted and extruded total ration. *Cienc Rural.* 37, 550-556.
- Anderson, K., Nagaraja, T., Morrill, J., 1987. Ruminant metabolic development in calves weaned conventionally or early. *J. Dairy Sci.* 70, 1000-1005.
- Bach, A., Giménez, A., Juaristi, J.L., Ahedo, J., 2007. Effects of physical form of a starter for dairy replacement calves on feed intake and performance. *J. Dairy Sci.* 90, 3028-3033.
- Baldwin, R., McLeod, R., Klotz, J., 2004. Rumen development, intestinal growth and hepatic metabolism in the pre- and postweaning ruminant. *J. Dairy Sci.* 87, 55-65.
- Beauchemin, K.A., McGinn, S.M., 2006. Methane emissions from beef cattle: Effects of fumaric acid, essential oil, and canola oil. *J. Anim. Sci.* 84, 1489–1496.
- Beharka, A., Nagaraja, T., Morrill, J., Kennedy, G., Klemm, R., 1998. Effects of form of the diet on anatomical, microbial, and fermentative development of the rumen of neonatal calves. *J. Dairy Sci.* 81, 1946-1955.
- Benchaar, C., Calsamiglia, S., Chaves, A.V., Fraser, G.R., Colombatto, D., McAllister, T.A., Beauchemin, K.A., 2008. A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. *Anim Feed Sci Technol.* 145, 209-228.
- Caldwell, R., 1919. A further study of milk substitute materials in feeding dairy calves. *J. Dairy Sci.* 2, 312-329.
- Castro, P., Elizondo, J., 2012. Crecimiento y desarrollo ruminal en terneros alimentados con iniciador sometido a diferentes procesos. *Agronom Mesoam.* 23, 343-352.

- Chaves, A., Costa, S., Melo, L., Pereira, M., 2014. Performance of calves submitted to protocols using extruded or ground starter. *Braz Arch Biol Technol.* 57, 695-700.
- Ciganas, N., Gružasuska, R., Stankevičius, R., Dovidaitienė, G., Kudlinskienė, I., 2016. Extrusion influence on nutritional and energy value of feed material. *Vet Zootech-Lith.* 73, 19-23.
- Deckhardt, K., Khol, A., Zebeli, Q., 2013. Peculiarities of enhancing resistant starch in ruminants using chemical methods: opportunities and challenges. *Nutrients.* 5, 1970-1988.
- Diao, Q., Zhang, R., Fu T., 2019. Review of strategies to promote rumen development in calves. *Animals.* 9, 490.
- Domingues, D., De Beni, M., Lauritano, R., 2016. Rumenology. Springer International Publishing. Cham, Switzerland. pp. 39-57.
- Gorka, P., Kowalski, Z., Pietrzak, P., Kotunia, A., Kiljanczyk, R., Flaga, J., Holst, J., Guilloteau, P., Zabielski, R., 2009. Effect of sodium butyrate supplementation in milk replacer and starter diet on rumen development in calves. *J Physiol Pharmacol.* 60, 47-53.
- Hobson, P.N., Stuart, C.S., 1989. The rumen microbial ecosystem. Blackie Academic & Professional. London. pp. 10-14.
- Hulbert, L., Cobb, C., Carrol, J., Ballou, M., 2011. The effects of early weaning on innate immune responses of Holstein calves. *J. Dairy Sci.* 94, 2545-2556.
- Jeshari M, Riasi A, Mahdavi A. H., Khorvash M, Ahmadi F., 2016. Effect of essential oils and distillation residues blends on growth performance and blood metabolites of Holstein calves weaned gradually or abruptly. *Livest Sci.* Elsevier. 185, 117-122.
- Ji, S., H. Zhang, Yan, H., Azarfar, A., Shi, H., Alungongo, G., Li, S., Cao, Z., Wang, Y., 2017. Comparison of rumen bacteria distribution in original rumen digesta, rumen liquid and solid fractions in lactating Holstein cows. *J Anim Sci Biotechnol.* 8, 16.

- Kertz, A., Hill, T., Quigley, J., Heinrichs, A., Linn, J., Drackley, J., 2017. A 100-year review: Calf nutrition and management. *J. Dairy Sci.* 100, 10151-10172.
- Khan, M., Bach, A., Weary, D., Von Keyserlingk, M., 2016. Invited review: Transitioning from milk to solid feed in dairy heifers. *J. Dairy Sci.* 99, 885-902.
- Khan, M., Lee, H., Lee, W., Kim, H., Kim, S., Park, S., Baek, K., Ha, J., Choi, Y., 2008. Starch source evaluation in calf starter: Ruminal parameters, rumen development, nutrient digestibility, and nitrogen utilization in Holstein calves. *J. Dairy Sci.* 91, 1140-1149.
- Leão, A. E., Coelho, S. G., Azevedo, R. A., Campos, M. M., Machado, F. S., Laguna, J. G., Ferreira, A.L., Ribeiro, G.L., Tomich, T.R., Costa, S.F., Machado, M.A., de Lima Reis, D. R., 2020. Effect of pelleted vs. ground starter with or without hay on preweaned dairy calves. *Plos one.* 15.
- McRae, K., Schultz, M., Mackintosh, C., Schakell, G., Martinez, M., Knowler, K., Williams, M., Ho, C., Elmes, S., McEwan, G., 2016. Ovine rumen papillae biopsy via oral endoscopy; a rapid and repeatable method for serial sampling. *New Zealand Vet. J.* 64, 174-178.
- Moran, J., 2005. How the rumen works. In tropical dairy farming: feeding management for dairy farmers in the humid tropics. *Landlinks Press.* pp. 48-49.
- Morrill, J., Dayton, A., Zmoleck J., Vitcenda M., 1984. Early weaning program for dairy calves examined. *Feedstuffs.* 56, 30.
- NRC, 2016. Nutrient Requirements of Beef Cattle, Eight Revised Edition. Washington, DC: The National Academies Press. pp. 25-27
- Nazzaro F, Fratianni F, De Martino L, Coppola R., De Feo V., 2013. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals.* 2; 6: 1451-1474.
- Newbold, C.J., McIntosh, F.M., Williams, P., Losa, R., Wallace, R.J., 2004. Effects of a specific blend of essential oil compounds on rumen fermentation. *Anim. Feed Sci. Technol.* 114, 105-112.

- Niwińska B., 2012. Digestion in ruminants carbohydrates. In: Comprehensive studies on glycobiology and glycotecnology. *IntechOpen*. pp. 245-253.
- Nocek, J., Kesler, E., 1980. Growth and rumen characteristics of Holstein steers fed pelleted or conventional diets. *J. Dairy Sci.* 63, 249-254.
- Noziere, P., Ortigues, I., Loncke, C., Sauvant, D., 2010. Carbohydrate quantitative digestion and absorption in ruminants: from feed starch and fiber to nutrients available for tissues. *Animal*. 4, 1057-1074.
- Penner, G., Steele M., Aschenbach J., McBride, B., 2011. Ruminant nutrition symposium: Molecular adaptation of ruminal epithelia to highly fermentable diets. *J. Anim. Sci.* 89,1108-1119.
- Rey, M., Enjalbert, F., Montelis V., 2012. Establishment of ruminal enzyme activities and fermentation capacity in dairy calves from birth through weaning. *J. Dairy Sci.* 95, 1500–1512
- Rokey, G, Plattner, B., De Souza, E., 2010. Feed extrusion process description. *R. Bras. Zootec.* 39, 510-518.
- Safaei, K., Yang, W., 2017. Effects of grain processing with focus on grinding and steam-flaking on dairy cow performance. In: Herbivores. *Shields V.D.C. Intechopen*. pp. 118-126.
- Salazar, L., Nero, L., Campos, M., Cortinhas, C., Acedo, T., Tamassia, L., Busato, K., Morais, V., Rotta, P., Silva, A., Marcondes, M., 2019. Effect of selected feed additives to improve growth and health of dairy calves. *Plos one*. 14.
- Santos, F., Paula, M., Lezier, D., Silva, J., Santos, G, Bittar, C., 2015. Essential oils for dairy calves: Effects on performance, scours, rumen fermentation and intestinal fauna. *Animal*. 9, 1-8.
- Shabi, Z., Bruckental, I., Zamwell, S., Tagari, H., Arieli, A., 1999. Effects of extrusion of grain and feeding frequency on rumen fermentation, nutrient digestibility, and milk yield and composition in dairy cows. *J Dairy Sci* 82, 1252-1260.

- Shen, Z., Seyfert, H.M., Löhrke, B., Schneider, F., Zitnan, R., Chudy, A., Kuhla, S., Hammon, H.A., Blum, J.W., Martens, H., Hagemeister, H., Voigt, J., 2004. An energy-rich diet causes rumen papillae proliferation associated with more IGF type 1 receptors and increased plasma IGF-1 concentrations in young goats. *J. Nutr.* 134, 11-17.
- Suarez, B., Van Reenen, C., Gerrits, W., Stockhofe, N., Van Vuuren, A., Dijkstra, J., 2006. Effects of supplementing concentrates differing in carbohydrate composition in veal calf diets: II rumen development. *J. Dairy Sci.* 89, 4376-4386.
- Vakili, A.R., Khorrami, B., Danesh Mesgaran, M., Parand, E., 2013. The effects of thyme and cinnamon essential oils on performance, rumen fermentation and blood metabolites in holstein calves consuming high concentrate diet. *Asian-Australas J Anim Sci.* 26, 935-944.
- van Niekerk, J. K., Middeldorp, M., Steele M.A., 2018. Technical note: The development of a methodology for ruminal and colon tissue biopsy of young Holstein dairy calves. *J. Dairy Sci.* 101, 7212-7218.
- Wang, B., Yang, C.T., Diao, Q.Y., Tu, Y., 2018. The influence of mulberry leaf flavonoids and *Candida tropicalis* on antioxidant function and gastrointestinal development of preweaning calves challenged with *Escherichia coli* O141:K99. *J. Dairy Sci.* 101, 6098-6108.
- ZeidAli-Nej, A., Ghorbani., G.R., Kargar, S., Sadeghi, A., Pezeshki, A., Ghaffari, M.H., 2017. Nutrient intake, rumen fermentation and growth performance of dairy calves fed extruded full-fat soybean as a replacement for soybean meal. *Animal.* 12, 733-740.
- Zhang, Y.Q., Hed, C.H., Meng, Q.X., 2010. Effect of a mixture of steam-flaked corn and soybeans on health, growth, and selected blood metabolism of Holstein calves. *J Dairy Sci.* 93, 2271-2279.
- Zhao, G.Y., Sun, Y.B., 2010. Effects of volatile fatty acids on IGF-I, IGFBP-3, GH, insulin and glucagon in plasma, and IGFI and IGFBP-3 in different tissues of

growing sheep nourished by total intragastric infusions. *Asian-australas. J. Anim. Sci.* 23, 366-371.