



**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A.C.**

**SUPLEMENTACIÓN DE ÁCIDO FERÚLICO Y CLORHIDRATO
DE ZILPATEROL COMO PROMOTORES DE CRECIMIENTO
EN OVINOS EN FINALIZACIÓN**

Por:

M. en C. Edgar Fernando Peña Torres

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

DOCTORADO EN CIENCIAS

APROBACIÓN

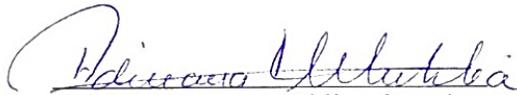
Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Edgar Fernando Peña Torres, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Doctorado en Ciencias.



Dr. Humberto González Ríos
Director de Tesis



Dra. Etna Aida Peña Ramos
Miembro del comité



Dra. Adriana T. Muhlia Almazán
Miembro del comité



Dra. Araceli Pinelli Saavedra
Miembro del comité

Dr. Leonel Avendaño Reyes
Miembro del comité

Dr. Ismael Jiménez Estrada
Miembro del comité

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Edgar Fernando Peña Torres, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Doctorado en Ciencias.

Dr. Humberto González Ríos
Director de Tesis

Dra. Etna Aida Peña Ramos
Miembro del comité

Dra. Adriana T. Muhlia Almazán
Miembro del comité

Dra. Araceli Pinelli Saavedra
Miembro del comité



Dr. Leonel Ayendaño Reyes
Miembro del comité

Dr. Ismael Jiménez Estrada
Miembro del comité

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Edgar Fernando Peña Torres, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Doctorado en Ciencias.

Dr. Humberto González Ríos
Director de Tesis

Dra. Etna Aida Peña Ramos
Miembro del comité

Dra. Adriana T. Muhlia Almazán
Miembro del comité

Dra. Araceli Pinelli Saavedra
Miembro del comité

Dr. Leonel Avendaño Reyes
Miembro del comité



Dr. Ismael Jiménez Estrada
Miembro del comité

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis “Suplementación de Ácido Ferúlico y Clorhidrato de Zilpaterol como Promotores de Crecimiento en Ovinos en Finalización” es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor Edgar Fernando Peña Torres, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director(a) de tesis.



Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme los recursos educativos y económicos para el desarrollo de mis estudios de posgrado.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD, A. C.) por recibirme y brindarme las herramientas necesarias para realizar los estudios de posgrado.

A mi director de tesis, Dr. Humberto González Ríos por permitirme formar parte de su equipo de trabajo y darme la oportunidad de ser su asesorado de maestría y doctorado, asimismo por su profesionalismo, enseñanza y amistad durante todo este tiempo.

Le agradezco a los miembros de mi comité los cuales desde un inicio siempre mostraron su disposición y profesionalismo para llevar a cabo este proyecto, además de su apoyo en las diferentes etapas del experimento.

A Dr. Candelario Castillo y a la asociación COSOCAPRI, por su gran colaboración en el aporte de las instalaciones, animales, las pruebas de comportamiento y evaluación de la canal las cuales fueron parte medular del experimento.

Al Dr. Ismael Jiménez y su equipo de trabajo, por su amabilidad y disposición para la realización de los análisis de histoquímica muscular en CINVESTAV, México.

Al laboratorio de bioenergética y genética molecular de CIAD, a cargo de la Dra. Adriana Muhlia y Q. B. Sandra Araujo por su valioso y fundamental apoyo en los análisis de expresión génica.

A la Q. B. Thalia Islava Lagarda por su apoyo y colaboración en los análisis de laboratorio y en el uso de equipos; asimismo al Dr. Martín Valenzuela, Dra. Aida Peña, M. C. Libertad Zamorano, por su colaboración en este proyecto. A mis compañeros del grupo de trabajo del laboratorio LACYTEC por su aporte de conocimientos y compañerismo que fueron de importancia para mi formación: Dr. José Luis Dávila, Q. B. Germán Cumplido, M. C. Julio González, M. C. Ángeles López, M. C. Lisdeth Gutiérrez, M. C. Anna Pérez, Dra. Nidia Valenzuela, Dr. Julio López, M. C. Felipe Rosales, M. C. Edgar Valle.

DEDICATORIA

A mi esposa e hijo por ser el gran soporte y motivación en este trayecto.

A mis padres y hermanos por su invaluable apoyo durante todas las etapas de mi vida.

A toda mi familia.

A dios por darme salud y vida para lograr este valioso objetivo y los que están por venir.

CONTENIDO

APROBACIÓN	2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	5
AGRADECIMIENTOS	6
DEDICATORIA	7
CONTENIDO	8
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE CUADROS	11
RESUMEN	12
ABSTRACT	13
1. INTRODUCCIÓN	14
2. ANTECEDENTES	16
2.1 Promotores de Crecimiento Implementados en Producción Animal.....	16
2.2 Agonistas Adrenérgicos- β	17
2.2.1 Modo de Acción de los AA- β a Nivel Fisiológico y Celular	18
2.2.2 Mecanismos Indirectos de los AA- β que Promueven el Crecimiento	21
2.2.3 Modificaciones en la Morfometría del Músculo Esquelético	22
2.2.4 Consecuencias Negativas en Calidad de la Carne y Rechazo del Consumidor al Uso de AA- β	23
2.3 Los Ácidos Hidroxicinámicos como Alternativa al Uso de Promotores de Crecimiento Sintéticos en Producción Animal	24
2.4 Ácido Ferúlico y sus Propiedades	28
2.5 Investigaciones Previas con AF como Aditivo en Animales de Engorda	29
3. HIPÓTESIS	32
4. OBJETIVOS	¡Error! Marcador no definido.
4.1 Objetivo General.....	33
4.2 Objetivos Particulares.....	33
5. MATERIALES Y MÉTODOS	34
5.1 Sitio Experimental, Animales y Tratamientos.....	34
5.2 Evaluación del Comportamiento Productivo.....	35
5.3 Sacrificio, Evaluación de las Características de la Canal y Recolección de las Muestras	36
5.4 Caracterización de la Fibra Muscular de <i>Longissimus thoracis</i> Mediante Tinción Histoenzimática	37
5.5 Evaluación de la Expresión Génica en el Músculo <i>Longissimus thoracis</i>	39
5.5.1 Preparación de Muestra y la Extracción del ARN Total	39
5.5.2 Diseño de Primers y Sondas	40

CONTENIDO (continuación)

5.5.3 Expresión Génica Mediante PCR en Tiempo Real.....	42
5.6 Análisis Estadístico	43
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	44
6.1 Comportamiento Productivo	44
6.2 Características de la Canal.....	47
6.3 Caracterización de la Fibra Muscular por Tinción Histoenzimática	49
6.3.1 Tinción de Músculo por NADH-TR.....	49
6.3.2 Tinción de Músculo por ATPasa	53
6.3.3 Densidad y Número Estimado Total de Fibras en el Músculo <i>Longissimus thoracis</i>	53
6.4 Expresión Génica Relativa de Indicadores Miogénicos en el Músculo <i>Longissimus thoracis</i>	59
6.4.1 Abundancia relativa en receptor adrenérgico $\beta 2$	59
6.4.2 Abundancia relativa en MHC-I.....	61
6.4.3 Abundancia relativa en MHC-IIx	63
6.4.4 Abundancia relativa en IGF-I	65
6.5 Concentración y relaciones ADN, ARN y proteína	67
7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	70
8. LITERATURA CITADA	71

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Modo de acción de los agonistas adrenérgicos- β a nivel celular.....	19
2. Principales ácidos hidroxicinámicos y su estructura química.....	27
3. Sección transversal del músculo <i>Longissimus thoracis</i> de corderos bajo la técnica NADH-TR.	51
4. Sección transversal del músculo <i>Longissimus thoracis</i> de corderos bajo la técnica <i>ATPasa</i>	52
5. Abundancia relativa del ARNm en receptor adrenérgico β 2 en el músculo <i>Longissimus thoracis</i> de corderos suplementados con ácido ferúlico y clorhidrato de zilpaterol (Media \pm DE, expresado en unidades relativas).....	60
6. Abundancia relativa del ARNm de MHC-I en el músculo <i>Longissimus thoracis</i> de corderos suplementados con ácido ferúlico y clorhidrato de zilpaterol (Media \pm DE, expresado en unidades relativas).....	62
7. Abundancia relativa del ARNm de MHC-IIx en el músculo <i>Longissimus thoracis</i> de corderos suplementados con ácido ferúlico y clorhidrato de zilpaterol (Media \pm DE, expresado en unidades relativas).....	64
8. Abundancia relativa del ARNm de IGF-I en el músculo <i>Longissimus thoracis</i> de corderos suplementados con ácido ferúlico y clorhidrato de zilpaterol (Media \pm DE, expresado en unidades relativas).....	67

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Dieta experimental.....	36
2. Secuencias de primers y sonda Taqman de corderos para PCR en tiempo real.....	41
3. Comportamiento productivo y características de la canal de corderos de pelo suplementados con ácido ferúlico y clorhidrato de zilpaterol durante 32 días.....	45
4. Porcentaje, área de sección transversal y perímetro de las fibras del músculo <i>Longissimus thoracis</i> con la técnica <i>NADH-TR</i>	54
5. Porcentaje, área de sección transversal y perímetro de las fibras del músculo <i>Longissimus thoracis</i> con la técnica <i>ATPasa</i>	55
6. Densidad y número total de fibras estimado del músculo <i>Longissimus thoracis</i> de corderos (tinción <i>NADH-TR</i>).....	57
7. Cuantificación y relación de ADN, ARN total y proteína en el músculo <i>Longissimus thoracis</i> de corderos suplementados con ácido ferúlico y clorhidrato de zilpaterol.....	69

RESUMEN

El efecto de agonistas adrenérgicos- β como promotores de crecimiento en ovinos es aún inconsistente y existe escasa evidencia sobre los mecanismos a nivel celular que ocurren al suplementar estas moléculas en esta especie. Además, se han propuesto nuevas alternativas naturales como el ácido ferúlico (AF), al cual se le ha encontrado un efecto promotor de crecimiento en animales similar a los agonistas adrenérgicos- β (AA- β). Sin embargo, la respuesta de AF a nivel productivo y fisiológico en ovinos aun es inconsistente. El objetivo del presente estudio fue evaluar el comportamiento productivo, las características de la canal, el tipo y morfometría de las fibras musculares y la expresión génica en tejido muscular de corderos de pelo suplementados con AF y clorhidrato de zilpaterol (CZ). Se utilizaron 32 corderos de pelo, machos, cruza Dorper \times Pelibuey (peso inicial 24 ± 3 kg) bajo un diseño en bloques completos al azar. Se alojaron dos corderos por corral ($n = 4$) y se les asignaron uno de cuatro tratamientos experimentales durante 32 días: 1) dieta basal sin aditivo (Testigo); 2) 300 mg/d de ácido ferúlico (AF300); 3) 600 mg/d de ácido ferúlico (AF600); 4) 6 mg/d de CZ. Los resultados del comportamiento productivo mostraron diferencias en el peso final y la ganancia diaria de peso con un aumento de 6.4% y 25.5%, respectivamente con los tratamientos AF300, AF600 y CZ respecto al testigo ($P < 0.05$). En las características de la canal, el área del músculo LT fue 13% mayor en CZ respecto a AF ($P < 0.05$). La suplementación con AF o CZ no afectó los porcentajes de fibras musculares ($P > 0.05$), pero el área de sección transversal (AST) en las fibras oxidativas incrementó entre 800 y 1000 μm^2 en animales suplementados con AF y CZ, respecto al testigo ($P < 0.05$). Los análisis de expresión de genes arrojaron una mayor abundancia de ARNm para el receptor β_2 en CZ, respecto a los demás tratamientos ($P < 0.05$). La expresión del gen MHC-I mostró que AF300, AF600 y CZ incrementaron los niveles de ARNm de 2 a 4 veces más respecto al testigo ($P < 0.05$); mientras que la expresión de MHC-IIx fue hasta 4 veces mayor en CZ respecto a los demás tratamientos ($P < 0.05$). Con base en lo anterior, consideramos que AF y CZ promueven una mejora en las variables en corral, mediante un aumento en la expresión de MHC-I, lo cual provocó fibras oxidativas más gruesas. Sin embargo, se concluyó que el mecanismo β -agonista solamente ocurrió con CZ debido al incremento en el contenido de ARNm para el receptor β_2 .

Palabras clave: Corderos de pelo, ácido ferúlico, clorhidrato de zilpaterol, comportamiento productivo, fibra muscular, expresión génica.

ABSTRACT

Studies of β -adrenergic agonists as growth promoters in lambs are still inconsistent and there is scarce evidence about their mode of action. Moreover, new natural alternatives for growth promoters have been proposed, such as ferulic acid (FA), which is a molecule that recently have shown evidence as growth promoter in animals similar to β -adrenergic agonists. However, FA's effect on productive performance parameters and mode of action in lambs are unknown. The aim of the present study was to evaluate growth performance, carcass characteristics, type and morphometric characteristics of muscle fibers and specific genes expression in lambs supplemented with FA and zilpaterol hydrochloride (CZ). Thirty-two male Dorper \times Pelibuey crossbred lambs (initial weight 24 ± 3 kg) were used under a randomized complete block design. Two lambs were allocated per pen ($n = 4$) and assigned to one of four experimental treatments: 1) basal diet without additive (Control); 2) 300 mg/day of ferulic acid (FA300); 3) 600 mg/day of ferulic acid (FA600); 4) 6 mg/day of zilpaterol hydrochloride (CZ). The period of supplementation was for 32 days and growth performance, carcass characteristics, and histomorphometry of *Longissimus thoracis* (LT) fibers and gene expression were evaluated. Results of growth performance showed differences for final weight and daily weight gain with an increase of 6.4% and 25.5%, respectively with FA or CZ supplementation in comparison to control ($P < 0.05$). In carcass characteristics, the LT muscle area was 13% higher in CZ than FA ($P < 0.05$). Supplementation of FA or CZ increased cross-sectional area of oxidative fibers between 800 and 1000 μm^2 in comparison to control ($P < 0.05$). Gene expression tests showed a higher levels of mRNA for β_2 receptors in CZ in comparison with all other treatments ($P < 0.05$); the expression for MHC-I showed that FA doses and CZ increased their mRNA levels, which were 2 to 4 fold higher than control ($P < 0.05$), the expression of MHC-IIx was 4 fold higher in CZ in comparison to the other treatments ($P < 0.05$). We concluded that FA and CZ generated an improvement in growth performance parameters through an increase in the expression of MHC-I, that promoted larger oxidative fibers; however, it was concluded that only CZ possessed a β -agonist mechanism due to the increase in abundance of β_2 receptor.

Keywords: Hair lambs, ferulic acid, zilpaterol hydrochloride, feedlot performance, muscle fiber, gene expression.

1. INTRODUCCIÓN

En México, la explotación de ganado ovino posee un impacto económico que va en crecimiento dentro del sector pecuario solo por debajo de especies como aves, bovinos y cerdos, en donde a través de los años y con el apoyo del sector gubernamental, la producción de esta especie ha incrementado. En el año 2003 la producción era de aproximadamente 40 mil toneladas en canal, actualmente se producen cerca de 60 mil toneladas de carne en canal (SIAP-SAGARPA, 2015). Esta producción se destina principalmente a la zona centro y sur de México, debido a la diversidad de platillos en la que este tipo de carne se utiliza; sin embargo, la demanda no se cubre en su totalidad y requiere buscar mercados extranjeros para la importación, estimándose que 30% de esta carne proviene de países como Nueva Zelanda, Estados Unidos y Australia (SIAP, 2012).

En este sentido, en algunos estados como Sonora, Sinaloa y Baja California, se trabaja en la explotación de esta especie mediante diferentes estrategias tecnológicas que ayudan a mejorar la producción, como son la manipulación genética y mejoras en el sistema de alimentación. Dentro de ésta última se encuentra el uso de compuestos promotores de crecimiento como implantes hormonales o compuestos agonistas adrenérgicos- β (AA- β) (Macías-Cruz et al., 2010). Los AA- β se consideran análogos de las hormonas endógenas catecolaminas y su efecto se caracteriza por una acción anabolizante, donde se incrementa la acreción de músculo y disminución en la síntesis de grasa (Mersmann, 2002; Pringle et al., 1993). El clorhidrato de zilpaterol (CZ) y clorhidrato de ractopamina (CR) son los únicos aprobados para su uso en México, Estados Unidos, Sudáfrica y otros países, y se implementan rutinariamente para promover el crecimiento en ganado bovino y porcino en etapas de finalización. La aplicación de estos dos compuestos genera mayor ganancia de peso, mejora la eficiencia alimenticia y se logra con esto una reducción de los costos productivos además de incrementar el rendimiento en carne (Strydom et al., 2009).

Como se mencionó anteriormente, en México está permitido el uso del compuesto AA- β clorhidrato de zilpaterol en rumiantes; sin embargo, a pesar que se sugieren dosis similares tanto en ovinos como en bovinos, los resultados en ovinos son inconsistentes. Algunos estudios reportan un efecto promotor en corral y mayores rendimientos en canal y carne, mientras que otros no observan cambios, esto debido a las diferentes variables como la especie, sexo, edad, raza, condiciones climáticas que pueden afectar la efectividad de estos compuestos (Dávila-Ramírez et

al., 2014; Estrada-Angulo et al., 2008; López-Carlos et al., 2010; Macías-Cruz et al., 2010; Salinas-Chavira et al., 2004).

A pesar de los beneficios que se obtienen por el uso de anabólicos sintéticos, se ha buscado implementar otras moléculas principalmente de origen natural provenientes de fuentes vegetales (fitoquímicos) que potencialmente presentan resultados similares. Esto debido al rechazo de carne con aditivos sintéticos por parte de países europeos y asiáticos. Además, en México se han reportado casos de intoxicación por consumo de vísceras y carne contaminada con un AA- β prohibido (clembuterol), lo que abre las puertas al uso alternativo de compuestos naturales como una estrategia favorable para mejorar el crecimiento animal y sin provocar riesgo al consumidor (Chaves et al., 2008; Sumano et al., 2002).

El fitoquímico ácido ferúlico (AF, ácido 4-hidroxi-3-metoxicinámico) es un ácido hidroxicinámico presente en una amplia gama de fuentes vegetales, tales como los cereales, granos y frutas (Kumar y Kanwar, 2011). En México, el AF se obtiene a partir de los residuos del proceso de nixtamalización del maíz (nejayote) y mediante procesos alcalinos y enzimáticos es posible obtener este compuesto de forma aislada con un alto grado de pureza (Asaff et al., 2004). La forma aislada de AF reporta diferentes propiedades bioactivas a nivel fisiológico y en la calidad de alimentos (Kikuzaki et al., 2002; Ou y Kwok, 2004). Dentro de estas propiedades se encuentra el efecto promotor de crecimiento mediante un posible mecanismo de tipo anabolizante. Un estudio previo *in vitro* con células satélite de bovino mostró que el AF incrementa los niveles de ARNm del receptor β 2 y de la cadena pesada de miosina similar al AA- β zilpaterol (Platt et al., 2012). Al ser adicionado en dietas de monogástricos y bovinos en etapa de finalización, se provocó un efecto promotor de crecimiento (Valenzuela-Grijalva, 2017; Peña-Torres, 2014; González-Ríos et al., 2013). Por tanto, el presente proyecto propone evaluar la inclusión de AF y CZ en la dieta de corderos y evaluar los efectos a nivel productivo, histológico y celular asociados a la ruta de acción anabolizante.

2. ANTECEDENTES

2.1 Promotores de Crecimiento Implementados en Producción Animal

Se les llama promotores de crecimiento (PC) a los aditivos que forman parte de la ración o bien se suministran vía subcutánea en animales con la finalidad de aumentar el peso diario en un menor tiempo y además mejorar la conversión de alimento consumido (Mora, 2007). Los promotores de crecimiento (ionóforos, prebióticos, agonistas adrenérgicos- β o implantes anabólicos) se utilizan comúnmente en el sector pecuario desde hace más de tres décadas, con el objetivo de lograr mayor rendimiento económico y productivo (Heitzman, 1979; Mersmann, 1998). El modo de acción de los PC es dependiente de la especie animal al cual se le suministra. En el caso de los aditivos como ionóforos, enzimas, probióticos o prebióticos pueden influir sobre las poblaciones microbianas en rumen y/o estómago e impedir la infección de microorganismos patógenos, lo que provoca una resistencia de los animales a enfermedades que perjudican la salud y el rendimiento (Mora, 2007). Para los rumiantes, los ionóforos ejercen cambios a nivel población ruminal, donde se modifican los patrones de ácidos grasos volátiles y se reduce la metanogénesis o se incrementa la proteína microbiana; además, dan lugar a una mayor eficiencia y uso de la energía disponible en la dieta por parte del animal (Flachowsky y Lebzien, 2012; García-González et al., 2006).

Por su parte, los compuestos anabolizantes pueden ser implantes subcutáneos o aditivos en el alimento con un efecto a nivel hormonal como los AA- β , estos compuestos modifican el metabolismo a través de una mayor síntesis de hormonas responsables del crecimiento. Estas moléculas pueden ser de origen natural o sintético y ejercen efectos metabólicos en células diana; tales compuestos se caracterizan por aumentar la síntesis de proteínas y/o promover la lipólisis (Araujo-Febres y Pietrosevoli, 1991; Stryer, 1996).

2.2 Agonistas Adrenérgicos- β

En el caso de los AA- β , son moléculas sintéticas análogas a las catecolaminas (epinefrina y norepinefrina) dentro de los que se encuentran el clorhidrato de clenbuterol, cimaterol, clorhidrato de zilpaterol y clorhidrato de ractopamina con un mecanismo de tipo hormonal y solo estos dos últimos se permite su uso en etapas de finalización en animales de engorda. La finalidad es incrementar el anabolismo hacia la síntesis de masa muscular mediante el aprovechamiento de nutrientes y energía proveniente del tejido adiposo. Estos compuestos provocan mayores rendimientos tanto en corral como en la carne, lo que resulta favorable a nivel productivo y económico para el productor (Anderson et al., 2004).

El uso de estas moléculas en rumiantes es una estrategia ampliamente utilizada en corrales de engorda. De acuerdo a las dosis recomendadas (0.15mg/kg de PV/día) se puede incrementar la ganancia diaria de peso hasta un 25% y la conversión alimenticia entre un 10 a 30% respecto a animales sin suplemento y manteniéndose similares consumos de alimento (Estrada-Angulo, 2008; Avendaño-Reyes et al., 2006; Strydom et al., 2009). Las características de la canal también se ven mejoradas al implementar AA- β , se han demostrado resultados positivos en el peso de las canales de bovinos para carne, las cuales aumentan hasta 12 kg, los rendimientos en la canal se incrementan desde 3 al 7%, el área del *Longissimus dorsi* hasta un 5% mayor y un 15% de reducción en la grasa dorsal (Moloney et al., 1990; Mohammadi et al., 2006).

No obstante, los resultados de la implementación de AA- β en corderos no muestran una evidencia consistente sobre su efecto en corral y características de la canal bajo las dosis de 6 y 10 mg/d de CZ. Por un lado, se ha reportado en ovinos un incremento de hasta 25% en la ganancia de peso, una mejora de conversión alimenticia del 30% y mayores rendimientos en la canal, sin encontrar cambios significativos en el área de *Longissimus dorsi* y grasa dorsal (Estrada-Angulo et al., 2008; López-Carlos et al., 2010; Avendaño-Reyes et al., 2011). Contrariamente, Dávila-Ramírez (2014) solo encontró un cambio significativo en rendimiento de canal (2%) y un incremento de 8% en el área de músculo *Longissimus thoracis*. Por su parte, Macías-Cruz (2016) no encontró diferencias en corral ni en la canal al suplementar 6 mg/d de CZ en corderos. Por lo tanto, es necesario mayor información en ovinos que respalde los cambios que ocurren en corral mediante el estudio de los eventos a nivel celular e intracelular.

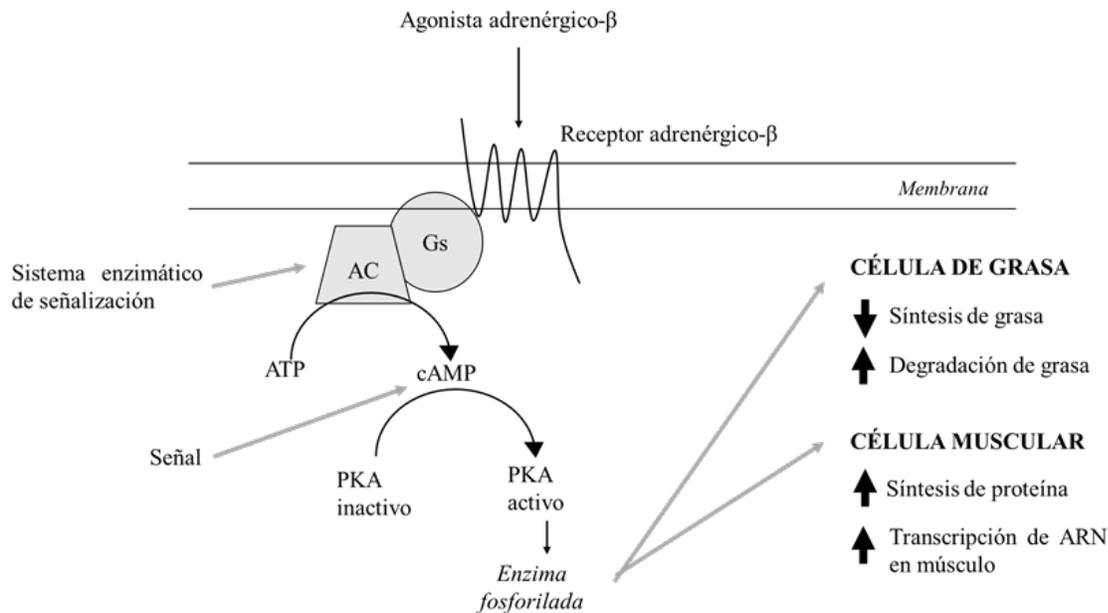
2.2.1 Modo de Acción de los AA- β a Nivel Fisiológico y Celular

Los AA- β son sustancias que actúan de manera similar a las hormonas naturales catecolaminas e influyen en la transformación de reservas energéticas (glucógeno y grasa) que son aprovechadas para la síntesis de proteínas musculares. Estas acciones ocasionan un cambio en la composición del músculo y grasa dorsal e intramuscular en el animal, lo que genera una carne mayormente magra (Karg, 1989; Mersmann, 2002).

Los AA- β se administran como parte de la ración alimenticia, atraviesan las paredes estomacales y se absorben en el sistema portal, posteriormente circula a través del torrente sanguíneo para ser reconocidos en células diana. Como se observa en la Figura 1, el AA- β es reconocido por los receptores $\beta 1$ o $\beta 2$ en membrana de células satélite muscular. Se forma el complejo agonista-receptor y esto activa la proteína G (proteína unida al nucleótido guanina), esta proteína G libera una subunidad proteica que activa a la enzima adenilato ciclasa, la cual es la responsable de la síntesis de AMPc (adenosina de monofosfato cíclico) a partir de ATP (adenosina de trifosfato). El AMPc es un segundo mensajero y el principal responsable de efectos posteriores dentro de la célula. La proteína cinasa A (PKA) se traslada hacia el núcleo en donde se libera la subunidad catalítica de esta cinasa la cual fosforila y activa la proteína CREB (cAMP response element-binding, por sus siglas en inglés). Esta proteína CREB se une a una región de otra proteína llamada CBP (proteína de unión a CREB; *CREB-binding protein*, por sus siglas en inglés), lo que aumenta o inhibe factores de transcripción y genes involucrados en el crecimiento celular, diferenciación y regulación de la masa muscular (Joassard et al., 2013).

Otra proteína que puede activar la PKA es la fosfoinositidina cinasa 3 (PI3K), la cual se sugiere como la principal iniciadora de la activación de la cinasa mTOR (mammalian target of rapamycin, en inglés). Esta proteína es clave en la regulación del crecimiento celular, ya que interviene en la integración de señales para factores de crecimiento, nutrientes y disponibilidad de energía para síntesis de proteína (Hay y Sonenberg, 2004; Teleman et al., 2008). Adicionalmente el mTOR participa en la regulación del tamaño del músculo esquelético mediante la procesos de traducción del ADN (ácido desoxirribonucleico) (Glass, 2005).

Figura 1. Mecanismo de conversión de la señal del receptor adrenérgico- β (Adaptado de Anderson et al., 2004).



En este sentido, los mecanismos mencionados provocan un efecto de hipertrofia de las células musculares después del tratamiento con AA- β . Esto se debe a un incremento en la transcripción de ARNm para la cadena pesada de miosina (MHC, por sus siglas en inglés), el ARNm de la β -actina y la enzima calpastatina, lo que conlleva a un incremento del tamaño de la fibra muscular. Cabe indicar que la miosina es la proteína de mayor abundancia y es responsable del efecto de contracción-relajación del músculo esquelético, mientras que la calpastatina se caracteriza por inhibir la degradación de las proteínas mediante la inhibición de calpaínas que son enzimas proteolíticas presente en el músculo. También puede ocurrir una transición en el tipo de fibras musculares a causa de modificaciones metabólicas que suceden cuando se presenta una hipertrofia muscular (Miller et al., 2012; Santiago, 1995; Yang y McElligott, 1989).

Cuando hay un reconocimiento celular de los AA- β en el tejido adiposo, estos compuestos inhiben o reducen la deposición de grasa en el animal mediante la activación de proteína quinasa A, la que a su vez fosforila a la hormona sensible a la lipasa, la cual es la iniciadora de la lipólisis (inhibición

de síntesis de ácidos grasos). Finalmente, los ácidos grasos se dirigen del adipocito hacia otros órganos para ser una fuente de energía, por lo que se ve afectado la cantidad de grasa almacenada en el animal (Mersmann, 2002; Mersmann, 1998).

En función de lo anterior, un estudio realizado por Baxa et al. (2010) reportan un efecto promotor en novillos suplementados con CZ, ya que se observó un incremento en la abundancia de ARNm que codifica a $\beta 2$ y de cadena pesada de miosina IIX (MHC-IIX, por sus siglas en inglés), 10 veces mayor en presencia del aditivo. Otro estudio en cerdos suplementados con ractopamina mostró una sobreexpresión de 3 veces en los transcritos de $\beta 2$ y factor de crecimiento insulínico-I (IGF-I, por sus siglas en inglés) (Valenzuela-Grijalva, 2017). Estudios en corderos también muestran que al inducir la hipertrofia muscular con cimaterol se presenta un incremento en el contenido celular de ARN total hasta 35% mayor y una reducción en el contenido de ADN del 22%, lo que arroja mejores relaciones ARN: ADN que indican un mayor aprovechamiento en los procesos de transcripción y traducción celular (Beerman et al., 1987).

Por otro lado, además de proporcionar efectos favorables en el metabolismo de las proteínas, la suplementación de AA- β por largos periodos de tiempo puede promover la desensibilización y la baja regulación de los receptores β (Rothwell et al., 1987; Ryall et al., 2004; Wallukat, 2002). Lo cual provoca cambios negativos a nivel comportamiento productivo y rendimientos en canal, como menor GDP, bajo consumo de alimento, menores rendimientos en canal y en AOC (Beerman, 2002). El descenso de regulación se define como una disminución en el número total de receptores debido a una sobreexposición de algún compuesto, lo que genera la desensibilización mediante fosforilaciones en la cola C-terminal de los receptores por la proteína G acoplada a proteína cinasa (Finney et al., 2001; Wallukat, 2002).

Esta desensibilización celular causada por los AA- β es dependiente de factores como cinética del compuesto, magnitud o duración del estímulo, lo que puede afectar los procesos de post-transcripción, formación del endosoma o resensibilización. Como se ha reportado previamente, la activación de CREB mediante la PKA, está relacionada con la transcripción del ARNm que codifica al receptor adrenérgico β , este transcrito puede ser degradado de manera espontánea o por la proteína ligada al receptor β (β -ARBP) mediante degradación (Hadcock et al., 1989; Mak et al., 1995). En función de lo anterior, la baja regulación de los receptores β de la membrana influye en los procesos tanto de traducción y transcripción de ARN. Sin embargo, es necesaria mayor

investigación sobre los procesos de transcripción, así como el estudio de estabilidad de ARNm para elucidar completamente este proceso (Sato et al., 2008).

2.2.2 Mecanismos Indirectos de los AA- β que Promueven el Crecimiento

Como se describió anteriormente, los compuestos AA- β promueven la acreción muscular debido a un aumento en la síntesis de proteínas como miosina y actina, a través de toda una cascada de señalizaciones que ocurre desde la membrana celular hasta el núcleo. Sin embargo, existen efectos indirectos que suceden en el organismo animal al utilizar AA- β y que ayudan a coadyuvar la hipertrofia muscular, tales como el aumento en la circulación sanguínea hacia músculo esquelético donde se mejora la entrega de sustratos y fuentes de energía para la síntesis de proteína muscular (Domínguez-Vara et al., 2009). De la misma forma, el aumento de flujo sanguíneo al tejido adiposo provoca que los ácidos grasos no esterificados (NEFA) se dirijan hacia afuera del tejido, lo que conlleva a mejorar el proceso de lipólisis (Mersmann, 1998).

Los AA- β incrementan la síntesis de la proteína IGF-I la cual está involucrada directamente en un efecto anabólico y por otro lado en la activación de mTOR mediada por proteínas cinasas (Akt). Esta proteína es responsable de la inhibición de factores de transcripción como Muscle atrophy F-box (MAFbx, por sus siglas en inglés) y Muscle Ring Finger-1 (MuRF1, por sus siglas en inglés) causantes de un déficit de crecimiento muscular (Coleman et al., 1995; Musarò et al., 2001). Otro efecto indirecto del uso de compuestos AA- β , es la modulación de la concentración de sustancias endocrinas, como el incremento de insulina y hormonas tiroideas en plasma. Sin embargo, el efecto puede ser variado dependiendo de la especie animal y el tiempo de administración del compuesto. Estudios previos han reportado un incremento significativo en la concentración de insulina en bovinos, sin embargo, en ovejas no existe tal efecto; contrariamente, la administración crónica de AA- β aumenta las hormonas tiroideas en el plasma de corderos, pero no de forma significativa en ganado bovino (Walker et al., 2007; Beermann et al., 1987; Zimmerli y Blum, 1990).

2.2.3 Modificaciones en la Morfometría del Músculo Esquelético

Una de las respuestas fisiológicas después de la suplementación con AA- β en animales, es el incremento del tamaño de la fibra muscular, ya que estos compuestos son responsables del aumento de la síntesis de proteínas formadoras de fibras glicolíticas (tipo IIX) o fibras oxidativas (tipo I) en músculo esquelético. A diferencia de las hormonas naturales como la del crecimiento (GH), donde se genera un aumento de la deposición de proteínas en varios órganos, los AA- β inducen tal efecto solamente en músculo esquelético, lo que conlleva a una hipertrofia muscular debido al incremento en la transcripción de proteínas de las cadenas pesadas de miosina. Lo que finalmente activa un redireccionamiento de sustratos y fuentes de energía para la síntesis de proteína (Koochmaraie et al., 1991; Miller et al., 2012; Santiago, 1995).

Además, el suministro de compuestos anabólicos o AA- β genera un aumento o transición en las fibras glicolíticas u oxidativas. Debido al uso de compuestos promotores de crecimiento, la proporción de fibras tienden a incrementarse, estableciendo que no solamente el tipo de fibras puede variar dependiendo de la actividad física, sino que el uso de anabólicos puede ejercer un efecto significativo ya que en estado de reposo se tienden a generar señalizaciones que estimulan la acreción de un tipo de fibras en específico (te Pas et al., 2004).

Las isoformas de MHC se consideran como parte medular en la caracterización y funcionalidad del músculo esquelético y una sobreexpresión de esta proteína se considera una de las alteraciones que ocurren con el uso de AA- β , lo cual causa un aumento en el AST. Así mismo, se conoce que las modificaciones que se inducen por estos compuestos son transiciones de fibras lentas a rápidas o Tipo I \rightarrow IIA \rightarrow IIX (Gonzalez et al., 2010; te Pas et al., 2004). Al utilizar promotores de crecimiento de tipo AA- β se tienden a modificar las proporciones de fibras y los tamaños, debido al fenómeno de hipertrofia muscular, y mediante ensayos de expresión génica se puede identificar y cuantificar los cambios a nivel molecular que ocurren con las isoformas de MHC. En este sentido, algunos reportes donde se evaluó CZ en animales de engorda, muestran mayores cambios en expresión de MHC- IIA, IIX y IIB aunado al efecto promotor encontrado en corral y en las canales, con un ligero cambio en la expresión de MHC-I (Baxa et al., 2010; Miller et al., 2012; Rathmann et al., 2009).

Existen un reporte donde se han evaluado los cambios en las proporciones de fibras musculares de novillos suplementados con AA- β , los cuales indican que existe una transición aproximadamente

de 21% de fibras tipo I hacia IIA (Gonzalez et al., 2010). Además diferentes estudios aseveran que existe un incremento en el tamaño o área de sección transversal en fibras tipo lentas, intermedias y rápidas que oscila desde el 25 hasta un 50% en especies como bovino y corderos suplementados con clenbuterol, ractopamina y cimaterol (Kim et al., 1987; Strydom et al., 2009). El incremento en el tamaño de la fibra es más recurrente en las fibras tipo IIA (intermedias) o IIX (rápidas), ya que el mecanismo de acción de los AA- β tiende a sintetizar mayormente proteínas que se dirigen a fibras con metabolismo glicolítico. En este sentido, Beermann et al. (1987) reportaron una mayor área de sección transversal (AST) en corderos suplementados con cimaterol, en donde estos aditivos incrementaron un 32% el tamaño de la fibra tipo-II en el músculo LT, y 29% las fibras tipo-II en el músculo *semitendinosus*.

2.2.4 Consecuencias Negativas en Calidad de la Carne y Rechazo del Consumidor al Uso de AA- β

A pesar de los beneficios que ofrecen los AA- β en cuanto a productividad en corral, se ha reportado que pueden presentarse repercusiones negativas en la calidad de la carne. Ejemplo de ello, es el incremento en la dureza debido a un déficit en los procesos enzimáticos *postmortem* del músculo y reducción en la cantidad de grasa intramuscular los cuales son factores importantes al momento de la percepción de la ternera por parte del consumidor (Wheeler y Koohmaraie, 1992). En este sentido, se han reportado valores de esfuerzo al corte en el músculo *Longissimus dorsi* de hasta 4 kg superiores respecto a la carne de los animales sin AA- β (Avendaño et al., 2006; Morón-Fuenmayor et al., 2002).

De igual forma, la suplementación de AA- β en animales causa una reducción en el depósito de glucógeno muscular, lo que afecta el descenso del pH que normalmente ocurre *postmortem* debido al metabolismo anaeróbico, lo que provoca una carne con un color oscuro indeseable. También, la miosina, la cual es susceptible a la desnaturalización, incrementa las posibilidades de una menor retención de agua y favorece las pérdidas por goteo. Inclusive como ya se indicó arriba, los AA- β tienden a reducir la cantidad de grasa, sobre todo la intramuscular o marmoleo. Estos cambios

pueden llevar a pérdidas económicas ya que existe un mercado donde se cotiza y es preferida una carne con mayor grado de marmoleo (Errecaide et al., 2003).

Adicionalmente, es necesario señalar, que dependiendo del tipo de AA- β , la dosis utilizada, la estabilidad de la molécula y la sobreexposición de estos al animal, se puede generar cierta residualidad en el músculo y vísceras, lo que constituye un riesgo para la salud de los consumidores, ya que pueden provocar cierta toxicidad aguda o crónica, efectos mutagénicos, reacciones alérgicas y diferentes malestares. Así, el riesgo de intoxicación es el principal motivo del rechazo de carne y subproductos provenientes de animales alimentados con AA- β (Fajardo-Zapata et al., 2011). Se han presentado reportes de intoxicaciones principalmente por el consumo de vísceras con residuos de clenbuterol, en un 70% de éstos casos las intoxicaciones fueron por consumo de hígado (Lozano y Arias, 2009; Vallejos et al., 2007).

A pesar de lo anterior, en Estados Unidos y México el uso de clorhidrato de ractopamina y zilpaterol está permitido. Estos compuestos cuando se usan adecuadamente en la producción animal, no representan riesgo de intoxicación ya que debido a su estructura química el organismo lo degrada rápidamente. Además de acuerdo a las recomendaciones del proveedor, se recomienda un tiempo de retiro 2 a 3 días antes del sacrificio de los animales. Sin embargo, es recomendable controlar su uso ya que investigaciones con rumiantes (ovinos y bovinos), han detectado niveles de residuos variables lo cual puede resultar riesgoso para la salud del consumidor, lo que posteriormente provoca pérdidas económicas para las empresas debido al rechazo (Brambilla et al., 2000; Errecaide et al., 2003). En base a lo anterior, es necesaria la búsqueda de compuestos naturales menos agresivos como alternativa en producción animal.

2.3 Los Ácidos Hidroxicinámicos como Alternativa al Uso de Promotores de Crecimiento Sintéticos en Producción Animal

Los ácidos hidroxicinámicos (AH) se derivan del ácido cinámico que normalmente está presente en plantas y frutas en forma de éster de ácidos orgánicos, glucósidos o inclusive unidos a proteínas y otras moléculas de la pared celular como celulosa, xilanos y lignina (Chen y Ho, 1997; Niño-Medina et al., 2009). Dentro de los AH, los más recurrentes en las fuentes vegetales son el ácido

cafeico, ferúlico, sináptico, p-cumárico y clorogénico, estas moléculas se denominan hidroxicinámicos por el grupo hidroxilo (-OH) adyacente al anillo aromático, además poseen un grupo alifático y un ácido carboxílico a su extremo (Chen y Ho, 1997) (Figura 2).

Los AH son productos secundarios del metabolismo en plantas, sintetizados mediante la vía del shikimato y el aminoácido fenilalanina es el precursor de los AH en esta ruta. Se sabe que estos compuestos son usados por las plantas como defensa ante patógenos e insectos (Lopez-Romero et al., 2016; Maeda y Dudareva, 2012). Recientemente se han estudiado sus posibles efectos bioactivos y beneficios en humanos y animales cuando son utilizados como suplementos alimenticios, estas propiedades bioactivas incluyen su efecto antioxidante, antimicrobiano, preventivo de enfermedades crónicas como el cáncer, arterosclerosis y últimamente se ha indagado su efecto como promotor de crecimiento con fines zootécnicos (Kroon y Williamson, 1999; Razzaghi-Asl et al., 2013; Windisch et al., 2008).

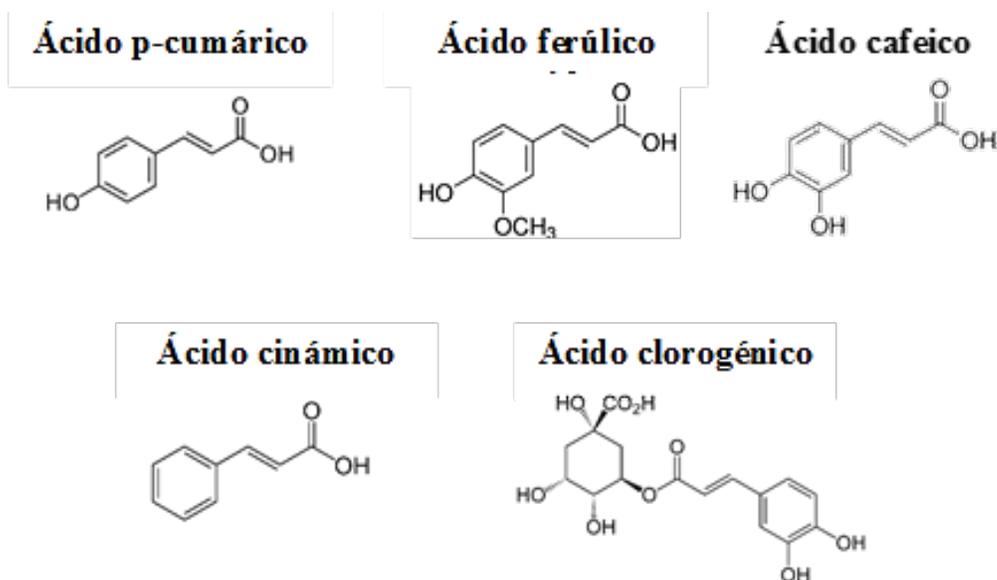
Los AH son considerados como una alternativa al uso de antibióticos o promotores de crecimiento. Contrario a lo que sucede con los aditivos sintéticos, los cuales se usan por un tiempo definido (al final del período de engorda), los AH pueden ser administrados en la dieta durante todo el periodo de crecimiento del animal. Los efectos de estos fitogénicos en la salud animal pueden ser diferentes y dependientes de la estructura del AH. Entre los efectos que pueden ejercer son antioxidante, mejorador de la palatabilidad del alimento del animal, antimicrobiano (efecto en patógenos o cambios en la flora bacteriana) y como promotor de crecimiento (Benchaar et al., 2008; García-González et al., 2006; Windisch et al., 2008).

El principal atributo de los AH es su actividad antioxidante, debido a los grupos hidroxilo presentes en el anillo aromático (Razzaghi-Asl et al., 2013). Esta capacidad se ha demostrado en algunos modelos tanto *in vivo* como *in vitro* donde se han utilizado ratones o líneas celulares con la finalidad de prevenir o tratar diferentes enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo como cáncer, diabetes, alteraciones cardiovasculares y enfermedades inflamatorias (Alam et al., 2016; Cai et al., 2004; Chen y Ho, 1997; Rocha et al., 2012). Recientemente, el efecto como antimicrobiano ha tomado interés por su capacidad de inactivar o eliminar bacterias patógenas, inclusive modificar la microflora intestinal con el objetivo de mejorar el aprovechamiento de nutrientes, además de reducir la incidencia a enfermedades mediante un óptimo funcionamiento del sistema inmune (Hong et al., 2012; Valenzuela-Grijalva et al., 2017; Zhao y Moghadasian, 2010). Con base en lo anterior, se sugiere que existe un amplio campo de posibilidades prometedoras para la utilización

de fitoquímicos con la finalidad de sustituir a las moléculas sintéticas y segundo con la posibilidad de aprovechar sus diferentes propiedades bioactivas.

Cabe señalar que los estudios sobre inclusión de AH de forma aislada en la dieta de animales de engorda son limitados y no hay pruebas suficientes que sustenten un beneficio productivo en animales (Liu, 2003; Meskin et al., 2002). En este sentido, se ha reportado que el ácido ferúlico suplementado en vaquillas incrementó la síntesis de hormonas endógenas entre las cuales se encuentra la prolactina y la hormona del crecimiento, lo que se puede traducir en una mayor deposición de músculo mediante un posible mecanismo anabólico (Gorewit, 1983). Por su parte, el ácido cinámico en su forma pura aún no ha sido estudiado *in vivo* con animales de engorda; sin embargo, *in vitro* se demostró que el ácido cinámico es reconocido por las células 3T3-L1 de los adipocitos y que estimula la activación de la AMPk y mejora la sensibilidad a la insulina lo que causa una alteración en el perfil de ácidos grasos (Kopp et al., 2014).

Figura 2. Principales ácidos hidroxicinámicos y su estructura química.



Fuente: Elaboración propia.

El cinamaldehído es un compuesto sintetizado a partir de ácido cinámico y se ha reportado que al suplementar cinamaldehído (400 y 800 mg/día) en novillos durante 28 días, la ganancia diaria de peso se mejora (2.18 y 2.08 kg/d vs 1.97 kg/d en el grupo testigo) y el área de ojo de costilla se incrementa un 3.7% respecto al testigo (Yang et al., 2010). Los mecanismos por los cuales se producen estos beneficios aún no han sido completamente elucidados. Sin embargo, se ha hipotetizado que se modifican las poblaciones microbianas, el perfil de ácidos grasos volátiles, lo que provoca una mejor digestibilidad de nutrientes, que se redireccionan hacia el crecimiento muscular. Por otro lado, se ha reportado que una dosis elevada de cinamaldehído (1600 mg/d) puede disminuir la población ruminal y de esta forma reducir la disponibilidad de proteína microbiana o alimento y así causar un detrimento en la nutrición del animal (Cardozo et al., 2006). En algunos estudios se ha planteado la hipótesis de que en los rumiantes, los compuestos fenólicos como los ácidos cinámico, p-cumárico y ferúlico, presentes en el forraje se pueden liberar y absorber en el tracto gastrointestinal, y posiblemente provocan cambios benéficos en el animal (Borneman et al., 1986; Jung et al., 1983). Además, estudios *in vivo* suplementando ácido ferúlico

en ratones, muestran posibles actividades reductoras de grasa, debido a una disfunción de los adipocitos, lo que involucra un menor crecimiento de preadipocitos, así como detrimento de los ácidos grasos y colesterol en hígado y plasma (Adam et al., 2002; Zhao y Moghadasian, 2008). Por su parte, el ácido cafeico y ácido clorogénico muestran una inhibición de enzimas responsables de la síntesis de ácidos grasos tales como la ácido graso sintasa y 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA (Li et al., 2010; Olthof et al., 2001).

Con base en lo anterior, la suplementación de los AH en animales de engorda puede tener efectos favorables para promover el crecimiento, por lo que es necesario realizar más estudios para confirmar la existencia de esta actividad promotora.

2.4 Ácido Ferúlico y sus Propiedades

El nombre químico del AF es ácido 4-hidroxi-3-metoxicinámico, y es uno de los ácidos fenólicos con mayor abundancia en las plantas, frutas, hierbas y cereales. El AF se encuentra usualmente ligado a los polisacáridos de la pared celular como arabinosilanos, pectinas y xiloglucanos. No obstante, rara vez este ácido se encuentra en su forma libre, por lo que se utilizan técnicas analíticas para su obtención y purificación, como lo son: extracción alcalina y fermentación microbiana. Esta molécula es implementada en un amplio ramo de áreas, como cosméticos, elaboración de bebidas, preservativo en alimentos, coadyuvante en la formación de geles y con fines farmacéuticos (Li et al., 2015; Ou y Kwok, 2004).

El ácido ferúlico presenta una importante capacidad de inhibir la generación de productos de la oxidación como peróxidos, radicales hidroxilos y radicales libres de dióxido de nitrógeno. Esta actividad antioxidante además de proteger el deterioro de las grasas, puede prevenir enfermedades inducidas por radicales libres, como el cáncer y arterioesclerosis e inclusive la degeneración por la edad, por lo cual, algunos autores sugieren que posiblemente el AF puede actuar sobre estos padecimientos (Kikuzaki et al., 2002; Ou y Kwok, 2004).

Adicionalmente, el AF posee una actividad antimicrobiana de amplio espectro, que puede abarcar su efecto en bacterias gram positivas, gram negativas y levaduras. El AF inhibe el crecimiento de algunas bacterias y patógenos que crecen en el tracto gastrointestinal como los son *Escherichia*

coli, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter koseri*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Helicobacter pylori* y *Shigella sonnei* (Lo y Chung, 1998; Tsou et al., 1999).

El AF se encuentra como un conjugado soluble en el citosol y en formas esterificadas en la pared celular de plantas. Su forma conjugada es soluble en agua y facilita su traslado en el sistema digestivo para posteriormente ser absorbido en sistema portal y dirigido hacia tejidos diana. En 1993, Chang et al., investigaron la farmacocinética del ácido ferúlico libre en ratas hembras y concluyeron que este no entró en la circulación enterohepática. De lo anterior se concluyó que el efecto quimiopreventivo de AF en la carcinogénesis de colon obedece en gran medida de la ingestión de AF unido en la pared celular de los vegetales, donde llega a colon y se libera parcialmente por acción de los microorganismos del mismo. El AF que se absorbe está presente en la circulación en forma glicosilada y es excretado por la orina o bilis (Ou y Kwok, 2004).

Es importante enfatizar que el AF ligado a los polisacáridos de la pared celular de vegetales no puede ser absorbido directamente por el tracto gastrointestinal, por lo tanto, es necesaria la presencia de esterasas microbianas que provoquen la liberación de AF y otros compuestos hidroxicinámicos, y así posteriormente poder llegar al sistema circulatorio (Bourne y Rice-Evans, 1998; Kroon et al., 1997; Virgili et al., 2000). Finalmente se puede afirmar que el AF se absorbe en el tracto digestivo y se metaboliza de diferentes formas. La variedad de metabolitos y sus proporciones serán dependientes de factores como, dosis, la vía de administración y de las especies animales.

2.5 Investigaciones Previas con AF como Aditivo en Animales de Engorda

Como primeros hallazgos, existen dos patentes donde reportan que el AF tiene un efecto aditivo en bovinos (González-Ríos et al., 2012) y en cerdos (Herrera et al., 2009); ambas patentes sugieren que el AF podría estar involucrado un mecanismo anabólico similar a AA- β . Además se demostró *in vitro* en células satélite de bovino, que el AF tiene reconocimiento en el receptor adrenérgico β_2 de la membrana celular y genera una sobreexpresión del ARNm de igual forma que el AA- β zilpaterol (Platt et al., 2012).

El ácido ferúlico al ser un compuesto hidrosoluble, se sugiere que podría ser transportado en el torrente sanguíneo a tejidos periféricos y actuar en los receptores de tejido muscular o bien, en el rumen mediante la modificación de los patrones de fermentación y aprovechamiento de energía (Soberon, Cherney, Liu, et al., 2012). Sin embargo, el modo de acción del AF no está completamente elucidado y los estudios sobre el efecto promotor de crecimiento de AF en animales de engorda son limitados. Dos estudios previos en bovinos suplementados con AF reportaron que a bajas dosis (2250 mg/día) durante 30 días, se mejora la ganancia diaria de peso y rendimientos en la canal, además de mantener la calidad de la carne a través del tiempo, lo que se atribuye al posible efecto antioxidante (Peña-Torres, 2014; Serna, 2012).

Recientemente, Valenzuela-Grijalva (2017) observó un incremento en la ganancia diaria de peso y en el área de ojo de costilla de cerdos en finalización que fueron suplementados con 25 mg de AF/kg de alimento. Estos beneficios asociados a un efecto promotor del crecimiento, fueron evidenciados también mediante los cambios en la fibra muscular, ya que ocurrió una hipertrofia muscular en las fibras glicolíticas, debido a sobreexpresión de los transcritos para el receptor $\beta 2$ de membrana, cadena pesada de miosina e IGF-I.

En contraparte, la suplementación en la dieta de 300 mg/d de AF en corderos, no modificó el crecimiento en corral, la calidad de canal y los metabolitos en sangre (Macías-Cruz et al., 2014); asimismo otros autores no encontraron efecto de AF en las variables de corral y metabolitos en plasma en borregos y cerdos (Li et al., 2015; Soberon, Cherney, y Cherney, 2012). En el estudio realizado por Li et al. (2015), a pesar de no encontrar un efecto promotor de crecimiento al suplementar AF (100 mg/d) en cerdos, observaron que se mejoró la calidad de la carne debido a una actividad antioxidante. Los autores indicaron que ésta respuesta se generó debido a un incremento en actividad de enzimas endógenas como glutatión peroxidasa (GSH-Px, por sus siglas en inglés) y glutatión (GSH, por sus siglas en inglés). Otro efecto bioactivo se encontró en ratas diabéticas sometidas a alto estrés oxidativo, ya que AF (15 mg/100 g PV) logró estabilizar los niveles de glucosa e insulina en sangre (Yoo et al., 2012).

En función de lo revisado en este apartado, es de interés realizar investigaciones sobre los efectos del AF y CZ a nivel productivo y celular en ovinos. En el caso de la suplementación de AF, además de evaluar la dosis que ya ha sido utilizada en estudio previo con ovinos, se propone evaluar una dosis más alta, con la finalidad de buscar efectos contundentes sobre el comportamiento productivo, y que estos sean también corroborados a través de los cambios en la expresión génica

de proteínas involucradas en la deposición muscular y en la morfometría de las fibras musculares, a fin de poder confirmar si existe o no un efecto promotor de tipo anabólico tal como sucede con los AA- β .

3. HIPÓTESIS

El efecto promotor de crecimiento del ácido ferúlico y el clorhidrato de zilpaterol suplementados en corderos en finalización es similar y ocasionado por un efecto anabólico que es evidenciado a nivel celular, por la expresión de genes relacionados con la deposición de músculo y por los cambios morfométricos en las fibras musculares.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Realizar un estudio comparativo sobre parámetros relacionados con el mecanismo de acción anabolizante del ácido ferúlico y el clorhidrato de zilpaterol dietarios en corderos en etapa de finalización.

4.2 Objetivos Particulares

- Realizar una prueba de alimentación con la suplementación de ácido ferúlico y clorhidrato de zilpaterol, para evaluar el efecto sobre el comportamiento productivo y características de la canal de corderos en finalización.
- Determinar el efecto de la suplementación de ácido ferúlico y clorhidrato de zilpaterol sobre las proporciones y características morfométricas del músculo LT mediante tinciones histoenzimáticas.
- Evaluar el efecto de la inclusión de ambos compuestos sobre la respuesta del metabolismo proteico en el tejido muscular (LT), a través de la evaluación del contenido de proteína, ácidos nucleicos y sus relaciones, y la expresión de genes relacionados con la acreción muscular.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Los procedimientos de manejo y sacrificio de los corderos se llevaron a cabo bajo los lineamientos de las Normas Oficiales Mexicanas correspondientes al cuidado, manejo y sacrificio animal (NOM-033-ZOO, 1995; NOM-051-ZOO, 1995).

5.1 Sitio Experimental, Animales y Tratamientos

La prueba experimental se llevó a cabo durante la temporada de primavera en una granja comercial localizada en El Valle del Yaqui (100° N, 27° W), situada en el Estado de Sonora al noroeste de México. Las condiciones climáticas del sitio experimental durante la prueba de alimentación fueron de una temperatura mínima promedio de 17° y máxima de 37 °C y humedad relativa (RH) promedio de 30.5 %. El índice de temperatura-humedad (ITH) se calculó de acuerdo a la ecuación descrita por Hahn (1999) $ITH = 0.81 \times Te + RH/100 (Te - 14.40) + 46.40$, donde Te es temperatura promedio y RH humedad relativa promedio. De acuerdo a los valores de ITH las condiciones climatológicas se consideraron termoneutrales ($ITH \leq 74$) para la primera repetición (bloque 1) ($Te = 20.68 \pm 2.17$ °C, $RH = 42 \pm 9.58\%$, $ITH = 65.72 \pm 2.55$ unidades) y la segunda repetición del estudio (bloque 2) ($Te = 25 \pm 2.19$ °C, $RH = 32.59 \pm 9.66\%$, $ITH = 70.14 \pm 2.58$ unidades).

Treinta y dos corderos machos de cruza Dorper × Pelibuey (peso inicial 24 ± 3 kg) fueron agrupados en 2 bloques completos al azar de 16 animales por bloque; donde el criterio de bloqueo fue la disponibilidad de los animales. La prueba de alimentación para el primer bloque se realizó entre febrero y marzo de 2017, y entre los meses de abril y mayo para el segundo bloque de animales. Dentro de cada bloque se asignaron 2 corrales por tratamiento y cada corral alojaba 2 animales, obteniéndose en total 4 corrales/tratamiento. Todos los animales fueron sometidos a un periodo de adaptación a la dieta y alojamiento (10 d). La dieta basal (cuadro 1) fue formulada de acuerdo a las recomendaciones del NRC (2007). Además, previo al inicio del experimento, los corderos recibieron una dosis de vitaminas A, D, y E (Vigantol; Bayer, Cd. México, México; 1

mL/animal) y fueron desparasitados (Ivermectina; Laboratorios Sanfer, Cd. México, México; 0.5 mL/animal).

Al final del periodo de adaptación, los animales fueron pesados individualmente y asignados al azar en corrales equipados con alimento y agua. Los tratamientos fueron los siguientes: 1) Dieta basal sin aditivo (Testigo); 2) 300 mg/d de ácido ferúlico (AF300) (Laboratorios Minkab SA, de CV, Guadalajara, Jalisco, México); 3) 600 mg/d de ácido ferúlico (AF600); 4) 6 mg/d de clorhidrato de zilpaterol (CZ) (Grofactor ®, Laboratorios Virbac, México, dosis recomendada). El período experimental de la alimentación en cada bloque fue de 32 días.

Para asegurar el consumo del AF y CZ, cada aditivo fue pesado con una balanza analítica y mezclado en 50 g de la dieta, esta mezcla se ofreció de manera individual para cada animal previo a la ración experimental de la mañana. El agua se ofreció a libre acceso y el alimento fue proporcionado diariamente a las 08 y 16 h. Adicionalmente, se monitoreó el estado de salud de los animales durante todo el periodo de la prueba. De acuerdo a las recomendaciones del proveedor, el clorhidrato de zilpaterol fue retirado 72 h antes del sacrificio de los animales.

5.2 Evaluación del Comportamiento Productivo

Durante la prueba de alimentación de los corderos, se evaluaron las siguientes variables en corral: peso vivo inicial y final individual por animal (Báscula Electrónica Colgante Rhino BAC-500-Gris), consumo de alimento diario en kg, el cual se estimó por la diferencia entre la cantidad de alimento ofrecido y rechazado. La ganancia diaria de peso (GDP) fue calculada mediante la diferencia del peso vivo final y el inicial y dividido entre los días de alimentación. Además, se calculó la conversión alimenticia mediante la relación de la media de consumo de alimento por corral/ganancia diaria de peso por corral.

Cuadro 1. Composición porcentual de la ración experimental para corderos de pelo en finalización.

Ingredientes, % MS	
Maíz en grano	55.5
Alfalfa	22.5
Paja de Trigo	2.1
Harinolina	13.16
Pasta de soya	4
Melaza de caña	1.23
Carbonato de calcio	0.46
Sal común	0.46
Minerales	0.46
EM Mcal/kg	2.88
Proteína Cruda	15.56

Calculado de acuerdo a la base de valores de energía para los ingredientes individualmente (NCR, 2007). Ácido ferúlico fue suplementado a 300 y 600 mg/día por animal (Laboratorios Minkab, Guadalajara, México; clorhidrato de zilpaterol suplementado a 6 mg/día por animal (Grofactor ®). EM= Energía metabolizable.

5.3 Sacrificio, Evaluación de las Características de la Canal y Recolección de las Muestras

Finalizada la prueba de alimentación, los animales fueron trasladados al rastro municipal de Bacum, Sonora, para ser sacrificados (NOM-033-ZOO-1995), y evaluar las características de la canal y tomar muestras de músculo. Se evaluó el peso de la canal caliente (Báscula Electrónica Colgante Rhino BAC-500-Gris), el pH a 45 min y 24 h (potenciómetro portátil HANNA HI 99163), el espesor de la grasa dorsal (mm) con un vernier y área de ojo de la costilla en cm² (plantilla cuadrículada con cuadrantes de 1 cm²) en el *Longissimus thoracis* (LT) a nivel del 12avo espacio intercostal. Además, se calculó el rendimiento de la canal caliente mediante la relación del peso de la canal caliente entre el peso vivo al sacrificio x 100. Para los análisis de tinción histoenzimática

en músculo y expresión de genes se tomaron muestras dentro de los primeros 45 minutos *postmortem* del músculo LT (a nivel de la 8va vertebra torácica) de cuatro animales por tratamiento los cuales fueron seleccionados aleatoriamente. De cada canal seleccionada, se tomaron tres muestras de músculo aproximadamente 1 x 1 x 0.5 cm de tamaño para el aislamiento de ácidos nucleicos y de 1.5 x 1.5 x 2 cm para las tinciones histoenzimáticas, las cuales fueron inmediatamente crioconservadas en isopentano previamente enfriado con nitrógeno líquido y después colocadas en viales identificados y almacenados en un tanque con nitrógeno líquido (-196 °C), para su transportación y almacenamiento (-80 °C) en las instalaciones del Laboratorio de Ciencia y Tecnología de la Carne, en el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), en Hermosillo, Sonora, México.

5.4 Caracterización de la Fibra Muscular de *Longissimus thoracis* Mediante Tinción Histoenzimática

A partir de las muestras congeladas del músculo LT obtenidas durante el sacrificio, se realizaron 5 cortes transversales por unidad experimental (10 µm de grosor) en un criostato a -20 °C (CM-1100; Leica Microsystems, Nussloch, Germany), los cuales fueron montados en portaobjetos para las subsecuentes tinciones por NADH-TR (nicotinamida adenina dinucleótido tetrazolio reductasa) y ATPasa alcalina.

La tinción NADH-TR determina el tipo de metabolismo de la fibra y se realizó siguiendo la metodología de Nachlas et al. (1958). Para esta evaluación, los cortes transversales montados en el cubreobjetos se incubaron en jarras Coplin por 1 h a 37 °C con la solución NBT 1:1 (v/v [1.2 mM nitro-blue tetrazolio] Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) y nicotinamida adenina dinucleótida (NADH; Sigma–Aldrich, USA) a 2.25 mM. Posteriormente, se realizaron tres lavados con agua desionizada. El exceso de solución NBT-NADH fue removido mediante lavados con acetona al 30, 60 y 90%.

La técnica ATPasa alcalina (pH 9.4) determina el tipo de fibra de acuerdo a la tonalidad de la tinción que presenta cada fibra (ver más adelante figura 3) en función de la velocidad de contracción del músculo influida por el aprovechamiento de adenosín trifosfato (ATP). Esta técnica

se realizó de acuerdo a la metodología de Guth y Samaha (1970). Las secciones transversales de músculo fueron colocadas en cubreobjetos y montadas en jarras Coplin con una solución de pre-incubación (Tris base 10 mM [BioRad, USA] y cloruro de calcio 18 mM [J.T. Baker, México], pH 10.3) por 15 min. Subsecuentemente, los portaobjetos se lavaron tres veces con agua desionizada y se incubaron por 1 h a 37 °C en la solución Tris Buffer con adenosin 5'-trifosfato (Sigma-Aldrich, USA) a pH 9.4. Después, los cortes fueron lavados en cloruro de calcio (200 mM) por 3 min, cloruro de cobalto al 2% (Sigma-Aldrich, UK) por 3 min, sulfuro de amonio al 10% (SigmaAldrich, USA) 3 min y agua desionizada.

Las tinciones de músculo para ambas técnicas fueron observadas mediante un microscopio óptico (Nikon Eclipse E600, Tokyo, Japan). Se tomaron fotografías a una amplificación de 10X con una cámara digital acoplada al microscopio (Olympus C-5060 digital camera, Tokyo, Japan).

Las imágenes de cada músculo fueron reconstruidas en el programa Image J versión 1.45s (NIH, Bethesda, MD, USA), y los cortes que mostraron mejor integridad fueron seleccionados para determinar las variables histomorfométricas. El tipo de fibra fue clasificada de acuerdo al siguiente criterio: para la tinción NADH-TR, las fibras de color oscuro o negro se identificaron como oxidativas (O) y las de color blanco o claro como glicolíticas (G). Con la tinción de *ATPasa* se determinaron 3 tipos de fibras, ello de acuerdo a la tonalidad que presentan: fibras lentas-tonalidad blanca o transparente (tipo I); fibras intermedias-tonalidad grisácea (tipo IIA) y fibras rápidas-tonalidad oscura o negra (IIB) (ver la Figura 4 de la sección de Resultados y Discusión).

A partir de lo anterior y con la ayuda del programa Image J versión 1.45s, se contabilizaron las fibras presentes en cada corte de músculo teñido y se determinó el porcentaje de los tipos de fibra para cada técnica, además se calculó el área de sección transversal (AST, μm^2) y perímetro (μm) de la fibra. Adicionalmente, se determinó la densidad de cada tipo de fibra muscular mediante el conteo de cada tipo de fibra en un área de 50 000 μm^2 por corte del músculo y subsecuentemente, se estimó el número total de fibras en el músculo con respecto a la media del área de ojo de costilla LT (cm^2), evaluada al sacrificio de los animales.

5.5 Evaluación de la Expresión Génica en el Músculo *Longissimus thoracis*

5.5.1 Preparación de Muestra y la Extracción del ARN Total

El proceso de extracción de ARN total para músculo se realizó de acuerdo a la metodología de Baxa et al. (2010) con modificaciones en los tiempos de homogenización y la cantidad de solvente. Se pesaron 200 mg de muestra en tubos de 2 mL (Lysing Matrix A tubes) y se añadieron 0.6 mL de Trizol[®] (Life Technologies Corporation, Carlsbad CA, USA). La muestra fue homogenizada durante 60s (FastPrep-24-5G, MP Biomedicals) y se incubó por 1 min a 2 °C. Posteriormente se agregaron 0.4 mL de Trizol, se agitó e incubó 5 min a 4 °C y centrifugadas a 12,000 \times g durante 10 min. EL sobrenadante fue transferido a un nuevo microtubo se adicionaron 0.3 mL de cloroformo, y se incubó 3 min a 2 °C y se centrifugó a 12,000 \times g durante 15 min. La fase superior se recuperó y se adicionaron 0.3 mL de cloroformo, se centrifugó nuevamente a 12,000 \times g durante 15 min. Después, se tomó la fase acuosa donde se adicionaron 0.5 mL de Trizol, se agitó e incubó 5 min a 2 °C, se agregaron 0.3 mL de cloroformo y se agitó por 15 s. La muestra fue incubada 3 min a 4 °C y centrifugada a 12,000 \times g durante 15 min. Se recolectó la fase acuosa y adicionó isopropanol (0.5 mL), se dejó incubar 1 noche y para el día siguiente se centrifugó a 12,000 \times g durante 15 min. Finalmente, el isopropanol se removió y el pellet de ARN se lavó con 1 mL de alcohol etílico al 75%, se centrifugó a 7,500 \times g durante 5 min, el pellet se dejó secar y fue suspendido en 30 μ l de agua DEPC (Dietilpirocarbonato).

La cantidad de ARN total se evaluó en un espectrofotómetro NanoDrop (NanoDrop, ND-1000 spectrophotometer) a una longitud de onda de 260/280 nm, estableciendo radios óptimos de 1.6 a 1.8 para muestras libres de contaminantes. La integridad del ARN total se evaluó por electroforesis (65V, 40 min) en gel de agarosa al 2% (agarosa, Sigma Aldrich). El pellet de ARN total fue tratado con el kit DNase 1 Recombinante-RNAase-free (Roche Life Science) para remover ADN genómico presente en el pellet. La limpieza del ARN total se confirmó mediante un PCR convencional con primers del gen RSP9 que codifica al ADN genómico y por electroforesis en un gel de agarosa al 2%, donde la ausencia de bandas en el gel confirma la ausencia de ADN contaminante en las muestras de ARN total de los animales experimentales.

5.5.2 Diseño de Primers y Sondas

Los genes cuya expresión fue evaluada en este estudio fueron: receptor adrenérgico $\beta 2$, cadena pesada de miosina I (MHC-I), cadena pesada de miosina IIX (MHC-IIX), factor de crecimiento insulínico (IGF-I) y proteína ribosomal S9 (RSP9, por sus siglas en inglés) como normalizador de la expresión. Las secuencias específicas de los primers y sondas se diseñaron mediante el programa Primer3Plus de la base de datos de nucleótidos de GenBank¹ (Cuadro 2). Las secuencias de cada gen fueron sintetizadas en un solo tubo por Applied Biosystems Integrated DNA Technologies, con el fluoróforo FAM al extremo 5' y IABLKFQ al extremo 3'.

¹ <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>.

Cuadro 2. Secuencias de primers y sonda Taqman de corderos para PCR en tiempo real.

Gen	Secuencia	No. de acceso GENBANK
Adrenoreceptor β2		NM_001130154.1
Forward	5'-TGCAGACGGTCACCAACTAC-3'	
Reverse	3'-ACGTCAGTCAAGTGGAGCAG-5'	
Taqman probe	5'-FAM-CCGGGCCAGCCACAAGGAAG-IABLK FQ-3'	
Myosin heavy chain-I		AB058898.1
Forward	5'-GACGTCTTTGTGCCTGATGA-3'	
Reverse	3'-ACAGAGCATGGCAAGACAG-5'	
Taqman probe	5'-FAM-AAGAGGAGTTCGTCAAGGCCACAA-IABLK FQ-3'	
Myosin heavy chain-2X		AB058897.1
Forward	5'-GATTGGGCTGCCATCAATAAC-3'	
Reverse	3'-TTTCAGACTTTCGGAGGTAAGG-5'	
Taqman probe	5'-FAM-TTCCTGGTCTGAACTCATGGCTGC-IABLK FQ-3'	
IGF-I		NM_001009774.3
Forward	5'-TCCCATCTCCCTGGATTTCT-3'	
Reverse	3'-AATCAGCAGTCTTCCAACCC-5'	
Taqman probe	5'-FAM-CAGACTTTGCACTTCAGAAGCAATGGG-IABLK FQ-3'	
RSP9		XM_015100112.1
Forward	5'-CTGACGCTGGATGAGAAAGA-3'	
Reverse	3'-CTTCAGGCC CAGGATGTAAT-5'	
Taqman probe	5'-FAM-TGCTGGACGAGGGCAAGATGAAG-IABLK FQ-3'	

5.5.3 Expresión Génica Mediante PCR en Tiempo Real

Se realizó un RT-PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction, por sus siglas en inglés) cuantitativo en tiempo real para evaluar los cambios en la expresión génica del músculo de los animales experimentales.

El ARN aislado de tejido de músculo esquelético se utilizó como templado para evaluar la expresión génica, la retrotranscripción del ARN a ADNc y la amplificación se llevaron a cabo durante cada reacción de PCR en tiempo real con el reactivo 2X One-Step Brilliant II QRT-PCR Low Rox Master Mix (Agilent Technologies, EE. UU.) y la enzima transcriptasa reversa. Cada reacción de RT-PCR en tiempo real se conformó de los siguientes componentes: 12.5 µl de 2X One-Step Brilliant II QRT-PCR Low Rox Master Mix, 1 µl de enzima transcriptasa reversa, 1 µl de primer (primer y sonda incluida en un solo tubo), 0.8 µl de templado (400 ng de ARN) y agua libre de nucleasas hasta un volumen final de 25 µl. Todas las muestras se evaluaron por triplicado y se incluyeron controles negativos sin templado.

Se utilizó el equipo de PCR en tiempo real StepOne™ Applied Biosystems (Applied Biosystems) y las condiciones en las cuales se llevó a cabo cada reacción de PCR en tiempo real fueron las indicadas por el fabricante: 1 ciclo de 30 min a 50 °C, 1 ciclo 10 min a 95 °C, 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C y 40 ciclos de 1 min a 60 °C. La expresión génica relativa se calculó utilizando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak y Schmittgen, 2001) y se tomó como referencia el gen endógeno RSP9, los datos se expresaron como unidades relativas.

5.6 Cuantificación y Relaciones de ADN, ARN y Proteína

A partir de las muestras experimentales de músculo se realizaron las extracciones de ADN genómico y ARN total por triplicado para cada unidad experimental mediante el protocolo recomendado por el proveedor (DNazol®, Life Technologies, USA) y la metodología de Baxa et al., (2010), la cuantificación de proteína se realizó mediante la técnica de Gornall et al. (1949). Los

datos de ADN y ARN fueron expresados en ng/mg de tejido y proteína en $\mu\text{g}/\text{mg}$ de tejido y se calcularon las relaciones entre los datos obtenidos.

5.6 Análisis Estadístico

El análisis estadístico de los datos de comportamiento productivo, características de la canal y caracterización de la fibra muscular, se realizó mediante un ANOVA-GLM para un diseño en bloques completos al azar. El modelo incluyó el efecto aleatorio del bloque, efecto fijo de los tratamientos y el peso de los animales como covariable. Se estimaron significancias a un nivel de $P < 0.05$. Cuando se encontraron diferencias significativas, se realizaron comparaciones de medias por contrastes ortogonales. Los siguientes contrastes fueron probados: contraste 1= Testigo vs AF300 + AF600 + CZ; contraste 2= AF300 + AF600 vs CZ; contraste 3= AF300 vs AF600. Los datos de expresión de genes y contenido de ADN, ARN y proteína se analizaron mediante un ANOVA de una vía, con una prueba de comparación de medias por Tukey-Kramer a un nivel de significancia $P < 0.05$. Todos los datos fueron procesados en el paquete estadístico NCSS versión 2007.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Comportamiento Productivo

Los resultados de las variables de comportamiento productivo se presentan en el cuadro 3. El peso vivo inicial no presentó diferencias entre tratamientos ($P > 0.05$), los valores oscilaron entre 23 y 24 kg, lo que indica una correcta aleatorización de los animales al inicio de la prueba. Los pesos finales fluctuaron entre 30 y 32 kg y presentaron diferencias entre tratamientos ($P < 0.05$), el peso final de los animales suplementados fue 7% mayor respecto al Testigo (contraste 1); dentro de esta misma variable en el contraste 2, no se encontraron diferencias significativas entre las dosis de AF respecto a CZ lo cual sugiere un similar comportamiento entre el promotor sintético y AF ($P > 0.05$).

Respecto a la ganancia diaria de peso se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0.05$). Los animales suplementados mejoraron en 25.5% la GDP respecto al grupo testigo (efecto de contraste C1, $P < 0.05$); sin embargo, los contrastes C2 y C3 no fueron significativos ($P > 0.05$), lo cual indicó que la GDP de ambas dosis de AF fue similar a la obtenida para CZ, y no hubo efecto de la dosis de AF. El consumo de alimento no se modificó por los tratamientos ($P > 0.05$), los animales consumieron en promedio 1 kg. Por su parte, la conversión alimenticia no fue afectada por los tratamientos ($P > 0.05$); a pesar de ello, los animales suplementados fueron 14% más eficientes respecto a los no suplementados (contraste 1), esto significa que fue necesario 14% menos alimento para ganar 1 kg de peso en el animal, esta disminución tiene un impacto favorable en la reducción de los costos de alimentación.

Cuadro 3. Comportamiento productivo y características de la canal de corderos de pelo suplementados con ácido ferúlico y clorhidrato de zilpaterol durante 32 días.

	Tratamientos					Significancia del contraste		
	Testigo	AF300	AF600	CZ	EEM	C1	C2	C3
Peso inicial, kg	23.55	24.80	23.77	23.98	1.746	0.75	0.89	0.68
Peso final, kg	30.27	32.56	32.54	31.94	0.567	<0.05	0.40	0.97
GDP, kg	0.195	0.265	0.265	0.258	0.016	<0.05	0.43	0.99
Consumo de alimento, kg/d	1.10	1.204	1.263	1.262	0.060	0.07	0.71	0.51
Conversión alimenticia, kg	5.63	4.60	4.86	4.91	0.413	0.10	0.72	0.66
Peso de canal caliente, kg	15.02	15.53	15.45	15.31	0.34	0.28	0.64	0.86
Rendimiento canal, %	48.24	48.01	47.61	48.54	0.72	0.83	0.44	0.74
AOC, cm ²	14.40	14.40	13.68	16.18	0.42	0.67	<0.05	0.47
Grasa dorsal, mm	1.80	2.78	2.03	2.85	0.44	0.19	0.42	0.26
pH 45 min	6.48	6.44	6.38	6.39	0.06	0.27	0.76	0.49
pH 24 h	5.59	5.58	5.71	5.59	0.03	0.42	0.24	0.13

Tratamientos: Testigo (sin aditivo); AF300, corderos alimentados con 300 mg de AF/d; AF600, 600 mg de AF/d; clorhidrato de zilpaterol (CZ) a 6 mg/d.

Valores de probabilidad de los contrastes ortogonales: C1= Testigo vs AF300 + AF600 + CZ; C2= AF300 + AF600 vs CZ; C3= AF300 vs AF600. (P < 0.05).

EEM= Error estándar de la media, n= 8.

GDP= Ganancia diaria de peso

AOC= Área de ojo de costilla

Los resultados de GDP con AF y CZ en comportamiento productivo fueron similares a otros estudios con CZ en corderos en finalización (Estrada-Angulo et al., 2008; Avendaño-Reyes et al., 2011; López-Carlos et al., 2011), quienes han reportado hasta 0.062 kg de diferencia en la ganancia al día respecto a animales sin suplemento y conversiones alimenticias de 24% mejores. Estas modificaciones en el rendimiento del crecimiento están bien documentadas como un efecto de repartición causado por los AA- β (Johnson et al., 2014). Sin embargo, otros estudios en corderos muestran resultados diferentes. Dávila-Ramírez et al. (2014) y Macías-Cruz et al. (2013) evaluaron las características productivas en corderos de pelo macho y hembra con CZ a 10 mg/d y no observaron cambios en GDP y conversión alimenticia. Estas diferencias se pueden deber a factores ambientales de los sitios experimentales. Macías-Cruz et al. (2013) reportaron que el CZ actúa mejor en corderos bajo condiciones termoneutrales debido a que el estrés por calor o frío afecta directamente el metabolismo animal. Las condiciones climáticas del presente estudio fueron favorables con temperaturas bajo condiciones termoneutrales (primavera), lo que contribuye a que la energía proveniente del alimento se dirija en mayor proporción hacia la síntesis muscular (Bernabucci et al., 2009).

Por su parte, estudios relacionados con el efecto de la suplementación de AF en especies productivas son limitados. Los resultados del presente estudio concuerdan con un reporte previo en vaquillas de finalización suplementadas con AF (2250 o 4500 mg/día) y se observó un aumento del 24% en GDP, respecto a animales no suplementados (Peña-Torres, 2014). Además, en cerdos suplementados con AF a 25 ppm/kg de alimento, se mejoró en 15% la GDP (Valenzuela-Grijalva, 2017), lo anterior atribuido a un efecto promotor de AF tanto en rumiantes como en monogástricos. Tal efecto promotor podría estar ligado a la activación de hormonas responsables de la acreción muscular como la somatotropina, tal como ocurrió en un estudio previo, realizado en vacas lactantes que recibieron una infusión de AF y los niveles de esta hormona en sangre aumentaron significativamente (Gorewit, 1983).

De manera contraria, en un estudio de Macías-Cruz (2014) observaron que la suplementación AF no modificó las variables productivas en corderas. Tales diferencias pueden deberse a las condiciones experimentales implementadas, especie, sexo, entre otros. Por su parte, en ese estudio se utilizaron hembras lo cual se conoce que el metabolismo y la deposición de músculo es menor respecto a machos lo cual puede ser un factor importante en la actividad de la molécula (te Pas, 2004). Por otro lado, se ha reportado que en corderas suplementadas con 300 mg/d de AF se ejerció

un efecto sobre aspectos reproductivos, ya que se incrementó el tamaño de los ovocitos y se mejoró la funcionalidad del sistema glucosa-insulina (Macías-Cruz et al., 2018). Por lo que posiblemente AF pueda tener una respuesta en la liberación estrógenos en hembras y en el caso de machos promover un estímulo de crecimiento mediante la liberación de hormonas androgénicas como testosterona.

En la búsqueda de la posible explicación de porqué AF tuvo un efecto favorable sobre el comportamiento productivo de los corderos, y de acuerdo a esto se proponen dos hipótesis. La primera asocia a un mecanismo anabólico similar al descrito para AA- β , debido a que su estructura molecular es semejante a la de las catecolaminas y el reconocimiento a nivel de receptores β de células satélite y tejido muscular (Gorewit, 1983; Valenzuela-Grijalva, 2017). Por otro lado, otra posible ruta de acción es mediante la modificación del ecosistema microbiano del sistema digestivo debido a la naturaleza antimicrobiana de estos compuestos. Existen algunos estudios realizados con fitogénicos, en los cuales los resultados se inclinan hacia un posible mecanismo ligado a la modificación de la fermentación ruminal. Por ejemplo, en estudios previos donde se realizaron pruebas de fermentación microbiana y se probaron compuestos fitoquímicos, los resultados muestran cambios en las poblaciones microbianas provenientes del rumen y modificaciones en la proporción de ácidos grasos volátiles y reducción de metano. En este sentido, puede resultar favorable para el aprovechamiento de energía dirigida hacia el crecimiento y deposición del músculo (Busquet et al., 2006; García-González et al., 2006).

6.2 Características de la Canal

El cuadro 3 muestra los datos de las características de la canal, donde el peso de la canal caliente no fue modificado por los tratamientos ($P > 0.05$). De igual forma, el porcentaje de rendimiento de las canales no fue afectado por la suplementación de AF o CZ ($P > 0.05$), donde los datos fluctuaron entre 47 y 48%. El área de ojo de costilla presentó diferencias significativas debido a los tratamientos ($P < 0.05$), donde se observó un aumento del 14% en las canales de animales suplementados con CZ respecto a los animales suplementados con AF (contraste 3). El espesor de la grasa dorsal, el pH 45min y 24 h no fueron modificados por los tratamientos ($P > 0.05$).

Respecto a las características de la canal, el pH fue similar para todos los tratamientos y dentro de lo normal para las carnes frescas de corderos (Mach et al., 2008). Solo CZ mostró un aumento significativo en el área del músculo LT, lo cual coincide con lo observado previamente en otros estudios de corderos (Avendaño-Reyes et al., 2011; Vahedi, 2014). El aumento del área del músculo LT con zilpaterol, lo que daría lugar a un mayor volumen de cortes para su venta, lo cual puede ser debido a una regulación positiva de la proteína muscular causada por la activación de las células satélite, que redirige la energía de la grasa y el alimento hacia el crecimiento muscular (Beermann, 2002). A pesar de los importantes beneficios del AF en las variables en corral, las características de canal fueron semejantes al Testigo. Resultados similares fueron reportados por Macías-Cruz et al. (2014) al suplementar 300 mg/d de AF en corderas, ya que no observaron cambios de las variables en canal ni rendimiento en cortes. De manera contraria, en otro estudio con cerdos suplementados con AF a 25 ppm/kg de alimento, el espesor de la grasa dorsal se redujo por encima del 50% y el área de ojo de costilla se incrementó un 16%, lo que se atribuyó a una acción anabólica de AF (Valenzuela-Grijalva, 2017).

Una posible explicación del efecto promotor encontrado en corral y la ausencia de diferencias con AF, CZ y el testigo en las características de la canal, podría ser que se presentó un crecimiento compensatorio por la dieta alta en energía. Está demostrado que en ovinos sometidos a dietas altas en energía después de una restricción alimenticia ocurre una ganancia de peso compensatoria con duración de hasta de 56 días (Quintero et al., 1988). Lo anterior debido a que se mejora la utilización de energía mediante una disminución en el requerimiento energético para mantenimiento de peso y una mayor disposición de energía para crecimiento. Por lo que estas condiciones pueden ser determinantes durante el desarrollo y crecimiento de animales con fines productivos indistintamente al uso de promotores como implantes de tipo hormonal o AA- β (te Pas et al. 2004). En el presente estudio a pesar de uniformizar los pesos iniciales en los corderos, se desconocía si existía algún déficit alimenticio previo en los animales.

Además, es necesario mencionar que, como limitante en el presente estudio debido a las condiciones logísticas del experimento, no fue posible medir el peso de los órganos y los componentes no pertenecientes a la canal. La literatura indica una reducción en el peso de hígado, intestino o piel debido a la redirección de nutrientes de órganos para el desarrollo muscular, lo que es una característica del modo de acción de los AA- β (Reeds y Mersmann, 1991; Montgomery, 2009). Este estudio mostró una mejora en el rendimiento en corral, sin embargo, solo un ligero

aumento en el peso de las canales con los tratamientos experimentales (500 g aproximadamente) posiblemente por lo mencionado anteriormente.

El leve cambio en las características de la canal, también podría atribuirse a cambios en el ecosistema microbiano del rumen. Estudios *in vitro* con microbiota del rumen muestran que dosis altas de fitoquímicos provocan un efecto antimicrobiano mediante el rompimiento de la pared celular de bacterias celulolíticas y protozoos, lo que puede limitar la producción de ácidos grasos volátiles, la digestibilidad de la fibra proveniente del forraje y la concentración de proteína microbiana se reducen (Akin, 1982; Borneman et al., 1986). Los hallazgos del presente estudio mostraron una mejora en la ganancia diaria de peso con AF y CZ, sin embargo solo con zilpaterol se encontraron incrementos en el AOC, por lo que la evaluación de cambios histomorfométricos y de expresión génica pueden ayudar a confirmar si estos compuestos ejercen o no un mecanismo de tipo anabólico.

6.3 Caracterización de la Fibra Muscular por Tinción Histoenzimática

Las secciones transversales de músculo teñidos mediante la técnica NADH-TR muestran el tipo de fibras de acuerdo con el tipo de metabolismo (oxidativo o glicolítico) (Figura 3). Por su parte, la tinción ATPasa categorizó las fibras según sus características contráctiles, ya sea fibras lentas o de tipo I (color blanco), intermedia o IIA (color gris) y fibras rápidas o IIB (color negro) (Figura 4). Con base en las fotografías obtenidas, se realizaron los análisis de porcentaje e histomorfométricos del músculo LT (ver Cuadros 4, 5 y 6 de esta sección).

6.3.1 Tinción de Músculo por NADH-TR

Bajo esta técnica, los porcentajes de fibras oxidativas y glicolíticas no presentaron diferencias significativas entre tratamientos ($P > 0.05$; cuadro 4). Sin embargo, las fibras musculares con los tratamientos experimentales presentaron mayor AST y perímetro respecto a los no suplementados

(efecto de contraste C1; $P < 0.05$), en donde se observa un aumento del doble en el AST de la fibra ya sea con AF o CZ (Cuadro 4). El contraste 2 no fue significativo, por lo tanto, las AST de las fibras oxidativas con AF fueron similares al tratamiento CZ ($P > 0.05$), lo que indica un tamaño similar de las fibras con el tratamiento AF respecto a CZ. Los perímetros de las fibras oxidativas de muestras tratadas con los aditivos fueron 37% mayores que las del testigo ($P < 0.05$). En cambio, el AST y perímetro de las fibras glicolíticas, no mostraron diferencias significativas los contrastes ($P > 0.05$).

Es importante señalar, que debido a limitaciones del estudio solo fue posible contar con 4 unidades experimentales por tratamiento ($n=4$), situación por la cual posiblemente no se encontraron diferencias en las fibras glicolíticas con el tratamiento CZ y AF300. Estos tratamientos presentaron fibras glicolíticas hasta 39% más grandes respecto al testigo, sin embargo por esta limitante no fueron estadísticamente diferentes. Además los hallazgos en los tamaños de la fibra con CZ pueden estar directamente asociados con el área del músculo LT en canal, y se puede atribuir a un posible efecto de hipertrofia muscular.

Figura 3. Sección transversal del músculo *Longissimus thoracis* de corderos bajo la técnica NADH-TR. Los tratamientos fueron: Testigo (T), ácido ferúlico 300 mg/d (AF300), ácido ferúlico 600 mg/d (AF600) y clorhidrato de zilpaterol (CZ). G= fibras glicolíticas, O= fibras oxidativas.

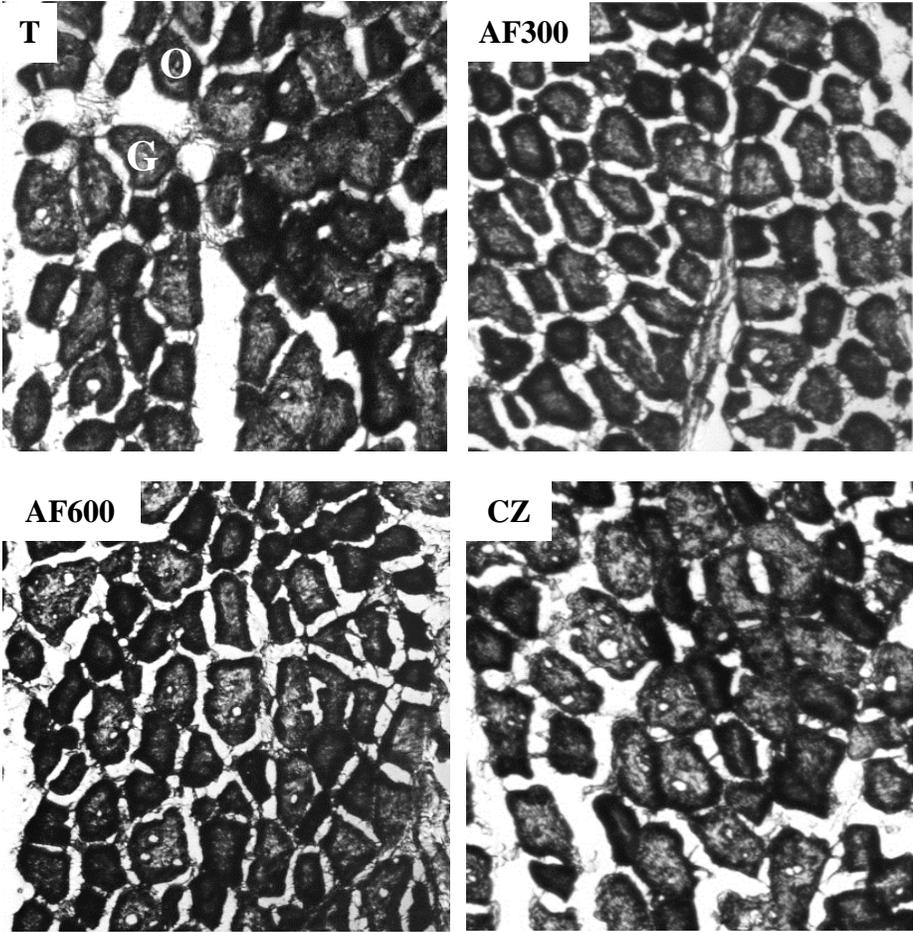
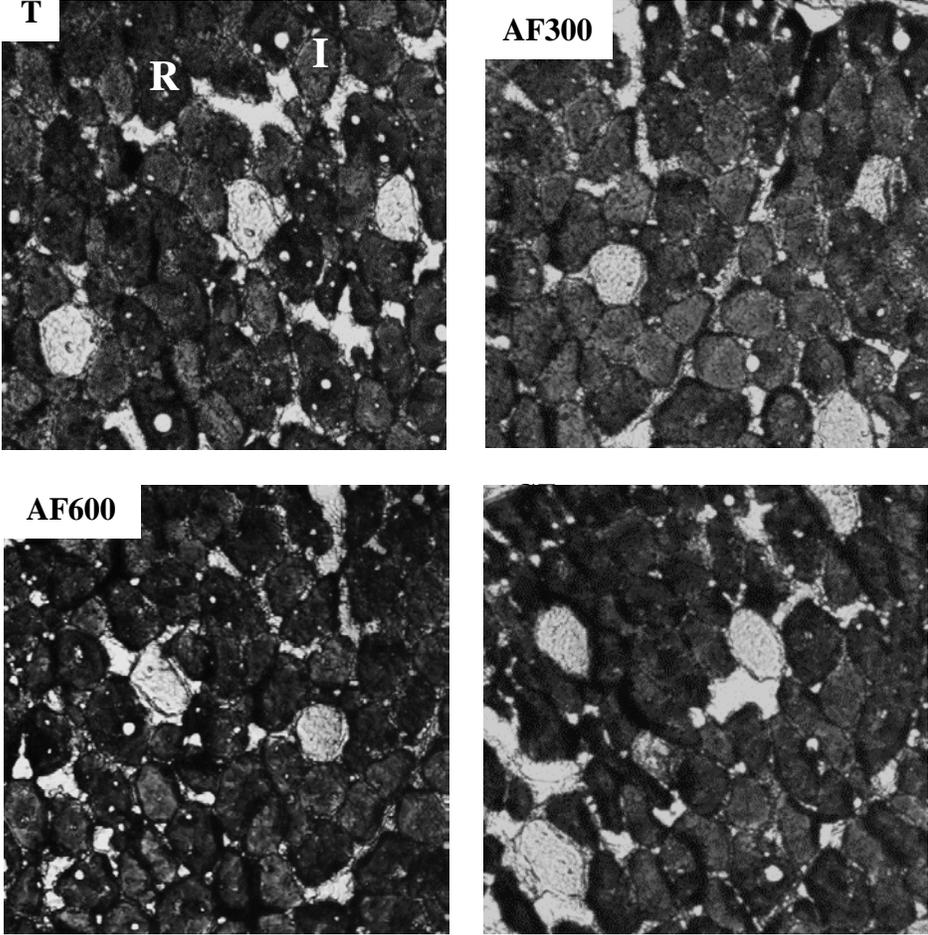


Figura 4. Sección transversal del músculo *Longissimus thoracis* de corderos bajo la técnica *ATPasa*. Los tratamientos fueron: testigo (T), ácido ferúlico 300 mg/d (AF300), ácido ferúlico 600 mg/d (AF600) y clorhidrato de zilpaterol (CZ). L= lentas o tipo I, I= intermedias o tipo IIA, R= rápidas o tipo IIB.



6.3.2 Tinción de Músculo por ATPasa

Los porcentajes de tipos de fibra diferenciados por el método de tinción ATPasa fueron similares para los cuatro tratamientos ($P > 0.05$; Cuadro 5). Tanto el AST y perímetro de las fibras lentas, intermedias y rápidas no se vieron afectadas por los tratamientos (Cuadro 5; $P > 0.05$). A pesar de este resultado, el AST de las fibras intermedias con CZ mostraron una tendencia mayor que el tratamiento con AF (Contraste 2, $P = 0.089$) y el perímetro en fibras lentas mostró una tendencia mayor en el contraste 1 ($P = 0.07$). El mismo escenario se observó para fibras rápidas, donde CZ fue hasta 56% mayor que AF en el área de sección transversal (Contraste 2, $P = 0.058$).

6.3.3 Densidad y Número Estimado Total de Fibras en el Músculo *Longissimus thoracis*

La densidad representa la cantidad de fibras en un área muscular determinada. Los tratamientos experimentales no afectaron la densidad de la fibra ($P > 0.05$). A pesar de no presentar diferencias, los tratamientos con AF300 y CZ fueron 23% y 12% menores en la densidad respecto al Testigo, lo cuales indican un menor número de fibras por área evaluada y esto coincide con el incremento de AST y perímetro en las fibras oxidativas. Además, se observó una tendencia en el contraste 3 ($P = 0.051$) donde el tratamiento la dosis alta de AF presentó valores menores de densidad respecto a la dosis baja. Por su parte, el número total de fibras no fue afectado por los tratamientos experimentales ($P > 0.05$; Cuadro 6).

Cuadro 4. Porcentaje, área de sección transversal y perímetro de las fibras del músculo *Longissimus thoracis* con la técnica *NADH-TR*.

	Tratamientos					Significancia del contraste		
	Testigo	AF300	AF600	CZ	EEM	C1	C2	C3
Tinción <i>NADH-TR</i>								
Porcentaje de fibra (%)								
Oxidativas	42.61	41.56	41.10	42.49	2.84	0.796	0.760	0.916
Glicolíticas	57.35	58.43	58.89	57.50	2.84	0.797	0.760	0.916
AST (μm^2)								
Oxidativas	1077.32	2081.12	1836.20	2073.81	157.78	<0.05	0.563	0.295
Glicolíticas	1619.28	2255.15	1738.53	2229.93	267.71	0.168	0.491	0.199
Perímetro (μm)								
Oxidativas	122.21	172.43	160.06	172.67	7.35	<0.05	0.490	0.258
Glicolíticas	147.64	178.23	155.47	177.06	13.09	0.162	0.537	0.244

Tratamientos: dieta basal sin aditivo (Testigo); dieta basal más 300 mg de AF/día (AF300); dieta basal más 600 mg de AF/día (AF600); dieta basal más clorhidrato de zilpaterol 6 mg/día (CZ). n=4.

Valores de probabilidad asociados a los contrastes ortogonales: C1= Control vs AF300 + AF600 + CZ; C2= AF300 + AF600 vs CZ; C3= AF300 vs AF600; P < 0.05.

AST: área de sección transversal (μm^2).

EEM: error estándar de la media.

Cuadro 5. Porcentaje, área de sección transversal y perímetro de las fibras del músculo *Longissimus thoracis* con la técnica *ATPasa* alcalina.

	Tratamientos					Significancia del contraste		
	Testigo	AF300	AF600	CZ	EEM [#]	C1	C2	C3
Tinción <i>ATPasa</i>								
Porcentaje de tipo de fibra (%)								
Lentas	12.34	9.19	10.72	12.23	1.61	0.553	0.254	0.529
Intermedias	36.53	41.52	33.65	37.84	7.42	0.902	0.981	0.479
Rápidas	51.11	49.28	55.62	49.91	6.89	0.785	0.801	0.537
AST (μm^2)								
Lentas	2349.97	2448.37	2303.84	3234.48	306.41	0.396	0.420	0.745
Intermedias	1760.86	1748.81	1350.51	2362.17	355.91	0.887	0.089	0.445
Rápidas	1477.01	1526.05	1512.52	2377.83	332.77	0.410	0.058	0.977
Perímetro (μm)								
Lentas	179.52	180.60	171.77	205.88	12.13	0.648	0.070	0.617
Intermedias	157.12	154.11	127.12	175.97	19.09	0.844	0.163	0.354
Rápidas	144.16	145.06	146.26	175.93	14.73	0.509	0.121	0.955

Tratamientos: dieta basal sin aditivo (Testigo); dieta basal más 300 mg de AF/día (AF300); dieta basal más 600 mg de AF/día (AF600); dieta basal más clorhidrato de zilpaterol 6 mg/día (CZ). n=4.

Valores de probabilidad asociados a los contrastes ortogonales: C1= Control vs AF300 + AF600 + CZ; C2= AF300 + AF600 vs CZ; C3= AF300 vs AF600; P < 0.05.

AST: área de sección transversal (μm^2).

EEM: error estándar de la media.

Los hallazgos en el área de sección transversal en la fibra muscular encontrados en el presente estudio son similares a lo reportado por Valenzuela-Grijalva (2017), pues se encontró un aumento del 14% en el AST de las fibras oxidativas en cerdos en finalización con 50 mg/d de AF, el cual se atribuyó a una sobreexpresión de los genes de las cadenas pesadas de miosina. Se ha propuesto que los AH presentan un mecanismo de reconocimiento en células satélite, ya que una evaluación *in vitro* en mioblastos con ácido clorogénico (10 ng/ml) provocó una sobrerregulación de miogenina y factor potenciador específico de miocitos 2D (MEF2D, por sus siglas en inglés), posiblemente a través de un anclaje a receptores de membrana Sema3A, lo que generó un incremento en la síntesis de MHC-I (Anderson et al., 2016).

Otro mecanismo de señalización por el cual pueden actuar los fitoquímicos es mediante la fosforilación de IGF-I, se ha probado en modelos murinos que el ácido ursólico (0.27%) en dieta tiende a aumentar el diámetro de la fibra muscular mediante el aumento de síntesis proteica por fosforilación de IGF-I. Adicionalmente se inhibieron factores asociados a la atrofia muscular, reducción de adipocitos, colesterol y triglicéridos (Kunkel et al., 2011).

Los hallazgos encontrados con CZ en el presente estudio muestran un similar comportamiento con otras moléculas AA- β como el cimaterol, el cual al ser suministrado en corderos no provocó cambios en las proporciones de fibras oxidativas o glicolíticas pero incrementó el AST de las fibras glicolíticas hasta un 50% respecto al testigo (Kim et al., 1987).

A pesar de no encontrar diferencias estadísticas en el presente estudio posiblemente por el número de muestra utilizado, CZ incrementó el tamaño de las fibras lentas y rápidas hasta 38%. Un reporte muestra similares resultados en vaquillas suplementadas con CZ (6 mg/kg PV/día), donde observaron que el AST del *Longissimus lumborum* fue 15% mayor en las fibras lentas y rápidas comparadas con los animales no suplementados (Ebarb et al., 2016). Asimismo este efecto se encontró en novillos suplementados con CZ en el músculo LT (Kellermeier et al., 2009; Strydom et al., 2009).

Cuadro 6. Densidad y número total de fibras estimado del músculo *Longissimus thoracis* de corderos suplementados con ácido ferúlico y clorhidrato de zilpaterol (tinción NADH-TR).

	Tratamientos					Significancia del contraste		
	Testigo	AF300	AF600	CZ	EEM	C1	C2	C3
Densidad (50,000 μm^2)	23.14	17.77	26.02	20.15	2.67	0.566	0.604	0.051
Número de fibras	668027.8	511540.3	711799.3.6	651370.6	81184	0.654	0.681	0.093

Tratamientos: dieta basal sin aditivo (Testigo); dieta basal más 300 mg de AF/día (AF300); dieta basal más 600 mg de AF/día (AF600); dieta basal más clorhidrato de zilpaterol 6 mg/día (CZ). n=4.

Valores de probabilidad asociados a los contrastes ortogonales: C1= Control vs AF300 + AF600 + CZ; C2= AF300 + AF600 vs CZ; C3= AF300 vs AF600; $P < 0.05$.

EEM: error estándar de la media.

No obstante, estos reportes sugieren que el aumento de las AST en las fibras se debe a una sobreexpresión de genes que codifican para cadenas pesadas de miosina y receptores adrenérgicos- β , y así generar un mayor desarrollo muscular. En este sentido, Valenzuela-Grijalva (2007) encontró un aumento de tamaño en las fibras glicolíticas y oxidativas del músculo LT de cerdos suplementados con el AA- β ractopamina y una sobreexpresión en receptor adrenérgico- β e isoformas de miosina. Además de lo mencionado anteriormente, el modo de acción de los AA- β se caracteriza por ocasionar una mayor retención de proteína a través de alteraciones en el sistema calpaína-calpastatina, el cual actúa de forma crucial en el tamaño de la fibra y recambio proteico; por lo que todos estos eventos señalados tienen un papel importante en la acreción muscular (Koochmaraie et al., 1991).

Un estudio realizado por Mizunoya et al. (2017) en ratones de 12 semanas de edad y suplementados con 0.5% de polifenoles de manzana por 8 semanas muestran una actividad similar a lo encontrado en nuestro estudio. Los resultados que obtuvieron estos investigadores mostraron un incremento en la resistencia a la fatiga muscular, la cual está mediada por un incremento en la síntesis de proteína para fibras lentas lo que incrementó su tamaño. Sin embargo, a diferencia de nuestro estudio, estos autores encontraron de mayores proporciones de fibras tipo rápidas respecto a las intermedias, lo cual atribuyen a cambios a nivel hormonal en ratones.

En apartados anteriores se ha expresado que las moléculas anabólicas tienden a incrementar principalmente el tamaño de las fibras glicolíticas. Sin embargo, la respuesta en el crecimiento de las fibras encontrada con AF en el presente estudio es diferente. Cuando se suplementan AA- β , se generan transiciones de fibras lentas hacia intermedias o rápidas, además de mayores tamaños en el AST en las fibras, debido a que estos compuestos estimulan mayormente la síntesis proteica hacia los diferentes tipos de fibras por activación de células satélite musculares (Kellermeier et al., 2009; Strydom et al., 2009). Contrario a lo anterior, Gonzalez et al. (2010) argumentan que durante la hipertrofia muscular puede existir una limitación en la capacidad de síntesis de proteína dirigida hacia las fibras glicolíticas. Por lo tanto, las moléculas con efecto de tipo anabólico pueden redireccionar o estimular la síntesis de proteína hacia las fibras oxidativas lo cual incrementa su tamaño respecto a las glicolíticas, situación que al parecer ocurrió con el tratamiento con AF.

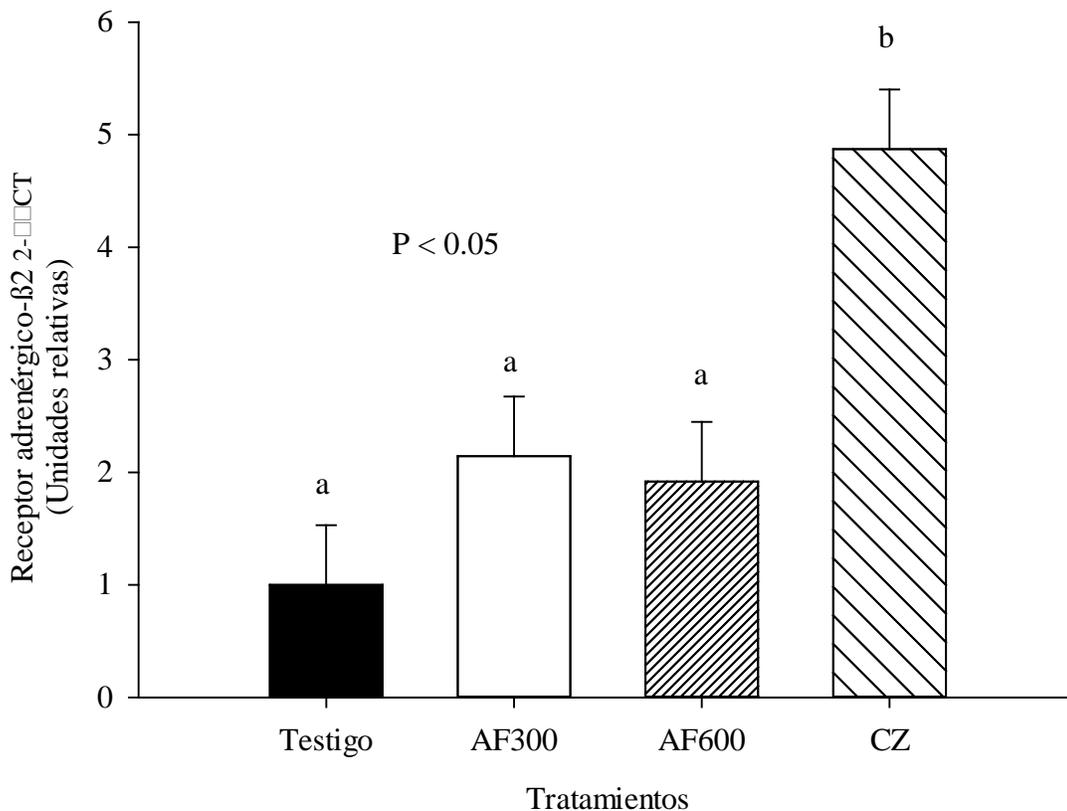
6.4 Expresión Génica Relativa de Indicadores Miogénicos en el Músculo *Longissimus thoracis*

6.4.1 Abundancia relativa en receptor adrenérgico $\beta 2$

Los resultados de la evaluación en expresión génica en músculo de corderos se muestran en la figura 5, 6, 7 y 8. En lo que respecta al receptor adrenérgico $\beta 2$, se encontró una expresión cinco veces mayor en los niveles del ARNm para el tratamiento CZ respecto al testigo (Figura 5; $P < 0.05$). Por su parte, ambas dosis de AF mostraron una expresión similar en el receptor $\beta 2$ respecto al testigo ($P > 0.05$).

Los hallazgos del presente estudio respecto a la expresión del receptor $\beta 2$ en ovinos, corresponden con estudios previos donde han evaluado la abundancia de ARNm en receptores $\beta 1$ y $\beta 2$ en tejido muscular de novillos en fase de finalización suplementados con CZ. Se ha encontrado que la expresión génica para el receptor $\beta 2$ se incrementa el doble respecto a animales sin tratamiento, por su parte en el receptor $\beta 1$ no mostró cambios significativos debido a los tratamientos, esto indica que tal estímulo en bovinos sucede predominantemente en el subtipo $\beta 2$ (Baxa et al., 2010; Rathmann et al., 2009). Este reconocimiento evaluado a través de la expresión génica en tiempo real del receptor β indica que estas moléculas adrenérgicas tienen como característica anclarse a los receptores β de membrana celular y producir una serie de señalizaciones. Lo que da por consecuencia un aumento en la transcripción y traducción celular e incremento en la síntesis de proteína muscular. Adicionalmente, está reportado en rumiantes, que el subtipo de receptor $\beta 2$ tiene mayor afinidad a los AA- β y se encuentra en mayor abundancia en músculo esquelético respecto al $\beta 1$ (Beermann, 2002).

Figura 5. Abundancia relativa del ARNm del receptor adrenérgico β -2 en el músculo *Longissimus thoracis* de corderos suplementados con ácido ferúlico y clorhidrato de zilpaterol (Media \pm EEM, expresado en unidades relativas). ^{ab}Barras con distinta literal, indican diferencia ($P < 0.05$).



Los resultados de la expresión del receptor β 2 en los corderos tratados con AF no coinciden con lo reportado por Platt et al., (2012) y Valenzuela-Grijalva (2017), pues ambos estudios mostraron altos niveles de abundancia relativa en receptores β 1 con AF tanto en células satélite de bovino y en tejido muscular de cerdos respectivamente. Estas diferencias en la expresión pueden sugerir que AF suplementado en corderos puede tener un efecto menor en los receptores β o una ausencia de anclaje (Sissom et al., 2007). Sin embargo, debido a las mejoras que se encontraron en comportamiento productivo y morfología de las fibras, podemos sugerir que el AF tiene un efecto promotor mediante un mecanismo diferente, ya sea mediante su anclaje a los receptores β 1, modulación de la microbiota ruminal, o bien, un mecanismo indirecto mediante la activación de hormonas endógenas como la hormona de crecimiento (García-González et al., 2006; Gorewit,

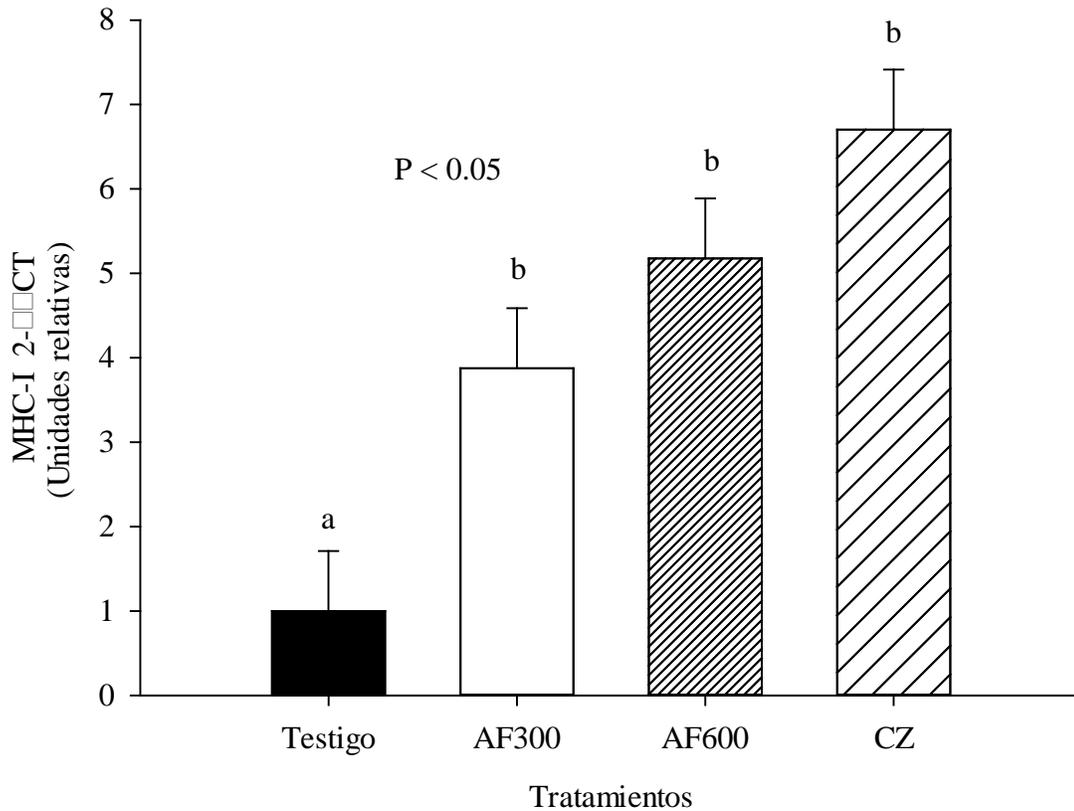
1983). Para aceptar o rechazar estos últimos supuestos, es necesario realizar mayor investigación donde se considere la evaluación de estas variables y sus relaciones.

6.4.2 Abundancia relativa en MHC-I

Para el gen que codifica para MHC-I, los resultados mostraron que niveles del ARNm fueron de 3 a 5 veces mayores en los animales suplementados con AF300, AF600 y CZ respecto al testigo ($P < 0.05$), en el cual las unidades relativas fluctuaron entre 3 y 6 para los tratamientos experimentales; asimismo las unidades relativas en las dosis de AF se consideran similares respecto al tratamiento CZ (Figura 6; $P > 0.05$).

En el presente estudio el efecto producido por el AF y el CZ a nivel de tamaño de las fibras lentas coincide con lo encontrado en la expresión de MHC-I. Sin embargo, de forma contraria una evaluación en cerdos suplementados con AF y ractopamina indicaron una baja regulación en la expresión de MHC-I a pesar de incrementar el AST en las fibras lentas (Valenzuela-Grijalva, 2017). Lo anterior se pueden deber a la diferencias entre especies y la afinidad de la molécula con el receptor, ya que ractopamina tiene mayor afinidad a los receptores $\beta 1$ y que provoca una sobreexpresión en MHC-IIX (Beermann, 2002).

Figura 6. Abundancia relativa del ARNm de MHC-I en el músculo *Longissimus thoracis* de corderos suplementados con ácido ferúlico y clorhidrato de zilpaterol (Media \pm EEM, expresado en unidades relativas). ^{ab}Barras con distinta literal, indican diferencia ($P < 0.05$).



Similar a nuestro estudio, un reporte en cerdos suplementados con ractopamina generó cambios favorables en corral y un mayor tamaño de fibras lentas (Aalhus et al., 1992); de igual forma otro estudio en cerdos con ractopamina exhibió una sobreexpresión mayor en MHC-I respecto a las otras isoformas (Lefaucheur et al., 2004). En vacas suplementadas con una combinación de ractopamina y acetato de trembolona se encontraron mayores tamaños del AST (32%) en fibras lentas para el músculo *Longissimus thoracis* (Gonzalez et al., 2007). El AA- β cimaterol suplementado a 10 ppm en corderos también presentó un comportamiento similar en fibras tipo I, donde el tamaño de la fibra se incrementó hasta un 30% respecto al testigo. Lo anterior indica que a pesar de no ser habitual, existe un aumento en la expresión de MHC-I al suplementar AA- β lo

cual también genera una hipertrofia muscular en las fibras lentas debido al anclaje agonista-receptor (Beermann et al., 1987).

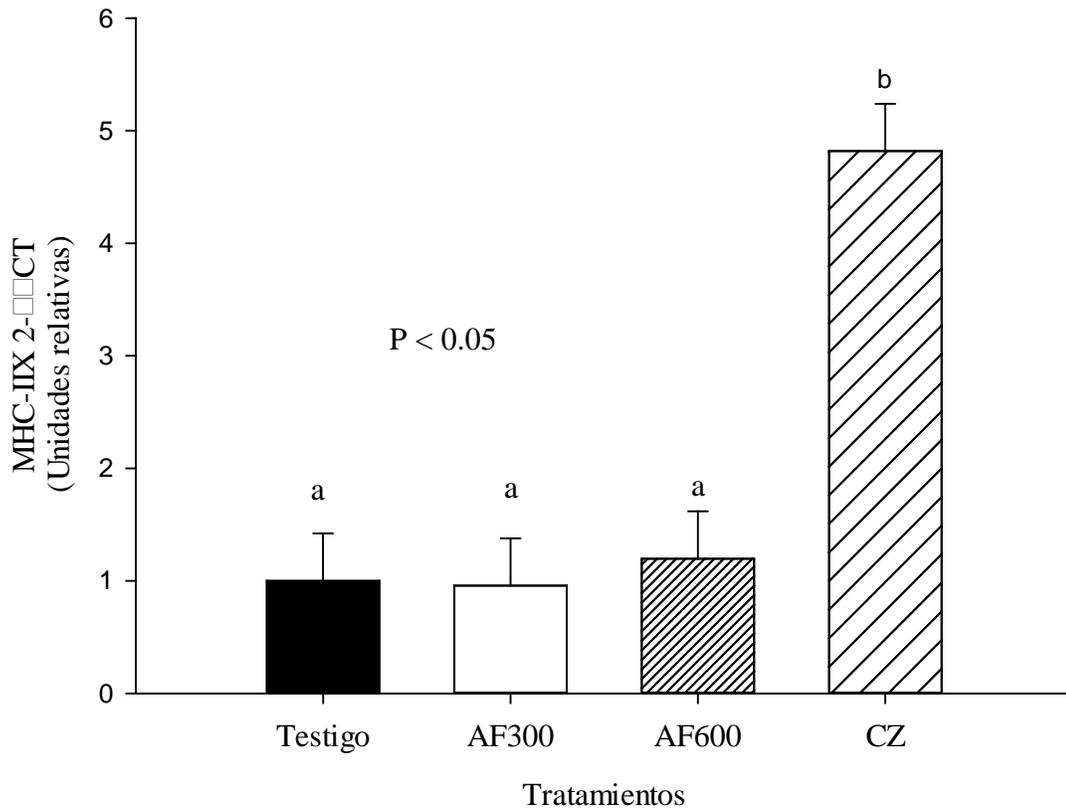
Hasta el momento existe escasa información sobre la expresión génica de indicadores de deposición muscular como MHC en animales suplementados con fitoquímicos. Ya que debido a su naturaleza antioxidante, en animales con fines de producción de carne se ha evaluado la expresión génica de indicadores mejoradores del estatus de salud como enzimas antioxidantes incluyendo la glutatión peroxidasa y la catalasa y del sistema inmune como citocinas pro-inflamatorias (Lee et al., 2017; Li et al., 2015; Paraskeuas et al., 2017).

6.4.3 Abundancia relativa en MHC-IIX

La expresión génica de MHC-IIX, mostró solamente cambios en el tratamiento con CZ, pues el compuesto AA- β aumentó la expresión aproximadamente 3.7 veces respecto a los tratamientos testigo, AF300 y AF600 (Figura 7; $P < 0.05$). Por su parte los tratamientos AF300, AF600 y testigo fueron similares ($P > 0.05$).

La sobreexpresión del ARNm de MHC-IIX encontrada en los organismos tratados con CZ es consistente con un reporte en novillos suplementados con CZ durante 30 días, el cual la abundancia de ARNm en MHC-IIX se incrementó (Baxa et al., 2010). Lo anterior, evidencia que los promotores de crecimiento se caracterizan por estimular la síntesis de proteína en el músculo esquelético en mayor forma que reducir la degradación proteica.

Figura 7. Abundancia relativa del ARNm de MHC-IIX en el músculo *Longissimus thoracis* de corderos suplementados con ácido ferúlico y clorhidrato de zilpaterol (Media \pm EEM, expresado en unidades relativas). ^{ab}Barras con distinta literal, indican diferencia ($P < 0.05$).



El efecto de hipertrofia muscular encontrado en nuestro estudio es debido al incremento en la expresión del gen MHC-IIX. Sin embargo, otra variable que puede ser evaluada para confirmar dicho efecto es la expresión de cadenas ligeras de miosina. Smith et al. (1989) encontró un incremento en la cantidad cadenas ligeras de miosina (MLC-1/3, por sus siglas en inglés) mediante la evaluación de la cantidad de ARNm de novillos suplementados con ractopamina. Estos autores argumentan que estos eventos están ligados a una respuesta de tipo anabólica en el músculo mediante una mayor transcripción de MLC-1/3, lo que proporciona una mejor estabilidad en las fibras glicolíticas.

En el presente estudio no se modificó la expresión de MHC-IIX al suplementar AF, lo cual coincide con las nulas diferencias encontradas en el AST de las fibras rápidas, esto puede ser explicado en

función que AF no actuó como un AA- β ya que la expresión génica en receptor fue similar al control, por lo que el efecto promotor solo se dirigió hacia la sobreexpresión del gen MHC-I, posiblemente mediante cambios a nivel poblaciones del rumen donde se mejora la relación propionato-acetato, reducción de metanogénesis, aumento de la proteína microbiana, entre otros (García-González et al., 2006).

Las fibras del músculo esquelético tienen la cualidad de modificar su composición y tamaño de la siguiente manera: Tipo I \leftrightarrow IIA \leftrightarrow IIX \leftrightarrow IIB a través del estímulo de factores como la actividad física, alimentación, perfil hormonal o uso de promotores (te Pas et al., 2004). En nuestro estudio los corrales fueron de un espacio más amplio ya que alojaban a dos corderos, por lo que la actividad física era mayor respecto a jaulas individuales lo que posiblemente contribuyó con los tratamientos experimentales para estimular el crecimiento de fibras más resistentes a la fatiga (Tipo I).

Asimismo, la capilaridad de las fibras musculares influye directamente en la morfología de la fibra ya que estas necesitan un suministro de sangre suficiente donde se provea de nutrientes como carbohidratos, ácidos grasos, aminoácidos necesarios para el crecimiento, desarrollo y mantenimiento de la fibra. Los capilares rodean a la fibra y se conoce que el número de capilares es mayor en las fibras tipo I (oxidativas) respecto al tipo II (glicolíticas) lo que el suministro de nutrientes y energía puede dirigirse mayormente a las primeras (Karlström et al., 1991), que el aumento en la expresión génica de MHC-I demostrada con AF y CZ pudo ser coadyuvada por esta característica.

6.4.4 Abundancia relativa en IGF-I

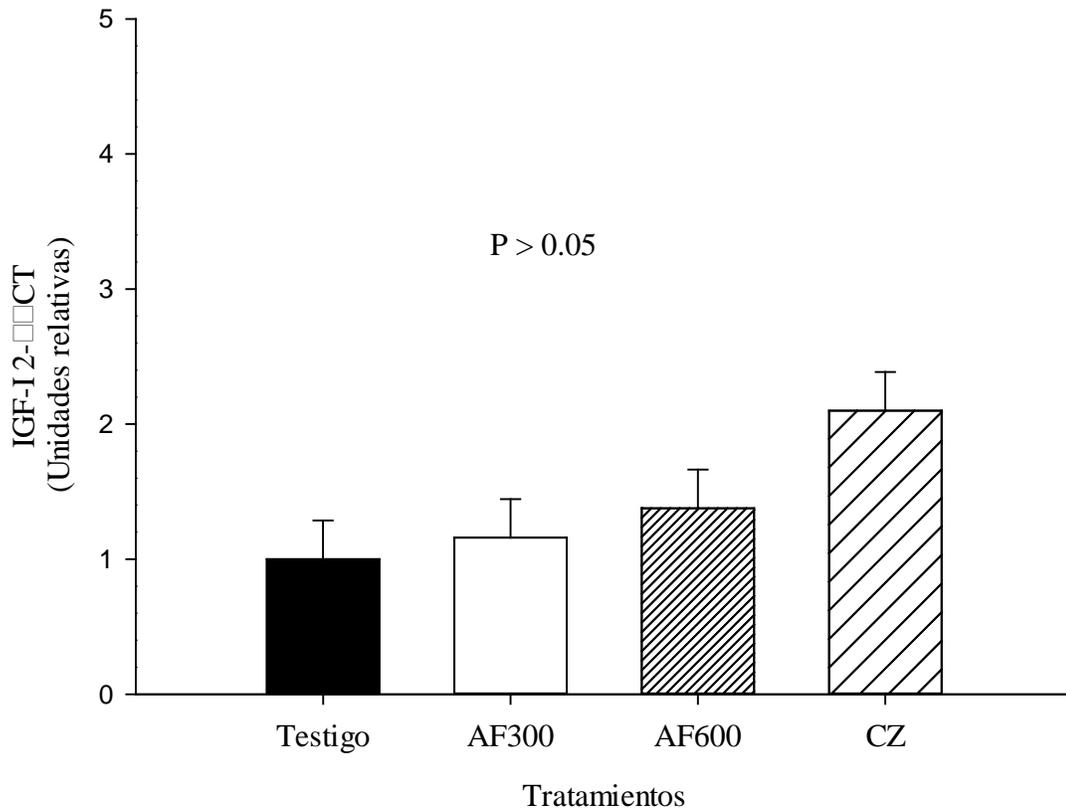
En la figura 8, se muestra la expresión génica para IGF-I, donde los tratamientos experimentales no ocasionaron cambios en la abundancia del ARNm y los valores oscilaron entre 1 y 2 unidades relativas para todos los tratamientos ($P > 0.05$).

Los resultados en la expresión de IGF-I mostraron que los tratamientos no modificaron la abundancia de ARNm que codifica para esta proteína; esto contrasta con el estudio de Valenzuela-Grijalva (2017) ya que reportó un incremento de un 77% en la expresión de IGF-I en cerdos suplementados con AF.

De igual forma, Awede et al. (2002) evaluaron el efecto de clenbuterol en ratas tratadas y observaron una expresión 4 veces mayor de IGF-I con este tratamiento, además de reportar transiciones en los tipo de fibra y mayor concentración de IGF en plasma. Este comportamiento lo responden como un estímulo local de factores de crecimiento como hormona de crecimiento, testosterona, insulina causada por el anclaje de clenbuterol en receptores y el incremento en la masa muscular.

No obstante, existen reportes que se asemejan a lo encontrado en el presente estudio con los tratamientos CZ y AF, donde no se reportan cambios significativos en la abundancia o concentración del ARNm de IGF-I utilizando AA- β . En un estudio *in vitro* con células satélite de bovino donde utilizaron CZ no encontraron efecto significativo en la abundancia relativa de IGF-I a las 192 h (Miller et al., 2012). Marple et al. (1989) probó una dosis de clenbuterol (1.87 mg/kgPV) en corderos tampoco reportaron cambios. De igual manera en corderos macho suplementados con 10ppm de cimaterol no se reportaron modificaciones en las concentraciones de IGF-I; estos autores indican que al suministrar AA- β en corderos, a pesar de encontrar mejoras en la deposición muscular, las alteraciones a nivel sistema endócrino que ocurren son bajas o nulas (O'Connor et al., 1991).

Figura 8. Abundancia relativa del ARNm de IGF-I en el músculo *Longissimus thoracis* de corderos suplementados con ácido ferúlico y clorhidrato de zilpaterol (Media \pm EEM, expresado en unidades relativas).



6.5 Concentración y relaciones ADN, ARN y proteína

El Cuadro 7 describe las concentraciones de ácidos nucleicos, proteína y sus relaciones. La suplementación de AF y CZ no mostraron diferencias significativas en el contenido de ADN, ARN y proteína ($P > 0.05$). Asimismo, las relaciones ARN:ADN, proteína:ARN y proteína:ADN, no fueron afectadas por los tratamientos ($P > 0.05$).

Los AA- β generan diferentes cambios metabólicos a nivel celular, los cuales están ligados a la hipertrofia muscular y no a una multiplicación de las fibras. Rehfeldt et al. (1994), evaluaron las relaciones ADN:Proteína, ARN:Proteína y ARN:ADN en ratas tratadas con clenbuterol, en el cual

encontró una disminución del 17% en la relación ADN:Proteína y un aumento en ARN:ADN de 22%. Por su parte, Beermann et al. (1987), encontraron un incremento de 35% en la cantidad de ARN en músculo de corderos suplementados con cimaterol, aunado también a mayores tamaños de músculo. En el estudio de O'Connor et al. (1991) probaron una dosis de 10 mg/día de cimaterol en corderos machos durante seis semanas, el músculo evaluado fue el *semitendinosus* y las concentraciones de ADN se incrementaron un 25%, ARN 12% y la relación ARN: ADN aumentó 52%.

En nuestro estudio no se observaron diferencias significativas por los tratamientos experimentales, sin embargo, en CZ se muestra una diferencia respecto al testigo de 11% en la relación Proteína:ADN y 26% en ARN:ADN, posiblemente las diferencias se deben al tipo de estructura de los compuestos, ya que AA- β como cimaterol y clenbuterol son de acción más potente, ya que incrementan la masa muscular y provocan un impacto en la proliferación de material genético de las células satélite hacia las fibras musculares (O'Connor et al., 1991).

Cuadro 7. Cuantificación y relación de ADN, ARN total y proteína en el músculo *Longissimus thoracis* de corderos de pelo suplementados con ácido ferúlico y clorhidrato de zilpaterol.

	Control	AF300	AF600	CZ	EEM	Valor de P
ADN, ng/mg	8240.37	8937.87	7917.6	5735.75	1226.15	0.32
ARN, ng/mg	1825.53	1778.55	2077.19	2637.85	453.55	0.53
Proteína, µg/mg	224.06	210.56	213.94	210.97	7.61	0.57
ARN:ADN	0.24	0.20	0.34	0.50	0.12	0.35
Proteína:ARN	7.97	8.42	9.75	12.61	2.05	0.41
Proteína:ADN	36.81	42.91	36.85	27.42	5.93	0.36

Tratamientos: dieta basal sin aditivo (Testigo); dieta basal más 300 mg de AF/día (AF300); dieta basal más 600 mg de AF/día (AF600); dieta basal más clorhidrato de zilpaterol 6 mg/día (CZ). n=4.

Nivel de significancia $P < 0.05$.

EEM: error estándar de la media.

7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Los resultados de este estudio muestran que la suplementación con AF en ambas dosis en corderos presentaron un impacto similar en la ganancia de peso al AA- β clorhidrato de zilpaterol, y a pesar de no resultar significativa la conversión alimenticia, los tratamientos con AF y CZ la redujeron en un 14%, lo cual tiene un beneficio directo sobre los costos de alimentación. Sin embargo, solo CZ causó un aumento en el área del músculo LT en canal, lo que implica un mayor volumen en cortes.

Respecto a las determinaciones morfométricas de las fibras, los resultados coincidieron con el efecto promotor encontrado en la ganancia diaria de peso, donde los tratamientos AF y CZ causaron incrementos similares en el área de sección transversal de las fibras oxidativas, lo anterior se considera como una hipertrofia muscular.

Con base a los resultados de expresión génica en el músculo, se establece que los cambios a nivel productivo e histomorfométrico ocasionados por el CZ, son ocasionados por un reconocimiento de ésta molécula por los receptores β 2, lo cual activa el anabolismo en el animal. Por su parte, el efecto promotor encontrado con AF posiblemente no se debe a un mecanismo de tipo AA- β , ya que la abundancia en receptores β 2 tuvo una respuesta similar al Testigo. No obstante, se encontró una mayor cantidad de ARNm en MHC-I, situación por la cual puede sugerirse un efecto de hipertrofia muscular, ya sea mediante otros mecanismos como la activación de hormonas o anclaje en otros receptores.

En función de lo anterior, se puede concluir que la inclusión dietaria de AF en corderos de pelo puede ser una alternativa favorable para promover el crecimiento, sin causar detrimento en las características de la canal. No obstante, se recomienda realizar estudios más amplios con AF a nivel celular que incluyan por ejemplo, la evaluación del tipo de anclaje y activación de receptores β 1, activación de metabolitos secundarios y factores de transcripción. Esto con la finalidad de proporcionar mayores respuestas sobre el modo de acción y los cambios que ocurrieron con ácido ferúlico a nivel productivo, fibras musculares y expresión génica.

8. LITERATURA CITADA

- Aalhus, J. L., Schaefer, A. L., Murray, A. C., Jones, S. D. M. 1992. The effect of ractopamine on myofibre distribution and morphology and their relation to meat quality in swine. *Meat Sci.* 31(4): 397-409.
- Adam, A., Crespy, V., Levrat-Verny, M.-A., Leenhardt, F., Leuillet, M., Demigné, C., Rémésy, C. 2002. The bioavailability of ferulic acid is governed primarily by the food matrix rather than its metabolism in intestine and liver in rats. *J. Nutr.* 132(7): 1962-1968.
- Alam, M., Subhan, N., Hossain, H., Hossain, M., Reza, M., Rahman, M., Ullah, O. 2016. Hydroxycinnamic acid derivatives: a potential class of natural compounds for the management of lipid metabolism and obesity. *Nutr. Metab.* 13(1): 27.
- Anderson, D., Moody, D., Hancock, L. 2004. Beta adrenergic agonists. *Encyclopedia of Animal Science.* 104-107 pp.
- Anderson, J. E., Do, M. K. Q., Daneshvar, N., Suzuki, T., Dort, J., Mizunoya, W., Tatsumi, R. 2016. The role of semaphorin3A in myogenic regeneration and the formation of functional neuromuscular junctions on new fibres. *Biol. Rev.* 92(3): 1389-1405.
- Araujo-Febres, O., y Pietrosevoli, E. 1991. Estudio comparativo de implantes hormonales vs no hormonales en novillos comerciales a pastoreo con suplementación. *Rev. Fac. Agron.* 8: 209-217.
- Asaff, A., Macías, R., De la Torres, M. 2004. Proceso para la recuperacion de ácido ferúlico: Google Patents. Número: WO2004110975A1.
- Avendaño, L., Torres, V., Meraz, F., Pérez, C., Figueroa, F., Robinson, P. 2006. Effects of two b-adrenergic agonists on finishing performance, carcass characteristics, and meat quality of feedlot steers. *J. Anim. Sci.* 84: 3259-3265.
- Awede, B. L., Thissen, J.-P., Lebacqz, J. 2002. Role of IGF-I and IGFBPs in the changes of mass and phenotype induced in rat soleus muscle by clenbuterol. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 282(1): E31-E37.
- Baxa, T., Hutcheson, J., Miller, M., Brooks, J., Nichols, W., Streeter, M., Yates, D., Johnson, B. 2010. Additive effects of a steroidal implant and zilpaterol hydrochloride on feedlot performance, carcass characteristics, and skeletal muscle messenger ribonucleic acid abundance in finishing steers. *J. Anim. Sci.* 88(1): 330-337.
- Beermann, D., Butler, W., Hogue, D., Fishell, V., Dalrymple, R., Ricks, C., Scanes, C. 1987. Cimaterol-induced muscle hypertrophy and altered endocrine status in lambs. *J. Anim. Sci.* 65(6): 1514-1524.
- Beermann, D. H. 2002. Beta-Adrenergic receptor agonist modulation of skeletal muscle growth. *J. Anim. Sci.* 80(E-suppl_1): E18-E23.
- Benchaar, C., Calsamiglia, S., Chaves, A., Fraser, G., Colombatto, D., McAllister, T., Beauchemin, K. 2008. A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. *Anim. Feed Sci. Tech.* 145(1): 209-228.

- Borneman, W. S., Akin, D., VanEseltine, W. 1986. Effect of phenolic monomers on ruminal bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 52(6): 1331-1339.
- Bourne, L. C., Rice-Evans, C. 1998. Bioavailability of ferulic acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 253(2): 222-227.
- Brambilla, G., Cenci, T., Franconi, F., Galarini, R., Macrì, A., Rondoni, F., Strozzi, M., Loizzo, A. 2000. Clinical and pharmacological profile in a clenbuterol epidemic poisoning of contaminated beef meat in Italy. *Toxicol. Lett.* 114(1): 47-53.
- Cai, Y., Luo, Q., Sun, M., Corke, H. 2004. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sci.* 74(17): 2157-2184.
- Cardozo, P., Calsamiglia, S., Ferret, A., Kamel, C. 2006. Effects of alfalfa extract, anise, capsicum, and a mixture of cinnamaldehyde and eugenol on ruminal fermentation and protein degradation in beef heifers fed a high-concentrate diet. *J. Anim. Sci.* 84(10): 2801-2808.
- Coleman, M. E., DeMayo, F., Yin, K. C., Lee, H. M., Geske, R., Montgomery, C., Schwartz, R. J. 1995. Myogenic vector expression of insulin-like growth factor I stimulates muscle cell differentiation and myofiber hypertrophy in transgenic mice. *J. Biol. Chem.* 270(20): 12109-12116.
- Chang, M., Chen, J., Feng, Y. 1993. Pharmacokinetic study of ferulic acid in rats. *J Chin Med Mat.* 18: 300-304.
- Chaves, A., Stanford, K., Gibson, L., McAllister, T., Benchaar, C. 2008. Effects of carvacrol and cinnamaldehyde on intake, rumen fermentation, growth performance, and carcass characteristics of growing lambs. *Anim. Feed Sci. Tech.* 145(1): 396-408.
- Chen, J. H., Ho, C. 1997. Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compounds. *J. Agric. Food Chem.* 45(7): 2374-2378.
- Dávila-Ramírez, J. L., Macías-Cruz, U., Torrentera-Olivera, N., González-Ríos, H., Soto-Navarro, S., Rojo-Rubio, R., Avendaño-Reyes, L. 2014. Effects of zilpaterol hydrochloride and soybean oil supplementation on feedlot performance and carcass characteristics of hair-breed ram lambs under heat stress conditions. *J. Anim. Sci.* 92(3): 1184-1192.
- Domínguez-Vara, I. A., Mondragón-Ancelmo, J., Ronquillo, M. G., Salazar-García, F., Bórquez-Gastelum, J. L., y Aragón-Martínez, A. 2009. Los β -agonistas adrenérgicos como modificadores metabólicos y su efecto en la producción, calidad e inocuidad de la carne de bovinos y ovinos: una revisión. *CIENCIA ergo-sum*, 16(3): 278-284.
- Ebarb, S. M., Drouillard, J. S., Maddock-Carlin, K. R., Phelps, K. J., Vaughn, M. A., Burnett, D. D., Van Bibber-Krueger, C. L., Paulk, C. B., Grieger, D. M., Gonzalez, J. M. 2016. Effect of growth-promoting technologies on Longissimus lumborum muscle fiber morphometrics, collagen solubility, and cooked meat tenderness. *J. Anim. Sci.* 94(2): 869-881.
- Errecalde, C., Prieto, G., Lüders, C., y Ovando, H. G. 2003. Farmacos β -adrenergicos en produccion animal. Seguridad alimentaria y calidad carnica. Primer Congreso Argentino y Primer Congreso Mercosur de BPM-POES-HACCP, Argentina.
- Estrada-Angulo, A., Barreras-Serrano, A., Contreras, G., Obregon, J. F., Robles-Estrada, J. C., Plascencia, A., Zinn, R. A. 2008. Influence of level of zilpaterol chlorhydrate

- supplementation on growth performance and carcass characteristics of feedlot lambs. *Small Rum. Res.* 80: 107-110.
- Fajardo-Zapata, Á. L., Méndez-Casallas, F. J., y Molina, L. H. 2011. Residuos de fármacos anabolizantes en carnes destinadas al consumo humano. *Univ. Sci.* 16(1): 77-91.
- Finney, P. A., Donnelly, L. E., Belvisi, M. G., Chuang, T. T., Birrell, M., Harris, A., Mak, J. C., Scorer, C., Barnes, P. J., Adcock, I. M. 2001. Chronic systemic administration of salmeterol to rats promotes pulmonary β 2-adrenoceptor desensitization and down-regulation of G α . *Br. J. Pharmacol.* 132(6): 1261-1270.
- Flachowsky, G., Lebzien, P. 2012. Effects of phytogenic substances on rumen fermentation and methane emissions: A proposal for a research process. *Anim. Feed. Sci. Tech.* 176(1-4): 70-77.
- García-González, R., López, S., Fernández, M., González, J. S. 2006. Effects of the addition of some medicinal plants on methane production in a rumen simulating fermenter (RUSITEC). *International Congress Series*, 1293(0): 172-175.
- Glass, D. J. 2005. Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37(10): 1974-1984.
- González-Ríos, H., Valenzuela-Grijalva, N. V., Valenzuela-Melendres, M., y Torrescano, G. 2012. Efecto de la estrategia de implante con zeranol y maduración post-mortem sobre la fuerza de corte de la carne de corderos mestizos de pelo corto. *Revista Científica.* 22(003): 238-244.
- Gonzalez, J., Carter, J., Johnson, D., Ouellette, S., Johnson, S. 2007. Effect of ractopamine-hydrochloride and trenbolone acetate on longissimus muscle fiber area, diameter, and satellite cell numbers in cull beef cows. *J. Anim. Sci.* 85(8): 1893-1901.
- Gonzalez, J., Johnson, S., Stelzleni, A., Thrift, T., Savell, J., Warnock, T., Johnson, D. 2010. Effect of ractopamine-HCl supplementation for 28 days on carcass characteristics, muscle fiber morphometrics, and whole muscle yields of six distinct muscles of the loin and round. *Meat Sci.* 85(3): 379-384.
- Gorewit, R. 1983. Pituitary and thyroid hormone responses of heifers after ferulic acid administration. *J. Dairy Sci.* 66(3): 624-629.
- Gornall, A. G., Bardawill, C. J., David, M. M. 1949. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.* 177(2): 751-766.
- Guth, L., Samaha, F. J. 1970. Procedure for the histochemical demonstration of actomyosin ATPase. *Exp. Neurol.* 28(2): 365-367.
- Hadcock, J. R., Wang, H., Malbon, C. 1989. Agonist-induced destabilization of beta-adrenergic receptor mRNA. Attenuation of glucocorticoid-induced up-regulation of beta-adrenergic receptors. *J. Biol. Chem.* 264(33): 19928-19933.
- Hahn, G. 1999. Dynamic responses of cattle to thermal heat loads. *J. Anim. Sci.* 77(suppl_2): 10-20.
- Hay, N., y Sonenberg, N. 2004. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev.* 18(16): 1926-1945.

- Heitzman, R. 1979. The efficacy and mechanism of action of anabolic agents as growth promoters in farm animals. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 11(1): 927-930.
- Herrera R, Alejo ML, Asaff A. Methods to accelerate muscle development, decrease fat deposits, and enhance feeding efficiency in pigs. U.S. patent published in February 24, 2009, with number 20110046224. www.faqs.org/patents/app/20110046224
- Hong, J., Steiner, T., Aufy, A., Lien, T. 2012. Effects of supplemental essential oil on growth performance, lipid metabolites and immunity, intestinal characteristics, microbiota and carcass traits in broilers. *Livest. Sci.* 144(3): 253-262.
- Joassard, O. R., Durieux, A., Freyssenet, D. G. 2013. β 2-Adrenergic agonists and the treatment of skeletal muscle wasting disorders. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 45(10): 2309-2321.
- Jung, H.-J. G., Fahey, G. C., Merchen, N. R. 1983. Effects of ruminant digestion and metabolism on phenolic monomers of forages. *Br. J. Nutr.* 50(3): 637-651.
- Karg, H. 1989. Manipulation of growth. *Biotechnology for Livestock Production*, Plenum Press, New York and London, 18. 159-180 pp.
- Karlström, K., Essén-Gustavsson, B., Lindholm, A. Persson, S. 1991. Capillary supply in relation to muscle metabolic profile and cardiocirculatory parameters. *Equine Exerc. Physiol.* 3, 239–244.
- Kellermeier, J. D., Tittor, A. W., Brooks, J. C., Galyean, M. L., Yates, D. A., Hutcheson, J. P., Nichols, W. T., Streeter, M. N., Johnson, B. J., Miller, M. F. 2009. Effects of zilpaterol hydrochloride with or without an estrogen-trenbolone acetate terminal implant on carcass traits, retail cutout, tenderness, and muscle fiber diameter in finishing steers. *J. Anim. Sci.* 87(11): 3702-3711.
- Kikuzaki, H., Hisamoto, M., Hirose, K., Akiyama, K., Taniguchi, H. 2002. Antioxidant properties of ferulic acid and its related compounds. *J. Agric. Food Chem.* 50(7): 2161-2168.
- Kim, D., Kim, K., Choi, C., Kwon, E., Hong, S., Lee, S., Seol, Y., Yeo, J., Kim, W., Keum, J. 2010. Effects of a mixture of eugenol, thymol and malate on growth performance, beef quality and liver function in hanwoo finishing steers fed a high-concentrate diet. *J. Anim. Sci. Tech.* 52(6): 505-511.
- Kim, Y., Lee, Y., Dalrymple, R. 1987. Effect of the repartitioning agent cimaterol on growth, carcass and skeletal muscle characteristics in lambs. *J. Anim. Sci.* 65(5): 1392-1399.
- Koohmaraie, M., Shackelford, S. D., Muggli-Cockett, N. E., Stone, R. T. 1991. Effect of the beta-adrenergic agonist L644, 969 on muscle growth, endogenous proteinase activities, and postmortem proteolysis in wether lambs. *J. Anim. Sci.* 69(12): 4823-4835.
- Kopp, C., Singh, S. P., Regenhard, P., Müller, U., Sauerwein, H., Mielenz, M. 2014. Trans-cinnamic acid increases adiponectin and the phosphorylation of AMP-activated protein kinase through G-protein-coupled receptor signaling in 3T3-L1 adipocytes. *Int. J. Mol. Sci.* 15(2): 2906-2915.
- Kroon, P. A., Faulds, C. B., Ryden, P., Robertson, J. A., Williamson, G. 1997. Release of covalently bound ferulic acid from fiber in the human colon. *J. Agric. Food. Chem.* 45(3): 661-667.

- Kroon, P. A., Williamson, G. 1999. Hydroxycinnamates in plants and food: current and future perspectives. *J. Sci. Food Agric.* 79(3): 355-361.
- Kumar, A., Kanwar, S. S. 2011. Synthesis of ethyl ferulate in organic medium using celite-immobilized lipase. *Bioresour. Technol.* 102(3): 2162-2167.
- Kunkel, S. D., Suneja, M., Ebert, S. M., Bongers, K. S., Fox, D. K., Malmberg, S. E., Alipour, F., Shields, R. K., Adams, C. M. 2011. mRNA expression signatures of human skeletal muscle atrophy identify a natural compound that increases muscle mass. *Cell Metabol.* 13(6): 627-638.
- Lee, M. T., Lin, W. C., Yu, B., Lee, T. T. 2017. Antioxidant capacity of phytochemicals and their potential effects on oxidative status in animals -A review. *Asian-Australas J. Anim. Sci.* 30(3): 299-308.
- Lefaucheur, L., Milan, D., Ecolan, P., Le Callennec, C. 2004. Myosin heavy chain composition of different skeletal muscles in Large White and Meishan pigs. *J. Anim. Sci.* 82(7): 1931-1941.
- Li, S., Huang, K., Zhong, M., Guo, J., Wang, W., Zhu, R. 2010. Comparative studies on the interaction of caffeic acid, chlorogenic acid and ferulic acid with bovine serum albumin. *Spectrochim. Acta A. Mol Biomol Spectrosc.* 77(3): 680-686.
- Li, Y., Li, L., Li, J., Zhang, L., Gao, F., Zhou, G. 2015. Effects of dietary supplementation with ferulic acid or vitamin e individually or in combination on meat quality and antioxidant capacity of finishing pigs. *Asian-Australas J. Anim. Sci.* 28(3): 374.
- Liu, R. H. 2003. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *Am. J. Clin. Nutr.* 78(3): 517S-520S.
- Lo, H.-H., Chung, J. 1998. The effects of plant phenolics, caffeic acid, chlorogenic acid and ferulic acid on arylamine N-acetyltransferase activities in human gastrointestinal microflora. *Anticancer Res.* 19(1A): 133-139.
- López-Carlos, M., Ramírez, R., Aguilera-Soto, J., Aréchiga, C., Méndez-Llorente, F., Rodríguez, H., Silva, J. 2010. Effect of ractopamine hydrochloride and zilpaterol hydrochloride on growth, diet digestibility, intake and carcass characteristics of feedlot lambs. *Livest. Sci.* 131(1): 23-30.
- Lopez-Romero, J. C., Ansorena, R., Gonzalez-Aguilar, G. A., Gonzalez-Rios, H., Ayala-Zavala, J. F., Siddiqui, M. W. 2016. Chapter 5 Applications of Plant Secondary Metabolites in Food Systems Plant Secondary Metabolites, 3 Volume Set (pp. 195-232): Apple Academic Press.
- Lozano, M. C., y Arias, D. C. 2009. Residuos de fármacos en alimentos de origen animal: panorama actual en Colombia. *Rev. Colom. Cienc. Pec.* 21(1): 121-135.
- Macías-Cruz, U., Álvarez-Valenzuela, F., Torrentera-Olivera, N., Velázquez-Morales, J., Correa-Calderón, A., Robinson, P., Avendaño-Reyes, L. 2010. Effect of zilpaterol hydrochloride on feedlot performance and carcass characteristics of ewe lambs during heat-stress conditions. *Anim. Prod. Sci.* 50(10): 983-989.
- Macías-Cruz, U., Perard, S., Vicente, R., Álvarez, F., Torrentera-Olivera, N., González-Ríos, H., Soto-Navarro, S., Rojo, R., Meza-Herrera, C., Avendaño-Reyes, L. 2014. Effects of free ferulic acid on productive performance, blood metabolites, and carcass characteristics of feedlot finishing ewe lambs. *J. Anim. Sci.* 92(12): 5762-5768.

- Macías-Cruz, U., Vicente-Pérez, R., López-Baca, M. A., González-Ríos, H., Correa-Calderón, A., Arechiga, C. F., Avendaño-Reyes, L. 2018. Effects of dietary ferulic acid on reproductive function and metabolism of pre-pubertal hairbreed ewes during the anestrous season. *Theriogenology*, 119, 220-224.
- Mach, N., Bach, A., Velarde, A., Devant, M. 2008. Association between animal, transportation, slaughterhouse practices, and meat pH in beef. *Meat Sci.* 78(3): 232-238.
- Maeda, H., Dudareva, N. 2012. The shikimate pathway and aromatic amino acid biosynthesis in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 63: 73-105.
- Mak, J., Nishikawa, M., Shirasaki, H., Miyayasu, K., Barnes, P. J. 1995. Protective effects of a glucocorticoid on downregulation of pulmonary beta 2-adrenergic receptors in vivo. *J. Clin. Invest.* 96(1): 99-106.
- Marple, D. N., Mulvaney, D. R., McCarthy, F. D., Sartin, J. L., Claeys, M. C., Gore, M. T. 1989. Skeletal muscle protein synthesis and growth hormone secretion in young lambs treated with clenbuterol. *J. Anim. Sci.* 67(9): 2245-2254.
- Mersmann, H. 2002. Beta-adrenergic receptor modulation of adipocyte metabolism and growth. *J. Anim. Sci.* 80(Suppl 1): E24.
- Mersmann, H. J. 1998. Overview of the effects of beta-adrenergic receptor agonists on animal growth including mechanisms of action. *J. Anim. Sci.* 76(1): 160-172.
- Meskin, M. S., Bidlack, W. R., Davies, A. J., Omaye, S. T. 2002. *Phytochemicals in nutrition and health*: CRC press. 102 pp.
- Miller, E., Chung, K., Hutcheson, J., Yates, D., Smith, S., Johnson, B. 2012. Zilpaterol hydrochloride alters abundance of β -adrenergic receptors in bovine muscle cells but has little effect on de novo fatty acid biosynthesis in bovine subcutaneous adipose tissue explants *J. Anim. Sci.* 90(4): 1317-1327.
- Mizunoya, W., Okamoto, S., Miyahara, H., Akahoshi, M., Suzuki, T., Do, M. K. Q., Ohtsubo, H., Komiya, Y., Qahar, M., Waga, T. 2017. Fast-to-slow shift of muscle fiber-type composition by dietary apple polyphenols in rats: Impact of the low-dose supplementation. *Animal Sci. J.* 88(3): 489-499.
- Mohammadi, M., Abazari, M., Nourozi, M. 2006. Effects of Two Beta-Adrenergic Agonists on Adipose Tissue, Plasma Hormones and Metabolites of Moghani Ewes. *Small Rumin. Res.* 63.
- Moloney, A., Allen, P., Ross, D., Olson, G., Convey, E. 1990. Growth, feed efficiency and carcass composition of finishing Friesian steers fed the beta-adrenergic agonist L-644,969. *J. Anim. Sci.* 68(5), 1269.
- Mora, I. 2007. *Nutrición Animal* (E. EUNED Ed.). Costa Rica: Editorial EUNED.
- Morón-Fuenmayor, O., Zamorano García, L., Ysunza, F., y González Méndez, N. F. 2002. Efecto del clorhidrato de zilpaterol y la vitamina D3 sobre la calidad de la carne en novillas comerciales. *Revista Científica.* 12(6): 725-729
- Musarò, A., McCullagh, K., Paul, A., Houghton, L., Dobrowolny, G., Molinaro, M., Barton, E. R., Sweeney, H. L., Rosenthal, N. 2001. Localized Igf-1 transgene expression sustains hypertrophy and regeneration in senescent skeletal muscle. *Nature Genet.* 27(2): 195-200.

- Nachlas, M. M., Walker, D. G., Seligman, A. M. 1958. A histochemical method for the demonstration of diphosphopyridine nucleotide diaphorase. *J. Cell Biol.* 4(1): 29-38.
- Niño-Medina, G., Carvajal-Millán, E., Lizardi, J., Rascon-Chu, A., Marquez-Escalante, J. A., Gardea, A., Martinez-Lopez, A. L., Guerrero, V. 2009. Maize processing waste water arabinoxylans: Gelling capability and cross-linking content. *Food Chem.* 115(4): 1286-1290.
- Norma Oficial Mexicana-NOM-033-ZOO, 1995. Sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres. SAGARPA, México, DF.
- Norma Oficial Mexicana-NOM-051-ZOO. 1995. Trato humanitario en la movilización de animales. SAGARPA, México, DF.
- O'Connor, R. M., Butler, W. R., Finnerty, K. D., Hogue, D. E., Beermann, D. H. 1991. Acute and chronic hormone and metabolite changes in lambs fed the beta-agonist, cimaterol. *Domest. Anim. Endocrinol.* 8(4): 537-548.
- Olthof, M. R., Hollman, P. C., Katan, M. B. 2001. Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *J. Nutr.* 131(1): 66-71.
- Ou, S., Kwok, K. C. 2004. Ferulic acid: pharmaceutical functions, preparation and applications in foods. *J. Sci. Food Agric.* 84(11): 1261-1269.
- Paraskeuas, V., Fegeros, K., Hunger, C., Theodorou, G., Mountzouris, K. C. 2017. Dietary inclusion level effects of a phytogenic characterised by menthol and anethole on broiler growth performance, biochemical parameters including total antioxidant capacity and gene expression of immune-related biomarkers. *Anim. Prod. Sci.* 57(1): 33-41.
- Peña-Torres, E. 2014. Efecto de la suplementación de ácido ferúlico y ferulato de etilo sobre el comportamiento productivo y calidad de la carne de bovinos. (Tesis de Maestría en Ciencias). Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Hermosillo, México.
- Platt, J. P., Anderson, M. J., Johnson, B. J. (2012). The effect of ferulic acid on myogenic regulators of growth in bovine satellite cells. Texas Tech University.
- Pringle, T. D., Calkins, C. R., Koohmaraie, M., Jones, S. J. 1993. Effects over time of feeding a beta-adrenergic agonist to wether lambs on animal performance, muscle growth, endogenous muscle proteinase activities, and meat tenderness. *J. Anim. Sci.* 71(3): 636-644.
- Quintero, R., Avalos, A., y Ruelas, A. 1988. Crecimiento compensatorio en el borrego Pelibuey. *Rev Mex de Cienc Pecu.* 26(1), 8-15.
- Rathmann, R., Mehaffey, J., Baxa, T., Nichols, W., Yates, D., Hutcheson, J., Brooks, J., Johnson, B., Miller, M. 2009. Effects of duration of zilpaterol hydrochloride and days on the finishing diet on carcass cutability, composition, tenderness, and skeletal muscle gene expression in feedlot steers. *J. Anim. Sci.* 87(11): 3686-3701.
- Razzaghi-Asl, N., Garrido, J., Khazraei, H., Borges, F., Firuzi, O. 2013. Antioxidant properties of hydroxycinnamic acids: a review of structure-activity relationships. *Curr. Med. Chem.* 20(36): 4436-4450.
- Rehfeldt, C., Weikard, R., Reichel, K. 1994. The effect of the beta-adrenergic agonist clenbuterol on the growth of skeletal muscles of rats. *Archiv. Fur. Tierernahrung.* 45(4): 333-344.

- Rocha, L. D., Monteiro, M. C., Teodoro, A. J. 2012. Anticancer properties of hydroxycinnamic acids-A Review. *Cancer Clin. Oncol.* 1(2): 109-121.
- Rothwell, N. J., Stock, M. J., Sudera, D. K. 1987. Changes in tissue blood flow and β -receptor density of skeletal muscle in rats treated with the β 2-adrenoceptor agonist clenbuterol. *Br. J Pharmacol.* 90(3): 601-607.
- Ryall, J. G., Plant, D. R., Gregorevic, P., Sillence, M. N., Lynch, G. S. 2004. β 2-Agonist administration reverses muscle wasting and improves muscle function in aged rats. *J. Physiol.* 555(1): 175-188.
- Salinas-Chavira, J., Ramírez, R., Domínguez-Muñoz, M., Palomo-Cruz, R., López-Acuña, V. 2004. Influence of zilpaterol hydrochloride on growth and carcass characteristics of Pelibuey lambs. *J. Appl. Anim. Res.* 26(1): 13-16.
- Santiago, D. 1995. Residuos de fármacos en alimentos de origen animal. Aspectos regulatorios, analíticos y toxicológicos. *Almirez*, 4, 9-32.
- Sato, S., Nomura, S., Kawano, F., Tanihata, J., Tachiyashiki, K., Imaizumi, K. 2008. Effects of the beta 2-Agonist Clenbuterol on Beta 1 and beta. 2-Adrenoceptor mRNA expressions of rat skeletal and left ventricle muscles. *J. Pharmacol. Sci.* 107(4): 393-400.
- Serna, P. 2012. Impacto de la suplementación de ácido ferúlico sobre la calidad de la carne de bovinos comerciales. (Tesis de Maestría en Ciencias). Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Hermosillo, México.
- SIAP-SAGARPA. 2015. Panorama de la Carne y Lana de Ovino. México. Recuperado de: http://infosiap.siap.gob.mx/anpecuario_siapx_gobmx/ResumenNacional.do
- SIAP. 2012. Resumen Nacional. Producción, precio, valor, animales sacrificados y peso 2012. Recuperado de: <http://www.siap.gob.mx/ganaderia-resumen-nacional-pecuario/>
- Sissom, E., Reinhardt, C., Hutcheson, J., Nichols, W., Yates, D., Swingle, R., Johnson, B. 2007. Response to ractopamine-HCl in heifers is altered by implant strategy across days on feed. *J. Anim. Sci.* 85(9): 2125-2132.
- Smith, S. B., Garcia, D. K., Anderson, D. B. 1989. Elevation of a Specific mRNA in Longissimus Muscle of Steers Fed Ractopamine. *J. Anim. Sci.* 67(12): 3495-3502.
- Soberon, M., Cherney, D., Cherney, J. 2012. Free ferulic acid uptake in ram lambs. *J. Anim. Sci.* 90(6): 1885-1891.
- Soberon, M., Cherney, J., Liu, R., Ross, D., Cherney, D. 2012. Free ferulic acid uptake in lactating cows. *J. Dairy Sci.* 95(11): 6563-6570.
- Strydom, P., Frylinck, L., Montgomery, J., Smith, M. 2009. The comparison of three β -agonists for growth performance, carcass characteristics and meat quality of feedlot cattle. *Meat Sci.* 81(3): 557-564.
- Stryer, L. 1996. *Bioquímica*. Cap. 13. Cascada de transducción de Señales. México, D. F.: Editorial Reverté.
- Sumano, H., Ocampo, L., y Gutiérrez, L. 2002. Clenbuterol y otros β -agonistas, ¿una opción para la producción pecuaria o un riesgo para la salud pública?. *Vet. Mex.* 33(2): 137-159

- te Pas, M. F., Everts, M., Haagsman, H. 2004. Muscle development of livestock animals: physiology, genetics and meat quality: CABI publishing.
- Teleman, A. A., Hietakangas, V., Sayadian, A. C., Cohen, S. M. 2008. Nutritional control of protein biosynthetic capacity by insulin via Myc in *Drosophila*. *Cell Metabol.* 7(1): 21-32.
- Tsou, M., Hung, C., Lu, H., Wu, L., Chang, S., Chang, H., Chen, G., Chung, J. 1999. Effects of caffeic acid, chlorogenic acid and ferulic acid on growth and arylamine N-acetyltransferase activity in *Shigella sonnei* (group D). *Microbios.* 101(398): 37-46.
- Valenzuela-Grijalva, N. 2017. *Ácido ferúlico como promotor de crecimiento en cerdos: Mecanismos y efectos sobre la deposición de tejido muscular.* (Tesis doctorado). Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Hermosillo, México.
- Valenzuela-Grijalva, N. V., Pinelli-Saavedra, A., Muhlia-Almazan, A., Domínguez-Díaz, D., González-Ríos, H. 2017. Dietary inclusion effects of phytochemicals as growth promoters in animal production. *J. Anim. Sci. Tech.* 59(1): 2-17.
- Vallejos, A., Zaragoza, J. C., y Parres, J. A. 2007. Intoxicación por clenbuterol”. *Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica.* 18, 24.
- Virgili, F., Pagana, G., Bourne, L., Rimbach, G., Natella, F., Rice-Evans, C., Packer, L. 2000. Ferulic acid excretion as a marker of consumption of a French maritime pine (*Pinus maritima*) bark extract. *Free Radic. Biol. Med.* 28(8): 1249-1256.
- Walker, D. K., Titgemeyer, E. C., Sissom, E. K., Brown, K. R., Higgins, J. J., Andrews, G. A., Johnson, B. J. 2007. Effects of steroidal implantation and ractopamine-HCl on nitrogen retention, blood metabolites and skeletal muscle gene expression in Holstein steers. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 91(9-10), 439-447.
- Wallukat, G. 2002. The β -adrenergic receptors. *Herz,* 27(7): 683-690.
- Wheeler, T., Koohmaraie, M. 1992. Effects of the beta-adrenergic agonist L644, 969 on muscle protein turnover, endogenous proteinase activities, and meat tenderness in steers. *J. Anim. Sci.* 70(10): 3035-3043.
- Windisch, W., Schedle, K., Plitzner, C., Kroismayr, A. 2008. Use of phytogetic products as feed additives for swine and poultry. *J. Anim. Sci.* 86(14 Suppl): E140-E148.
- Yang, W., Ametaj, B., Benchaar, C., He, L., Beauchemin, K. 2010. Cinnamaldehyde in feedlot cattle diets: Intake, growth performance, carcass characteristics, and blood metabolites. *J. Anim. Sci.* 88: 1082–1092.
- Yang, Y. T., McElligott, M. A. 1989. Multiple actions of beta-adrenergic agonists on skeletal muscle and adipose tissue. *Biochem. J.* 261(1): 1-10.
- Yoo, K. M., Lee, C., Lo, Y. M., Moon, B. 2012. The hypoglycemic effects of American red ginseng (*Panax quinquefolius* L.) on a diabetic mouse model. *J. Food Sci.* 77(7): H147-H152.
- Zhao, Z., Moghadasian, M. H. 2008. Chemistry, natural sources, dietary intake and pharmacokinetic properties of ferulic acid: a review. *Food Chem.* 109(4): 691-702.
- Zhao, Z., Moghadasian, M. H. 2010. Bioavailability of hydroxycinnamates: a brief review of in vivo and in vitro studies. *Phyto. Rev.* 9(1): 133-145.

Zimmerli, U., Blum, J. 1990. Acute and longterm metabolic, endocrine, respiratory, cardiac and skeletal muscle activity changes in response to perorally administered β -adrenoceptor agonists in calves. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 63(1-5): 157-172.