

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 975 437**

51 Int. Cl.:

A23K 10/30	(2006.01)
A23K 20/111	(2006.01)
A23K 20/163	(2006.01)
A23K 50/10	(2006.01)
A23K 50/30	(2006.01)
A61K 31/353	(2006.01)
A61K 31/7048	(2006.01)
A61P 37/02	(2006.01)
A61K 31/352	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.02.2020 PCT/EP2020/054479**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **27.08.2020 WO20169733**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.02.2020 E 20705977 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.02.2024 EP 3927177**

54 Título: **Flavonoides y rendimiento y salud animal**

30 Prioridad:

21.02.2019 EP 19382127

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.07.2024

73 Titular/es:

**HEALTHTECH BIO ACTIVES, S.L.U. (100.0%)
Avenida Diagonal 567, Planta 4
08029 Barcelona, ES**

72 Inventor/es:

**CRESPO MONTERO, FRANCISCO JAVIER;
PANIAGUA JIMÉNEZ, MONTSERRAT;
ARÍS GIRALT, ANNA y
DEVANT GUILLE, MARIA**

74 Agente/Representante:

CONTRERAS PÉREZ, Yahel

ES 2 975 437 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Flavonoides y rendimiento y salud animal

La solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud de Patente Europea 19382127.9 presentada el 21 de febrero del 2019.

CAMPO TÉCNICO

La presente invención se refiere al uso de naringina, su forma aglicona, naringenina, o mezclas de estos en la modulación de la expresión de algunos receptores génicos específicos en los rumiantes y/o cerdos que impactan de forma positiva en el comportamiento de alimentación, patrones de ingesta y comportamiento del animal.

ESTADO DE LA TÉCNICA

Los fitoquímicos son sustancias químicas encontradas en los vegetales y frutas comestibles. Tienen importantes funciones en las plantas, actúan como moléculas protectoras de agentes dañinos (insectos, bacterias...) o situaciones estresantes (UV, temperatura, falta de agua...). De lo contrario, los fitoquímicos han mostrado actividades biológicas y efectos saludables en humanos y animales.

Los flavonoides son polifenoles que han sido estudiados en profundidad, y las frutas cítricas son consideradas la mayor fuente de flavonoides, que contienen un amplio rango de estos fitoquímicos. Algunos de estos compuestos tienen propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y antimicrobianas. Debido a sus capacidades interesantes, los flavonoides de diferentes fuentes están siendo estudiados para diferentes aplicaciones en la producción animal. Bioflavex® CA (Interquim, S.A., España) es un extracto de naranja amarga (*Citrus aurantium*) cuyo principal flavonoide es la naringina. La naringina es una flavanona glicosilada clasificada en el tipo neohesperidósido, con una neohesperidosa (ramnosil- α -1,2 glucosa) unida a su estructura básica como una flavanona. Otros extractos que contienen naringina han demostrado tener efectos beneficiosos para regular el pH del rumen en el vacuno de engorde, así como reducir la producción de metano in vitro de novillos alimentados con dietas altas en concentrado. Las propiedades de la naringina pueden afectar la microflora del rumen, aumentar la concentración de la bacteria que consume ácido láctico tal como la *Megasphaera elsdenii* lo que da como resultado un pH ruminal mayor, y una depresión de las comunidades de arqueas metanogénicas (número de solicitud PCT WO2013156574). La composición de ácidos grasos volátiles de rumen (VFA) también ha sido modificada, aumentando la proporción molar de ácido propiónico. Dado que el ácido propiónico es un regulador importante de ingesta de alimento en los rumiantes alimentados con dietas altas en almidón, lo cual afecta tanto la saciedad como el hambre, la complementación de flavonoides podría afectar el patrón de alimentación de los toros alimentados con dietas altas en concentrado. Además, esta complementación podría reducir la producción de metano, y junto con las fluctuaciones de pH ruminal reducido podría aumentar la eficiencia del uso de nutrientes en novillos.

Sin embargo, los mecanismos donde los flavonoides de citrus pueden modular la alimentación y el comportamiento del animal son desconocidos. La naringina es el flavonoide responsable del sabor amargo típico en algunas frutas cítricas, por lo cual otro mecanismo posible puede estar relacionado con el sabor amargo, uno de los cinco sabores básicos (dulce, salado, amargo, ácido y umami) percibido por los humanos y los animales. Estudios recientes han demostrado que los receptores del sabor, que incluyen los receptores del sabor amargo (TAS2R), son expresados en el tracto gastrointestinal, que incluye los rumiantes y porcinos. Por lo tanto, los receptores amargos pueden modular el patrón de alimentación de los animales, al reducir los tamaños de las comidas grandes, mejorar los parámetros de salud del epitelio digestivo y aumentar el bienestar del animal como resultado. El tracto gastrointestinal de nutrición puede tener un impacto en el comportamientos del animal al modular sus comportamientos sexuales y agresivos, así como los comportamientos no nutritivos orales, dado que hay una conexión entre el tracto digestivo y el sistema nervioso central, también conocido como eje intestino-cerebro donde la microbiota digestiva tiene un papel fundamental.

Se han propuesto varias soluciones hasta el momento en la técnica para mejorar el comportamiento y, como consecuencia, el bienestar en los animales. Sin embargo, es difícil obtener sustancias naturales que posean efectos a largo plazo en los animales, dado que los animales parecen acostumbrarse a estas, y como consecuencia desaparecen sus efectos positivos con el tiempo.

US2010/291239A1 divulga el uso de naringina para mejorar la fermentación ruminal.

US2010/136161 un pienso que contiene por lo menos naringina dihidrochalcona para mejorar el apetito o el rendimiento en el ganado.

Finalmente, Wibke S.U. Roland et al. en Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 61, páginas 10454-10466 divulga la activación del receptor amargo hTAS2R39 en humanos debido a la naringina. Meyerhof Wolfgang et al. en

Chemical Senses, IRL Press, Oxford, GB, 2010, vol. 35, nº 2, páginas 157-170 divulga que la naringina no provoca ninguna respuesta en algunos hTAS2Rs en humanos. Tepper Beverly J et al. en Annals of the New York Academy of Sciences, 2009, vol. 1170. páginas 126-139 habla de la percepción de sabor de zumo de pomelo con naringina. US2015/362481 divulga el uso de naringina como compuesto de sabor amargo (o antagonista amargo), porque activa algunos receptores amargos humanos.

Por lo tanto, existe una necesidad en la técnica de nuevos métodos, que sean capaces de proporcionar modulación dirigida de la expresión génica de algunos receptores génicos específicos implicados en el eje intestino-cerebro, a saber, receptores de sabor amargo y receptores de inmunidad, que impactan de forma positiva en el comportamiento de alimentación, microflora de los intestinos, respuesta inflamatoria y comportamiento animal.

Además, es un objeto de la invención proporcionar composiciones de alimento para animales alternativas que comprendan compuestos de origen natural y que sean seguras para su uso en la producción ganadera y eficaces para mejorar el comportamiento de alimentación y su impacto en los desajustes digestivos, el comportamiento animal y, por lo tanto, el bienestar de los animales.

Los problemas anteriores han sido abordados en la presente invención y realizaciones específicas de esta.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 representa interacciones agonistas de toros alimentados con dietas altas en concentrado con o sin complemento de Bioflavex® CA.

La Figura 2 representa interacciones agonistas de toros alimentados con dietas altas en concentrado con o sin complemento de Bioflavex® CA.

La Figura 3 representa interacciones sexuales de toros alimentados con dietas altas en concentrado con o sin complemento de Bioflavex® CA.

La Figura 4 representa la relación de la expresión génica relativa en rumen de toros Holstein alimentados con dietas altas en concentrado complementadas o no con Bioflavex CA después de 168 días de tratamiento.

La Figura 5 representa la relación de expresión génica relativa de TAS2R en el yeyuno de cerditos después de 7 días de ser alimentados con dos dietas que corresponden a T1: dieta basal y T2: T1 + extracto de naranja amarga (300g/Tm).

La Figura 6 representa la relación de expresión génica relativa en el duodeno de toros Holstein alimentados con dietas altas en concentrado complementadas o no con Bioflavex CA después de 168 días de tratamiento.

RESUMEN DE LA INVENCION

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un uso no terapéutico de naringina, naringenina o mezclas de estas para la modulación dirigida de la expresión génica de al menos un receptor de sabor amargo y/o al menos un receptor del eje de intestino-cerebro para modificar el patrón de alimentación y rumia en rumiantes o para la modulación dirigida de la expresión génica de al menos un receptor de sabor amargo para modificar el patrón de alimentación en cerdos, en el que el uso no terapéutico comprende administrar naringina, naringenina o mezclas de estas, en el que la cantidad de naringina, naringenina o mezclas de estas se administra como una mezcla con el pienso, en el que dicha composición de pienso comprende por lo menos un 0,005% p/p de naringina o la cantidad equimolar de naringenina o de una mezcla de naringina y naringenina si las dos están presentes.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a naringina, naringenina o mezclas de estas para el uso en la modulación de la expresión génica de al menos un gen relativo a la inmunidad en rumiantes y/o cerdos, en el que dicho producto se administra como una mezcla con pienso, en el que dicha composición de pienso comprende por lo menos un 0,005% p/p de naringina o de una cantidad equimolar de naringenina o de una mezcla de naringina y naringenina si las dos están presentes.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se refiere al uso de naringina, su forma aglicona, naringenina, o mezclas de estos en la modulación de la expresión de algunos receptores génicos específicos en los rumiantes y/o cerdos que impactan de forma positiva el comportamiento de alimentación, patrones de ingesta y comportamiento del animal.

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un uso no terapéutico para la modulación dirigida de la expresión génica de al menos un receptor de sabor amargo y/o al menos un receptor del eje de intestino-cerebro, en rumiantes y/o cerdos, que comprende administrar naringina, naringenina o mezclas de estas.

El término “modulación dirigida de expresión génica” tal como se usa en la presente pretende incluir una reducción de la expresión génica, así como una amplificación de dicha expresión génica.

5 Los autores de la presente invención han hallado ahora que la naringina, naringenina o mezclas de estas administradas a rumiantes y/o cerdos, modifican de forma considerable la expresión de algunos genes en el epitelio del rumen en el caso de los rumiantes o intestino en el caso de cerdos implicados en la percepción del sabor, inflamación y mecanismos de interferencia de intestino-cerebro. Este efecto explica las diferencias observadas en el patrón de alimentación y comportamiento animal en rumiantes y/o cerdos.

10

Además, también se halló de forma sorprendente que los rumiantes complementados con naringina, naringenina o mezclas de estas modificaron su patrón de alimentación al reducir los tamaños de comidas grandes y pasar más tiempo comiendo paja y los parámetros de salud de la pared del rumen mejoraron. Además, también se observó que los rumiantes complementados con naringina, naringenina o mezclas de estas redujeron el comportamiento agonista y las interacciones sexuales.

15

Receptor del sabor amargo

En una realización de la presente invención, el receptor del sabor amargo se selecciona del grupo que consiste en TAS2R7, TAS2R16, TAS2R38 y TAS2R39.

20

Los receptores del sabor fueron inicialmente descubiertos en las papilas gustativas en la lengua y diferentes partes de la cavidad oral. Recientemente, muchos estudios describen la presencia de receptores de sabor para los gustos básicos (dulce, amargo, umami, ácido y salado) a través del cuerpo, que incluye el sistema respiratorio y tracto gastrointestinal. Este sistema gustativo periférico tendría la función de saborear el contenido luminal del tracto digestivo, y regular la expresión de los transportadores de nutrientes, absorción de nutrientes y también la liberación de las hormonas del intestino y neurotransmisores implicados en la regulación de la función gastrointestinal, alimentación y saciedad.

25

Las moléculas amargas accionan la liberación de hormonas anorexigénicas y péptidos, como la colecistoquinina (CCK), neuropéptido Y (NPY), y el péptido YY (PYY). Esto sería una respuesta lógica, ya que el sabor amargo se ha relacionado generalmente con la presencia de toxinas, y se considera que tiene un valor negativo. Por lo tanto, la activación de una respuesta anorexigénica en el tracto digestivo sería una respuesta adaptiva a este sabor. La alimentación y el comportamiento del animal podrían estar relacionados. Se ha descrito que algunas estrategias nutricionales que se enfocaron en aumentar el tiempo dedicado a comer redujeron el comportamiento agresivo y anormal en los animales.

30

Los autores de la presente invención hallaron que los toros complementados con naringina, naringenina o mezclas de estas dedicaron más tiempo a comer concentrado o rumiar durante el procedimiento de escaneo visual. Ver, por ejemplo, comportamiento animal descrito en el Ejemplo 1 (Tablas 7 y 8). Por lo tanto, los animales que dedican más tiempo a eventos de alimentación tenían menos tiempo para realizar otro comportamiento, tan agresivo como las interacciones sexuales. En la presente, los receptores del sabor amargo en el tracto digestivo juegan un importante papel al modular el comportamiento de la alimentación y en consecuencia el comportamiento del animal. Además, de forma sorprendente, la complementación de flavonoides modificó la expresión génica de todos los receptores del sabor amargo analizados en la pared de rumen (TAS2R7, TAS2R16, TAS2R38, y TAS2R39), como se puede ver en el Ejemplo 1 (Tabla 11) así como en el epitelio del duodeno, como se puede ver en el Ejemplo 3 (Figura 6). Aunque la naringina tiene un sabor amargo característico, es rápidamente desglicosilada por las enzimas en naringenina, y la microflora de rumen es capaz de degradar la naringina en naringenina también. Contrario a la naringina, la naringenina actúa como una importante molécula que enmascara lo amargo, y esta propiedad es conocida en la industria de alimentos, principalmente por su uso en las bebidas (US 8685436). Se ha descrito cómo algunos flavanones actúan como antagonistas reales para el receptor del sabor amargo humano TAS2R39, que reduce la respuesta del receptor posiblemente mediante mecanismo ortostérico que actúa sobre un solo bolsillo de unión del receptor del sabor amargo. El Ejemplo 1 y el Ejemplo 3 mostraron una reducción en la expresión génica de los cuatro receptores del sabor amargo analizados en toros complementados con flavonoides de citrus (TAS2R7, TAS2R16, TAS2R38, y TAS2R39). Estos resultados coincidirían con la función de la naringenina como una molécula de enmascaramiento amargo, que actúa como antagonista para diferentes receptores del sabor amargo diferentes al mismo tiempo. Esta reducción en la expresión génica de los receptores del sabor amargo analizados podría estar relacionada con el mayor tiempo dedicado a comer observado en toros alimentados con Bioflavex®. Por lo tanto, la complementación con flavonoides de citrus en toros modula el patrón de alimentación que actúa regulando los receptores del sabor amargo expresados en la pared del rumen y el duodeno, y como consecuencia modifican la liberación de hormonas y péptidos bioactivos implicados en el hambre y la saciedad. Por lo tanto, los flavonoides de citrus pueden actuar como moléculas que enmascaran lo amargo en el rumen, y los toros complementados con estos flavonoides dedicaron más tiempo para comer, y realizaron menos interacciones sexuales y agonistas.

35

40

45

50

55

60

En el caso de los cerdos, cuando los flavonoides de citrus sfueron agregados al alimento de los cerditos destetados la expresión génica de todos los receptores del sabor amargo analizados (TAS2R7, TAS2R16, TAS2R38, y TAS2R39) fueron mayores en el yeyuno en comparación con animales no complementados como se puede ver en el Ejemplo 2, Figura 5.

5

El término "flavonoides" tal como se usa en la presente se refiere a una clase de pigmentos vegetales solubles en agua que producen pigmentación amarilla o roja/azul en pétalos. El término "flavanonas" se refiere a un tipo de flavonoides. Las flavanonas están generalmente glucosiladas por un disacárido en la posición siete para proporcionar "glucósidos de flavanonas".

10

Receptor del eje intestino-cerebro

En otra realización de la presente invención, el receptor del eje intestino-cerebro se selecciona del grupo que consiste en FFAR2, FFAR3, PPYR1 y CCKBR.

15 El eje de intestino-cerebro ha sido propuesto como una red de comunicación entre el sistema digestivo y el cerebro, y puede afectar el comportamiento en humanos y otros animales. Se ha sugerido que el rumen podría estar implicado en la interferencia entre el sistema digestivo y el cerebro en el ganado bovino, y modificar el comportamiento sexual y agresivo del animal podría estar implicado en esta modulación del comportamiento. Observaron que la dieta modificaba la expresión de diferentes genes (FFAR3, PPYR1, ADRA2C, occluding y TNF α)

20 en rumen de ganado alimentado con dietas altas en concentrado que pueden estar implicadas en el eje de intestino-cerebro. Estos autores sugirieron que el rumen podría tener un papel importante en la interferencia entre el sistema digestivo y el cerebro, y modificar el comportamiento sexual y agresivo del animal. De manera sorprendente, los resultados de la presente invención han mostrado un claro descenso en la expresión génica de receptores relacionados con neurotransmisores, como CCKBR (actúa como CCK y receptor de gastrina) y PPYR (actúa como

25 NPY y receptor de PYY) en toros complementados con flavonoides, como se puede ver en el Ejemplo 1 (Tabla 11) y Ejemplo 3 (Figura 6). Estos resultados estarían de acuerdo con la reducción en la expresión de los receptores del sabor amargo analizado en la pared del rumen y duodeno de estos animales, dado que estos receptores están implicados en la liberación de estas moléculas anorexigénicas.

30 En otra realización de la presente invención, la expresión génica de al menos uno de dicho receptor se reduce. En una realización preferida de la presente invención, la expresión génica de al menos uno de dicho receptor se reduce al menos por un 20 %, preferentemente se reduce al menos por un 30 %, más preferentemente se reduce al menos por un 40 %.

35 Como se muestra en los ejemplos más adelante, los inventores han hallado de forma sorprendente que la expresión de receptores del sabor amargo y los receptores del eje intestino-cerebro se ven reducidos de forma considerable al administrarle a rumiantes una composición de pienso de acuerdo con la presente invención con respecto a aquellos no alimentados con tal composición.

40 El término "rumiante" tal como se usa en la presente se refiere a cualquier mamífero Artiodactyla del suborden Ruminantia. Dichos mamíferos mastican el bolo alimenticio y tienen un estómago de cuatro compartimientos, uno de los cuales es el rumen. El grupo incluye, entre otros, bovinos, búfalos, ovejas, ciervos, camellos, cabras y antílopes. El término "bovinos" se debería entender que incluye vacas, terneros y toros. En otra realización de la presente invención, los rumiantes del primer aspecto son bovinos, búfalos, ovejas, ciervos, camellos, cabras o antílopes. En

45 una realización preferida de la presente invención, dichos rumiantes son bovinos.

El término "cerdo" tal como se usa en la presente se refiere a cualquier mamífero de la familia de los suidos. Dichos suidos son animales robustos con ojos pequeños y cabello grueso a veces escaso. Todos tienen bozales que terminan en un disco de cartílago redondeado que se usa para hurgar en busca de alimento. Algunas especies

50 tienen colmillos. Los suidos son omnívoros y generalmente gregarios. El grupo incluye, entre otros, cerdos, cerdos salvajes o domésticos, porcinos y jabalíes. En otra realización de la presente invención, los cerdos del primer aspecto son cerdos salvajes o domésticos, porcinos o jabalíes.

La cantidad de naringina, naringenina o mezclas de estas se administra como una mezcla con pienso, donde dicha

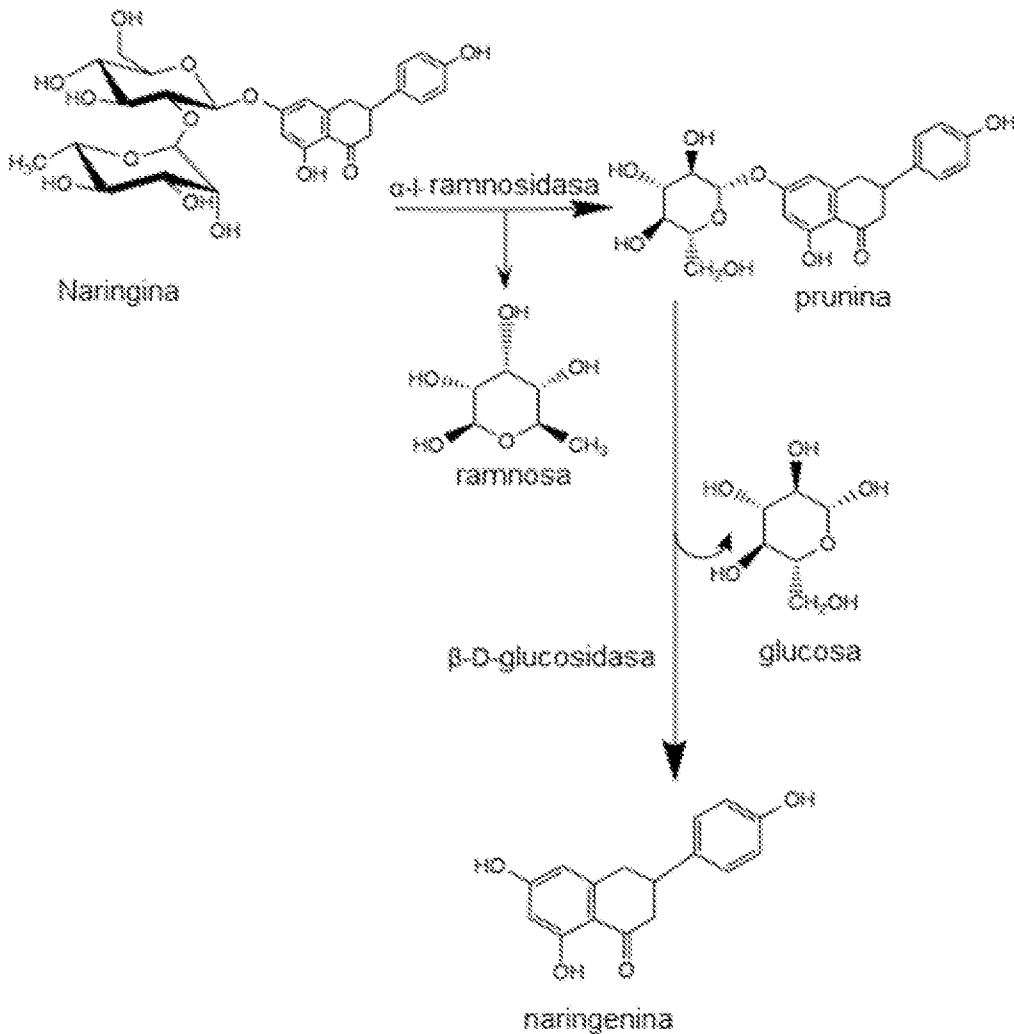
55 composición de pienso comprende al menos un 0,005 % p/p de naringina o la cantidad equimolar de naringenina o de una mezcla naringina y naringenina si ambas están presentes.

En una realización preferida de la presente invención, dicha composición de pienso comprende al menos un 0,01% p/p de naringina o la cantidad equimolar de naringenina o de una mezcla naringina y naringenina si ambas están

60 presentes cuando se administra a rumiantes.

En otra realización preferida de la presente invención, dicha composición de pienso comprende al menos un 0,0075 % p/p de naringina o la cantidad equimolar de naringenina o de una mezcla naringina y naringenina si ambas están presentes cuando se administra a cerdos.

- 5 La naringina es una flavanona-7-O-glucósido entre la flavanona naringina y el disacárido neohesperidosa. La naringina flavonoide ocurre de forma natural en las frutas cítricas, especialmente en el pomelo, mientras que la naringina es responsable por el sabor amargo de la fruta. En la producción de jugo de pomelo comercial, la enzima naringinasa se puede usar para quitar el amargor creado por la naringina. En los humanos la naringina se metaboliza hasta la naringenina aglicona (no amarga) mediante la naringinasa presente en los intestinos. La naringinasa es un complejo de multienzimas que posee centros activos de α -L-ramnosidasa y β -d-glucosidasa. Esto sucede en dos etapas, primero, la naringina se hidroliza mediante una actividad de α -L-ramnosidasa de naringinasa respecto a ramnosa y prunina. La prunina formada luego se hidroliza mediante actividad β -d-glucosidasa naringinasa en naringenina y glucosa (ver el Esquema 1). La naringinasa es una enzima que tiene una aparición amplia en la naturaleza y es producida por muchos microorganismos principalmente hongos, levadura y bacteria. Mientras que los glucósidos se pueden escindir mediante lactasa-floridina hidrolasa intestinal o β -glucosidasa de células epiteliales del intestino delgado, no existe α -L-ramnosidasa humana o rutinosidasa y la biodisponibilidad de la ramnosa que contiene flavonoides es completamente dependiente de su escisión mediante microbiota intestinal. En los cerdos, estas enzimas también se pueden encontrar en los intestinos. Sin embargo, en los rumiantes se encuentran en el rumen.
- 10
- 15
- 20



Esquema 1. Hidrólisis de la naringina mediante naringinasa para proporcionar naringenina.

- 25 La naringenina tiene la estructura esqueleto de una flavanona con tres grupos hidroxilo en los carbonos 4', 5 y 7. Se pueden encontrar ambos en la forma de aglicol, naringenina, o en su forma glicosídica, naringina, que tiene la adición del disacárido neohesperidosa mediante un enlace glicosídico en el carbono 7.

Esta cantidad equimolar de naringina o de una mezcla de naringina y naringenina se pretende, por ejemplo, la cantidad de naringenina equivalente en % p/p respecto a naringina considerando el peso molecular. Por ejemplo, el 0,01 % p/p de naringina será equivalente a un 0,0053 % p/p de naringenina.

5

En otra realización preferida de la presente invención, dicha composición de pienso se administra en forma de pasta o gránulos.

La manera de alimentación no está restringida a ninguna en particular, y la composición de pienso de la presente invención se puede proporcionar al esparcir sobre el pienso compuesto, o se puede alimentar después que la composición de pienso presente se mezcle con el pienso compuesto.

La forma de la composición de pienso de acuerdo con la presente invención no está restringida a ninguna en particular y puede ser en cualquier forma de una composición de pienso convencional, tal como polvo o pasta y un gránulo. Además, dicha composición de pienso se puede producir de acuerdo con el método generalmente empleado para producir un pienso compuesto y un complemento alimenticio.

La composición de acuerdo con la presente invención puede contener otros ingredientes alimenticios tal como vitaminas, enzimas, sales minerales, cereales molidos, componentes que contienen proteína, componentes que contienen carbohidratos, harinas y/o salvados de trigo.

La composición de pienso de la presente invención puede ser cualquier tipo de pienso para animales, cuyas composiciones posibles son bien conocidas por los expertos en la técnica, diseñados de acuerdo con requisitos nutricionales de los animales específicos y el período de edad específico. Por ejemplo, un pienso para crías de cerdo contiene típicamente cereales, tal como maíz, trigo, soja, cebada o avena; diferentes fuentes de proteína, tal como harina de pescado, harina de soja y plasma animal, por ejemplo; aminoácidos, tal como metionina, treonina, valina, triptófano, arginina, histidina o leucina; así como vitaminas y minerales para cumplir los requisitos de crecimiento de las crías de cerdo (U.S. National Research Council, NRC, 2012).

En otra realización de la presente invención, la naringina, naringenina o mezclas de estas se administran en una dosis diaria de 0,001 a 0,01 g de naringina por kg de peso corporal del animal o la cantidad equimolar de naringenina o de una mezcla naringina y naringenina si ambas están presentes. En una realización preferida de la presente invención, la naringina, naringenina o mezclas de estas se administran en una dosis diaria de 0,002 a 0,003 g de naringina por kg de peso corporal del animal o la cantidad equimolar de naringenina o de una mezcla naringina y naringenina si ambas están presentes.

En otra realización de la presente invención, la naringina, naringenina o mezclas de estas se encuentran en forma de un extracto de planta natural.

En otra realización preferida de la presente invención, dicho extracto de planta natural es extracto de naranja amarga. En otra realización preferida de la presente invención, dicho extracto de naranja amarga comprende adicionalmente al menos un glucósido de flavanona que se selecciona del grupo que consiste en neohesperidina, isonaringina, poncirina, hesperidina y mezclas de estos.

En otra realización preferida de la presente invención, dicho extracto de naranja amarga es una mezcla que comprende un 20 a 35 % p/p de naringina, un 10 % a 20 % p/p de neohesperidina y un 0,5 % a 5 % p/p de poncirina, preferentemente, dicho extracto de naranja amargo comprende un 21 a 30 % p/p de naringina, un 11 a 18 % p/p de neohesperidina y un 1 a 5 % p/p de poncirina, más preferentemente dicho extracto de naranja amarga comprende un 25 a 27 % p/p de naringina, un 11 a 15 % p/p de neohesperidina y un 1 a 3 % p/p de poncirina. En un caso particular, dicho extracto de planta natural se encuentra comercialmente disponible (Bioflavex®).

Por lo tanto, de acuerdo con la presente invención, la naringina, naringenina o mezclas de estas de la presente invención se pueden obtener de una planta, más particularmente, de una planta cítrica. Todos los productos de acuerdo con la presente invención son productos de origen natural y fáciles de obtener.

55

El término "cítrico" tal como se usa en la presente se refiere a una planta del género Citrus. Ejemplos de dicha planta cítrica incluye Citrus maxima (Pomelo), Citrus medica (citrón) Citrus reticulata (Mandarina), Citrus aurantium (naranja agria), Citrus latifolia (limón persa), Citrus limon (limón) Citrus paradisi (pomelo), Citrus sinensis (naranja dulce), Citrus trifoliata (naranjo trifoliado), etc.

60

Los métodos para el aislamiento de flavonoides de plantas son conocidos en la técnica. En un caso particular, el extracto de naranja amarga se puede obtener de frutas cítricas molidas (especialmente Citrus aurantium) mediante métodos ordinarios conocidos por el experto en la técnica tal como extracción, filtración, concentración, precipitación,

aclarado y secado final. Los procesos de extracción se pueden realizar en sistemas de agua/alcohol binarios, donde el alcohol se selecciona de metanol, etanol, propanol y similares. El metanol se usa preferentemente. A modo de un ejemplo ilustrativo, no taxativo, 50 g de naranja amarga seca se extrajo con 300 ml de metanol. La suspensión se centrifuga para separar el residuo y el licor madre se concentra al vacío hasta un volumen final de 50 ml. El líquido
5 resultante se deja estar a temperatura ambiente durante cinco días, se filtra para separar el material insoluble, se concentra, se filtra nuevamente a través de un lecho de tierra diatomea y se seca por atomización.

En una realización particular, dicha flavanona se puede obtener de la fruta de una planta cítrica. Por ejemplo, la naringina es una flavanona glucosilada obtenida de la cáscara de algunas frutas cítricas tal como pomelo (Citrus
10 paradise) y naranja amarga (Citrus aurantium). También se encuentra en la pulpa de la fruta y en las hojas, flores y semillas de la planta. Métodos ilustrativos, no taxativos para el aislamiento de los flavonoides de acuerdo con la presente invención son, por ejemplo, aquellos descritos en los documentos US2421063A y US2421062A donde se describe un método para la recuperación de naringina del material de la planta. Además, la hesperidina se puede obtener de acuerdo con los métodos descritos en los documentos US2442110A, US2348215A y US2400693A.
15 Asimismo, la neohesperidina se puede obtener de acuerdo con el método descrito en el documento US3375242A. US3375242A describe un método para producir neohesperidina donde la naringina se reacciona con isovanilina para producir chalcona de neohesperidina. Esta chalcona luego se cicla para proporcionar neohesperidina.

De manera adicional, las flavononas de la composición de la presente invención se pueden obtener fácilmente dado que se encuentran comercialmente disponibles. Por ejemplo, como se muestra en los ejemplos que acompañan la presente invención, isonaringina, neoeritrocina y poncirina se compran de INDOFINE Chemical Company, Inc (EUA).
20 Además, tal como se describe anteriormente, dicho extracto de planta natural de acuerdo con la presente invención se encuentra comercialmente disponible (Bioflavex®).

25 En otra realización de la presente invención, dicho extracto de naranja amarga se administra en una dosis diaria de 0,005 g por kg de peso corporal del animal a 0,02 g por kg de peso corporal del animal, preferentemente dicho extracto de naranja amarga se administra en una dosis diaria de 0,01 g por kg de peso corporal del animal.

En una realización adicional de la presente invención, comprende administrar naringina, naringenina o mezclas de estas a un rumiante y/o cerdos durante al menos 5 días. En una realización preferida de la presente invención,
30 comprende administrar naringina, naringenina o mezclas de estas a cerdos durante al menos 10 días. En otra realización preferida, comprende administrar naringina, naringenina o mezclas de estas a rumiantes durante al menos 15 días.

35 Genes relacionados con el sistema inmunitario

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a naringina, naringenina o mezclas de estas para su uso en la modulación de la expresión génica de al menos un gen relativo a la inmunidad en rumiantes y/o cerdos.

El término "modulación de expresión génica" tal como se usa en la presente pretende incluir una reducción de la expresión génica, así como una amplificación de dicha expresión génica. También se podría entender que tal modulación de la expresión génica podría tener como resultado también una modulación de la producción de al menos un gen relacionado con el sistema inmunitario en rumiantes y/o cerdos. Por lo tanto, una reducción de la expresión génica de cualquier gen relacionado con el sistema inmunitario tendrá como resultado una reducción de la producción de dicho gen y además una modulación de la inflamación.
40

Además, los autores de la presente invención encontraron que la complementación con flavonoides cítricos claramente reducía la expresión génica de los receptores relacionados con la inflamación en la pared del rumen de los toros. Se ha sugerido que la inflamación juega un papel importante en el comportamiento y el bienestar del animal, posiblemente por la interferencia en el eje del intestino-cerebro. La inflamación podría estar implicada en una
50 disminución de los niveles de serotonina en el suero, debido al aumento en el uso del triptófano de aminoácidos para producir quinurina. La serotonina es un neurotransmisor que juega un rol importante dentro del eje intestino-cerebro y una reducción en los comportamientos agresivos. De manera adicional, los inhibidores de recaptación de serotonina selectivos (que aumentan la serotonina extracelular) se han relacionado con la reducción en la libido y problemas sexuales en los humanos. IL-25 es producida por una variedad de células, que incluyen células
55 inmunitarias y no inmunitarias (epiteliales y endoteliales) y puede potenciar la inflamación alérgica. Defensina-β es un péptido antimicrobiano, y tiene efectos moduladores en procesos inmunitarios adaptivos e innatos en los mamíferos. Por lo tanto, el Ejemplo 1 (ver Tabla 11) y el Ejemplo 3 muestran que la complementación con flavonoides cítricos redujo la expresión génica de estas moléculas pro-inflamatorias, y esto podría llevar a una reducción en la respuesta inflamatoria y la inflamación en la pared del rumen y el duodeno. De manera adicional, la
60 naringenina actúa como un antioxidante potente y su efecto antiinflamatorio es de acuerdo con la técnica previa. Además, los resultados obtenidos, tal como se enumera en la Tabla 7 y 8, muestran que las interacciones sexuales y agresivas en los toros complementados con flavonoides cítricos se redujeron, y los datos de la expresión génica del rumen respaldaban que la reducción de la inflamación del rumen podría ser un papel clave en esta respuesta.

En resumen, la regulación de la ingesta de concentrado (tiempo dedicado a comer) junto con la inflamación y otros mecanismos de interferencia intestino-cerebro en la pared del rumen están implicados en la mejora del comportamiento del animal y bienestar de los animales, complementados con flavonoides cítricos.

5 El término "bienestar animal" tal como se usa en la presente incluye tres elementos: El funcionamiento biológico normal del animal (que, entre otras cosas, significa asegurar que el animal esté saludable y bien alimentado), su estado emocional (que incluye la ausencia de emociones negativas, tal como dolor y miedo crónico), y su capacidad de expresar determinado comportamiento normal. Eso, sin embargo, no todo comportamiento es igualmente importante en términos de bienestar animal. Desde un punto de vista práctico, la indicación más clara que un comportamiento dado es importante es si el animal muestra una respuesta de estrés o exhibe comportamiento anormal cuando se evita que lo realice. Un comportamiento de nidificación de preparto de una cerda o el comportamiento de forrajeo de los cerdos son ejemplos de tal comportamiento importante. Estos tres principios no necesariamente se contradicen entre sí; de hecho, generalmente se complementan.

15 En una realización del segundo aspecto, el gen relacionado con el sistema inmunitario se selecciona del grupo que consiste en IL-6, IL-8, IL-10, IL-25, y β -defensina.

20 En otra realización del segundo aspecto, la expresión génica de al menos uno de dicho receptor se reduce. En una realización preferida de la presente invención, la expresión génica de al menos uno de dicho receptor se reduce al menos por un 20 %, preferentemente se reduce al menos por un 30 %, más preferentemente se reduce al menos por un 40 %.

25 Como se muestra en los ejemplos más adelante, los inventores han hallado de forma sorprendente que la expresión de genes relacionados con el sistema inmunitario se ve reducida de forma considerable al administrarle a rumiantes una composición de pienso de acuerdo con la presente invención con respecto a aquellos no alimentados con tal composición.

30 En otra realización del segundo aspecto, dichos rumiantes son bovinos, búfalos, ovejas, ciervos, camellos, cabras o antílopes. En una realización preferida de la presente invención, dichos rumiantes son bovinos.

En otra realización del segundo aspecto, dichos cerdos son cerdos salvajes o domésticos, porcinos o jabalíes.

35 El producto se administra como una mezcla con pienso, donde dicha composición de pienso comprende al menos un 0,005 % p/p de naringina o la cantidad equimolar de naringenina o de una mezcla naringina y naringenina si ambas están presentes. El producto pretende incluir naringina, naringenina o mezclas de estas.

40 En una realización preferida del segundo aspecto, dicha composición de pienso comprende al menos un 0,01% p/p de naringina o la cantidad equimolar de naringenina o de una mezcla naringina y naringenina si ambas están presentes cuando se administra a los rumiantes.

45 En otra realización preferida del segundo aspecto, dicha composición de pienso comprende al menos un 0,0075 % p/p de naringina o la cantidad equimolar de naringenina o de una mezcla naringina y naringenina si ambas están presentes cuando se administra a cerdos.

En otra realización preferida del segundo aspecto, dicha composición de pienso se administra en forma de pasta o gránulos.

50 En otra realización del segundo aspecto, el producto se administra en una dosis diaria de 0,001 a 0,01 g de naringina por kg de peso corporal del animal o la cantidad equimolar de naringenina o de una mezcla naringina y naringenina si ambas están presentes. En una realización preferida del segundo aspecto, el producto se administra en una dosis diaria de 0,002 a 0,003 g de naringina por kg de peso corporal del animal o la cantidad equimolar de naringenina o de una mezcla naringina y naringenina si ambas están presentes.

55 En otra realización del segundo aspecto, dicho producto se encuentra en forma de un extracto de planta natural. En otra realización preferida del segundo aspecto, dicho extracto de planta natural es extracto de naranja amarga. En otra realización preferida, dicho extracto de naranja amarga comprende adicionalmente al menos un glucósido de flavanona que se selecciona del grupo que consiste en neohesperidina, isonaringina, poncirina, hesperidina y mezclas de estos.

60 En otra realización preferida del segundo aspecto, dicho extracto de naranja amarga es una mezcla que comprende un 20 a 35 % p/p de naringina, un 10 % a 20 % p/p de neohesperidina y un 0,5 % a 5 % p/p de poncirina, preferentemente, dicho extracto de naranja amargo comprende un 21 a 30 % p/p de naringina, un 11 a 18 % p/p de

neohesperidina y un 1 a 5 % p/p de poncirina, más preferentemente dicho extracto de naranja amarga comprende un 25 a 27 % p/p de naringina, un 11 a 15 % p/p de neohesperidina y un 1 a 3 % p/p de poncirina.

En otra realización del segundo aspecto, dicho extracto de naranja amarga se administra en una dosis diaria de 0,005 g por kg de peso corporal del animal a 0,02 g por kg de peso corporal del animal, preferentemente dicho extracto de naranja amarga se administra en una dosis diaria de 0,01 g por kg de peso corporal del animal.

En una realización adicional del segundo aspecto, comprende administrar dicho producto a un rumiante y/o cerdos durante al menos 5 días. En una realización preferida del segundo aspecto, comprende administrar dicho producto a los cerdos durante al menos 10 días. En otra realización preferida, comprende administrar dicho producto a rumiantes durante al menos 15 días.

En una realización adicional del segundo aspecto se refiere a la naringina, naringenina o mezclas de estas para su uso en el tratamiento o prevención de enfermedades que tienen una respuesta inflamatoria en rumiantes y/o cerdos.

Las principales enfermedades neurológicas inflamatorias causadas por bacterias en rumiantes son: listeriosis, leptomeningitis supurativa y meningoencefalitis, abscesos en médula espinal y cerebrales, empiema basilar y neurotuberculosis.

20 EJEMPLOS

La presente invención ahora se describirá en mayor detalle con referencia a los siguientes Ejemplos, que no deberían ser considerados como taxativos del alcance de la presente invención.

25 **Ejemplo 1: Efecto de flavonoides en rendimiento, comportamiento animal y expresión génica de rumen en toros alimentados con dietas altas en concentrado.**

Materiales y métodos

Animales, alimentación, alojamiento y diseño experimental

Este estudio se llevó a cabo de acuerdo con las normas españolas para la protección de los animales con fines experimentales (Decreto Real 53/2013 del 1 de febrero en la protección de los animales usados para experimentación u otros fines científicos; Boletín Oficial del Estado, 2013). Ciento cuarenta y cuatro toros Holstein ($164,8 \pm 5,91$ kg de peso corporal (BW, por sus siglas en inglés) y $135 \pm 7,2$ días de edad) fueron engordados en condiciones comerciales en una granja (Granja l'Alzina, L'Alzina, Lleida). Los animales fueron asignados de forma aleatoria en uno de ocho corrales totalmente cubiertos (12 por 6 m) con lechos gruesos de paja y equipados con un comedero de tres espacios (1,50 m de longitud, 0,40 m de ancho, 1,50 m de altura y 0,35 m de profundidad). El comedero de cada corral pesaba el concentrado de forma continua tal como se describe en Verdú et ál. (2017), y estos datos se registraron para calcular el consumo de concentrado por corral.

Los corrales también se equiparon con un bebedero (0,30 m longitud, 0,30 m ancho, 0,18 m profundidad) y un medidor de agua que registra el consumo diario de agua por corral. Se ofreció paja ad libitum en un comedero de paja separado (3,60 m de longitud, 1,10 m de ancho, y 0,32 m de profundidad), y cada vez que se reemplazó se registró para estimar el consumo de paja total. Dado que la paja también se usó para los lechos, estos datos son solo una estimación.

Consumo de alimento y rendimiento

Los animales fueron alimentados un concentrado comercial en forma de harina, formulado para cumplir los requisitos nutricionales de los animales (NRC, 2001). Los primeros 112 días del estudio, los animales fueron alimentados una fórmula de concentrado de crecimiento, y entre los 112 días al final del estudio, los animales fueron alimentados un concentrado finalizador. Los ingredientes y composición nutricional de los concentrados se muestran en la Tabla 1. A lo largo del estudio, los animales tenían acceso ad libitum a paja de trigo (3,5 % CP, 1,6 % de extracto de éter, 70,9 % NDF, y 6,1 % de ceniza; base de DM) y agua fresca.

Tabla 1. Ingredientes y composición de nutrientes de los concentrados alimenticios.

Artículo	Crecimiento	Terminación
Ingredientes, %		
Harina de grano de maíz	39,97	45,09
Harina de grano de cebada	17,98	15,55
DDG	17,98	15,02

Artículo	Crecimiento	Terminación
Ingredientes, %		
Trigo	10,97	11,03
Pulpa de remolacha	7,39	8,02
Aceite de palma	2,00	2,50
Carbonato de calcio	1,55	1,28
Urea	0,80	0,40
Bicarbonato de sodio	0,50	0,40
Fosfato de dicalcio	0,36	0,31
Premezcla de vitaminas	0,30	0,20
Sal	0,20	0,20
Nutrientes, en base a materia seca (DM)		
UFc/kg	1,18	1,06
Proteína en bruto (CP), %	15,73	12,26
Extracto de éter (EE), %	5,82	5,41
Ceniza, %	5,60	4,38
NDF, %	17,80	15,11
TDN, %	88,19	79,02
PDIE, g/kg	101,6	88,1
PDIN, g/kg	100,7	79,9
NFC, %	55,05	51,23

DM: materia seca; UFc: Unidad de cultivos de forraje de carne; CP: proteína en bruto; NDF: Fibra de detergente neutral; TDN: Nutrientes digestivos totales; PDIE: Proteína digerida en el intestino (proteína digerida en el intestino delgado cuando la energía fermentable del rumen es limitada) – Energía; PDIN: Proteína digerida en el intestino (proteína digerida en el intestino delgado cuando el nitrógeno fermentable del rumen es limitado) – Nitrógeno; NFC: Carbohidratos que no son fibra.

Los animales fueron asignados de forma aleatoria a uno de 8 corrales, y se asignaron a uno de los dos tratamientos (4 corrales por tratamiento), ya sea control (C) o complementados (BF) con un 0,04 % de extracto de naranja amarga (*Citrus aurantium*) de la fruta entera rica en naringina, >20 % (Bioflavex® CA, Interquim, S.A., Barcelona, España).

Los animales fueron pesados de forma individual cada 14 días a lo largo del estudio en 12 períodos experimentales de 14 días, durante los primeros 8 períodos (de 1 a 112 días) los animales consumieron el concentrado de crecimiento y durante los últimos 4 períodos (de 113 a 168 días) y durante los días antes de ser sacrificados los animales consumieron el concentrado de terminación (ver la Tabla 1). Después de 168 días de estudio, los toros fueron transportados al matadero (Escorxador del Grup Alimentari Guissona, Guissona, España), ubicado a 15 km de la granja. Los animales fueron sacrificados en dos semanas, 4 corrales por semana, dos corrales de toros C y dos de toros BF. El tiempo de espera antes de ser sacrificados fue menos de 6 horas. Los animales fueron pesados antes de ser cargados. Fueron sacrificados por prácticas comerciales y acorde a la Regulación EU 1099/2009 sobre la protección de animales al momento de ser matados o sacrificados. Se registró el peso de la carcasa caliente (HCW, por su sigla en inglés) de cada animal.

Comportamiento del animal

Se realizó un procedimiento de escaneo visual en los días 15, 30, 43, 57, 71, 85, 94, 112, 127, 141, 155, y 170 del estudio para estudiar la actividad general (estando de pie, recostado, comiendo, bebiendo, y rumiando) y el comportamiento social (no agonista, agonista e interacciones sexuales) de los animales en cada corral. Las actividades de comportamiento social se registraron tal como se describe en la Tabla 2. La observación visual se

realizó para 2 corrales al mismo tiempo de 8:00 a 10:30 h de la mañana, tal como se describe en Mach et al. (2008), Rotger et al. (2006), Robles et al. (2007), y Martí et al. (2010). Las actividades generales se puntuaron usando muestras de 3 escaneos de intervalos de 10 s a 5 minutos, y el comportamiento social se puntuó durante tres períodos de muestreos continuos de 5 min. Este procedimiento de escaneo de 15 min se repitió dos veces consecutivas en cada corral, comenzando de forma aleatoria en un corral diferente cada día de escaneo. Este método describe un comportamiento exhibido por un animal en un intervalo de tiempo fijo.

Tabla 2. Descripción de las categorías de comportamiento social registradas.

Interacciones	Artículo	Definición
Interacciones agonistas	Autoacicalamiento	Lamida no estereotipada de su propio cuerpo, rascado con un miembro trasero o contra las instalaciones.
	Comportamiento social	Lamer, empujar con el hocico o golpear con los cuernos a un toro vecino.
	Comportamiento nutritivo	Lamer o morder partes de las instalaciones sin fines nutritivos.
	Peleas	Cuando los toros empujan de forma vigorosa cabeza con cabeza.
Interacciones agonistas	Embestidas	Cuando un toro empuja de forma vigorosa su cabeza contra cualquier parte del cuerpo de otro toro.
	Desplazamiento	Cuando un toro comienza a empujarse entre 2 otros toros o entre un toro y cualquier equipamiento.
	Persecución	Cuando un toro sigue rápido o corre detrás de otro toro.
	Arremetimiento	Cuando un toro empuja a un animal que está descansando y lo obliga a levantarse.
Interacciones sexuales	Flehmen	Labio superior invertido.
	Intento de montada	Cabeza en el lomo de otro animal.
	Montadas completas	Miembros delanteros en el lomo de otro animal.
Estereotipias	Estereotipias orales	Enrollar la lengua, lamida estereotipada o morder cualquier equipamiento

10

Calidad de la carcasa

Después de ser sacrificados, el peso de carcasa caliente (HCW) se registró para cada animal. El porcentaje de terminación se calculó al dividir el HCW por el peso corporal (BW) registrado antes de ser sacrificado. Y, de acuerdo con las categorías (S)EUROP descritas por la reglamentación EU n.º 1208/81 y 1026/91, se clasificó la conformación de las carcasas, donde "E" corresponde a una conformación excelente, "U" a una conformación muy buena, "R" a una conformación buena, "O" a una conformación razonable y "P" a una conformación mediocre. La cubierta de grasa se clasificó de acuerdo con la regulación EU n.º 1208/81, que usa un sistema de clasificación por números, 1.2.3.4.5, donde 5 significa un grado muy elevado de grasa que cubre y depósitos de grasa pesada en la cavidad torácica, y 1 se clasifica como un grado bajo, sin cubierta de grasa.

20

Evaluación macroscópica de hígado y rumen en recolección de muestras

El rumen y el hígado de cada animal se evaluó de forma macroscópica en el matadero. Los rúmenes se clasificaron dependiendo del color mediante evaluación visual de 1 a 5, donde "5" es un rumen de color negro y "1" es un rumen de color blanco (González et al., 2001). También se dividieron en áreas de acuerdo con Lesmeister et al. (2004) para examinar la presencia de úlceras, regiones sin pelo, y de pupilas agrupadas (Nocek et al., 1984). Los abscesos del hígado se clasificaron de acuerdo con Brown et al. (1975).

25

De manera adicional, se muestreó una sección de 1-cm² de cada sitio de rumen y se enjuagó 2 veces con PBS enfriado después del muestreo e inmediatamente incubado en ARN después (Invitrogen, Madrid, España) para conservar la integridad del ARN. Después de 24 horas de incubación con ARN después a 4 °C, el líquido se quitó y el tejido se congeló a -80 °C hasta la extracción adicional de ARN y posterior análisis de expresión génica.

30

Análisis químico y biológico

Se muestreó una sección de 1-cm² de cada sitio de rumen y se enjuagó 2 veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) enfriada después del muestreo e inmediatamente incubado en ARN después (Invitrogen, Madrid,

35

España) para conservar la integridad del ARN. Después de 24 horas de incubación con ARN después a 4 °C, el líquido se quitó y el tejido se congeló a -80 °C hasta la extracción adicional de ARN y posterior análisis de expresión génica.

5 Durante este estudio, las muestras de concentrado se recolectaron en los días 0, 42, 84, 126 y 168 días y se analizó en busca de materia seca (DM) (24 h a 103 °C), ceniza (4 h a 550 °C), proteína en bruto (CP) mediante el método Kjeldahl (método 981.10; AOAC, 1995), fibra de detergente ácido (ADF, por su sigla en inglés) y fibra de detergente neutral (NDF, por su sigla en inglés) de acuerdo con Van Soest et al. (1991) usando sulfito de sodio y alfa-amilasa, y extracto de éter (EE) mediante Soxhlet con una hidrólisis de ácido previo (método 920.39; AOAC, 1995).

10

La naringina se determinó para cada muestra como un marcador Bioflavex® CA para el grupo BF, y se usó como un análisis de control de calidad para garantizar la adición correcta del producto en el alimento por el Laboratorio de Interquim S.A. Se usó el método interno para la cuantificación de naringina mediante el uso de HPLC desarrollado por Interquim S.A. (Paniagua et al., 2018).

15

Para los análisis de expresión génica, el ARN total se extrajo de los tejidos de pared de rumen usando Trizol (Invitrogen). Al ARNm aislado se le realizó una transcripción inversa a ADNc usando un kit de reactivo PrimeScript RT (Takara, Frankfurt, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. La pureza de ARN se evaluó mediante un instrumento de NanoDrop (ThermoFisher, Madrid, España) a 260, 280 y 230 nm. La cuantificación de la expresión de genes que codifican 1) genes que codifican la producción, expresión, y rotación de neurotransmisores: receptor de ácido graso libre 2 (FFAR2) y receptor de ácido graso libre 3 (FFAR3), receptor de polipéptido pancreático 1 (PPYR1); genes del receptor de colecistoquinina B (CCKBR) 2) que codifican citocinas proinflamatorias o citocina IL-25 (IL25) y péptidos antimicrobianos liberados por las células intestinales, β -defensinas, y 3) receptores del sabor amargo tipo 2 miembro 7, 16, 38 y 39 (TAS2R7, TAS2R16, TAS2R38 y TAS2R39) se realizaron mediante PCR cuantitativa (qPCR) mediante codificación génica para la Subunidad de la proteína ribosómica 9 (RPS9) como un gen constitutivo, que se evaluó para ver su estabilidad conforme a Vandesompele et al. (2002) en comparación con genes que codifican α -actina (ACTB), la proteína de transcripción expresada de forma ubicuita (UXT) y deshidrogenasa de gliceraldehído 3-fosfato (GAPDH). Las condiciones qPCR para cada conjunto de cebadores se optimizaron de forma individual. La especificidad de la amplificación se evaluó mediante la identificación de una sola banda en el peso molecular esperado en geles de agarosa de ADN al 0,8 % y un solo pico en la curva de fusión. La eficiencia se calculó al amplificar las diluciones 1:10 seriales de cada amplicón génico. Una curva estándar de punto de cruzamiento (Cq) versus el logaritmo de la concentración se graficó para obtener la eficiencia, que se calculó usando la fórmula $10^{1/\text{pendiente}}$, con un rango aceptable de 1,8 a 2,2. Se usó un volumen de reacción total de 20 μ L que contiene 50 ng de ADNc, 10 μ L de SYBR Premix EXtaq (TliRNaseH) (Takara, Frankfurt, Alemania) y la concentración del cebador optimizado para cada gen. Las reacciones de qPCR se ciclaron de la siguiente manera: una etapa de desnaturalización inicial de 10 min a 95 °C seguido por 40 ciclos de 10 s a 95 °C, 15 s a temperatura de hibridación optimizada para cada gen, 30 s a 72 °C, y una extensión final de 10 min a 72 °C. Los valores Cq resultantes se usaron para calcular la expresión relativa de genes seleccionados por cuantificación relativa usando un gen de referencia (gen constitutivo) y un calibrador de grupo de control.

40

La concentración de ácidos grasos volátiles ruminales (VFA) se analizó con una columna semicapilar (15 m mediante 0,53 mm i.d., grosor de película 0,5- μ m, TRB-FFAP; Teknokroma, Barcelona, España) compuesta de 100 % polietilenglicol esterificado con ácido nitrotereftálico, de fase unida y reticulada (método número 5560) usando un CP-3800-GC (Varian, Inc., Walnut Creek, CA).

45

Resultados

Salud animal

50 Dos animales del grupo de control (grupo C) no terminaron el estudio debido a problemas de cojera, y fueron retirados antes del día 168. Un animal del grupo tratado con BF® CA (grupo BF o toros BF) que terminó el estudio también fue retirado de la base de datos debido a problemas de salud crónica. Todos los datos de estos animales fueron quitados de la base de datos.

Ingesta y consumo de agua, rendimiento y calidad de la carcasa

55 No se encontraron diferencias estadísticas a través del estudio para la ingesta de concentrado entre los tratamientos (Tabla 3), ni durante la fase de crecimiento (Tabla 4) ni para la fase de terminación (Tabla 5). En la misma forma, el estimado del consumo de paja no mostró diferencias estadísticas durante todo el estudio (Tabla 3), ni para la fase de crecimiento (Tabla 4) ni para la fase de terminación (Tabla 5). El consumo de agua tampoco se vio afectado por tratamientos a través del estudio (Tabla 3), ni durante el crecimiento (Tabla 4) ni para la fase de terminación (Tabla 60 5).

5 Tabla 3. Rendimiento, ingesta de concentrado y comportamiento de alimentación de 0 d a 168 días de edad para los toros Holstein alimentados con dietas altas en concentrado complementadas con BIOFLAVEX® CA.

Artículo	Tratamiento ¹			valor P ²		
	Control	BF® CA	SEM ⁴	T	Tiempo	T x Tiempo
Edad inicial, d	134,25	135,22	0,215	0,002		
Edad final, d	302,02	303,22	0,677	0,25		
BW inicial, kg	165,03	164,64	5,906	0,96		
BW final (168 d de estudio), kg	436,34	439,48	1,849	0,28		
CV, %	8,10	8,91	0,764	0,46	<,0001	0,34
ADG, kg/d	1,62	1,64	0,011	0,19	<,0001	0,57
CV, %	27,60	26,85	1,564	0,74	<,0001	0,61
Ingesta de DM de concentrado						
Medio, kg/d	7,21	7,04	0,126	0,37	<,0001	0,51
CV, %	10,93	11,32	0,623	0,66	0,0002	0,97
FCR, kg/kg	5,36	5,11	0,108	0,10	<,0001	0,03

¹ Control = no complementado, BF® CA = concentrado complementado con BIOFLAVEX® CA al 0,04 %.

² T = efecto de tratamiento; Tiempo = efecto de tiempo (período de 14 días); T x Tiempo = tratamiento por efecto de interacción de tiempo.

10 ³ ADG = aumento diario promedio

⁴SEM = error estándar de los medios de los datos transformados por logaritmo

15 Tabla 4. Rendimiento, ingesta de concentrado y comportamiento de alimentación de 4 a 9 meses de edad para los toros Holstein alimentados con dietas altas en concentrado complementadas con BIOFLAVEX® CA.

Artículo	Tratamiento ¹			valor P ²		
	Control	BF® CA	SEM	T	Tiempo	T x Tiempo
Edad inicial, d	134,25	135,22	0,215	0,002		
Edad final, d	246,16	247,22	0,689	0,32		
BW inicial, kg	165,03	164,64	5,906	0,96		
BW final (168 d de estudio), kg	360,34	360,27	1,282	0,97		
CV, %	8,65	9,37	0,773	0,54	<,0001	0,34
ADG, kg/d	1,75	1,75	0,011	0,97	<,0001	0,58
CV, %	19,98	22,15	0,934	0,11	0,0011	0,29
Ingesta de DM de concentrado						
Medio, kg/d	6,83	6,60	0,143	0,26	<,0001	0,46
CV, %	10,53	11,29	0,700	0,45	0,0002	0,95

Tabla 6. La calidad de la carcasa de los toros Holstein alimentados con dietas altas en concentrado complementadas con BIOFLAVEX® CA.

5

Artículo	Tratamiento ¹			valor P ²
	Control	BF® CA	SEM	T
Edad antes de ser sacrificados, d	313,38	314,75	0,916	0,29
Días en estudio, d	179,37	179,53	0,431	0,80
BW antes de ser sacrificados, kg	450,39	452,62	3,154	0,62
Peso de carcasa caliente, kg	237,60	239,92	2,019	0,42
Porcentaje de terminación, %	52,80	53,07	0,326	0,56
Gordura, %				-
1				
2				
3	100	100		
Conformación ³ , %				0,37
P	91,43	84,93		
O	8,57	13,70		
R	0	1,37		
U				

¹ Control = no complementado, BF® CA = concentrado complementado con BIOFLAVEX® CA al 0,04 %.

² T = efecto de tratamiento; Tiempo = efecto de tiempo (período de 14 días); T x Tiempo = tratamiento por efecto de interacción de tiempo.

10 ³ Conformación de las carcasas: las categorías (S)EUROP descritas por la reglamentación EU n.º 1208/81 y 1026/91, donde "E" corresponde a una conformación excelente, "U" a una conformación muy buena, "R" a una conformación buena, "O" a una conformación razonable y "P" a una conformación mediocre.

Comportamiento del animal

15 Todos los datos para el comportamiento del animal, actividades generales y también comportamiento activo, se muestran en la Tabla 7 y Tabla 8 para la fase de crecimiento y de terminación, respectivamente.

Actividades generales. No se encontraron diferencias estadísticas en el porcentaje de animales por corral estando de pie, recostados, comiendo, bebiendo, y rumiando a través del período de observación visual (2:30 h) para la fase de crecimiento (de 0 a 112 días del estudio). El porcentaje de animales que se alimenta con concentrado fue mayor (P < 0,01) para los toros BF en comparación con los animales del grupo C, y la proporción de animales que beben agua tendían a (P < 0,10) ser mayores también para los toros BF que los toros C durante esta fase.

25 Para la fase de terminación, no se hallaron diferencias en la proporción de animales por corral estando de pie, recostados, comiendo paja y bebiendo agua durante el período de observación visual. En esta fase, la proporción de animales por corral que comían concentrado tendían (P < 0,10) a ser mayores en los toros BF en comparación con los toros C, y la proporción de animales que rumiaban en el grupo BF fue mayor (P < 0,01) que para los toros C.

Comportamiento activo. En la fase de crecimiento, durante el período de observación de escaneo visual, el único parámetro no afectado por el tratamiento fue el comportamiento social. El comportamiento de autoacicalamiento fue mayor para los toros BF en comparación con el grupo C, y este grupo C exhibió más (P = 0,01) comportamiento no nutritivo oral que los toros del grupo BF. Estos resultados se muestran gráficamente en la Figura 1. Todo comportamiento relacionado con las interacciones agonistas fue estadísticamente diferente durante esta fase (Figura 2) y más frecuentemente exhibidas por toros del grupo C. El comportamiento de pelea fue mayor (P < 0,01) en los toros C que en los toros BF, y las embestidas fueron mayores (P < 0,01) para el grupo C en comparación con el grupo BF también. Las interacciones de desplazamiento fueron mayormente exhibidas (P < 0,01) por el grupo C en comparación con el grupo BF. Interacciones de arremetimiento y persecución fueron exhibidas ocasionalmente, pero fueron mayores (P < 0,05) en el grupo C que en el grupo BF. El comportamiento de Flehmen fue más exhibido (P = 0,05) en los toros C en comparación con el grupo BF. De manera adicional, el intento de montar y completar las montadas tendió a ser mayor (P < 0,10) para los toros C que para los toros del grupo BF (Figura 3).

Durante esta fase de terminación (de 113 a 168 días), no se observaron diferencias entre los tratamientos para el comportamiento social y oral. Los toros del grupo C tendieron ($P < 0,10$) a realizar más comportamiento de autoacicalamiento que los toros BF (Figura 1). De otro modo, el comportamiento agonista, como las peleas y las interacciones de embestidas, fueron mayores ($P < 0,001$ y $P < 0,001$, respectivamente) en el grupo C que en el grupo BF. Además, aunque el desplazamiento y persecución ocurrían muy raramente, los toros del grupo C exhibieron más interacciones ($P < ,0001$ en ambos casos) que en los toros BF. Con respecto a las interacciones sexuales, tanto el intento de montar como las montadas completas fueron más exhibidas ($P < 0,001$) por el grupo C que por los toros BF, mientras que el Flehmen tendió a ser mayor ($P < 0,10$) para los toros C en comparación con los toros BF también. Las interacciones sexuales y agonistas fueron mostradas de forma gráfica en la Figura 2 y 3.

10

Tabla 7. Comportamiento, 1 - 112 días en ensayo (del estudio).

Artículo	Tratamiento ¹			Valores P^2		
	Control	BF	SEM ³	T	Tiempo	T x Tiempo
Actividad general, %						
De pie	64	58,80	4,123	0,60	<,0001	0,99
Acostados	36	41,15	4,104	0,58	0,008	0,99
Comiendo concentrado	15	11,07	0,495	<,0001	<,0001	0,82
Comiendo paja	17	7,45	0,617	0,35	0,188	0,44
Bebiendo	10	2,59	0,192	0,09	0,059	0,89
Rumiando	24	14,74	2,035	0,70	0,003	0,86
Comportamiento social, /15 min						
Autoacicalamiento	22	18,23	0,717	0,01	<,0001	0,096
Social	11	5,97	0,851	0,14	<,0001	0,99
Oral no nutritivo	11	0,88	0,283	0,01	0,177	0,78
Peleando	12	3,20	0,908	0,0003	0,0004	0,91
Embistiendo	9	1,61	0,480	0,001	<,0001	0,73
Desplazamiento	19	1,09	0,109	0,004	0,0008	0,85
Persecución	14	0,30	0,203	0,14	0,140	0,70
Arremetimiento	6	0,02	0,068	0,13	0,103	0,22
Flehmen	13	2,00	0,574	0,15	0,045	0,63
Intento de montar	16	0,75	0,524	0,19	<,0001	0,31
Montadas completas	13	0,91	0,284	0,19	<,0001	0,31

¹ C = control, BF = concentrado complementado con BIOFLAVEX® CA al 0,04 %.

² T = efecto de tratamiento; Tiempo = efecto de tiempo (mediciones cada 14 días); T x Tiempo = tratamiento por interacción de tiempo.

³ SEM = error estándar de los medios de los datos transformados por logaritmo (actividad general) o datos de transformada de raíz (comportamiento social).

20 Tabla 8. Comportamiento, 112 – 168 días en ensayo (del estudio).

Artículo	Tratamiento ¹			Valores P^2		
	Control	BF	SEM ³	T	Tiempo	T x Tiempo
Actividad general, %						

Artículo	Tratamiento ¹			Valores F^2		
	Control	BF	SEM ³	T	Tiempo	T x Tiempo
Actividad general, %						
De pie	63,46	64,11	2,700	0,51	0,739	0,70
Acostados	35,44	35,68	2,673	0,75	0,881	0,86
Comiendo concentrado	6,00	7,91	0,815	0,09	0,395	0,65
Comiendo paja	4,27	6,25	0,869	0,24	0,072	0,69
Bebiendo	1,87	1,93	0,382	0,87	0,203	0,85
Rumiando	7,33	12,68	1,813	<,0001	0,194	0,99
Comportamiento social, /15 min						
Autoacicalamiento	8,62	7,00	0,809	0,08	0,480	0,80
Social	4,69	3,53	1,067	0,24	0,451	0,92
Oral no nutritivo	0,94	0,38	0,318	0,20	0,271	0,54
Peleando	10,34	3,53	1,712	<,0001	0,0004	0,49
Embistiendo	4,63	2,00	0,869	0,0004	0,046	0,50
Desplazamiento	0,78	0,28	0,242	0,0009	0,143	0,91
Persecución	1,62	0,19	0,194	<,0001	<,0001	0,025
Arremetimiento	0,13	0,03	0,042	0,12	0,450	0,17
Flehmen	4,91	3,78	0,807	0,07	0,010	0,86
Intento de montar	8,01	2,32	1,717	0,0008	<,0001	0,020
Montadas completas	6,16	2,52	1,610	0,0008	<,0001	0,20

¹ C = control, BF = concentrado complementado con BIOFLAVEX® CA al 0,04 %.

² T = efecto de tratamiento; Tiempo = efecto de tiempo (mediciones cada 14 días); T x Tiempo = tratamiento por interacción de tiempo.

³ SEM = error estándar de los medios de los datos transformados por logaritmo (actividad general) o datos de 5 transformada de raíz (comportamiento social).

10 Cuando se analizaron los períodos de observación visual de comportamiento de alimentación (mañana), estos indicaron que los toros complementados con flavonoides tenían mayor ocupación del comedero de concentrado en comparación con los toros C; este efecto fue más pronunciado durante la fase de crecimiento que durante la fase de terminación. Luego, durante el período de observación visual estos animales BF dedicaron más tiempo a comer. En la fase de crecimiento, a pesar de esta mayor ocupación del comedero, la ingesta de concentrado fue numéricamente menor para los toros BF, lo cual indica que probablemente la tasa de alimentación podría ser menor. Aunque se encontraron diferencias no estadísticas para la ocupación del comedero de paja (datos de muestreo de escaneo visual a la mañana) a través del estudio, los toros BF exhibieron mayor comportamiento rumiante durante la 15 fase de terminación. Es difícil explicar este resultado, y puede deberse al procedimiento de escaneo visual, que no describe la ocupación del comedero diaria total y actividades rumiantes. La ocupación del bebedero tendía a ser mayor para los toros complementados con flavonoides durante la fase de crecimiento. Usualmente, la ingesta de materia seca e ingesta de agua estaban directamente relacionadas.

20 Fermentación de rumen

La fermentación del rumen VFA se presenta en la Tabla 10. La concentración de VFA total en el rumen no se vio afectada por el tratamiento. La proporción molar de acetato fue mayor ($P < ,0001$) en toros BF en comparación con toros C, mientras que la proporción molar de propionato fue mayor ($P < ,0001$) para los toros de los toros C que para los toros BF. Por consiguiente, la relación de acetato: propionato fue mayor ($P < ,0001$) para los toros BF que para los toros C. El resto del VFA analizado (butirato, valerato, isobutirato e siovalerato) no se vio afectado por el 25 tratamiento.

Tabla 10. Parámetros de fermentación de rumen de VFA de toros Holstein alimentados con dietas altas en concentrado complementadas o no con Bioflavex CA.

	Control ¹	BF CA ²	SEM	Valor p
Rumen				
VFA total, mM	75,6	67,2	4,76	0,22
VFA individual, mol/100 mol				
Acetato	58,8	66,4	1,12	<,0001
Propionato	28,9	20,7	1,21	<,0001
Isobutirato	7,4	7,5	0,34	0,90
n-butirato	1,2	1,5	1,13	0,11
IsoValerato	1,5	1,3	0,13	0,26
Valerato	2,1	2,5	0,24	0,22
Acetato:propionato, mol/mol	2,15	3,35	0,171	<,0001

¹ Control = no complementado

² BF CA = concentrado complementado con BIOFLAVEX® CA al 0,04 %.

Expresión de genes en el rumen

10 La relación de expresión relativa de genes estudiados en el epitelio del rumen se presenta en la Tabla 11 y la Figura 4. La complementación con flavonoides afectó la relación de expresión relativa de todos los receptores del sabor amargo (TAS2R) analizados, que fueron menos expresada por toros BF en comparación con los toros C. La relación de expresión relativa de TAS2R7, TAS2R16, TAS2R38 y TAS2R39 fueron mayores (P = 0,002, P = 0,003, P = 0,002, y P = 0,002, respectivamente) para toros en el grupo C en comparación con los toros BF.

15 La relación de expresión relativa de receptores relacionados con la señalización del neurotransmisor difiere entre el tipo de receptor. Mientras el FFAR3 tendía (P = 0,10) a ser mayor para los toros C que para los toros BF, el FFAR2 fue más expresado (P = 0,002) en estos toros C en comparación con los toros BF. Además, la relación de expresión relativa para PPYR1 y CCKBR fue mayor (P = 0,003 y P = 0,007, respectivamente) también para los toros C que para los toros BF.

Además, la relación de expresión relativa de los receptores relacionados con la inflamación como IL-25, y β -defensina, fueron mayores (P = 0,005, P = 0,03, y P = 0,0002, respectivamente) para los toros C que para los toros BF.

25 Tabla 11. La expresión génica relativa de toros Holstein alimentados con dietas altas en concentrado complementadas o no con Bioflavex CA después de 168 días de tratamiento.

	Control ¹	BF CA ²	SEM ³	Valor p
TAS2R7 ⁴	0,94	0,13	0,139	0,002
TAS2R16 ⁵	0,94	0,46	0,097	0,003
TAS2R38 ⁶	1,06	0,38	0,125	0,002
TAS2R39 ⁷	0,88	0,37	0,100	0,002
FFAR3 ⁸	0,98	0,64	0,141	0,10
FFAR2 ⁶	0,96	0,38	0,111	0,002
PPYR1 ¹⁰	1,02	0,55	0,103	0,003
CCKBR ¹¹	1,04	0,62	0,098	0,007
IL-25	0,98	0,50	0,107	0,005
β -Defensina- β	1,00	0,48	0,085	0,0002

¹ Control = no complementado.

30 ² BF CA = concentrado complementado con BIOFLAVEX® CA al 0,04 %.

³ SEM derivan de análisis estadísticos de datos transformados por logaritmo de base 10, y los medios son valores retrotransformados.

⁴ Receptor del sabor amargo 7

⁵ Receptor del sabor amargo 16

5 ⁶ Receptor del sabor amargo 38

⁷ Receptor del sabor amargo 39

⁸ receptor de ácido graso libre 3 (gpr41)

⁹ receptor de ácido graso libre 2 (gpr43)

¹⁰ receptor de polipéptido pancreático 1

10 ¹¹ receptor de colecistoquinina 4

Ejemplo 2: Efecto de la complementación con flavonoides de dietas de destetados sobre la expresión génica de receptores del sabor amargo (T2Rs) en cerditos para el período de lactancia.

15 Materiales y métodos

Animales, alimentación, alojamiento y diseño experimental

Se utilizó un total de 168 cerdos de cruce comercial ([Large White x Landrace] x Pietrain) en el ensayo. Los animales se obtuvieron de la misma granja comercial en el día del destete y se mudaron a la unidad de lactancia (sin transporte). Se usaron cerditos machos y hembras de 21 días de edad de 4-7 kg de BW. Se utilizó identificación mediante etiquetas de oreja plásticas con el número del animal. Para el ensayo del rendimiento, los animales fueron distribuidos en 2 bloques mediante peso corporal inicial. Dentro de cada bloque los cerdos fueron distribuidos en corrales para una distribución de peso corporal equilibrado. Cada bloque, por lo tanto, consistía en 6 corrales de 14 animales a los que se les asignó de forma aleatoria dietas experimentales. Los cerdos fueron ubicados en 12 corrales (14 cerditos/corral/lotos destetados). Cada corral tenía una tolva sin tapa comercial y un bebedero con boquilla roscada para asegurar la alimentación ad libitum y el libre acceso a agua. Los corrales se asignaron a dos tratamientos experimentales (6 duplicados para cada tratamiento).

Programa de alimentación

30 Al destete, a los animales seleccionados se les ofreció las mismas dietas basales preiniciación luego de la misma especificación, pero con o sin la complementación con el producto experimental actualmente en estudio. La dieta preiniciación se alimentó ad libitum durante catorce días consecutivos (Tabla 1, ingredientes y Tabla 2, composición de nutrientes).

35 La dieta experimental se produjo en pasta y se empaquetó y etiquetó, lista para ser despachada a la granja. Las dietas se mezclaron en lotes de 1500 kg.

Tabla 12. Composición de la dieta preiniciación (%)¹.

INGREDIENTES	%
Maíz	18,86
Trigo	16,25
Suero de leche ácida	13,00
Harina de soja HTM96	9,38
Cebada	8,81
Trigo extruido	7,83
Maíz extruido	5,22
Harina de soja (47 % de proteína)	4,05
Concentrado de harina de soja	4,00
Harina de pescado 70 % CP	4,00
Plasma animal 80CP	3,00
Grasa de cerdo	2,90
Fosfato de di-calcio	0,96
Sulfato de lisina	0,53
Premezcla de vit-min	0,40
DL-Metionina	0,22
Sal	0,20

ES 2 975 437 T3

INGREDIENTES	%
L-treonina	0,18
L-valina	0,11
L-Triptófano	0,07

¹ Suministró lo siguiente por kg de dieta: 7.000 IU de vitamina A (acetato); 500 IU de vitamina D3 (colecalfiferol); 250 IU de vitamina D (25-hidroxicolecalciferol); 45 mg de vitamina E; 1 mg de vitamina K3; 1,5 mg de vitamina B1; 3,5 mg de vitamina B2; 1,75 mg de vitamina B6; 0,03 mg de vitamina B12; 8,5 mg de ácido D-pantoténico; 22,5 mg de niacina; 0,1 mg de biotina; 0,75 mg de folacina; 20 mg de Fe (quelato de aminoácidos); 2,5 mg de Cu (sulfato); 7,5 mg de Cu (quelato de glicina); 0,05 mg de Co (sulfato); 40 mg de Zn (óxido); 12,5 mg Zn (quelato de aminoácidos); 12,5 mg de Mn (óxido); 7,5 de Mn (quelato de glicina); 0,35 mg de I, 0,5 de Se (orgánico); 0,1 mg de Se (sodio).

Tabla 13. La composición de nutrientes de la dieta preiniciación experimental (%. como base de alimento).

NUTRIENTES	%
Materia seca	90,104
Ceniza	5,291
Energía neta (Kcal/kg)	2460
Extracto de éter	6,738
Ácido linoleico	1,836
Fibra en bruto	2,75
Fibra de detergente neutro	3,914
Almidón	32,465
Azúcares	10,965
Proteína en bruto	20,7
Lys	1,472
Lys dig	1,368
Met	0,538
Met dig	0,51
Cys	0,372
Cys dig	0,324
Met+Cys	0,91
Met+Cys dig	0,834
Thr	0,994
Thr dig	0,899
Trp	0,328
Trp dig	0,295
Val	1,004
Val dig	0,999
Ile	0,565
Ile dig	0,517
Leu	1,07
Leu dig	0,985
Phe	0,453
Phe dig	0,408
Tyr	0,274
Tyr dig	0,243
Phe+Tyr	0,727
Phe+Tyr dig	0,651

NUTRIENTES	%
His	0,26
His dig	0,231
Ca	63
P Total	0,65
P dig	0,36
Na	0,29
Cl	0,43

Tratamientos y diseño experimental

5 Dos tratamientos experimentales se prepararon, control (T1) o complementado (T2) con un 0,03 % de extracto de naranja amarga (*Citrus aurantium*) de la fruta entera rica en naringina, >20 % (Bioflavex® CA, Interquim, S.A., Barcelona, España). Por lo tanto, los diferentes tratamientos experimentos son los siguientes:

T1: Dieta basal

10 T2: T1 + extracto de naranja amarga (300g/Tm)

Muestreo de tejido intestinal

Se eutanizó un cerdito por corral en el día 7 luego del destete (período que se sugiere por ser el más crítico luego del destete) y las muestras de tejidos de la sección del yeyuno se recolectaron en ARN después y formaldehído
15 respectivamente y se mantuvieron almacenadas para análisis adicional.

Análisis biológico

Para los análisis de expresión génica, el ARN total se extrajo de los tejidos del yeyuno usando Trizol (Invitrogen). Al ARNm aislado se le realizó una transcripción inversa a ADNc usando un kit de reactivo PrimeScript RT (Takara, Frankfurt, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. La pureza de ARN se evaluó mediante un instrumento de NanoDrop (ThermoFisher, Madrid, España) a 260, 280 y 230 nm. La cuantificación de la expresión de genes que codifican los receptores del sabor amargo tipo 2 miembro 7, 17, 38 y 39 (TAS2R7, TAS2R16, TAS2R38 y TAS2R39) fue realizada mediante PCR cuantitativo (qPCR) usando codificación génica para la subunidad de proteína ribosomal 9 (RPS9) como un gen constitutivo, que fue evaluado para ver su estabilidad luego
20 de Vandesompele et al. (2002) en comparación con genes que codifican a α -actina (ACTB), la proteína de transcripción expresada de forma ubicuita (UXT) y deshidrogenasa de gliceraldehído 3-fosfato (GAPDH). Las condiciones qPCR para cada conjunto de cebadores se optimizaron de forma individual. La especificidad de la amplificación se evaluó mediante la identificación de una sola banda en el peso molecular esperado en geles de agarosa de ADN al 0,8 % y un solo pico en la curva de fusión. La eficiencia se calculó al amplificar las diluciones
25 1:10 seriales de cada amplicón génico. Una curva estándar de punto de cruzamiento (Cq) versus el logaritmo de la concentración se graficó para obtener la eficiencia, que se calculó usando la fórmula $10^{1/\text{pendiente}}$, con un rango aceptable de 1,8 a 2,2. Se usó un volumen de reacción total de 20 μ L que contiene 50 ng de ADNc, 10 μ L de SYBR Premix EXTaq (TliRNAseH) (Takara, Frankfurt, Alemania) y la concentración del cebador optimizado para cada gen. Las reacciones de qPCR se ciclaron de la siguiente manera: una etapa de desnaturalización inicial de 10 min a 95
30 °C seguido por 40 ciclos de 10 s a 95°C, 15 s a temperatura de hibridación optimizada para cada gen, 30 s a 72°C, y una extensión final de 10 min a 72°C. Los valores Cq resultantes se usaron para calcular la expresión relativa de genes seleccionados por cuantificación relativa usando un gen de referencia (gen constitutivo) y un calibrador de grupo de control (Pfaffl, 2004, Eq. [3.5]).

40 **Resultados**

La relación de expresión relativa de genes estudiados en el epitelio del yeyuno de los cerditos se presenta en la Figura 5. La complementación con flavonoides afectó la relación de expresión relativa de todos los receptores del sabor amargo (TAS2R) analizados, que fueron más expresada por cerditos del T2 en comparación con los animales del T1.

45

Ejemplo 3: Efecto de flavonoides en la expresión génica de epitelio de duodeno en toros alimentados en dietas de terminación altas en grasas

Materiales y métodos

5 Lo mismo que en el Ejemplo 1.

Consumo de alimento y rendimiento

10 Los animales fueron alimentados un concentrado comercial en forma de harina, formulado para cumplir los requisitos nutricionales de los animales (FEDNA, 2008). Los primeros 112 días del estudio, los animales fueron alimentados una fórmula de concentrado de crecimiento, y entre los 112 días al final del estudio, los animales fueron alimentados un concentrado de terminación alto en grasa. Los ingredientes y composición nutricional de los concentrados se muestran en la Tabla 14. A lo largo del estudio, los animales tenían acceso ad libitum a paja de trigo (3,5 % CP, 1,6 % de extracto de éter, 70,9 % NDF, y 6,1 % de ceniza; base de DM) y agua fresca.

Tabla 14. Ingredientes y composición de nutrientes de los concentrados alimenticios.

Artículo	Crecimiento ¹	Terminación ²
Ingrediente, g/kg		
Harina de grano de maíz	399,7	436,9
Harina de grano de cebada	179,8	150,2
DDG	179,8	150,2
Trigo	109,7	109,8
Pulpa de remolacha	73,9	80,0
Aceite de palma	20,0	45,0
Carbonato de calcio	15,5	12,8
Urea	8,0	4,0
Bicarbonato de sodio	5,0	4,0
Fosfato de dicalcio	3,6	3,1
Premezcla de vitaminas	3,0	2,0
Sal	2,0	2,0
Nutriente		
UFc/kg DM	1,18	1,25
CP, g/ kg DM	157	136
Extracto de éter, g/ kg DM	58	84
Ceniza, g/ kg DM	56	46
NFD, g/ kg DM	178	169
NFC, g/ kg DM	551	565

¹ de 0 a 112 días del estudio.

² de 113 días hasta el final del estudio.

5 DM: materia seca; ME energía metabólica; CP: Proteína en bruto; NDF: Fibra de detergente neutral; NFC: Carbohidratos que no son fibra.

10 Los animales fueron asignados de forma aleatoria a uno de 8 corrales, y se asignaron a uno de los dos tratamientos (4 corrales por tratamiento), ya sea control (C) o complementados (BF) con un 0,04 % de extracto de naranja amarga (*Citrus aurantium*) de la fruta entera rica en naringina, >20 % (Bioflavex® CA, Interquim, S.A., Barcelona, España).

15 Los animales fueron pesados de forma individual cada 14 días a lo largo del estudio en 12 períodos experimentales de 14 días, durante los primeros 8 períodos (de 1 a 112 días) los animales consumieron el concentrado de crecimiento y durante los últimos 4 períodos (de 113 a 168 días) y durante los días antes de ser sacrificados los animales consumieron el concentrado de terminación (ver la Tabla 14). Después de 168 días de estudio, los toros fueron transportados al matadero (Escorxador del Grup Alimentari Guissona, Guissona, España), ubicado a 15 km de la granja. Los animales fueron sacrificados en dos semanas, 4 corrales por semana, dos corrales de toros C y dos de toros BF. El tiempo de espera antes de ser sacrificados fue menos de 6 horas. Los animales fueron pesados 20 antes de ser cargados. Fueron sacrificados por prácticas comerciales y acorde a la Regulación EU 1099/2009 sobre la protección de animales al momento de ser matados o sacrificados. Se registró el peso de la carcasa caliente (HCW, por su sigla en inglés) de cada animal.

Análisis químico y biológico

25 Se muestreó una sección de 1-cm2 de cada sitio de duodeno y se enjuagó 2 veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) enfriada después del muestreo e inmediatamente incubado en ARN después (Invitrogen, Madrid, España) para conservar la integridad del ARN. Después de 24 horas de incubación con ARN después a 4 °C, el

líquido se quitó y el tejido se congeló a -80 °C hasta la extracción adicional de ARN y posterior análisis de expresión génica.

Para los análisis de expresión génica, el ARN total se extrajo de los tejidos de pared de rumen usando Trizol (Invitrogen). Al ARNm aislado se le realizó una transcripción inversa a ADNc usando un kit de reactivo PrimeScript RT (Takara, Frankfurt, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. La pureza de ARN se evaluó mediante un instrumento de NanoDrop (ThermoFisher, Madrid, España) a 260, 280 y 230 nm. La cuantificación de la expresión de genes que codifican 1) genes que codifican la producción, expresión, y rotación de neurotransmisores: receptor de ácido graso libre 2 (FFAR2) y receptor de ácido graso libre 3 (FFAR3), receptor de polipéptido pancreático 1 (PPYR1); genes del receptor de colecistoquinina B (CCKBR) 2) que codifican citocinas proinflamatorias o citocina IL-25 (IL25) y péptidos antimicrobianos liberados por las células intestinales, β -defensinas, y 3) receptores del sabor amargo tipo 2 miembro 7, 16, 38 y 39 (TAS2R7, TAS2R16, TAS2R38 y TAS2R39) se realizaron mediante PCR cuantitativa (qPCR) mediante codificación génica para la Subunidad de la proteína ribosómica 9 (RPS9) como un gen constitutivo, que se evaluó para ver su estabilidad conforme a Vandesompele et al. (2002) en comparación con genes que codifican α -actina (ACTB), la proteína de transcripción expresada de forma ubicuita (UXT) y deshidrogenasa de gliceraldehído 3-fosfato (GAPDH). Las condiciones qPCR para cada conjunto de cebadores se optimizaron de forma individual. La especificidad de la amplificación se evaluó mediante la identificación de una sola banda en el peso molecular esperado en geles de agarosa de ADN al 0,8 % y un solo pico en la curva de fusión. La eficiencia se calculó al amplificar las diluciones 1:10 seriales de cada amplicón génico. Una curva estándar de punto de cruzamiento (Cq) versus el logaritmo de la concentración se graficó para obtener la eficiencia, que se calculó usando la fórmula $101/\text{pendiente}$, con un rango aceptable de 1,8 a 2,2. Se usó un volumen de reacción total de 20 μ L que contiene 50 ng de ADNc, 10 μ L de SYBR Premix EXTaq (TliRNaseH) (Takara, Frankfurt, Alemania) y la concentración del cebador optimizado para cada gen. Las reacciones de qPCR se ciclaron de la siguiente manera: una etapa de desnaturalización inicial de 10 min a 95 °C seguido por 40 ciclos de 10 s a 95°C, 15 s a temperatura de hibridación optimizada para cada gen, 30 s a 72°C, y una extensión final de 10 min a 72°C. Los valores Cq resultantes se usaron para calcular la expresión relativa de genes seleccionados por cuantificación relativa usando un gen de referencia (gen constitutivo) y un calibrador de grupo de control.

Resultados

- Respecto a la expresión relativa en el nivel de ARNm de los genes estudiados en el epitelio del duodeno, los datos se presentan en la Figura 6. Su complementación con flavonoides afectó la expresión de todos los receptores de sabor amargo (TAS2R) analizados excepto TAS2R38. En el duodeno, la expresión relativa de TAS2R7, TAS2R16, y TAS2R39 fue mayor ($P < 0,001$) en toros C en comparación con toros BF. La expresión relativa de algunos receptores relacionados con la señalización del neurotransmisor difiere también entre los tratamientos. El FFAR2 ($P < 0,01$) fue más expresado en estos toros C en comparación con los toros BF. Además, la expresión relativa para PPYR1 y CCKBR fue mayor ($P < 0,01$) también para los toros C que para los toros BF. De manera adicional, la expresión relativa de los receptores relacionados con la inflamación IL-25 y β -defensina, fue nuevamente mayor ($P < 0,05$) para los toros C que para los toros BF.
- La expresión génica de estas moléculas proinflamatorias en el epitelio del duodeno de toros BF se redujo, como se observó en el epitelio de rumen en el estudio previo (Ejemplo 1). Estos resultados también estaban de acuerdo con la reducción de los receptores de detección de nutrientes estudiados en el epitelio del duodeno de toros BF, tal como TAS2R, FFAR2, PPYR1 y CCKBR.
- En resumen, la complementación con flavonoides modificó de forma diferente la expresión génica de los genes en el epitelio del duodeno que podría estar relacionado con la regulación del patrón de alimentación y de comportamiento animal.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso no terapéutico de naringina, naringenina o mezclas de estas para la modulación dirigida de la expresión génica de al menos un receptor de sabor amargo y/o al menos un receptor del eje de intestino-cerebro para modificar el patrón de alimentación y rumia en rumiantes o para la modulación dirigida de la expresión génica de al menos un receptor de sabor amargo para modificar el patrón de alimentación en cerdos, en el que el uso no terapéutico comprende administrar naringina, naringenina o mezclas de estas, en el que la cantidad de naringina, naringenina o mezclas de estas se administra como una mezcla con pienso, en el que dicha composición de pienso comprende por lo menos un 0,005% p/p de naringina o la cantidad equimolar de naringenina o de una mezcla de naringina y naringenina si las dos están presentes, en el que métodos de tratamiento del cuerpo humano o animal por cirugía o terapia son excluidos.
- 10 2. El uso no terapéutico de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el receptor del sabor amargo se selecciona del grupo que consiste en TAS2R7, TAS2R16, TAS2R38 y TAS2R39.
- 15 3. El uso no terapéutico de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el receptor del eje intestino-cerebro se selecciona del grupo que consiste en FFAR2, FFAR3, PPR1 y CCKBR.
- 20 4. El uso no terapéutico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la expresión génica de al menos uno de dichos receptores se reduce.
- 25 5. El uso no terapéutico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la naringina o naringenina o mezclas de estas se administran en una dosis diaria de 0,001 a 0,01 g de naringina por kg de peso corporal del animal o la cantidad equimolar de naringenina o de una mezcla de naringina y naringenina si ambas están presentes.
- 30 6. El uso no terapéutico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la naringina, naringenina o mezclas de estas se encuentran en forma de un extracto de planta natural, preferiblemente dicho extracto de planta natural es extracto de naranja amarga.
- 35 7. El uso no terapéutico de acuerdo con la reivindicación precedente, en el que dicho extracto de planta natural es extracto de naranja amarga que se administra en una dosis diaria de 0,005 g por kg de peso corporal del animal a 0,02 g por kg de peso corporal del animal.
- 40 8. El uso no terapéutico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes que comprende administrar naringina, naringenina o mezclas de estas a un rumiante y/o cerdos durante al menos 5 días.
- 45 9. Naringina, naringenina o mezclas de estas para su uso en la modulación de la expresión génica de al menos un gen relacionado con la inmunidad en rumiantes y/o cerdos, en el que dicho producto se administra como una mezcla con pienso, en el que dicha composición de pienso comprende al menos 0,005 % p/p de naringina o la cantidad equimolar de naringenina o de una mezcla naringina y naringenina si ambas están presentes.
- 50 10. El producto para su uso de acuerdo con la reivindicación precedente, en el que el gen relacionado con el sistema inmunitario se selecciona del grupo que consiste en IL-6, IL-8, IL-10, IL-25 y β -defensina.
- 55 11. El producto para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 10, en el que la expresión génica de al menos uno de dichos receptores se reduce.
12. El producto para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en el que el producto se administra en una dosis diaria de 0,001 a 0,01 g de naringina por kg de peso corporal del animal o la cantidad equimolar de naringenina o de una mezcla de naringina y naringenina si ambas están presentes.
13. El producto para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, que comprende administrar dicho producto a rumiantes y/o cerdos durante al menos 5 días.

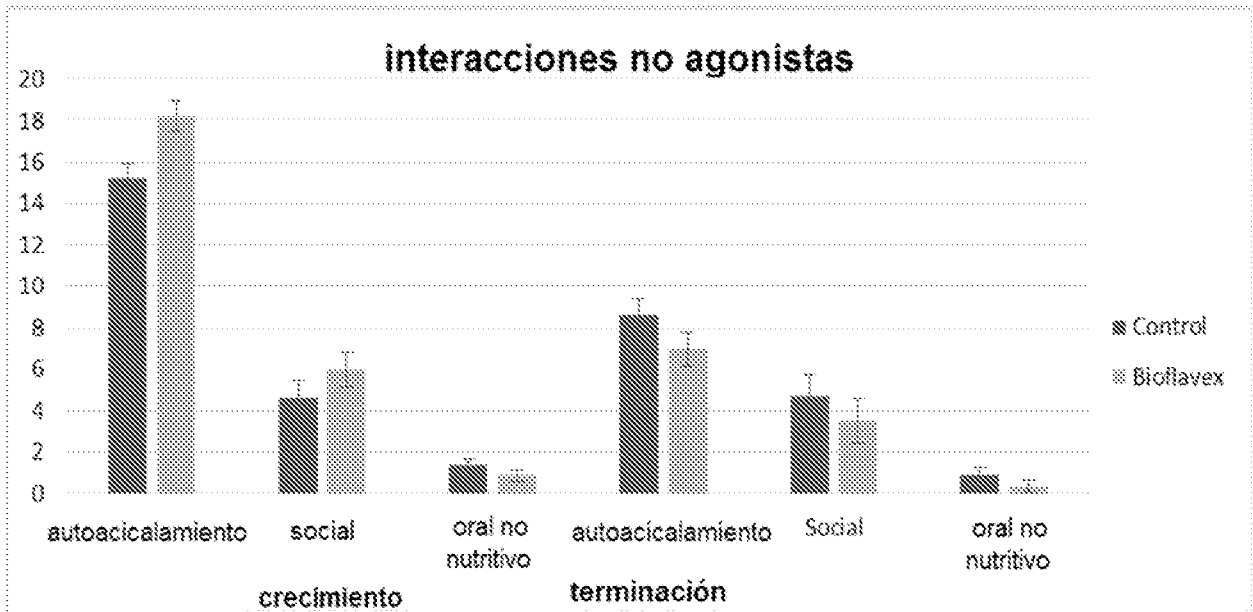


FIGURA 1

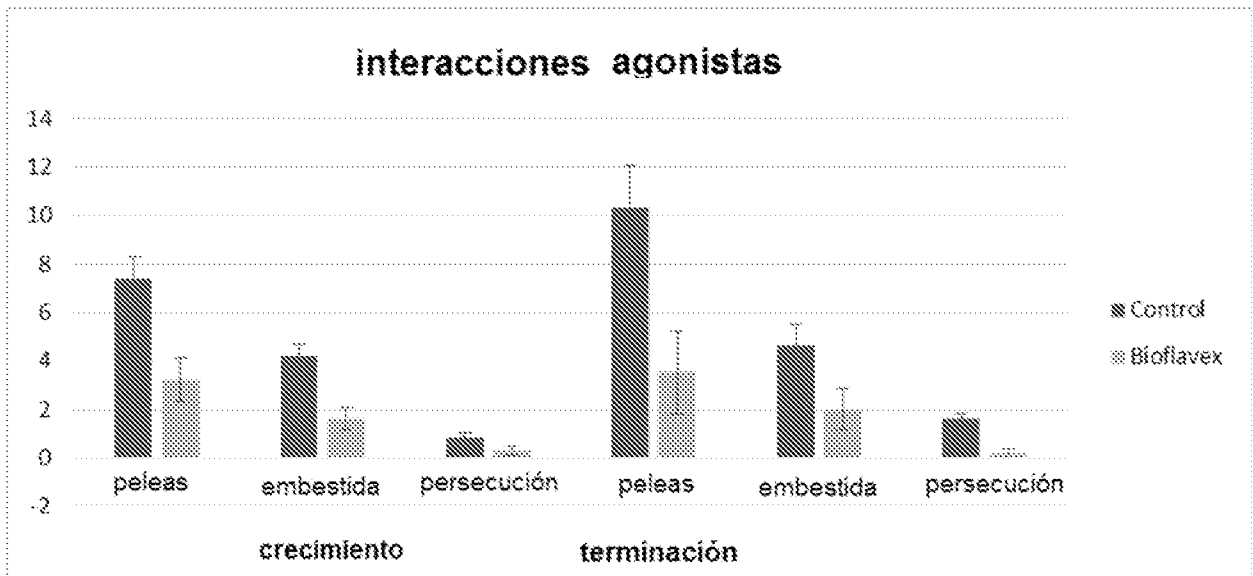


FIGURA 2

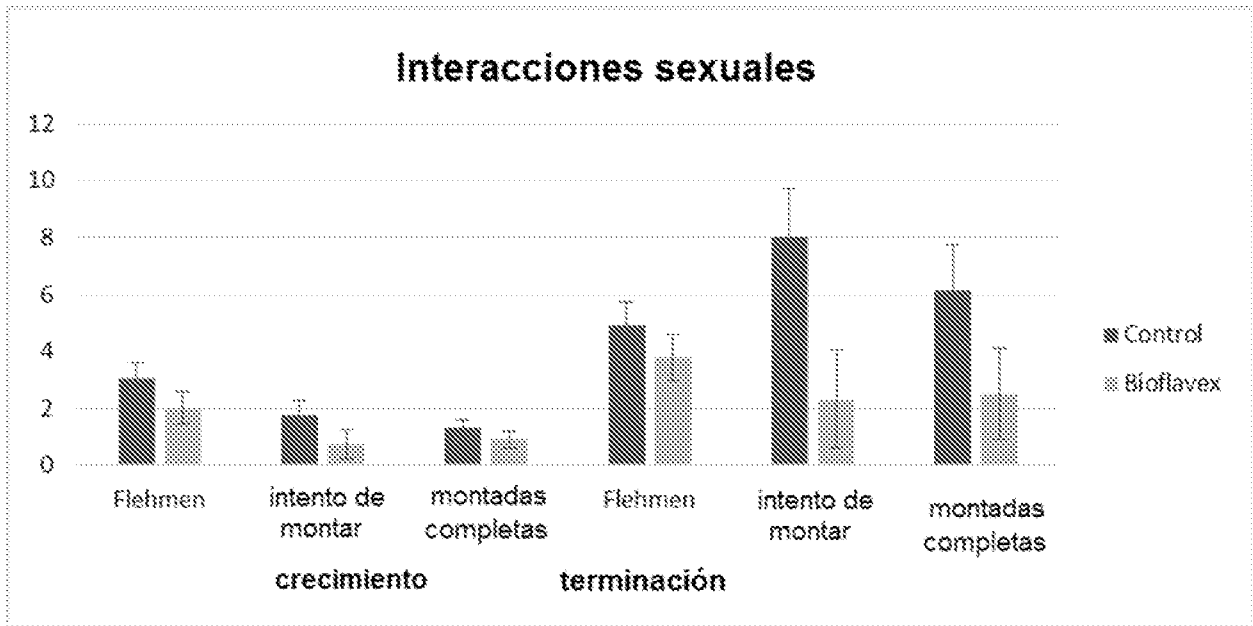


FIGURA 3

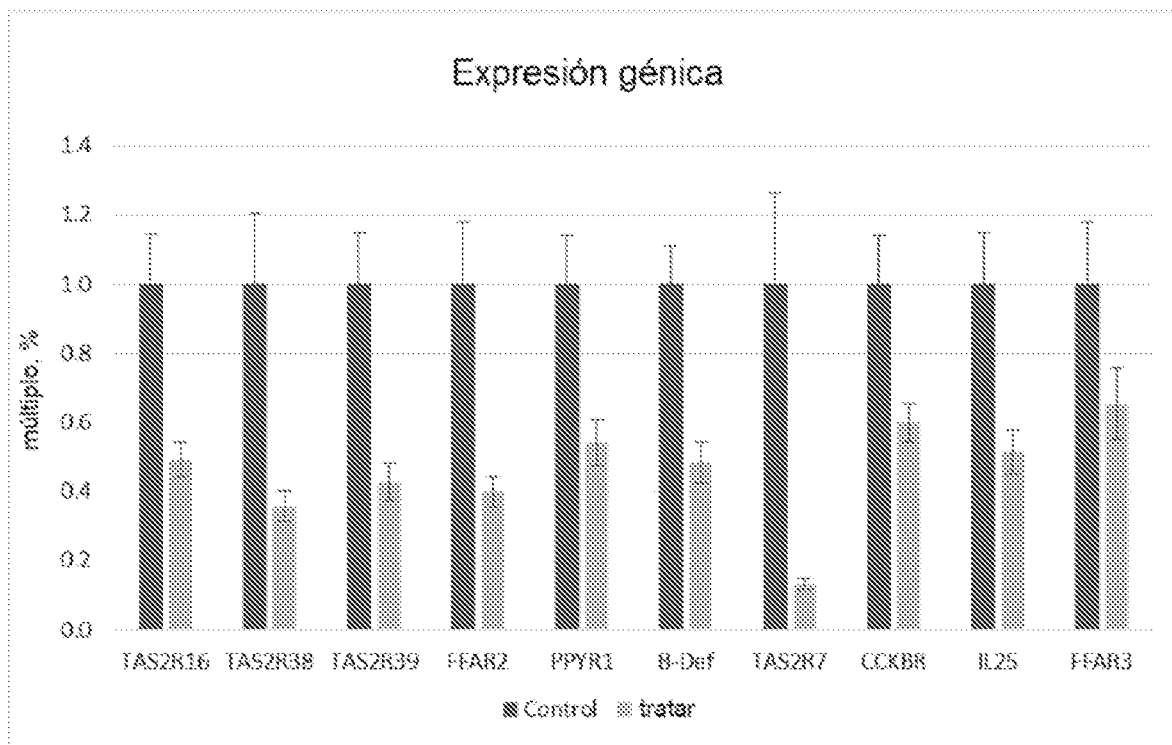


FIGURA 4

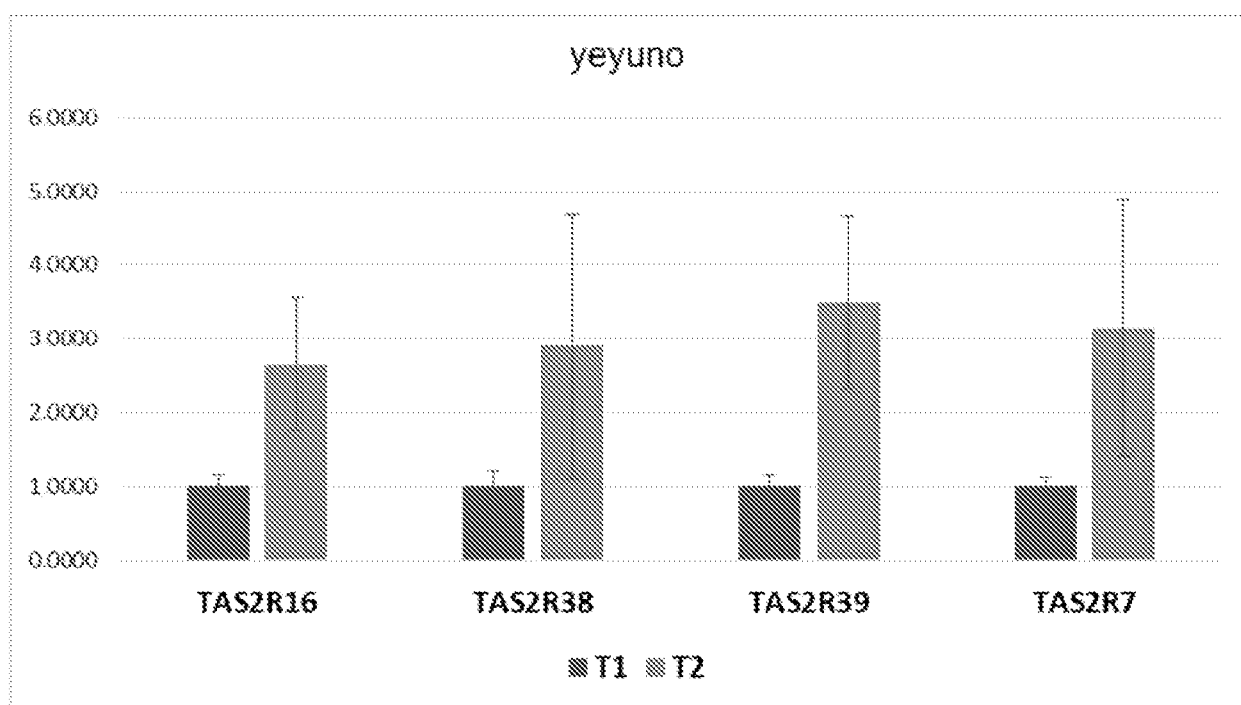


FIGURA 5

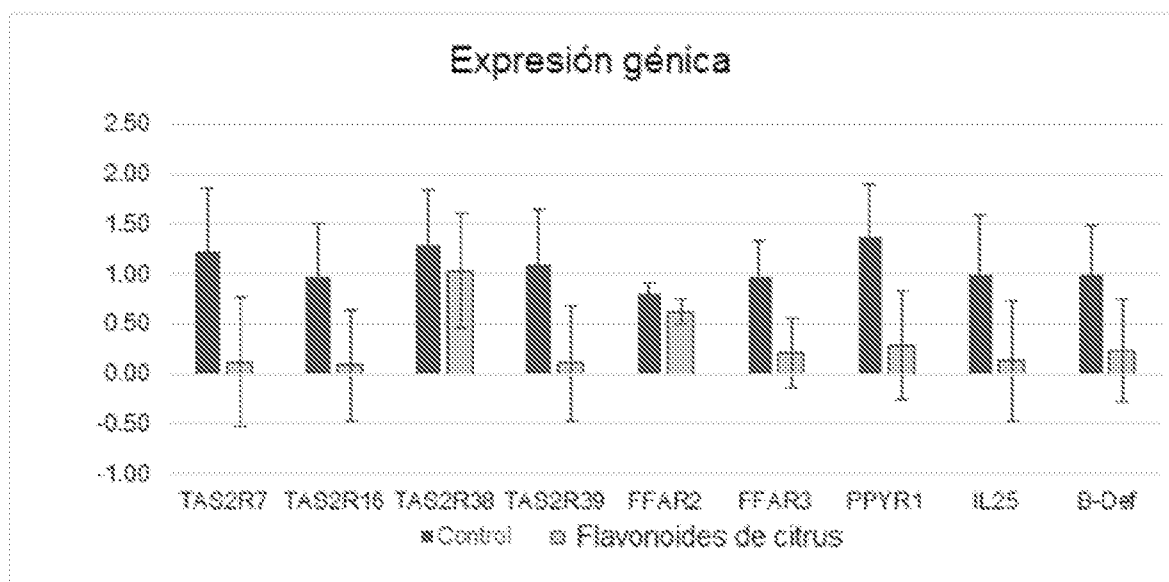


FIGURA 6

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.

Literatura diferente de patentes citada en la descripción

- Brown, H., Bing, R.F., Grueter, H.P., McAskill, J.W., Cooley, C.O., Rathmacher, R.P., 1975. Tylosin and chlortetracycline for the prevention of liver abscesses, improved weight gains and feed efficiency in feedlot cattle. *J. Anim. Sci.* 40, 207–213.
- González, J.M., Garcia de Jalón, J.A., Askar, A.R., Guada, J.A., Ferrer, L.M., de las Heras, M., 2001. Efecto de la dieta con cebada y núcleo proteico sobre la patología ruminal en corderos. In: XXVI Jornadas de la SEOC. Sevilla, Spain. pp. 733–739.
- Lesmeister, K.E., Tozer, P.R., Heinrichs, A.J., 2004. Development and analysis of a rumen tissue sampling procedure. *J. Dairy Sci.* 87, 1336–1344. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73283-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73283-X).
- Nocek, J.E., Heald, C.W., Polan, C.E., 1984. Influence of ration physical form and nitrogen availability on ruminal morphology of growing bull calves. *J. Dairy Sci.* 67, 334–343. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(84\)81306-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(84)81306-5).
- Mach, N., Bach, A., Realini, C.E., Font i Furnols, M., Velarde, A., Devant, M., 2009. Burdizzo pre-pubertal castration effects on performance, behaviour, carcass characteristics, and meat quality of Holstein bulls fed high-concentrate diets. *Meat Sci.* 81, 329–334. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2008.08.007>.
- Marti, S., Velarde, A., de la Torre, J.L., Bach, A., Aris, A., Serrano, A., Manteca, X., Devant, M., 2010. Effects of ring castration with local anesthesia and analgesia in Holstein calves at 3 months of age on welfare indicators. *J. Anim. Sci.* 88, 2789–2796. <https://doi.org/10.2527/jas.2009-2408>.
- Paniagua, M., Crespo, J., Bach, A., Devant, M., 2018. Effects of flavonoids extracted from *Citrus aurantium* on performance, eating and animal behavior, rumen health, and carcass quality in Holstein bulls fed high-concentrate diets. *Anim. Feed Sci. Technol.* 246, 114–126.
- Robles, V., González, L.A., Ferret, A., Manteca, X., Calsamiglia, S., 2007. Effects of feeding frequency on intake, ruminal fermentation, and feeding behavior in heifers fed high-concentrate diets. *J. Anim. Sci.* 85, 2538–2547.
- Rotger, A., Ferret, A., Manteca, X., Ruiz De La Torre, J.L., Calsamiglia, S., 2006. Effects of dietary nonstructural carbohydrates and protein sources on feeding behavior of tethered heifers fed high-concentrate diets. *J. Anim. Sci.* 84, 1197–1204.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes, *Genome Biology* , 2002, vol. 3 RESEARCH0034.
- Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A., 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74, 3583–3597. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78551-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2).
- Verdú, M., Bach, A., Devan, M., 2017. Effect of feeder design and concentrate presentation form on performance, carcass characteristics, and behavior of fattening Holstein bulls fed high-concentrate diets. *Anim. Feed Sci. Technol.*