

Senen de la Torre Santos

Identificación de biomarcadores
específicos para autenticar el
origen y el sistema de
alimentación del vacuno lechero.

Director/es

Vicente Mainar, Fernando
Royo Martín, Luis J.

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>

© Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606

Tesis Doctoral

IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES
ESPECÍFICOS PARA AUTENTIFICAR EL ORIGEN Y
EL SISTEMA DE ALIMENTACIÓN DEL VACUNO
LECHERO.

Autor

Senen de la Torre Santos

Director/es

Vicente Mainar, Fernando
Royo Martín, Luis J.

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Escuela de Doctorado

2021



Universidad
Zaragoza

FACULTAD DE VETERINARIA

DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN ANIMAL Y
CIENCIA DE LOS ALIMENTOS

**“Identificación de biomarcadores específicos para
autenticar el origen y el sistema de alimentación del
vacuno lechero”**

Memoria que presenta para aspirar al grado de Doctor:

Senén De La Torre Santos

Zaragoza, noviembre de 2020



SERIDA

**Servicio Regional de Investigación
y Desarrollo Agroalimentario**

La presente tesis doctoral ha sido desarrollada en el Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario del Principado de Asturias (SERIDA), en el Área de Nutrición de Pastos y Forrajes y dentro del Grupo de Investigación de Nutrición y Sanidad Animal (NySA).



Trabajo financiado por el Instituto Nacional de investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) a través del proyecto RTA-2014-00086-C02, con cofinanciación del Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).

Senén De La Torre Santos ha sido beneficiario de una beca de doctorado de la Secretaría Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (SENACYT) y el Instituto para la Formación y Aprovechamiento de Recursos Humanos (IFARHU) de la República de Panamá.

El Grupo de Investigación de Nutrición y Sanidad Animal (NySA) está financiado por el Plan de Ciencia, Tecnología e Innovación de Asturias (PCTI) 2018-2020 (IDI2018-000237) y cofinanciado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).



AGRADECIMIENTOS

Dicen que la vida está llena de caminos y que cada camino que escoges te lleva por diferentes sendas, llenas de altibajos y personas que te sirven de soporte, que te dan aliento, otras que solo son pasajeras y algunas que se quedan contigo como un recuerdo impermutable del tiempo, ya que hicieron que esa estancia que viviste mientras recorrías tu camino, fuese simplemente la mejor parte de lo vivido.

La familia es la brújula que guía nuestro camino, es la inspiración para llegar al punto más alto y el mayor consuelo cuando algo sale mal. He de agradecer así a mis padres Senén y Corina, a mis hermanos Gabriel y Lay, porque siempre me han acompañado en cada decisión que he tomado y sobre todo me han apoyado para cumplir cada meta que me he propuesto. A mi sobrino Kevin por cada llamada de fin de semana para contarme las noticias. A mi familia en general por su apoyo incondicional.

Todos sabemos algo, ignoramos algo, pero siempre aprendemos algo. Aprovecho para mostrar especial gratitud a mis directores de Tesis Fernando y Luis por cada uno de los conocimientos aportados, por todos los consejos, paciencia y sobre todo por toda la ayuda brindada durante mi estancia en el SERIDA para sacar adelante este trabajo. Físicamente no figuras como mi directora de tesis, pero has sido para mí mucho más que eso, ya que me has ayudado a la par de los demás y has estado ahí siempre dándome aliento y animándome a caer en el estrés, sabes que eres especial para mí y te has ganado mi cariño y respeto Adela. Como dejar de lado a Alfonso, a Rocio y a Begoña, siempre con una conversación amena, una historia y echándome una mano en todo lo posible.

Uno recuerda con aprecio a los que pasan por tu vida, pero con gratitud a aquellos que realmente la tocaron. A mis amigos María, Rodrigo, Isa y Sergio que no sólo estuvieron conmigo para un café, sino en medio de risas y vaivenes doctorales. A mis compañeros de “viaje” Esther, Álvaro, Loubna, Silvia, Laura y José Daniel, por todo el tiempo que disfrutamos juntos en cada salida, en el despacho o en el coche.

El trabajo más pesado se hace ligero cuando todos colaboran por igual. A mis compañeras del laboratorio Cris y Natalia, a los de molienda José y Tito y a Luisa de fitopatología por toda la ayuda que me brindaron. A los de la cuadra Pedro, Aitor, Luis, Javi, Ramonin, Vizcaíno, Jesús Paulino, Benedicto, José Ramón y Felgueres, porque por ustedes fue posible todo el trabajo de campo de ambos experimentos, no solo en medio de risas, sino tratando de hacer lo mejor posible en todo lo planeado.

Gracias a los doctores Marimar Campo y Antonio de Vega y a Inma, por facilitarme todas las gestiones y trámites en la Universidad de Zaragoza, haciendo que la distancia no fuese impedimento en ningún momento para el buen desarrollo laboral.

No hay que ser perfectos para todos, es suficiente ser especial para alguien. A ti José Luis, Lili, Denis, Gav, Santiago y Yassy simplemente por estar presentes, brindarme todo su apoyo, por ser incondicionales y regalarme un poco de felicidad durante toda esta etapa, con esas conversaciones interminables por teléfono y los memes de cada día.

Sacas lo mejor de los demás cuando das lo mejor de ti, pues qué decir de mí, espero haberles dado lo mejor, porque lo que recibí fue más que lo mejor de todos y todas. Finalmente, la gratitud en silencio no sirve a nadie, por eso soy consciente que han sido muchos/as los que me han acompañado durante estos años y les doy mis más sinceros agradecimientos. Si, a ti que tal vez tu nombre no figura en estas páginas, pero no dejas de ser importante o una pieza clave para completar el puzzle personal o laboral en este recorrido. Gracias!

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	11
ÍNDICE DE TABLAS	15
ÍNDICE DE FIGURAS	17
ABREVIATURAS.....	19
RESUMEN	25
SUMMARY	31
1. INTRODUCCIÓN	37
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	41
2.1. SISTEMAS DE PRODUCCIÓN DEL BOVINO DE LECHE	41
2.1.1. Sistemas Intensivos.....	41
2.1.2. Sistemas Extensivos o de Pastoreo.....	42
2.1.3. Sistemas Mixtos, Combinados, Semi-intensivos o Semi-extensivos.....	43
2.1.4. Ganadería Ecológica.....	44
2.2. COMPOSICIÓN DE LA LECHE DE VACA	45
2.2.1. Grasa	46
2.2.2. Proteína.....	50
2.2.2.1. Caseínas	51
2.2.2.2. Seroproteínas	51
2.2.3. Lactosa	52
2.2.4. Enzimas	52
2.2.5. Vitaminas	53
2.2.6. Minerales	53
2.2.7. Componentes Nitrogenados no Proteicos (NNP)	54
2.3. FACTORES QUE MODIFICAN LA COMPOSICIÓN Y CALIDAD DE LA LECHE	55
2.3.1. Genética y Herencia	56
2.3.2. Estado de Lactación	57
2.3.3. Estado Sanitario	57
2.3.4. Estacionalidad y Ambiente	58
2.3.5. Alimentación.....	59
2.4. IMPORTANCIA PARA EL DESARROLLO RURAL DE TENER MARCAS DE CALIDAD O UN PRODUCTO DIFERENCIADO	62
2.5. BIOMARCADORES PARA LA TRAZABILIDAD ALIMENTARIA.....	63
2.5.1. Ácidos Grasos.....	66
2.5.2. Antioxidantes	70
2.5.2.1. Vitamina E.....	72
2.5.2.2. Carotenoides y Vitamina A	72
2.5.3. MicroARN.....	74
3. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL	79

4. EFECTO DEL MODO DE APORTE DE LA HIERBA EN PASTOREO, FRESCA EN CORTE Y ACARREO O ENSILADA, SOBRE LA CAPACIDAD DISCRIMINANTE DE LOS MARCADORES DEL SISTEMA DE ALIMENTACIÓN.....	83
4.1. INTRODUCCIÓN.....	83
4.2. MATERIALES Y MÉTODOS	86
4.2.1. Lugar Experimental	86
4.2.2. Diseño Experimental.....	86
4.2.3. Producción de Leche y Control de Ingestión	87
4.2.3.1. Ingestión de Forraje en Pesebre	87
4.2.3.2. Ingestión de Hierba en Pastoreo	88
4.2.3.3. Ingestión del Pienso Suplementario	91
4.2.4. Toma de Muestras	91
4.2.4.1. Praderas.....	91
4.2.4.2. Ensilado de Hierba, Hierba Fresca en corte y acarreo y Pienso Suplementario	92
4.2.4.3. Leche.....	93
4.2.5. Determinaciones Analíticas	93
4.2.5.1. Alimentos.....	93
4.2.5.2. Leche.....	95
4.2.6. Análisis Estadístico	101
4.3. RESULTADOS	102
4.3.1. Composición Botánica e Índices de Diversidad Florística de las parcelas de pastoreo.....	102
4.3.2. Composición Química de los Alimentos	103
4.3.2.1. Valor Nutritivo y Aporte Energético	103
4.3.2.2. Contenido en Ácidos Grasos.....	104
4.3.2.3. Contenido en Antioxidantes	106
4.3.3. Variables de Producción	106
4.3.4. Producción y Composición de la Leche.....	107
4.3.4.1. Perfil de Ácidos Grasos de la Leche	108
4.3.4.2. Perfil de Antioxidantes de la Leche	111
4.3.4.3. Perfil de microARN de la Leche	111
4.3.4.3.1. Validación de los Normalizadores	111
4.3.4.3.2. MicroARN Diferenciadores.....	113
4.4. DISCUSIÓN.....	115
4.5. CONCLUSIONES	121
5. EFECTO DEL TIPO DE ENSILADO SOBRE LA CAPACIDAD DISCRIMINANTE DE LOS MARCADORES.	125
5.1. INTRODUCCIÓN.....	125
5.2. MATERIALES Y MÉTODOS	128
5.2.1. Lugar Experimental.....	128
5.2.2. Diseño Experimental.....	128

5.2.3. Producción de Leche y Control de Ingestión	129
5.2.3.1 Ingestión de TMR.....	129
5.2.3.2. Ingestión de Pienso Suplementario.....	130
5.2.3.3. Ingestión de Hierba.....	130
5.2.4. Toma de Muestras y Análisis	130
5.2.4.1. Praderas.....	130
5.2.4.2. Ensilado de Raigrás, Ensilado de Habas, Ensilado de Guisantes, Raciones TMR y Pienso Suplementario	131
5.2.5. Análisis Estadístico	131
5.3. RESULTADOS	132
5.3.1. Composición Botánica e Índices de Diversidad Florística de las Parcelas de Pastoreo.....	132
5.3.2. Composición Química de los Ensilados y de la Dieta.....	133
5.3.2.1. Valor Nutritivo y Aporte Energético	133
5.3.2.2. Contenido en Ácidos Grasos.....	134
5.3.2.3. Contenido en Antioxidantes	136
5.3.3. Variables de Producción	136
5.3.4. Producción y Composición de la Leche.....	137
5.3.4.1. Perfil de Ácidos Grasos de la Leche	138
5.3.4.2. Perfil de Antioxidantes de la Leche	142
5.3.4.3. Perfil de microARN de la Leche	142
5.4. DISCUSIÓN.....	144
5.5. CONCLUSIONES	151
6. RECAPITULACIÓN FINAL Y FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN	155
6.1. RECAPITULACIÓN FINAL.....	155
6.2. FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN	157
7. CONCLUSIONES.	161
8. BIBLIOGRAFÍA.....	165
9. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA.....	199
9.1. ARTÍCULOS EN REVISTAS SCI.....	199
9.2. COMUNICACIONES A CONGRESOS	200
9.2.1. Congresos Internacionales.....	200
9.2.2. Congresos Nacionales	200
9.2.3. Artículos Divulgativos	201

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1. Componentes mayoritarios (%) de la leche de diferentes especies de mamíferos	46
Tabla 2.2. Composición de los lípidos de la leche de vaca (%).....	47
Tabla 2.3. Composición promedio (%) de los ácidos grasos (AG) mayoritarios de la leche de vaca.....	49
Tabla 2.4. Concentración de las proteínas de la leche de vaca (g/L).	50
Tabla 4.1. Protocolo programado en el Termociclador GeneAmp PCR System 9700 para la <i>Poly(A) Tailing Reaction</i>	99
Tabla 4.2. Protocolo programado en el Termociclador GeneAmp PCR System 9700 para la <i>Adaptor ligation</i>	99
Tabla 4.3. Protocolo programado en el Termociclador GeneAmp PCR System 9700 para la <i>Reverse Transcription Reaction</i>	100
Tabla 4.4. Protocolo programado en el Termociclador GeneAmp PCR System 9700 para la <i>mirAmp Reaction</i>	100
Tabla 4.5. Protocolo programado en el Termociclador StepOnePlus Real-Time PCR Systems para la qPCR a tiempo real.....	101
Tabla 4.6. Características de las praderas destinadas al pastoreo de las vacas en producción durante el ensayo 2017.	103
Tabla 4.7. Composición química y energía neta de lactación de los alimentos.....	104
Tabla 4.8. Perfil de ácidos grasos de los alimentos (g/100g de ácidos grasos).....	105
Tabla 4.9. Perfil de antioxidantes de los alimentos (mg/kg MS).....	106
Tabla 4.10. Peso vivo corporal y consumos de materia seca de las vacas en función de la ración ofertada.	107
Tabla 4.11. Producción y composición de la leche de acuerdo al sistema de alimentación.....	107
Tabla 4.12. Perfil de ácidos grasos (g/100 g ácidos grasos) según el sistema de alimentación.....	109
Tabla 4.12. Perfil de ácidos grasos (g/100 g ácidos grasos) según el sistema de alimentación (continuación).	110
Tabla 4.13. Composición de antioxidantes liposolubles (mg/kg de leche) según el sistema de alimentación.	111
Tabla 4.14. Expresión de microARN en grasa según el sistema de alimentación.....	114
Tabla 4.15. Expresión de microARN en células según el sistema de alimentación.....	114
Tabla 5.1. Características de las praderas destinadas al pastoreo de las vacas en producción durante el ensayo 2018.	132
Tabla 5.2. Valor nutritivo, aporte energético y parámetros fermentativos de los ensilados.....	133
Tabla 5.3. Composición química y estimación energía neta de lactación de la ración completa mezclada (TMR), del forraje verde de la parcela de pastoreo y del pienso.....	134
Tabla 5.4. Perfil de ácidos grasos de los alimentos (g/100g de ácidos grasos).....	135

Tabla 5.5. Perfil de antioxidantes de los alimentos (mg/kg MS).....	136
Tabla 5.6. Peso vivo corporal (Kg), variación de peso (kg/día) y consumos de materia seca (kg/día) de las vacas en función de la ración ofertada.	137
Tabla 5.7. Producción y composición de la leche de acuerdo al sistema de alimentación.....	138
Tabla 5.8. Perfil de ácidos grasos (g/100 g ácidos grasos) de acuerdo al sistema de alimentación.....	139
Tabla 5.8. Perfil de ácidos grasos (g/100 g ácidos grasos) de acuerdo al sistema de alimentación (continuación).	140
Tabla 5.8. Perfil de ácidos grasos (g/100 g ácidos grasos) de acuerdo al sistema de alimentación (continuación).	141
Tabla 5.9. Composición de antioxidantes liposolubles (mg/kg de leche) según el sistema de alimentación.	142
Tabla 5.10. Composición de microARN en grasa según el sistema de alimentación.	143
Tabla 5.11. Composición de microARN en células según el sistema de alimentación.....	143

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Biohidrogenación Ruminal (Fuente: García et al., 2017)	68
Figura 4.1. Gráfica del promedio de estabilidad de los microARN candidatos a normalizadores en grasa.	112
Figura 4.2. Gráfica del promedio de estabilidad de los microARN candidatos a normalizadores en células.....	113

ABREVIATURAS

Acrónimo	Significado
AA	Aminoácido
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AG	Ácido Graso
AGI	Ácidos Grasos Insaturados
AGMI	Ácidos Grasos Monoinsaturados
AGPI	Ácidos Grasos Poliinsaturados
AGR	Ácidos Grasos Ramificados
AGS	Ácidos Grasos Saturados
AGT	Ácidos Grasos Trans
AGV	Ácidos Grasos Volátiles
ALA	Ácido Alfa-linoléico
ALM	Almidón
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i> (Análisis de Varianza)
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm	Ácido Ribonucleico mensajero
ATF2	<i>Activating Transcription Factor 2</i> (Factor de Transcripción Activador 2)
ATP	<i>Adenosine Triphosphate</i> (Adenosín Trifosfato)
CAE	Código Alimentario Español
CAT	Catalasa
Cdna	<i>Complementary DNA</i> (ADN Complementario)
CEN	Cenizas
CLA	Ácido Linoleico Conjugado
COPAE	Consejo De La Producción Agraria Ecológica Del Principado De Asturias
D	Dieta
DHA	Ácido Docosaheptaenoico
DEMO	Digestibilidad Enzimática de la Materia Orgánica
DMO	Digestibilidad de la Materia Orgánica
DPA	Ácido Docosapentaenoico
DOP	Denominación de Origen Protegida

Dvivo	Digestibilidad <i>in vivo</i> de la Materia Orgánica
EE	Extracto Etéreo
eer	Error Estándar Residual
EM	Energía Metabolizable
EN	Energía Neta
ENAC	Entidad Nacional de Acreditación
EN _d	Energía Neta por la Actividad de Desplazamiento
EN _g	Energía Neta de Gestación
EN _L	Energía Neta para Lactación
EN _m	Energía Neta de Mantenimiento
EN _p	Energía Neta por la Actividad de Pastoreo
EN _{pv}	Energía Neta de Cambio de Peso Corporal
EPA	Ácido Eicosapentaenoico
ESM	Extracto Seco Magro
ETG	Especialidades Tradicionales Garantizadas
FAD	Fibra Ácido Detergente
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i> (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura)
FB	Fibra Bruta
FID	<i>Flame Ionization Detector</i> (Detector de Ionización de Llama)
FND	Fibra Neutro Detergente
G	Guisantes
GC	<i>Gas chromatography</i> (Cromatografía de Gases)
GSHPx	Glutación Peroxidasa
H	Habas
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento)
IGP	Indicación Geográfica Protegida
LA	Ácido Linoleico
LIGAL	Laboratorio Interprofesional Galego de Análise do Leite
LILA	Laboratorio Interprofesional Lechero de Asturias
LOQ	<i>Limit of Quantification</i> (Limite de Cuantificación)
LPx	Lactoperoxidasa

MAFF	<i>Ministry of Agriculture, Fisheries and Food</i> (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación)
MAGRAMA	Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente
MEF2D	<i>Myocyte-specific Enhancer Factor 2D</i> (Factor Potenciador Específico de Miocito 2D)
MELN	Materiales Extractivos Libres de Nitrógeno
MO	Materia Orgánica
MOD	Materia Orgánica Digestible
MS	Materia Seca
MSI	Materia Seca Ingerida
NA	No Analizada
NIRS	<i>Near-Infrared Reflectance Spectroscopy</i> (Espectroscopía de Reflectancia en el Infrarrojo Cercano)
NNP	Nitrógeno No Proteico
NRC	<i>National Research Council</i> (Consejo Nacional de Investigación)
NS	No Significativo
OIE	Organización Mundial de la Sanidad Animal
P	Pastoreo
PAC	Política Agraria Común
PB	Proteína Bruta
PV	Peso Vivo
qPCR	<i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i> (Reacción en Cadena de la Polimerasa)
R	Raigrás Italiano
ROS	Radicales Libres de Oxígeno
SERIDA	Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario
SOD	Superóxido Dismutasa
TAG	Triglicéridos
TMR	<i>Total Mixed Ration</i> (Ración Completa Mezclada)
UE	Unión Europea
UV	Ultravioleta
Σ	Sumatorio

RESUMEN

RESUMEN

En la actualidad, una búsqueda constante por la optimización y sostenibilidad de los sistemas de producción lecheros pone de manifiesto el incremento en la demanda por parte de los consumidores de la distinción de las características nutricionales relacionadas con la calidad de la leche y los productos lácteos, aunado a un uso racional de los recursos, a una disminución en el impacto al medio ambiente y a una producción respetuosa con el bienestar animal. Los sistemas de alimentación basados en pastos y forrajes posibilitan alcanzar dichas propiedades y son un mecanismo clave para mejorar la rentabilidad de las ganaderías, ya que son económicamente competitivos y permiten alterar el perfil nutritivo de la leche y los productos lácteos. Ahora bien, es preciso establecer mecanismos de certificación de los productos que permitan relacionarlos con su sistema de producción.

En el presente trabajo se llevaron a cabo dos experimentos, desarrollados en la Unidad de Leche del Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA) de Asturias, con el objetivo principal de identificar biomarcadores específicos para autenticar el origen y el sistema de alimentación del vacuno lechero a partir de la leche.

El primero de los experimentos, con el objetivo de examinar el efecto del método de suministro del forraje: pastoreo, corte y acarreo o ensilado, sobre el rendimiento de la leche y los perfiles de ácidos grasos, antioxidantes y la expresión de microARN de la leche, con el fin de ser utilizados como biomarcadores del sistema de alimentación, se realizó con un ensayo *in vivo* del 26 de abril al 26 de junio de 2017, siguiendo un diseño *cross-over* con 18 vacas Holstein en lactación distribuidas en tres grupos sobre los que se estudiaron tres tratamientos: 1) estabulación permanente y ensilado de hierba *ad libitum*, 2) estabulación permanente y aporte de hierba *ad libitum* en corte y acarreo, y 3) pastoreo permanente. Durante el ensayo se tomaron muestras de los alimentos ofertados, para determinar su valor nutritivo, y de la leche producida, para análisis de composición química, perfil de ácidos grasos, antioxidantes y expresión de microARN. Se observó que las vacas en pastoreo tuvieron más ingesta de materia seca que las vacas en estabulación con corte y acarreo o ensilado de hierba *ad libitum* (18,1 vs. 14,1 y 15,2 kg/día respectivamente, $p < 0,001$). El rendimiento en la producción de leche fue diferente entre los tratamientos experimentales, así como las proporciones de proteína, lactosa, sólidos no grasos y urea, con una mayor concentración en la leche de las vacas en pastoreo que en las estabuladas. Dentro del perfil de la materia grasa de las muestras de leche de los diferentes tratamientos, se encontraron diferencias significativas en la

proporción de algunos ácidos grasos, como el vaccénico, ruménico, y en la ratio C18:1 *trans*-11/C18:1 *trans*-10 en los animales en pastoreo, lo cual, denota una dieta con un alto consumo de ácidos grasos poliinsaturados provenientes de la hierba fresca. En el contenido de antioxidantes liposolubles no se observaron diferencias significativas en la concentración de vitaminas A y E en la leche de acuerdo con el sistema de alimentación. La leche de las vacas en pastoreo tuvo una mayor proporción de luteína que la de las vacas alimentadas con ensilado de hierba ($p < 0,01$), con valores intermedios en el sistema de corte y acarreo. Sin embargo, no encontramos diferencias entre los tratamientos en la concentración de carotenos u otros antioxidantes debido, probablemente, a que toda la alimentación se realizó con pastos muy similares. La leche de vacas en pastoreo presentó una mayor proporción en ambas fracciones de bta-mir451 que la leche de vacas en estabulación que recibieron forraje verde de corte y acarreo o ensilado de hierba ($p < 0,01$).

El segundo experimento tenía como objetivo evaluar la influencia en la dieta, con y sin pastoreo, de leguminosas con creciente implantación en la cornisa cantábrica sobre la producción y composición de la leche, especialmente en el perfil de ácidos grasos, antioxidantes y expresión de microARN. Este ensayo se llevó a cabo del 6 de marzo al 7 de mayo de 2018, siguiendo, de igual manera que en el anterior, un diseño *cross-over* con 18 vacas en producción distribuidas en seis grupos sobre los cuales se estudiaron seis tratamientos: 1) estabulación permanente y ración completa mezclada de raigrás italiano, *ad libitum* 2) estabulación permanente y ración completa mezclada de habas forrajeras, *ad libitum* 3) estabulación permanente y ración completa mezclada de guisantes forrajeros, *ad libitum* 4) pastoreo continuo y oferta de dos horas tras cada ordeño de ración completa mezclada de raigrás italiano 5) pastoreo continuo y oferta de dos horas tras cada ordeño de ración completa mezclada de habas forrajeras y 6) pastoreo continuo y oferta de dos horas tras cada ordeño de ración completa mezclada de guisantes forrajeros. Durante el ensayo se tomaron muestras de los alimentos ofertados, para determinar su valor nutritivo, y de la leche producida, para análisis de composición química, perfil de ácidos grasos, antioxidantes y expresión de microARN, de modo similar al ensayo realizado en el 2017. En los resultados obtenidos de la materia grasa de las muestras de los diferentes tratamientos se observaron fuertes cambios relacionados con el consumo de diferentes tipos de ensilado en la dieta y al manejo con y sin pastoreo. Cuando se sustituye el ensilado de raigrás italiano por ensilado de leguminosas, la grasa de la leche tiene una mayor proporción de ácidos grasos insaturados, especialmente con la inclusión de ensilado de haba en la ración. La práctica del pastoreo en la alimentación de las vacas influye directamente en la

composición de la leche, mejorando su calidad al disminuir la proporción de ácidos grasos saturados e incrementar el contenido en insaturados, monoinsaturados, poliinsaturados y ácido linoleico conjugado, proporcionando de esta manera un perfil de ácidos grasos más saludable. En el contenido de antioxidantes liposolubles en la leche de acuerdo con la presencia o no de pastoreo, no se observaron diferencias significativas en la vitamina A, sin embargo, se observaron diferencias muy marcadas en la vitamina E, las xantofilas y β -Carotenos. A nivel de dieta, la leche de las vacas estabuladas tuvo más proporción de γ -tocoferol, contrariamente, a la leche de vacas con pastoreo que mostró diferencias significativas en cuanto a luteína y β -criptoxantina, con lo que podemos establecer que la presencia del pastoreo en la alimentación de las vacas influye directamente en el aumento de la proporción de los antioxidantes. En la capacidad para diferenciar la influencia de la inclusión en la dieta, con o sin pastoreo, de diferentes tipos de ensilados (raigrás, haba forrajera y guisantes) de los microARN de la fracción grasa y de las células de la leche no se observó ningún efecto de diferenciación significativo de la dieta en ninguno de los microARN estudiados en la fracción de la grasa, sin embargo, en presencia o no de pastoreo, el bta-mir451 es capaz de diferenciar entre tratamientos en estabulación o pastoreo. De igual manera, diferencias significativas se observaron entre dietas y en las vacas en pastoreo, con una mayor proporción del bta-mir451 en los tratamientos con pastoreo y diferencias significativas del bta-mir103 y bta-mir155 al comparar la leche de las vacas en pastoreo con la leche de las vacas en estabulación ($p < 0,01$).

Mediante el presente trabajo, se ha demostrado que la modificación de la composición de la leche está asociada al sistema de alimentación y que el uso de leguminosas como el haba forrajera y los guisantes son alternativas viables al raigrás italiano, que resultan más sostenibles para el medio ambiente al reducir el uso de insumos, por su capacidad fijadora de nitrógeno, y como fuente proteica para la alimentación del ganado, al mismo tiempo que son capaces de modificar el perfil de ácidos grasos y antioxidantes liposolubles de la leche, haciendo de ésta un producto más saludable para los consumidores. A su vez, la presencia de la práctica de pastoreo en la alimentación influye directamente en la composición de la leche, mejorando su perfil de ácidos grasos y antioxidantes y aumentando la expresión del bta-mir451.

SUMMARY

SUMMARY

Today, a constant search for the optimization and sustainability of dairy production systems shows the increase in consumers demand on the distinction of nutritional characteristics related to the quality of milk and dairy products, connected to a rational use of resources and a diminution on the environment impact. Grass and fodder-based feeding systems are a key mechanism for improving livestock profitability, as they are economically competitive and alter the nutritional profile of milk and dairy products.

In this work, two experiments were carried out in the Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA) of Asturias, with the main objective of identifying specific biomarkers, to authenticate the origin and feeding system of dairy cattle.

The aim of the first experiment was to evaluate the effect on milk of the forage supply method: grazing, zero-grazing or silage. Milk quality was evaluated on the base of milk yield, fatty acids and antioxidants profiles and microRNA expression of milk. An *in vivo* trial was carried out from 26 April to 26 June 2017, following a cross-over design, including eighteen homogeneous Holstein dairy cows in the second half of lactation, that were selected and randomly distributed into three groups of six cows each one. Three treatments were tested: 1) grass silage 2) zero-grazing, both *ad libitum* and in housing, and 3) permanent grazing. During the assay period, samples of the food offered were taken daily to determine its nutritional value. Individual samples of milk were taken daily on each milking session (morning and afternoon) to analyse its chemical composition, fatty acid and antioxidants profile and microRNA expression. Grazing cows had more dry matter intake than housed cows with zero-grazing or grass silage (18.1 vs. 14.1 and 15.2 kg day⁻¹ respectively, $p < 0.001$). Milk yield was different among the experimental treatments, as well as, protein, lactose, solid non-fat and urea, with higher concentration in milk from grazing cows than housed cows. Milk fat from grazing cows had a higher proportion of unsaturated fatty acids, with significant differences in the proportion of vaccenic, rumenic acids and in the ratio C18:1 *trans*-11/C18:1 *trans*-10, which denotes a diet with high consumption of polyunsaturated fatty acids from fresh grazing grass. No significant differences were observed in vitamins A and E in milk due to type of feeding system. Milk from grazing cows had more proportion of lutein than cows feeding grass silage ($p < 0.01$), with zero-grazing system with intermediates values. However, there were no differences in carotenes concentration and other antioxidants among treatments. In the ability to differentiate the effect on milk of the forage supply method

through the expression of different microRNA, no significant effect of the diet was observed in any of the microRNA studied in both fractions (fat and cells). However, milk from grazing cows had a higher proportion in both fractions of bta-mir451 than milk from housed cows who were fed with zero-grazing and grass silage ($p < 0.01$).

Legumes are increasing implantation in the north of Spain. The second experiment has thus the aim to evaluate the effect of the inclusion of different legumes (faba bean and pea bean), in the diet, with and without grazing in the production and composition of the milk especially in fatty acids and antioxidants profiles and microRNA expression. This trial was carried out from 6 March to 7 May 2018, following two 3 x 3 Latin square experiments performed in parallel with 18 lactating cows in the second half of lactation randomized into two groups and subdivided into three subgroups of three cows. Experimental treatments consisted on: 1) Italian raygrass silage unified *ad libitum* in housing, 2) faba bean silage unifeed *ad libitum* in housing, 3) pea silage unifeed *ad libitum* in housing, 4) italian raygrass silage unifeed offered at two hours of access after each milking and grazing the rest of the day, 5) faba bean silage unifeed offered at two hours of access after each milking and grazing the rest of the day, and 6) pea silage unifeed offered at two hours of access after each milking and grazing the rest of the day. During the assay period, samples of the food offered were taken daily to determine its nutritional value. Individual samples of milk were taken daily on each milking session (morning and afternoon) to analyse its chemical composition, fatty acid and antioxidants profile and microRNA expression, similar to the 2017 trial. Strong changes in milk fat related to the consumption of different types of silage in the diet and the management with and without grazing were observed in the results obtained from the different treatments. When Italian raygrass silage is replaced by legume silage, milk fat has a higher proportion of unsaturated fatty acids, especially with the inclusion of faba bean silage in the ration. The practice of grazing in the feeding of cows has directly influences in the composition of milk, improving its quality by decreasing the proportion of saturated fatty acids and increasing the content in unsaturated, monounsaturated, polyunsaturated and conjugated linoleic acid, thus providing a healthier fatty acid profile. In the content of fat-soluble antioxidants in milk according to the presence or not of grazing, no significant differences in vitamin A were observed, however, very marked differences in vitamin E, xanthophiles and β -Carotenes were observed. At the diet level, the milk of the housed cows had more proportion of γ -tocopherol, contrary to the milk of grazing cows that showed significant differences in lutein and β -cryptoxanthin, so we can establish that the presence of grazing in the feeding of cows has directly influences in the increase of antioxidants proportion.

In the ability to differentiate the influence of the inclusion in the diet, with or without grazing, of different types of silages (raygrass, fava bean and pea bean) of the microRNAs of the fat fraction and milk cells no significant dietary differentiation effect was observed in any of the microRNAs studied in the fat fraction, however, the presence or not of grazing, bta-mir451 is able to differentiate between treatments in housed or grazing cows. Similarly, significant differences were observed between diets and grazing cows, with a higher proportion of bta-mir451 in grazing treatments and significant differences in bta-mir103 and bta-mir155 when comparing milk from grazing cows with housed cows milk ($p < 0.01$).

Through this work, it has been shown that the modification of the composition of milk is associated with the feeding system and that the use of legumes, such as faba bean and pea bean are, viable alternatives to the Italian raygrass. Moreover, legumes are more sustainable for the environment by reducing the use of inputs because of their nitrogen-fixing capacity and as a protein source for livestock feed, at the same time they are able to modify the milk fatty acid and fat-soluble antioxidants profiles, making it a healthier product for consumers. In turn, the presence of grazing practice in the feeding has directly influences in the composition of milk, improving its fatty acid and antioxidant profiles and increasing the expression of bta-mir451.

CAPITULO 1

Introducción

1. INTRODUCCIÓN

Con el fin de optimizar el rendimiento de leche por hectárea y en vías de la búsqueda de la sostenibilidad de los sistemas de producción ganaderos, a través del aprovechamiento de los recursos propios de las explotaciones, hoy en día, se pone de manifiesto el creciente interés de los consumidores por reducir el impacto en el medio ambiente, garantizar el bienestar animal y determinar el origen y el método de producción de alimentos, reflejándose en una creciente preferencia por los productos alimenticios de los sistemas de producción basados en pastos y forrajes (Elgersma, 2015). La producción de leche basada en pastos y forrajes se extiende ampliamente por todo el Arco Atlántico y en la Cornisa Cantábrica, particularmente en Asturias, se dan las condiciones idóneas para su desarrollo.

El forraje, fresco o conservado, es una parte esencial de las dietas de las vacas lecheras. Los sistemas de alimentación basados en la utilización de recursos forrajeros propios son una alternativa para solventar el problema actual de la pérdida de rentabilidad económica en las explotaciones debido, principalmente, al aumento en los precios de los insumos. Los modelos basados en el pastoreo permiten ahorrar costes de alimentación (Peyraud y Delegard, 2013). Por otro lado, la necesidad de reducir el impacto ambiental de las explotaciones y aumentar la autosuficiencia proteica, garantizando una mejora en la calidad de la leche y los productos lácteos, a través del uso de formas más económicas y ecológicas de producir proteínas locales, con el empleo de leguminosas forrajeras, se convierte en una vía para alcanzar una mejor sostenibilidad económica, ambiental y social (Lüscher et al., 2014; Puhakka et al., 2016, Baizán, 2019). Las leguminosas ponen de relieve su gran potencial como una alternativa en los sistemas de producción lecheros por su gran capacidad como fijadoras de nitrógeno atmosférico en el suelo, garantizando un menor uso de insumos en forma de fertilizantes minerales, sumado a una mayor diversificación en la rotación de cultivos, que contribuye a la disminución de enfermedades, plagas y acumulación de especies arvenses, además de un incremento de la biodiversidad; menor uso y contaminación del agua y un mayor secuestro de carbono (Cellier et al., 2016; Watson et al., 2017).

La composición de ácidos grasos de la grasa de la leche depende en gran medida de los sistemas de alimentación del ganado vacuno (Dewhurst et al., 2006; Chilliard et al., 2007; Hernández-Ortega et al., 2014; Morales-Almaraz *et al.*, 2018), al igual que su contenido en antioxidantes liposolubles (Havemose et al., 2004; Elgersma et al., 2013) y, la expresión de ciertos microARN (Muroya et al., 2016). Por lo tanto, cobra gran importancia la calidad del forraje de una explotación, ya que es un factor

determinante de la cantidad y calidad de la leche producida en la misma. La leche de vacas de pastoreo o alimentadas con forrajes frescos, especialmente de pastizales ricos en especies o leguminosas forrajeras, tiene una proporción considerablemente mayor de ácidos grasos insaturados que saturados y un mayor contenido de ácidos grasos nutricionalmente beneficiosos, como los ácidos ruménico y vaccénico, y antioxidantes liposolubles, que la leche de vacas alimentadas a base de ensilados de maíz o heno (Agabriel et al., 2007; Kalac y Samková, 2010). El estudio de distintos sistemas de producción del vacuno lechero permite evaluar posibles mejoras visibles a corto plazo de la calidad nutricional de la leche y los productos lácteos, puede permitir su autenticación con biomarcadores que diferencien no solo el sistema de producción, sino también la dieta, el ejercicio y el bienestar animal, y permitir la trazabilidad de la “granja a la mesa”, lo que garantizará una plusvalía en el valor de la producción (Monahan et al., 2010; Moloney et al., 2014).

En base a todo lo anterior, y con el fin de identificar biomarcadores específicos en la leche de vaca que posibiliten la autenticación de su origen en función del sistema de producción para su posible tipificación en base a una alimentación rica en pastos y forrajes, que suponga un valor agregado a la producción de los sistemas ganaderos de leche, se planteó esta tesis de investigación. Se pretende que con los resultados obtenidos se logre determinar un sistema de producción de leche de vaca que combine una mayor autosuficiencia proteica y reducción de insumos, niveles de producción óptimos, al igual que una posible mejora en la calidad de la leche y los productos lácteos y su posible trazabilidad, en vías a una mayor sostenibilidad desde un punto de vista medioambiental y económico.

CAPITULO 2

Revisión bibliográfica

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. SISTEMAS DE PRODUCCIÓN DEL BOVINO DE LECHE

La producción ganadera está caracterizada por diferentes elementos que, de forma equilibrada y armónica, tienen como objetivo la obtención de productos o servicios que sirven de interés al hombre. Su definición y caracterización es compleja debido a la variedad de factores que se desarrollan dentro de ellos, entre de los cuales figuran los recursos naturales, económicos, humanos y tecnológicos que, entrelazados entre sí, tienen la finalidad de lograr el objetivo propuesto.

Según la OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal) los sistemas de producción de ganado vacuno de leche se definen como todo sistema comercial de producción de bovino cuyo propósito incluye la crianza, la reproducción y la gestión del ganado con vistas a la producción de leche (OIE, 2016). De esta manera, las vacas lecheras en los sistemas comerciales de producción pueden mantenerse en sistemas de estabulación o de pastoreo, o en una combinación de ambos.

2.1.1. Sistemas Intensivos

La ganadería intensiva se caracteriza por mantener a los animales en un entorno con elementos artificiales, con el objetivo de aumentar la productividad en el plazo más corto posible. Este tipo de ganadería pretende una mayor rentabilidad al reducir los costes de producción mediante la economía de escala.

Son sistemas que se caracterizan por ser altamente tecnificados, con una alta densidad de población, un alto rendimiento de productos por animal y unidad de superficie. Constituye una proporción relativamente grande de la producción de leche en el mundo. El ganado se mantiene en superficies delimitadas, interiores o exteriores, y depende por completo del hombre para satisfacer sus necesidades básicas. Los sistemas intensivos están dirigidos a situar al ganado en condiciones tales que permitan obtener de él los máximos rendimientos productivos en el menor tiempo posible, lográndolo generalmente, por la alta eficiencia en la conversión de piensos en productos utilizables para el hombre (Marín, 1996; Steinfeld et al., 2013). Se caracteriza por un alto aporte de concentrados y un mínimo de forrajes con el fin único de mantener la funcionalidad ruminal. Debido a su capacidad para responder rápidamente a la creciente demanda humana, los sistemas intensivos de producción ganadera representan ahora una parte dominante de la producción de leche (Steinfeld et al., 2013).

Presenta una serie de ventajas. Alcanza una alta producción, por lo que puede ser muy eficiente para el nivel de inversión, por lo que su precio suele ser competitivo. Puede adaptarse fácilmente a incrementos o reducciones de la demanda del consumidor. El producto es homogéneo, lo que favorece su atractivo en el mercado. El control de los animales es constante y reciben una alimentación equilibrada dirigida a maximizar la producción. Sin embargo, también tiene algunas desventajas. Precisa de una gran inversión en instalaciones, mano de obra y alimentos. Tiene un alto consumo de energía y agua por cada unidad de producto obtenido. Implica una intensificación de la superficie de cultivo para proveer de alimentos a los animales. El ganado está sujeto a condiciones de estrés (luz artificial, interacción continua con el ganadero, competitividad entre animales por los espacios, etc.). En determinados casos, sacrifica el bienestar de los animales en favor de un mayor beneficio económico. La producción de estiércol y purines de modo tan concentrado puede contaminar el suelo y las aguas. A pesar de que hay un alto control sanitario, hay grandes posibilidades de que a veces aparezcan enfermedades derivadas de la alta concentración de animales. Un mayor nivel de producción por vaca y lactación a medida que tienen mayor tamaño, supone una disminución en el número de lactaciones de la vaca y, por tanto, un mayor porcentaje de renovación. La mayor producción lechera de las vacas implica un peor rendimiento reproductivo, ya que aparecen problemas de fertilidad que se ven reflejados en un mayor número de días abiertos que incrementa cerca de un mes el intervalo entre partos (Jiménez-Calderón et al., 2017).

2.1.2. Sistemas Extensivos o de Pastoreo

La ganadería extensiva es un sistema de producción animal que se vincula al aprovechamiento de recursos naturales del territorio, basado en la carga ganadera y principalmente mediante pastoreo, con una baja utilización de insumos externos. Básicamente se trata de mantener a los animales en extensiones de terreno suficientes para una manutención más o menos natural. De este modo, se imita el ambiente en el que vivirían los animales antes de su industrialización, intentando que su desarrollo sea lo más natural posible. En general se caracteriza por el empleo de ganado adaptado al territorio, el aprovechamiento de pastos diversos ajustándose a su disponibilidad espacial y temporal, y el respeto del medio en el que se sustenta. Desde el punto de vista legal, se considera que una explotación ganadera extensiva es la explotación realizada con disposición total o parcial de una base territorial con aprovechamiento de pastos o prados para alimentar el ganado (RD 1259/1991). Se distinguen varias categorías de extensificación, siempre refiriéndose a la base territorial (Serrano y Mantecón, 2003).

Son sistemas que se caracterizan por una alimentación mayoritariamente con pastos y forrajes, haciendo poco uso de alimentos concentrados, lo que, garantiza una disminución en los costes de producción. Con frecuencia se asientan en medios desfavorables para el cultivo agrícola pero que proporcionan los recursos necesarios para la alimentación de los animales, empleo e ingresos en un número considerable de sociedades rurales, asegurando una sostenibilidad a futuro. Estos sistemas bien manejados, interactúan significativamente con el medio ambiente manteniendo los recursos naturales, proporcionando cobertura vegetal, que contribuye a la biodiversidad y a la fijación de carbono (Marín, 1996; Steinfeld et al., 2013).

La ganadería extensiva presenta una serie de ventajas. Hay una menor presión en el uso del territorio. Se requiere por hectárea de menos recursos energéticos, de mano de obra y materiales. Permite preservar los ecosistemas y la biodiversidad. Los animales están sujetos a una menor presión de producción por lo que presentan menores niveles de estrés. Sin embargo, presenta una serie de desventajas. Requiere de mucha superficie agraria, y para disponer de ella en algunos casos entra en competencia con otras actividades, recurriendo en ocasiones a la deforestación. Al tener una producción por animal menor es más ineficiente en el uso de costes. Sus productos suelen ser más caros y menos competitivos en precios en el mercado. El ciclo de producción no se ajusta necesariamente a la oferta de pastos y forrajes, por lo que puede haber períodos que requieran aporte suplementario de alimentos. Es muy dependiente de las condiciones climáticas. Existe una estacionalidad en la producción. Los productos no son homogéneos, haciéndolos menos atractivos en el mercado.

2.1.3. Sistemas Mixtos, Combinados, Semi-intensivos o Semi-extensivos

Son sistemas intermedios que cuentan con características en los que los animales se manejan dentro de una combinación de sistemas de producción con estabulación y periodos de pastoreo, sea simultáneamente o dependiendo de factores relacionados al clima, la disponibilidad de alimento y el estado físico del animal (OIE, 2016.; Marín, 1996).

Se caracterizan generalmente, por una menor utilización de insumos externos, que los sistemas intensivos. Combinan diversas fuentes de alimentación que van desde prados y praderas, preferentemente en pastoreo, cultivos forrajeros y residuos de cultivos, hasta los alimentos concentrados a base de granos y diversos suplementos, presentando, estrechas interacciones con la base de recursos naturales (Tarawali et al., 2004). La suplementación en los sistemas mixtos trata de incrementar la producción por

animal y unidad de superficie, aumentando el consumo de materia seca y energía que puede aportar el pasto (Peyraud y Delaby, 2001).

Como sistema intermedio entre el extensivo y el intensivo, requiere inversiones en tecnología e infraestructuras y exige un manejo adecuado tanto de animales como de la superficie agraria. Presenta la ventaja de ejercer un mayor control en la alimentación. Implica el uso intensivo de parcelas y la conservación de forrajes, así como permitir expresar en mayor medida el potencial genético del ganado. Sin embargo, requiere una mayor inversión en infraestructura y mano de obra.

2.1.4. Ganadería Ecológica

Existe una tendencia social en los últimos años al consumo de productos elaborados de manera orgánica. Dicha preferencia, más que una inclinación hacia los métodos de producción, está ligada al concepto de lo natural, a la preocupación de los consumidores por el medio ambiente y el bienestar ambiental, a la demanda de productos de mayor calidad alimentaria, sin importar que estos alimentos sean más caros que los de producción convencional. Una predisposición al consumo de alimentos, que generalmente suponen ser más sanos, más seguros, más nutritivos, libres de pesticidas y que garantizan la sostenibilidad agrícola, genera cierta incertidumbre a nivel científico y agrícola, donde las investigaciones planteadas hasta el momento, no demuestran una realidad clara o netamente diferente a lo que hasta ahora se ha propuesto (McCarty y DiNicolantonio, 2014).

La cría ecológica de animales, más allá de estar fundamentada en un manejo agrario adecuado, se asienta en el principio de complementariedad suelo-animal (Gobierno de La Rioja, 2016), donde se deben cumplir una serie de fundamentos y normas de producción, sobre el manejo de los pastos, el ganado, la alimentación, sanidad, gestión del estiércol y el purín, etc. (COPAE, 2012). Debe cumplir los requisitos legales establecidos en el Reglamento europeo UE 2018/848 sobre producción ecológica y etiquetado de los productos ecológicos.

El Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente de España define la ganadería ecológica como un sistema de producción sin el uso de sustancias químicas de síntesis, ni de organismos modificados genéticamente; con la alimentación basada en forrajes y piensos ecológicos obtenidos principalmente de la propia explotación, y que fomenta el respeto al bienestar de los animales, sin forzar sus ciclos naturales, con alojamientos adecuados y acceso a pastos. (MAGRAMA, 2014)

En este sentido, los sistemas de producción de la ganadería ecológica, a veces llamados biológicos u orgánicos, combinan los métodos tradicionales de producción con las tecnologías agrícolas modernas, lo que, no solo los hace sistemas de producción alternativos, sino que, se pueden diferenciar considerablemente uno de los otros, ya que, cada uno adapta sus prácticas para satisfacer necesidades ambientales y económicas específicas, con objetivos de sostenibilidad basados en la productividad, el impacto ambiental, la viabilidad económica y el bienestar social, donde la calidad del producto, el fomento de las razas autóctonas y el desarrollo de las zonas rurales, son aspectos que juegan un papel importante en su desarrollo (Altieri et al., 1999; MAGRAMA, 2014; Reganold y Wachter, 2016).

2.2. COMPOSICIÓN DE LA LECHE DE VACA

La leche, por sus características nutricionales, tiene una gran importancia para el ser humano y su alimentación, proporcionando un elevado contenido de nutrientes en relación a su contenido calórico. Según lo establecido en el Código Alimentario Español (CAE) (Decreto 2484/1967, de 21 de septiembre), la leche es el producto íntegro, no alterado ni adulterado y sin calostro, procedente del ordeño higiénico, regular, completo e ininterrumpido de las hembras mamíferas domésticas sanas y bien alimentadas. Cabe señalar, que la denominación de leche sin indicación de la especie animal de la que procede, se reserva exclusivamente a la leche de vaca, cualquier otra leche procedente de otra especie, debe designarse por la denominación leche seguida de la especie animal de la que procede (Gómez y Mejía, 2005). La legislación europea reserva exclusivamente la denominación de leche, así como la de productos lácteos derivados, como nata, chantillí, mantequilla, queso y yogur, a los productos de origen animal (Reglamento UE 1308/2013), salvo las excepciones establecidas expresamente, como la leche de almendras, única excepción admitida en España (Decisión UE 2010//791).

La leche es una compleja mezcla de distintas sustancias, que se encuentran presentes en suspensión o emulsión, de las cuales, podemos encontrar dentro de sus componentes mayoritarios, el agua (87%), seguido de la lactosa (4,6%), la grasa (4,2%), la proteína (3,6%), minerales (0,8%) y vitaminas (0,1%; Jennes, 1986; Lindmark Månsson, 2008). Algunos componentes de la leche están presentes en cantidades sensibles (componentes mayoritarios: grasa, sustancias nitrogenadas, lactosa y sales minerales), mientras que otros se encuentran en proporciones pequeñas (enzimas, pigmentos, vitaminas, etc.) (Tabla 2.1). Todas estas sustancias son sintetizadas en la glándula mamaria por células especializadas agrupadas en alveolos, los cuales, están

formados por capilares sanguíneos y células mioepiteliales, que absorben de la sangre los precursores de la leche y sintetizan sus componentes (Martínez, 2011).

La composición de la leche bovina está influenciada por muchos factores relacionados con el animal individual o con el medio ambiente. Son numerosos y variados los factores que influyen en el rendimiento y la composición de la leche bovina (Schwendel et al., 2015), dentro de los cuáles son destacables la dieta (Ferlay et al., 2008; Larsen et al., 2010), raza (Soyeurt et al., 2006; Palladino et al., 2010), fase de lactación (Craninx et al., 2008; Stoop et al., 2009), manejo (Coppa et al., 2013), estación del año (Heck et al., 2009), estado de salud (O'Callaghan et al., 2019), así como de las interacciones entre todos estos factores (Macdonald et al., 2008; Piccand et al., 2013; Stergiadis et al., 2013). De todos los factores mencionados anteriormente, la dieta es un factor primario que puede ser dirigido para manipular la composición y el estado nutricional de la leche bovina (Allothman et al., 2019).

Tabla 2.1. Componentes mayoritarios (%) de la leche de diferentes especies de mamíferos

Especie	Extracto Seco Magro	Proteína	Grasa	Lactosa	Cenizas
Humana	12,42	0,9-1,7	3,74	6,37	0,30
Vaca	12,73	3,42	4,09	4,82	0,72
Búfala	15,7-17,2	2,7-4,7	5,3-9,0	3,2-4,9	0,8-0,9
Oveja	18,15	5,73	6,99	4,75	0,93
Cabra	13,32	3,26	4,07	4,51	0,85
Rena	37,58	9,90	15,50	1,20	0,91
Yegua	9,42	1,90	1,30	6,90	0,36
Asna	11,04	1,72	0,38	6,88	0,47
Camella	15,38	3,26	3,80	4,30	0,74
Llama	13,45	4,20	4,70	5,90	0,80
Yak	16,9-17,7	4,9-5-3	5,5-7,2	4,5-5,0	0,8-0,9

Fuentes: Acevedo, (2007); Claeys et al., (2014); Numpaque et al., (2019).

2.2.1. Grasa

La fracción grasa de la leche es uno de sus constituyentes más importantes en cuanto a su enorme importancia nutricional. Como su principal contribuyente energético, es esencial para muchas de las propiedades físicoquímicas, cualidades de fabricación y características organolépticas de los productos lácteos (Harvatine et al., 2009). Desde un punto de vista funcional, la grasa juega un papel en la preferencia del consumidor por los productos lácteos, especialmente cuando es uno de sus componentes

principales. Además, la grasa puede ser una fuente de rasgos de sabor deseables o indeseables en la leche y los productos lácteos, principalmente porque una gran parte de los compuestos volátiles de sabor son liposolubles (Allothman et al., 2019).

La grasa de la leche se presenta en forma de glóbulos, con un núcleo hidrofóbico, que está constituido mayoritariamente (95%) por triglicéridos (TAG), rodeados de una membrana de naturaleza lipoproteica compuesta principalmente por fosfolípidos y glicoproteínas (Calvo et al., 2014). En su composición podemos encontrar, además otros lípidos simples (diglicéridos, monoglicéridos, ésteres de colesterol y ceras), lípidos complejos (mayoritariamente fosfolípidos), colesterol, antioxidantes (especialmente tocoferoles) y escualeno (Jensen, 2002) (Tabla 2.2). De igual manera, los lípidos de la leche juegan un papel como transporte de las vitaminas liposolubles (A, D, E y K), así como de los carotenoides (Juárez y Fontecha, 2009).

Tabla 2.2. Composición de los lípidos de la leche de vaca (%).

Lípidos	Rango promedio
Triacilglicerol	97 – 98
Colesterol	0,42
Fosfolípidos	0,2 – 1,0
Diacilglicerol	0,28 – 0,59
Ácidos grasos libres	0,10 – 0,44
Monoacilglicerol	0,16 – 0,38
Ésteres de colesterol	0,02
Hidrocarbonos	Trazas

Fuente: Jensen (2002).

La grasa de la leche se compone de aproximadamente 400 ácidos grasos diferentes de varias longitudes de cadena y grados de saturación (Tabla 2.3). La grasa láctea está compuesta en su mayoría de un elevado contenido de ácidos grasos saturados (AGS), del orden del 60-70 %, un 20-25 % corresponden a ácidos grasos monoinsaturados (AGMI), en los cuáles el ácido oleico (C18:1 *cis*-9) es su mayor representante, estando presente en un 20-22% y un 1-4 % de ácidos grasos trans (AGT), y 2-5 % de ácidos poliinsaturados (AGPI), en cuya fracción está incluido el ácido linoleico (C18:2 *cis*-9, *cis*-12) y el ácido linoleico conjugado (CLA). Ha habido un creciente interés en aumentar el contenido de ácido transvaccénico y los isómeros de ácido linoleico, porque se ha demostrado un efecto positivo en la salud contra la diabetes, la obesidad y el síndrome metabólico (Nudda et al., 2014; Shingfield y Wallace, 2014; Lordan et al., 2018). Además del CLA, la grasa de la leche contiene tipos

importantes de ácidos grasos Omega-3 (n-3) como los ácidos eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA) que son esenciales para el funcionamiento fisiológico normal y la salud humana (Palmquist, 2009). Entre los factores beneficiosos de estos componentes de la grasa de la leche para la salud, se han demostrado propiedades reductoras de la colesterolemia, antibacterianas y anticancerígenas, así como aglutinantes de vitaminas en la membrana del glóbulo graso de la leche bovina (MFGM) y en sus fosfolípidos agentes contra el cáncer de colon, patógenos gastrointestinales, enfermedad de Alzheimer, depresión y estrés (Spitsberg, 2005; Fong et al., 2007; MacGibbon y Cucco, 2007; Conway et al., 2014; Mohan et al., 2020).

Se han identificado dos fuentes de ácidos grasos en la leche bovina: el alimento (dieta de los animales) o como productos de procesos digestivos y metabólicos en el rumen por la síntesis *ex novo* (Lindmark Månsson, 2008). Los ácidos grasos de cadena larga generalmente se derivan de fuentes dietéticas y llegan a la leche a través del torrente sanguíneo, mientras que los ácidos grasos de cadena corta y media (C4 a C14 y algunos C16) se producen en la glándula mamaria por síntesis *ex novo* a partir de precursores como el acetato y el butirato (Bauman y Griinari, 2003; Palmquist, 2006). El acetato producido a partir de la fermentación de carbohidratos en el rumen, además del β -hidroxibutirato producido a partir del butirato absorbido por el epitelio ruminal, representa la fuente de carbono para la síntesis de estos ácidos grasos en la glándula mamaria del rumiante (es decir, síntesis *ex novo*). La otra mitad de los AG de 16 átomos de C y todos los AG de longitud de cadena más larga (18 o más átomos de C) llegan a la glándula mamaria por vía sanguínea procedentes de los lípidos de la dieta o desde la movilización de las reservas corporales (Bauman y Griinari, 2003).

Debido a la respuesta relativamente rápida de la fracción de lípidos a los cambios en la dieta en comparación con otros componentes de la leche, el sistema de alimentación tiene un efecto pronunciado sobre el contenido y la composición de la grasa de la leche (es decir, sobre el perfil de ácidos grasos). Estos cambios se producen ya sea mediante la introducción de ácidos grasos que se derivan directamente de los ingredientes de la alimentación, a través de la alteración de las condiciones del rumen (por ejemplo, pH) o mediante una fuente dietética al proporcionar ácidos grasos sustrato que se biohidrogenan en el rumen a otros ácidos grasos (por ejemplo, C18:3 n-3 se descompone en ácido linolénico, ácido vaccénico, CLA y otros ácidos grasos) (Lindmark Månsson, 2008; O'Callaghan et al., 2018).

Tabla 2.3. Composición promedio (%) de los ácidos grasos (AG) mayoritarios de la leche de vaca.

AG (nº de átomos de C)	Rango Promedio
4:0	3,13
6:0	1,94
8:0	1,17
10:0	2,48
12:0	2,99
14:0	10,38
14:1 <i>cis</i> -9	1,08
15:0 iso	0,29
15:0 anteiso	0,5
15:0	1,05
16:0 iso	0,22
16:0	28,51
16:1 <i>cis</i> -9	1,73
17:0 iso	0,55
17:0 anteiso	0,52
17:0	0,73
18:0	10,51
18:1 <i>cis</i> -9	20,5
18:1 (total) <i>trans</i>	4,25
18:2 <i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12	3,13
Otros 18:2	1,03
18:3 <i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12, <i>cis</i> -15	0,59
CLA	1,03
Total saturados	64,97
Total insaturados	27,56
Total poliinsaturados	5,78

Adaptado de Fontecha y Juárez, (2012). Fuente: Calvo et al., (2014).

2.2.2. Proteína

Del total de nitrógeno presente en la leche, cabe destacar que aproximadamente el 95% se encuentra formando parte de las proteínas, principalmente la caseína, la lactoalbúmina y otras proteínas (Tabla 2.4). El 5% restante corresponde a sustancias nitrogenadas no proteicas (aminoácidos, urea, amoníaco, creatinina, etc.). En conjunto son los nutrientes orgánicos más abundantes en la leche de los animales de granja (Rezaei et al., 2014).

Tabla 2.4. Concentración de las proteínas de la leche de vaca (g/L).

Proteínas	Concentración en Leche	Proteína Total (%)
α S1-Caseína	12,4	34,7
α S2-Caseína	3,0	8,3
β -Caseína	7,0	19,0
κ -Caseína	4,2	12,0
γ -Caseína	1,4	4,0
Total de Caseínas	28,0	78,0
β -Lactoglobulina	4,2	11,7
α -Lactoalbúmina	1,1	3,0
Fracción proteosa-peptona	0,8	2,2
Inmunoglobulina G	0,6	1,7
Inmunoglobulina M	0,09	0,25
Inmunoglobulina A	0,01	0,027
Albúmina de suero	0,3	0,83
Lactoferrina	0,1	0,27
Total Proteínas del lactosuero	7,2	20,0
Proteínas: membrana del glóbulo graso	0,7	2,0
Proteína Total	36,0	100

Asumiendo 36 g/L de proteína y 78 % de caseína.

Fuentes: Farrell Jr. et al., (2006); Barbosa et al., (2012); García et al., (2014).

La leche contiene una amplia gama de proteínas, muchas de las cuales se encuentran en cantidades muy pequeñas. Las proteínas de la leche por su comportamiento y estructura se agrupan en caseínas y proteínas del suero conocidas como seroproteínas (Rezaei et al., 2016). Contiene aproximadamente 30 a 35 g de proteínas por litro. La acción de la quimosina (renina), o la acidificación de la leche a pH=4,6 da como resultado la segregación de proteínas en 2 fracciones: lactoserum (suero) que contiene aproximadamente el 20% de las proteínas de la leche de vaca (es

decir, aproximadamente 6 g/L), y el coágulo (cuajada) que contiene aproximadamente el 80% (es decir, aproximadamente 28-30 g/L) en forma de caseína (Tsabouri et al., 2014). En su mayoría, las proteínas lácteas (excepto la albúmina sérica y las inmunoglobulinas) son sintetizadas a partir de aminoácidos y secretadas por las células epiteliales mamarias (Rezaei et al., 2016). La concentración proteica de la leche, no presenta cambios sobresalientes con la manipulación nutricional de las vacas (García et al., 2014).

Todos los aminoácidos esenciales se encuentran presentes en las proteínas de la leche, lo que pone de manifiesto su importancia desde el punto de vista de la nutrición humana.

2.2.2.1. Caseínas

La caseína por su importante valor nutricional, representa el complejo de proteínas más importante en la leche de vaca y a menudo es utilizada como un índice para medir su calidad. Constituye cerca del 80% del contenido proteico de la leche, lo que la convierte en la proteína más abundante de la leche de vaca (Gao et al., 2017; Shu et al., 2020). Existen 5 tipos de caseínas: α_1 , α_2 , β , κ y γ . Las caseínas están presentes en la leche en forma de micelas y pueden ser fosforiladas por quinasas proteicas en las células epiteliales mamarias. Los grupos de fosfato unidos covalentemente a las moléculas de caseína unen calcio a través de enlaces iónicos. La función biológica de la micela de caseína es como fuente de nutrientes para los neonatos, ya que suministran aminoácidos, calcio y fósforo y participan en la formación del coágulo en el estómago para permitir una digestión eficiente (Rezaei et al., 2016). Precipitan cuando se acidifica la leche a un pH de 4,6, mientras que las proteínas del lacto suero permanecen en solución (García et al., 2014).

2.2.2.2. Seroproteínas

El suero de la leche contiene esencialmente proteínas globulares. Las proteínas del suero de la leche conocidas como seroproteínas constituyen el 20% de las proteínas lácteas y consisten mayoritariamente de α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina, que son sintetizadas en la glándula mamaria a partir de los aminoácidos plasmáticos; y minoritariamente por lactoferrina, γ -globulina, albúmina sérica y otras inmunoglobulinas, que provienen de la sangre. La β -lactoglobulina comprende aproximadamente el 50% del total de proteínas del lactosuero y es la principal proteína del suero en la leche de rumiantes y cerdos. Por otro lado, la α -lactoalbúmina representa alrededor del 25% del total de proteínas del lactosuero y contiene un alto contenido de triptófano. Es la

subunidad reguladora del complejo enzimático de la lactosa sintetasa, jugando un papel importante en la producción y secreción de lactosa. Las inmunoglobulinas por su parte están presentes en concentraciones muy altas en el calostro, pero en concentraciones mucho más bajas en leche madura, sirviendo como parte del sistema inmunitario tanto del neonato como de la glándula mamaria (Tsabouri et al., 2014; Rezaei et al., 2016).

2.2.3. Lactosa

La lactosa es un disacárido sintetizado en la glándula mamaria a partir de glucosa y galactosa, considerado como el principal carbohidrato en la leche de mamíferos. Su contenido en la leche de vaca es de aproximadamente 5 g/100 ml lo que representa alrededor del 4,6% de la misma (Kaskous and Pfaffl, 2017; Heine et al., 2017; Numpaque et al., 2019). La lactosa es uno de los componentes con menores fluctuaciones en su contenido. Cuando esto ocurre, indica alteraciones en la glándula mamaria o situaciones de alimentación extremas o inusuales (Jenkins y McGuire, 2006). Durante su síntesis, la glucosa entra en las células epiteliales mamarias, donde parte se convierte en galactosa. Tanto la glucosa como la galactosa entran en el aparato de Golgi para formar la lactosa a través de una serie de reacciones catalizadas por enzimas. La formación de lactosa en el aparato de Golgi se da en el movimiento del agua desde el espacio extracelular (y por lo tanto la sangre) al citoplasma y luego al aparato de Golgi donde la lactosa pasa a convertirse en un componente de la leche. La lactosa y gran parte del agua asociada en la leche se liberan de las vesículas secretoras junto con las proteínas plasmáticas en el lumen de los alvéolos, ayudando a mantener la osmolaridad de la leche y relacionándose directamente con el volumen de leche producida (Shahbazkia et al., 2010; Rezaei et al., 2016). La síntesis de lactosa regula el volumen de leche segregada puesto que la cantidad de leche producida depende de la capacidad de síntesis de lactosa en la glándula mamaria. La lactosa es también uno de los factores dietéticos que estimula la absorción intestinal de calcio y fósforo, siendo así importante para la mineralización ósea y en la prevención de la osteoporosis (Martini et al., 2018).

2.2.4. Enzimas

La leche contiene un gran número de enzimas, secretadas por la glándula mamaria o de origen microbiano, pero su función biológica es en su mayoría desconocida (Claeys et al., 2014). Aunque presentes en pequeñas cantidades, las enzimas contenidas en la leche se aprovechan para efectos de inspección y control, ya que muchas de ellas influyen en la calidad de la leche y en el origen de distintas alteraciones. Existen dos grupos de enzimas: las hidrolasas, cuyo mecanismo de acción

se caracteriza por un desdoblamiento hidrolítico. A este grupo pertenecen entre otras, las esterasas, lipasas, carbohidratasas y proteasas; siendo la lipasa dentro de este grupo, la de mayor importancia, ya que actúa cuando la leche es depositada sin refrigeración, dándole un sabor rancio. El otro grupo importante de enzimas son las oxido-reductasas, las más importantes son la catalasa y la peroxidasa que sirven como indicadores de la calidad microbiológica de la leche (Agudelo Gómez y Bedoya Mejía, 2009).

2.2.5. Vitaminas

El contenido total de vitaminas de la leche es muy variable y depende del estado vitamínico, del estado de lactancia, de la época del año, del tiempo atmosférico, del ambiente y del régimen nutricional del animal. La leche contiene vitaminas como la A, D, E, K, B₁, B₂, B₆, B₁₂, C, carotenos, nicotinamida, biotina, ácido fólico, aunque su concentración está sujeta a grandes oscilaciones. Las vitaminas presentes en la leche son absorbidas de la sangre, ya que ninguna de ellas se sintetiza en la glándula mamaria. El calostro posee una extraordinaria riqueza vitamínica, contiene de 5 a 7 veces más vitamina C y de 3 a 5 veces más vitaminas B₂, D y E que la leche normal. En la leche de vaca se ha encontrado un contenido promedio de alrededor 1500 µg/100 ml de vitamina C y en torno a 0,03 µg/100 ml de vitamina D, en la cual se han mostrado variaciones estacionales, probablemente relacionadas con la exposición de los animales al sol (Agudelo Gómez y Bedoya Mejía, 2009; Claeys et al., 2014; Martini et al., 2017).

Los niveles de vitaminas hidrosolubles están más influenciados por la alimentación que los niveles de vitaminas liposolubles, repercutiendo especialmente en los carotenos y en la vitamina A cuando la base de la alimentación son forrajes frescos.

2.2.6. Minerales

Los minerales representan una pequeña fracción de los sólidos lácteos y desempeñan un papel importante a nivel nutricional, principalmente por los aportes de calcio y fósforo, los cuáles presentan una alta digestibilidad, ya que están asociados a otros componentes como la caseína. La leche contiene también otros minerales que están en solución, como el sodio, potasio y magnesio, además de oligoelementos como el yodo, selenio, zinc, hierro y cobre. Los minerales participan en numerosas funciones vitales dentro de las cuáles las principales son de tipo metabólico como el mantenimiento del pH, la salud ósea, la presión osmótica, la conducción nerviosa, la contracción muscular, la producción de energía y casi todos los demás aspectos del crecimiento corporal (Bilandžić et al., 2015; Bakircioglu et al., 2018).

Las concentraciones de calcio, magnesio y fósforo en la leche son altamente heredables, siendo escasamente influenciadas por la alimentación como en el caso del yodo y el selenio. La mayor parte del calcio (alrededor del 65%) y zinc producidos en la leche, están asociados con las micelas de caseína, cuyo contenido en la misma está relacionado a una alta heredabilidad (Gabryszuk et al., 2008; van Hulzen et al., 2009; Pilarczyk et al., 2011).

2.2.7. Componentes Nitrogenados no Proteicos (NNP)

El nitrógeno no proteico representa el 5% del nitrógeno total en la leche. Del total de NNP, aproximadamente el 30-35% es urea, 25% creatinina y ácido úrico, 15% aminoácidos y 10-30% amoníaco (Roy et al., 2011). La urea es el principal componente NNP de la leche. Las concentraciones óptimas oscilan entre 210 a 320 mg de urea/L de leche (Salcedo-Díaz y Villar-Bonet, 2015).

La mayor parte de la proteína ingerida con el alimento se degrada a amoníaco (NH_3) por acción de los microorganismos del rumen, que después ellos mismos utilizan para producir sus propias proteínas que pasan al intestino delgado como proteína microbiana (Salcedo-Díaz y Villar-Bonet, 2015). La sobrealimentación de proteína bruta altamente degradable en la medida que excede las necesidades microbianas dará como resultado la producción de grandes cantidades de amoníaco, el cuál pasará a ser convertido por el hígado en urea, que será reciclada a través de la saliva o filtrada por los riñones y eliminada mayoritariamente a través de la orina (Surra et al., 1997). El resto que no es eliminado aumenta su concentración en el rumen, la sangre y la leche (Salcedo-Díaz y Villar-Bonet, 2015; Mitani et al., 2015; Schären et al., 2016). La concentración de urea en leche es un buen indicador en el diagnóstico de un exceso de proteína o un déficit de energía en la ración (Vicente, 2002; Salcedo-Díaz y Villar-Bonet, 2015).

El consumo de alimento y la cantidad y fuente de energía y proteína en la dieta (disponibilidad de N) son factores directamente relacionados con la fermentación ruminal y determinan la cantidad de proteína microbiana sintetizada en el rumen y el flujo de proteína microbiana y dietética al intestino delgado (Clark et al., 1992; Allothman et al., 2019).

El pasto contiene altos niveles de proteína bruta altamente degradable (20-30 %; Westwood et al., 1998; Machado et al., 2005) y bajos niveles de carbohidratos no estructurales, lo que aumenta la ingesta de proteína bruta y disminuye la eficiencia de la utilización de N por la vaca en pastoreo. Esto explica la fuerte correlación entre las

concentraciones de urea de la leche con la relación proteína:carbohidratos solubles en el pasto (Kolver, 2003; Westwood et al., 1998; Mitani et al., 2015).

2.3. FACTORES QUE MODIFICAN LA COMPOSICIÓN Y CALIDAD DE LA LECHE

La leche es un alimento importante para la nutrición humana que se ha convertido en uno de los mayores desafíos económicos, sanitarios y nutricionales. Despierta diversos intereses entre los consumidores y entre los profesionales de la salud, procesadores y productores (Grenon et al., 2004). Se trata de un espectro muy vasto a tratar, en el cuál, hay que tener en cuenta todos los aspectos del concepto de calidad de la leche.

El concepto de calidad de la leche ha evolucionado mucho en las últimas décadas. Se trata de un asunto complejo que implica varias facetas tales como los aspectos físicos (punto de congelación, color, viscosidad etc.), químicos (pH, composición en proteínas, grasa, lactosa o minerales, etc.), microbiológicos (bacterias, células somáticas, etc) y las propiedades de conservación (flora microbiana, enzimas, etc.), así como las propiedades funcionales (estabilidad térmica, de emulsificación, etc.), y biofuncionales (valor nutricional, etc.) estrechamente relacionados entre sí (Grenon et al., 2004).

Según Grenon et al. (2004), la calidad de un producto se puede definir como "el conjunto de características que le permiten cumplir las necesidades de los consumidores." Sin embargo, cuando se discute la calidad, especialmente para un producto tan variable como es la leche, muchas interpretaciones pueden ser adoptadas. Por lo tanto, en la cadena de producción, el concepto de calidad de la leche es variable, ya que algunos actores toman en consideración las características de imagen o los criterios organolépticos, los cuales, incluyen aspectos visuales, mientras que, otros utilizan criterios de análisis cuantitativos para entender los aspectos higiénicos, tecnológicos o sensoriales (Sraïri y Hamama, 2006).

La composición de la leche determina su calidad nutricional e industrial, lo que afecta directamente la rentabilidad y competitividad de los sistemas de producción lecheros. Su composición es el reflejo de múltiples factores que pueden ser o no modificados en el sistema de producción a través de diferentes prácticas de manejo (Cerón y Correa, 2005; Calvache y Navas, 2012). Según Dillon et al. (2006) los factores relacionados con la nutrición, la alimentación y el manejo de los rebaños lecheros pueden producir cambios que pueden ser observados a corto plazo, sin embargo, el

mejoramiento genético del rebaño influye directamente sobre los sólidos totales de la leche y su efecto es observable a largo plazo.

La producción y la composición de la leche de vaca pueden verse afectadas por un elevado número de factores intrínsecos (relacionados al animal y difícilmente modificables) y extrínsecos (relacionados al medio y que dependen enormemente de las prácticas de manejo y la acción del hombre), que actúan de forma más o menos marcada a lo largo de la curva de lactación (Gispert, 2002). Entre los factores intrínsecos o los relacionados con el propio animal cabe destacar la herencia genética, el estado de lactación y el estado de salud. Entre los factores extrínsecos al animal se pueden destacar la estacionalidad, el ambiente y la alimentación.

2.3.1. Genética y Herencia

La composición de la leche está relativamente sujeta a la genética, con una heredabilidad estimada de 0,5 y 0,6 para los porcentajes de proteína y grasa, respectivamente. Sin embargo, la heredabilidad es más baja para el rendimiento de la producción de leche, estimada en 0,25. Por el contrario, los factores ambientales relacionados con la nutrición, alimentación, manejo y el medio tienen un mayor impacto en el rendimiento que en el porcentaje de los constituyentes mayoritarios de la leche (Heinrichs et al., 2016; Waldner et al., 2005).

La prioridad asignada a cada rasgo genético depende de su impacto económico o del beneficio que pueda representar, tal es el caso, del rendimiento de la producción de leche por vaca, el cual, tiende a recibir la mayor atención por parte del productor. Sin embargo, los rendimientos de los diferentes componentes de la leche (grasa, proteína y sólidos no grasos) no deben ser pasados por alto y la selección genética debe dirigirse hacia el aumento de los mismos, ya que, los porcentajes de estos tienden a tener asociaciones genéticas negativas con los rasgos de producción. Ahora bien, un cambio en estos porcentajes no es probable que se logre mediante la selección genética solamente (Waldner et al., 2005).

Según estudios realizados por Dillon et al. (2006) es posible realizar la selección para mejorar el rendimiento de la producción de leche como rasgo de importancia económica, aumentando así, la producción de leche por vaca, pero esto conlleva efectos indeseables en otros factores relativamente significativos para los sistemas de producción lecheros como son: la reproducción, menor puntuación de la condición corporal, mayor respuesta de la producción de leche a la suplementación de concentrado y fertilidad y supervivencia reducidas.

2.3.2. Estado de Lactación

Existen factores considerados como muy influyentes en la composición de la leche, sin embargo, varían dependiendo de las condiciones y objetivos establecidos. Según Waldner et al. (2005) la producción de leche aumenta desde el primer día postparto hasta el día 70, llegando al pico de producción entre la sexta y octava semana después del parto. El estado de lactación afecta la concentración de grasa y proteína de forma muy similar, mostrando así las concentraciones más elevadas de las mismas al inicio y al final de la lactación y las menores durante el pico de producción a medio ciclo de lactación (Heinrichs et al., 2016; Waldner et al., 2005; Calvache y Navas, 2012).

Al incrementar el volumen de producción, la concentración de grasa y proteína expresada en g/100g disminuye, debido al efecto de la dilución de las fracciones de grasa y proteína en el volumen de leche, ya que, la concentración de éstas, está en parte establecida genéticamente (Svennersten-Sjaunja y Olson, 2005; Heinrichs et al., 2016).

Desde el punto de vista práctico, el estado de lactación puede ser poco relevante en cuanto a la concentración de grasa y proteína cuando se recolectan muestras de leche de tanque de granjas que presentan partos durante todo el año. Sin embargo, es importante a nivel individual o cuando los partos se hacen estacionales o en periodos determinados (Nantapo et al., 2014). De esta manera, mayores influencias son contabilizadas y controladas en la concentración de las mismas (por ejemplo, en vacas en un ensayo de una misma raza, con genética similar, en la misma etapa de lactación, alimentadas con dietas similares), tomando en consideración factores menores como la composición de los forrajes (Schwendel et al., 2015).

2.3.3. Estado Sanitario

El estado sanitario ejerce una gran influencia tanto en la producción como la composición de la leche. La eficacia de un sistema de control sanitario de las vacas lecheras estará determinada por la capacidad de diagnosticar lo antes posible los cambios en el estado clínico y subclínico y desarrollar medidas preventivas relacionadas. Las vacas de alto rendimiento a menudo muestran una mayor susceptibilidad a enfermedades de producción multifactorial. Por lo tanto, los registros rutinarios de la vaca individual que están relacionados con las condiciones del rebaño y las influencias del ordeño pueden proporcionar decisiones estratégicas y de manejo (Hamann y Krömker, 1997).

De todas las enfermedades que aquejan y que pueden afectar el contenido y distribución de los componentes de la leche en el vacuno lechero, la mastitis ha sido la más estudiada, ya que, conlleva una gran problemática en los sistemas de producción, disminuyendo el contenido de grasa y caseína y aumentando el contenido de suero, así como, el contenido de proteínas de la sangre en la leche. Estos cambios relacionados con las proteínas de la leche, junto con alteraciones en la lactosa, contenido mineral y pH, muestran rendimientos más bajos de los derivados de la misma y propiedades de fabricación alteradas. El contenido de células somáticas juega un papel importante en la coagulación y en la cuajada de la leche, es por esto, que un recuento de células somáticas superior a 500.000 células somáticas/ml genera periodos más largos de coagulación y cuajadas más débiles que la leche con un recuento más bajo (Waldner et al., 2005; Heinrichs et al., 2016).

2.3.4. Estacionalidad y Ambiente

Los factores climáticos influyen directamente sobre los sistemas de producción de leche, ya que, no solo afectan la producción y calidad de forraje, presentándose diferencias en los aportes nutricionales de la pradera a lo largo del año, sino también, las condiciones ambientales afectan el consumo voluntario de los animales, lo que se ve reflejado en la producción y composición de la leche.

Existe una correlación negativa entre la temperatura ambiental y la cantidad de grasa y proteína en leche. Cuando la temperatura aumenta los contenidos de sólidos grasos disminuyen, de igual manera, se ha descrito que los porcentajes de caseína y toda la fracción nitrogenada son influenciados por las variaciones estacionales (Ng-Kwai-Hang et al., 1984; Lacroix et al., 1996).

Se han determinado cambios más significativos en el contenido de grasa de la leche que en otros componentes, relacionados a los cambios estacionales, sin embargo, es posible decir que cuando éste fue mayor, los contenidos de proteína y de sólidos totales fueron mayores también, dándose así, los contenidos más altos durante el invierno y los más bajos durante el verano (Ozrenk e Inci, 2008). Esta variación está relacionada con los cambios tanto en los tipos de alimento disponibles como en las condiciones climáticas. El clima caluroso y la alta humedad disminuyen la ingesta de materia seca y aumentan la selección de alimentos, lo que da como resultado una menor ingestión de forraje y de fibra (Waldner et al., 2005). Por esta razón, durante la temporada de altas temperaturas, las estrategias para reducir el impacto de altas cargas de calor en vacas lactantes son necesarias, factores como el sombreado, el cambio en las horas de alimentación y una administración apropiada de elementos minerales en

las raciones de alimentación pueden evitar el deterioro del rendimiento y la calidad de la leche (Ozrenk e Inci, 2008).

2.3.5. Alimentación

De todos los factores que pueden afectar la composición y el estado nutricional de la leche bovina, las prácticas de nutrición y alimentación son los más importantes que puede ser dirigido para manipular rápida y ampliamente el valor nutricional de la leche de vaca para consumo humano (Heinrichs et al., 2016; O'Callaghan et al., 2019). La influencia de la alimentación sobre la producción de leche se manifiesta en el último tercio de la gestación, donde hay un aumento de las reservas corporales que se movilizarán durante la lactación y, obviamente, durante el periodo de lactación a través de la cobertura de las necesidades nutricionales.

El manejo de la alimentación impacta de manera importante en la variación significativa en los macronutrientes (grasas y proteínas) y micronutrientes (aminoácidos (AA), minerales, vitaminas y ácidos grasos (AG)) de la leche. Asimismo, tiene como resultado una alteración funcional y de las características sensoriales de los productos lácteos (Martínez, 2011; Altohman et al., 2019).

Los cambios en la nutrición o formulación de raciones están más fuertemente correlacionados con el contenido de grasa de la leche que con la proteína de la misma, pudiendo variar de 0,1 a 1,0 puntos porcentuales y de 0,1 a 0,4 puntos, respectivamente. La depresión de la grasa de la leche puede atenuarse haciendo cambios en la dieta en unos 7 a 21 días. Sin embargo, los cambios en la proporción de proteína pueden ser más prolongados, tomando de 3 a 6 semanas o más si el problema ha sido persistente por un largo período (Heinrichs et al., 2016).

El factor nutricional que más afecta la concentración de grasa en la leche es un bajo contenido de fibra efectiva en relación con la cantidad de carbohidratos fermentables. La digestión de la fibra en el rumen produce los ácidos grasos volátiles (AGV) acético y butírico para la síntesis de grasa (Calvache y Navas, 2012). El butirato proporciona energía para la pared ruminal, en donde gran parte se convierte en β -hidroxibutirato. Aproximadamente la mitad de la grasa en la leche se sintetiza en la ubre a partir del acetato y el β -hidroxibutirato, mientras que el resto se transporta desde el conjunto de ácidos grasos que circulan en la sangre. Estos pueden originarse de la movilización de grasa corporal, la absorción de la dieta o las grasas metabolizadas en el hígado (Heinrichs et al., 2016). Cuando el contenido de fibra de la ración disminuye, el almidón generalmente aumenta, lo que tiene como consecuencia que las bacterias

del rumen que se encargan de su fermentación produzcan grandes cantidades de propionato y un aumento de energía fermentable disponible en el rumen, que da como resultado un incremento en la concentración molar de ácidos grasos volátiles (AGV). Como consecuencia, se produce una caída en el pH del rumen y un aumento de su osmolaridad, lo que favorece la síntesis de ácidos grasos trans (Santos, 2002). Un mayor contenido de almidón (es decir, energía) en las dietas también afecta la tasa de biohidrogenación de los ácidos grasos insaturados en el rumen de la vaca, reduciendo sus concentraciones en la leche. Las raciones con alto contenido de almidón conducen a un mayor contenido de energía de la dieta, aumento de la producción de leche, y disminución del contenido de grasa de la leche (Palmquist, 2006; Alothman et al., 2019).

La síntesis de proteínas por su parte es un proceso fisiológico complejo que ocurre en la glándula mamaria y que requiere de grandes cantidades de energía. A pesar de que puede variar considerablemente por la genética de las vacas, se ha demostrado que el sistema de alimentación afecta el rendimiento de la producción de leche y proteína (Vanbergue et al., 2017; O'Callaghan et al., 2019). El consumo de alimento y la cantidad y fuente de energía y proteína en la dieta son factores importantes que afectan directamente la fermentación ruminal, determinan la cantidad de proteína microbiana sintetizada en el rumen y el flujo de proteína microbiana y dietética que va al intestino delgado, lo que es una fuente primaria de aminoácidos esenciales para la vaca (Bionaz et al., 2012, Alothman et al., 2019). La glándula mamaria utiliza aminoácidos específicos, como la metionina y lisina, para sintetizar las proteínas de la leche. Éstos son los dos AA son limitantes en el vacuno lechero según NRC (2001). Una variación en la concentración de estos aminoácidos se puede traducir en un mayor rendimiento de proteína y contenido de caseína de mejor calidad en la leche (Bionaz et al., 2012; Gulati et al., 2018; O'Callaghan et al., 2019). Para proporcionar energía para apoyar esta síntesis de proteínas se requiere glucosa, que se forma a partir del propionato en el hígado o se absorbe directamente desde el intestino delgado. Esto puede reducir el suministro de aminoácidos disponibles para producir proteínas de la leche. Además, parte de las proteínas (albúmina e inmunoglobulina) se transfieren directamente a la leche desde la sangre (Heinrichs et al., 2016).

No solo los macronutrientes (grasa y proteína) de la leche se ven afectados por el sistema de alimentación. Otros compuestos bioactivos de naturaleza lipofílica también sufren alteraciones por la dieta de las vacas. Está claro que la concentración en la dieta de estos compuestos bioactivos liposolubles, dicta su concentración y tasa de recuperación posterior en la leche. Dietas ricas en pasto fresco, que es una buena fuente de diversas vitaminas y antioxidantes, los transfieren a través de complejos procesos

digestivos a la glándula mamaria y luego a la leche, lo que explica el mayor contenido de compuestos como β -caroteno, terpenos, luteína, vitamina A (retinol), vitamina E (tocoferol) y fitol (un derivado de la clorofila) en la leche de vacas alimentadas con pasto en comparación con la leche de vacas alimentadas con dietas ricas en concentrado, ensilado de maíz o raciones completas mezcladas (TMR) (Agabriel et al., 2007; Coppa et al., 2011; O'Callaghan et al., 2016a; O'Callaghan et al., 2017; Faulkner et al., 2018), por lo tanto, se espera un efecto significativo de la variación estacional (botánica) en la composición del pasto (Allothman et al., 2019).

Los minerales y oligoelementos existen en un equilibrio entre las fases solubles y coloidales de la leche, y su contenido junto con su distribución (principalmente Ca, Mg y P) tienen un significado tecnológico esencial en los procesos de tratamiento de la leche, especialmente en la fabricación de queso debido a su efecto directo sobre la estabilidad de las micelas de caseína en la leche (de la Fuente, 1998; Allothman et al., 2019). Diferentes estudios han demostrado que sus concentraciones en la leche están influenciadas por varios factores, como el estado de lactación, la raza, sistema de producción y los factores ambientales, sin mencionar que la concentración global de minerales en la leche se ve significativamente afectada por la composición mineral de la dieta. Los niveles de macroelementos (K, Na, S) y oligoelementos (Zn, Fe, I, Cu, Mo y Se) se ven influenciados en un grado dependiente del sistema de alimentación y del período de lactación, al igual que de las condiciones en las que han sido cultivados el pasto o los diferentes ensilados que forman parte de las dietas de alimentación (Gabryszuk et al., 2008; Horky, 2015; Gulati et al., 2018; Gulati et al., 2019).

Según Van Hulzen et al. (2009) las concentraciones de minerales en la leche pueden modificarse mediante la nutrición o la selección genética. El gran coeficiente de variación (26%) para el selenio (Se) en combinación con una heredabilidad intra rebaño de 0,20 sugiere que es posible alterar el contenido de Se de la leche mediante selección. Sin embargo, el 65% de la varianza total puede explicarse por la varianza del rebaño, lo que indica que cambiar los niveles de Se en la leche por nutrición es más efectivo. Para la concentración de Ca, K, Zn, Mg y P en la leche, la selección es una ruta más prometedora para el cambio.

Se ha demostrado en algunos estudios que la variación en la energía suministrada a través de los sistemas de alimentación altera el contenido de lactosa de la leche, un aumento de la energía a través de las TMR en comparación con un sistema de alimentación de pastos presenta una correlación positiva, especialmente en las

dietas altas en almidón cuando se incluyen el maíz y las habas forrajeras (Argamentaría et al., 2006; Vicente et al., 2017; Gulati et al., 2018).

2.4. IMPORTANCIA PARA EL DESARROLLO RURAL DE TENER MARCAS DE CALIDAD O UN PRODUCTO DIFERENCIADO

Actualmente los consumidores prestan cada vez más atención a la calidad y autenticidad de los productos alimenticios, siendo percibidos los productos regionales y tradicionales como más saludables y sabrosos, por lo que gozan de una creciente demanda entre los consumidores (Montowska y Pospiech, 2012; Rychlik et al., 2017). En Europa, esta tendencia encuentra apoyo en estrategias de certificación que se han diseñado para apoyar a los productores locales, especialmente en zonas marginales con altos costes de producción, a la diversidad de los productos agrícolas y la prevención de las migraciones de las zonas rurales, así como el aumento de los ingresos de los agricultores (Coppa et al., 2012; Montowska y Pospiech, 2012).

La Política Agraria Común (PAC) desarrollada por la Comisión Europea hizo hincapié en el papel de la política de calidad alimentaria como herramienta para la diversificación de productos y el desarrollo rural, por lo que se han creado diferentes etiquetas de calidad alimentaria que buscan salvaguardar las denominaciones de productos agrícolas y alimenticios cuya calidad proviene de su origen geográfico (Bouamra-Mechemache y Chaaban, 2012).

Según el MAGRAMA (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación de España), la calidad diferenciada es el conjunto de características peculiares y específicas de un alimento debidas al origen de las materias primas utilizadas y/o a los procedimientos de elaboración. Estos productos están regulados por la normativa de la Unión Europea (UE), que garantiza el cumplimiento de unos requisitos de calidad adicionales a los exigidos para el resto de productos convencionales. Son esquemas de carácter voluntario y los productos que cumplen con esos requisitos están inscritos en un registro de la UE y protegidos por derechos de propiedad intelectual. Actualmente existen tres tipos de marca de calidad.

- Los productos de Denominación de Origen Protegida (DOP) son aquéllos cuya calidad o características se deben exclusivamente al medio geográfico con sus factores naturales y humanos, y cuya producción, transformación y elaboración se realizan siempre dentro de esa zona geográfica delimitada de la que toman el nombre.

- Los productos con una Indicación Geográfica Protegida (IGP) poseen alguna cualidad determinada o reputación u otra característica que pueda atribuirse a un origen geográfico y que al menos una de las fases de producción, transformación o elaboración se realiza en la zona geográfica delimitada de la que toma su nombre.
- Las Especialidades Tradicionales Garantizadas (ETG) son los productos con rasgos específicos diferenciadores de otros alimentos de su misma categoría, y se producen a partir de materias primas tradicionales, o bien presentan una composición, modo de producción o transformación tradicional. En España sólo se tiene autorizada esta etiqueta a cuatro productos, entre los que se incluye la leche certificada de granja.
- Además, existe una cuarta etiqueta de calidad alimentaria: Producto procedente de la agricultura ecológica, que se puede aplicar adicionalmente a cualquiera de los anteriores o ser aplicada independientemente.

Estas etiquetas de certificación marcan los productos con alto valor añadido y, por lo tanto, con precios más altos, fomentándose una falsificación frecuente o una sustitución con productos de menor valor por parte de los productores que desean obtener beneficios rápidos y fáciles (Coppa et al., 2012; Montowska y Pospiech, 2012; Di Domenico et al., 2017).

Según Tempesta y Vecchiato (2013), los consumidores suelen estar dispuestos a pagar un precio *premium* por los alimentos nacionales y locales y en el caso particular de la leche puede estar relacionado a tres atributos: origen (región, país, etc.), área de producción (montaña o llanuras) y método de cría (pastoreo o estabulación). Con el fin de garantizar la autenticidad de los productos certificados para los consumidores, se requieren métodos fiables de autenticación y trazabilidad, para eliminar la competencia desleal y evitar que los consumidores sean engañados por productos no-genuinos (Coppa et al., 2012; Rychlik et al., 2017).

2.5. BIOMARCADORES PARA LA TRAZABILIDAD ALIMENTARIA

El aumento del comercio globalizado y la necesidad de garantizar la calidad de los alimentos, implica certificar el origen de los productos como una forma de evitar fraudes en el etiquetado y comercialización. La consecuencia directa es el establecimiento de políticas de identificación y seguimiento individual de los animales y sus productos, mediante la aplicación de tecnologías adaptadas a la modernización y globalización de los intercambios comerciales actuales, siendo la trazabilidad uno de los

principales resultados de estas políticas (Reglamento CE 1760/2000). De conformidad con el Reglamento UE 178/2002, la trazabilidad es " la posibilidad de encontrar y seguir el rastro, a través de todas las etapas de producción, transformación y distribución, de un alimento, un pienso, un animal destinado a la producción de alimentos o una sustancia destinados a ser incorporados en alimentos o piensos o con probabilidad de serlo". La trazabilidad es un conjunto de acciones, medidas y procedimientos técnicos que permiten identificar y registrar un producto desde su origen hasta el final de la cadena de comercialización. La autenticación de alimentos es el proceso que verifica que un alimento cumple con la descripción de su etiqueta. La prueba de procedencia es un tema importante para la inocuidad y calidad de los alimentos y la protección de los consumidores, ya que estos productos son a menudo blanco de etiquetado fraudulento. Esto puede incluir, entre otros, el origen (especie, geográfico o genético), el método de producción (convencional, orgánico, procedimientos tradicionales, rango libre) o tecnologías de procesamiento (irradiación, congelación, calentamiento por microondas; Danezis et al., 2016). En todo este proceso se debe asegurar la identidad del producto, como una forma de garantizar su inocuidad, calidad y origen. Por lo tanto, uno de los principales requisitos de la trazabilidad es la implementación de un sistema de identificación del producto que permita ligarlo al animal y a su sistema de producción y manejo. Existen actualmente en aplicación o desarrollo diversas herramientas certificadoras de la trazabilidad. Entre ellas, diversos componentes de la leche pueden utilizarse como biomarcadores para garantizar el origen de los productos. Un biomarcador o marcador biológico es una sustancia, molécula o componente que puede medirse objetivamente y pone en evidencia un proceso biológico, estado fisiológico o de respuesta a un tratamiento o manejo.

El contenido de grasa y la composición y concentración de ácidos grasos en la leche pueden ser un indicador de la dieta de los animales (Kalač y Samkova, 2010; Vicente et al., 2017) y también del sistema de manejo (extensivo, semi-extensivo, intensivo; Morales-Almaráz et al., 2011). Los perfiles de ácidos grasos y triacilglicerol (TAG) pueden ser utilizados para la autenticación del origen de la leche, ya que cambian rápidamente con los cambios en la dieta de los animales, lo que puede incluir una modulación diferente de la actividad de biohidrogenación microbiana en el rumen (Capuano et al., 2014). Efectos consistentes son observados en los ácidos grasos de la leche relacionados al sistema de alimentación, al sistema de pastoreo, la disponibilidad de hierba, el manejo de prados y pastizales y las especies herbáceas (Elgersma, 2015). Compuestos funcionales ventajosos para la salud humana, como los ácidos grasos, en particular el ácido linolénico (C18:3 n-3; Leiber et al., 2005) y los ácidos grasos

conjugados, como el ácido rumenico (C18:2 *cis*-9, *trans*-11; Collomb et al., 2002), están asociados al consumo de hierba y a su composición botánica (Elgersma, 2015).

Los biomarcadores vegetales son compuestos que no son sintetizados por los animales y cuya aparición en los productos o tejidos animales es inequívocamente debido al alimento que han comido (Prache, 2009). Los principales antioxidantes en la leche son enzimas, lactoferrina, tocoferoles, vitaminas A, C y E, urato y carotenoides (Kilcawley et al., 2018). Los carotenoides son biomarcadores potenciales, ya que tanto la luteína como el β -caroteno se encuentran en mayores concentraciones en la leche y productos lácteos derivados de una alimentación a base de pastos (Nozière et al., 2006). Se han encontrado otros metabolitos secundarios de las plantas con propiedades antioxidantes en la leche como es el caso de los terpenos (presentes en mayor proporción en plantas dicotiledóneas), que pueden conferir cierto sabor en algunos tipos de leche y productos lácteos (Tornambé et al., 2006; Coppa et al., 2011) y los polifenoles (Besle et al., 2010). De igual manera, se ha puesto de relieve la correlación potencial que presentan los pastos, con atributos sensoriales vinculados a la acumulación del p-cresol, que parece estar relacionada con el metabolismo del β -caroteno, aminoácidos aromáticos o isoflavonas en el rumen (Kilcawley et al., 2018). Por su parte, el tolueno, producto también del metabolismo del β -caroteno, ha sido identificado como un potencial biomarcador de la leche y productos lácteos derivados de pastos, aunque tiene poco impacto en la percepción sensorial debido a su alto umbral de olor (O'Callaghan et al., 2017; Faulkner et al., 2018).

Muchas características de los perfiles de microARN, incluyendo su accesibilidad en diferentes tipos de muestras como la leche y su potencial para la medición altamente sensible, han hecho que su estudio como biomarcadores de enfermedades sea un área popular (Pritchard et al., 2012). Dado su papel en numerosos procesos fisiológicos, la desregulación de la función de los microARN puede conducir a enfermedades; por lo tanto, el aumento de la evidencia apoya su uso como biomarcadores de diagnóstico (Alsaweed et al., 2015).

En gran medida, los microARN de la leche parecen ser endógenos de la glándula mamaria (Silveri et al., 2006), presentando una alta estabilidad, incluso en condiciones muy duras, incluyendo el proceso de esterilización, procesamiento y durante la fabricación de los productos lácteos, por lo tanto, podrían emplearse como biomarcadores tanto para el rendimiento como para el estado de salud de la glándula mamaria durante la lactancia (Alsaweed et al., 2015), para el control de la calidad de la

leche (Chen et al., 2010) y la mastitis (Lawless et al., 2014) y su asociación con el cáncer de mama y otras enfermedades (Heneghan et al., 2010; Alsaweed et al., 2015).

A continuación, se describen con mayor amplitud estos biomarcadores.

2.5.1. Ácidos Grasos

Los ácidos grasos (AG) de la leche de rumiantes se originan a partir de fuentes preformadas (dieta y tejido adiposo movilizado) y de la síntesis *ex novo* en la glándula mamaria. Los principales sustratos para la síntesis *ex novo* de los ácidos grasos son el acetato y el butirato, que tiene como productos finales los ácidos grasos de la leche con una longitud de hasta 14 carbonos, y aproximadamente la mitad de los ácidos grasos de 16 carbonos (Ungerfeld et al., 2019). Los restantes AG de 16 carbonos y todos los de mayor longitud tienen como origen los derivados de la dieta y los movilizados de las reservas corporales. La grasa de la leche ha sido cuestionada durante décadas por sus posibles efectos negativos para la salud humana, sin embargo, sus efectos tanto positivos, negativos o neutros en la salud del consumidor, están relacionados con la longitud de la cadena de los ácidos grasos de la leche y los productos lácteos y su consumo (Haug et al., 2007; Ungerfeld et al., 2019). En particular, al ácido butírico (C4:0), el miembro más corto de los ácidos grasos de la leche, se le han atribuido propiedades nutraceuticas, pudiendo actuar directamente en el tracto digestivo a nivel gastrointestinal, así como indirectamente en el intestino delgado en el desarrollo y reparación de tejidos (Guilloteau et al., 2010). La evidencia sugiere que el C4:0 ejerce efectos potentes sobre una variedad de funciones mucosas colónicas como la inhibición de la inflamación y la carcinogénesis, el refuerzo de varios componentes de la barrera de defensa colónica y la disminución del estrés oxidativo (Hamer et al., 2008). A nivel postabsortivo se ha demostrado que el C4:0 puede disminuir la resistencia a la insulina, inhibir la síntesis de colesterol, aumentar el gasto de energía y la oxidación de ácidos grasos, estimular la deposición de tejido magro, e inhibir la acreción de grasa corporal (Canfora et al., 2015, Ungerfeld et al., 2019). El ácido caprílico (C8:0) retrasa el crecimiento tumoral y al igual que el ácido cáprico (C10:0) ambos pueden tener actividades antivirales. Por su lado, el ácido láurico (C12:0) posee funciones antivirales y antibacterianas y puede actuar como anticaries y agente antiplaca (Haug et al., 2007). Los ácidos grasos láurico (C12:0), mirístico (C14:0) y palmítico (C16:0) han sido identificados como ácidos grasos que aumentan el riesgo de enfermedades cardiovasculares (Mensink et al., 2003), aunque la evidencia más reciente (Praagman et al., 2016) sugiere que los efectos del C12:0, C14:0 y C16:0 en la incidencia en dichas enfermedades puede diferir. El ácido esteárico (C18:0) no parece aumentar los niveles

de colesterol en suero en relación con otros ácidos grasos saturados de cadena larga y no ha mostrado ningún efecto perjudicial sobre el riesgo en las enfermedades cardiovasculares, debido probablemente a su alta tasa de conversión a C18:1 n-9 por la Δ -9-desaturasa (Legrand y Rioux, 2015).

La leche también es una fuente de ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados, omega-3 y omega-6 y ácido linoleico conjugado (CLA), siendo este último el nombre genérico de un grupo de isómeros de ácido linoleico (C18:2 n6) con un doble enlace conjugado (O'Callaghan et al., 2018). Los alimentos derivados de los rumiantes, en particular la leche, carne y los productos lácteos, representan la principal fuente de CLA en la dieta humana (Shingfield y Wallace, 2014; Yang et al., 2015). El isómero más abundante en la leche y los productos lácteos es el C18:2 *cis*-9, *trans*-11 comúnmente conocido como ácido ruménico (75-90% del total de isómeros CLA). Tanto a los CLA como al ácido ruménico se les atribuyen efectos beneficiosos potenciales para la salud humana debido a sus actividades anticarcinogénicas, antiaterogénicas, inmunomoduladoras, efectos protectores contra la obesidad y la diabetes (Pariza, 2004; Dilzer y Park, 2012; Yang et al., 2015), mientras que el isómero C18:2 *trans*-10, *cis*-12 se relaciona con la repartición y la distribución de la energía que conducen a la reducción de grasa corporal (Prieto-Manrique et al., 2016), así como una disminución de la grasa de la leche (Harvatine y Bauman, 2006). El ácido ruménico y el C18:2 *trans*-10, *cis*-12 son producidos a través de un doble origen: ruminal o endógeno (Lock y Bauman, 2004; Palmquist et al., 2005). La primera fuente se relaciona con la biohidrogenación ruminal de los ácidos poliinsaturados (Figura 1) de la dieta por microorganismos ruminales, incluidos los *Butyrivibrio fibrisolvens*, y se presenta como un metabolito intermediario de la conversión del ácido linoleico al ácido esteárico (O'Callaghan et al., 2019). La segunda fuente se explica esencialmente por la acción de la enzima Δ -9-desaturasa sobre el ácido vaccénico (C18:1, *trans*-11), otro producto del metabolismo ruminal de los ácidos grasos en la glándula mamaria (Griinari et al., 2000; Palmquist et al., 2005; Hervás et al., 2020). El ácido vaccénico es el principal ácido graso *trans* C18:1 presente en la leche y se produce a través de la biohidrogenación incompleta de los ácidos linoleico y linolénico por bacterias en el rumen (Lock y Bauman, 2004).

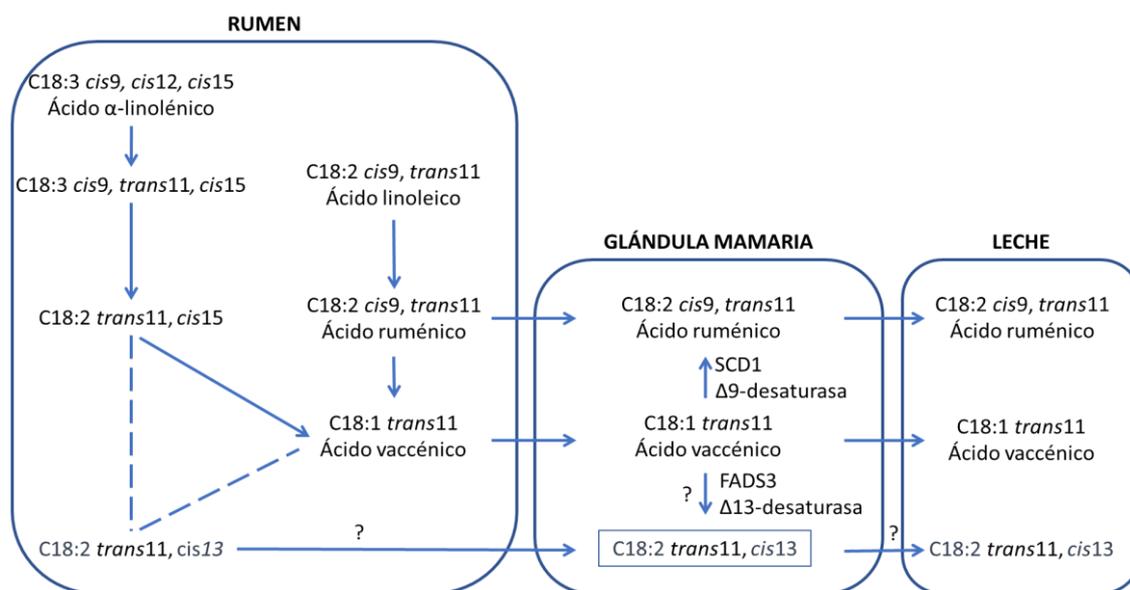


Figura 2.1. Biohidrogenación Ruminal (Fuente: García et al., 2017)

Se entiende ampliamente que el sistema de alimentación de las vacas lecheras puede tener un impacto directo en la composición de la leche, en particular la composición de ácidos grasos de la grasa láctea (Chilliard et al., 2007; O'Callaghan et al., 2016b). El contenido de CLA en la leche bovina y productos lácteos puede variar considerablemente y se reconoce que el régimen dietético puede tener un efecto significativo en su concentración (O'Callaghan et al., 2019). Los sistemas de alimentación basados en hierba fresca producen una grasa láctea con mayores proporciones de ácidos grasos insaturados en comparación con los ácidos grasos derivados de los sistemas intensivos convencionales con una ración completa mezclada (Bargo et al., 2002). Couvreur et al. (2006) demostraron aumentos en los CLA y en el ácido vaccénico de la leche de vaca con concentraciones crecientes de hierba fresca en la dieta del 0% al 100% del total de la alimentación. Por su lado, O'Callaghan et al. (2017), también demostraron los beneficios de la alimentación de pastos en las propiedades nutricionales del queso Cheddar, con un aumento de los CLA, ácido vaccénico y ácidos grasos omega-3. La biohidrogenación ruminal es más intensa en dietas con abundantes forrajes (Lee et al., 2006). Kucuk et al. (2001) han observado una reducción de la biohidrogenación con el incremento de concentrado en la dieta que se considera asociada con una reducción del pH ruminal. Por otro lado, cuando disminuye la proporción de forraje de la dieta aumenta el flujo duodenal de C18:1 *trans*-11 y resulta en un cambio en la producción ruminal de CLA *cis*-9, *trans*-11 hacia el CLA *trans*-10, *cis*-12 (Kucuk et al., 2001, Loor et al., 2004), lo que influye directamente en la relación entre los isómeros *trans*10 y *trans*11 del C18:1 de la leche. Las vacas lecheras

alimentadas con una ración a base de ensilado de maíz producen leche con un menor contenido de C18:3 y un incremento de C18:2, lo que causa una relación elevada de ácidos grasos poliinsaturados n-6/n-3 (AGPI) en comparación con las vacas alimentadas con pastos (Khan et al., 2011; Khan et al., 2012; Davis et al., 2020).

El ácido oleico (C18:1 n-9) es el ácido graso monoinsaturado más prominente presente en la leche, mientras que el ácido linoleico y el ácido α -linolénico (C18:3 n-3) son los principales ácidos grasos poliinsaturados en la grasa de la leche (Dewhurst et al., 2006). Se ha informado que el ácido oleico es favorable para la salud, con evidencias de que altas concentraciones de ácidos grasos monoinsaturados en la dieta reducirían las concentraciones de colesterol plasmático, colesterol LDL y triglicéridos (O'Callaghan et al., 2019).

Los ácidos grasos poliinsaturados pueden clasificarse en dos familias principales, los ácidos grasos omega-3 (n-3) y omega-6 (n-6), según la ubicación del doble enlace final en relación con el extremo metil terminal de la molécula (Wall et al., 2010). El ácido linoleico y el ácido α -linolénico se denominan ácidos grasos esenciales, ya que no pueden ser sintetizados por el cuerpo humano y son precursores de las series n-6 y n-3 de los ácidos grasos (Patterson et al., 2012). El n-3 más abundante en leche, ácido α -linolénico, que se convierte en el ácido eicosapentaenoico (EPA), el ácido docosapentaenoico (DPA) y el ácido docosahexaenoico (DHA), se ha asociado con un envejecimiento saludable, el desarrollo fetal y con efectos antidepresivos (Su et al., 2008; Swanson et al., 2012). Se ha demostrado que los ácidos grasos de cadena larga omega-3 provenientes del ácido α -linolénico (C18:3 *cis*-9, *cis*-12, *cis*-15), el ácido eicosapentaenoico, el ácido docosapentaenoico y el ácido docosahexaenoico reducen el riesgo de enfermedades coronarias y son antiinflamatorios, antitrombóticos y antiaterogénicos (Swanson et al., 2012; Patterson et al., 2012). Además, los ácidos grasos de cadena larga exhiben propiedades neuroprotectoras, son esenciales en el desarrollo y la función del cerebro y tienen efectos protectores que potencialmente apoyan el envejecimiento saludable (Janssen y Kiliaan, 2014; Dyllal, 2015). Mientras que el ácido linoleico (LA), el ácido graso poliinsaturado y omega-6 más abundante en la leche, es importante para una piel sana (McCusker y Grant-Kels, 2010). Una proporción elevada de n-6/n-3 conlleva un mayor riesgo de diabetes tipo 2, aumento de las enfermedades coronarias y obesidad (Thorsdottir et al., 2004; Simopoulos, 2013; Simopoulos, 2016).

2.5.2. Antioxidantes

En un sistema biológico, un antioxidante puede ser definido como "cualquier sustancia que, cuando presenta concentraciones bajas en comparación con las del sustrato oxidable, retrasa o previene significativamente la oxidación de ese sustrato" (Halliwell y Gutteridge, 2015). Los antioxidantes son capaces de inhibir o retardar la oxidación de dos maneras: captando radicales libres (compuestos fenólicos como la vitamina E o el α -tocoferol) o por mecanismos de unión a metales pesados, captación o desactivación de oxígeno, conversión de hidroperóxidos, absorción de la radiación ultravioleta (UV), etc. (Pokorny et al., 2001).

Los antioxidantes juegan un papel importante en la protección de las células animales de los daños ocasionados por la presencia de radicales libres (McDonald et al., 2011) y su uso se considera un tratamiento preventivo contra el envejecimiento celular. La suplementación con antioxidantes no solo mejoraría la salud de la vaca en una etapa sensible como el período de transición, sino también agregará un valor añadido como fuente de antioxidantes al producto final, ya sea leche o carne dotándolos con beneficios para la salud del consumidor (Castillo et al., 2013).

En función de su naturaleza, dentro de los antioxidantes que se distinguen en la leche y los productos lácteos se incluyen tanto los lipofílicos como hidrofílicos. Además de altamente activa y, en algunos casos, única fuente de antioxidantes lipofílicos, la leche también es una fuente de antioxidantes hidrofílicos (Grażyna et al., 2017). Dentro del grupo de antioxidantes lipofílicos los principales antioxidantes en la grasa de la leche son el ácido linoleico conjugado (CLA), las vitaminas A y E, el β -caroteno y la coenzima Q₁₀. Sin embargo, se encuentran otros compuestos con propiedades antioxidantes que incluyen la vitamina D₃, los fosfolípidos, ésteres y, posiblemente, el ácido 13-metil-tetradecanoico (German y Dillard, 2006; Baldi y Pinotti, 2008). En la leche, los antioxidantes hidrofílicos están constituidos por un gran grupo de compuestos nitrogenados, como fracciones de caseína, proteínas del suero (lactoferrina y β -lactoglobulina), péptidos bioactivos, compuestos de nitrógeno de bajo peso molecular y ácido úrico. Por otro lado, las enzimas que se encargan de neutralizar los radicales libres en la leche, incluyendo la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), lactoperoxidasa (LPx) y glutatión peroxidasa (GSHPx) conforman otro grupo importante de antioxidantes, las cuales, forman un sistema sinérgico que aumenta el potencial antioxidante de la leche (Pihlanto, 2006).

Es recomendable nutricionalmente un aumento en el consumo de vitaminas y antioxidantes liposolubles, como los carotenoides y el α -tocoferol, en la dieta (Średnicka-

Tober et al., 2016). Desde el punto de vista de los mecanismos de estrés oxidativo, éste está claramente asociado con una amplia gama de procesos de enfermedades crónicas y agudas, como las enfermedades cardiovasculares, el cáncer, las enfermedades neurodegenerativas y otras enfermedades. Según los datos epidemiológicos se ha demostrado que un consumo de dietas altas en antioxidantes generalmente indica un beneficio en dichas enfermedades. Sin embargo, hay muchas inconsistencias en los resultados. Por lo tanto, los efectos beneficiosos de la suplementación con antioxidantes aún no se han probado suficientemente (Willcox et al., 2004). Por otra parte, como los productos lácteos no son las principales fuentes de vitamina E y carotenoides en la dieta humana, se desconoce si las concentraciones de α -tocoferol y otros antioxidantes que se encuentran en la leche dependiendo del sistema de alimentación de las vacas, tendrán un gran impacto en la salud humana (Średnicka-Tober et al., 2016).

Los biomarcadores de las plantas son compuestos que no son sintetizados por los animales y cuya presencia en los productos o tejidos animales se debe sin duda alguna a la dieta ingerida. Los carotenoides forman el grupo principal de estos pigmentos naturales, que, junto a los terpenos, son un claro ejemplo de micronutrientes vegetales lipofílicos que se transfieren a los tejidos y productos animales después de su absorción, recuperándolos luego en la leche y la grasa animal (Prache, 2009).

Los antioxidantes y vitaminas liposolubles presentes en la leche se derivan de dos fuentes dietéticas diferentes: una a base de constituyentes naturales en los piensos y forrajes de la dieta o a base de compuestos sintéticos agregados como suplementos a la dieta de las vacas lactantes. Los carotenoides derivados del forraje fresco están dominados por el β -caroteno, pero también incluyen luteína, zeaxantina, criptoxantina, licopeno y α -caroteno (Butler et al., 2008).

El contenido de carotenoides en los tejidos y productos animales depende directamente del suministro dietético (Dian et al., 2007). Los pigmentos carotenoides están presentes en niveles altos en pastos de hojas verdes (430 a 700 mg/kg MS para carotenoides totales, 250 a 415 mg/kg MS para la luteína, Prache et al., 2003). El contenido de antioxidantes en el forraje disminuye con factores como la duración del secado y la conservación, dependiendo proporcionalmente del grado de exposición a la luz, ya que los carotenoides son altamente sensibles a los rayos UV. El secado en el campo, por lo tanto, disminuye fuertemente el contenido de carotenoides del forraje. En comparación con el nivel inicial en el pasto, la concentración observada para el ensilado está entre el 60% y el 30% y en el heno entre 30 y 20% (Nozière et al., 2006). El ensilado de maíz es pobre en carotenoides (70-80 mg/kg de MS), además, los rumiantes no son

capaces de almacenar la zeaxantina, presente en el grano de maíz. La mayoría de los concentrados tienen bajas proporciones de estos pigmentos (Prache, 2009). Por lo tanto, los carotenoides se han propuesto como marcadores del origen de la alimentación en la carne y la leche de los herbívoros (Prache et al., 2007).

2.5.2.1. *Vitamina E*

La vitamina E es el antioxidante lipofílico más activo en el cuerpo humano y cuenta con ocho formas biológicamente activas, incluyendo cuatro tocoferoles que presentan una cadena lateral isoprenoide saturada y cuatro tocotrienoles que presentan una cadena lateral isoprenoide insaturado, designados (α , β , γ y δ) según el número y la posición de los grupos metilo en el anillo de cromanol (Kalač, 2012). La vitamina E es biosintetizada sólo por las plantas y distribuida en la leche bovina principalmente como α -tocoferol, mientras que una menor contribución deriva del γ -tocoferol (Havemose et al., 2004; Sunarić et al., 2012).

Dentro de sus funciones biológicas, la vitamina E contribuye a la estructura óptima y la permeabilidad de las membranas celulares, lo que mejora la función de las células y los tejidos que están más expuestos al estrés oxidativo (eritrocitos y alvéolos pulmonares, Grażyna et al., 2017). Su deficiencia puede acelerar el envejecimiento y aumentar el riesgo de aterosclerosis, enfermedades cardiovasculares, cáncer y enfermedades neurodegenerativas (Alzheimer, Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica; Gohil et al., 2007; Niki, 2014).

A pesar de que la leche y los productos lácteos no son una fuente rica de vitamina E, ésta desempeña un papel importante como antioxidante, protegiendo su grasa contra la autooxidación. La vitamina E que se encuentra en las membranas de glóbulos grasos y presenta mayores concentraciones en la mantequilla (18–35 $\mu\text{g/g}$ de grasa) que en la leche (0,30– 0,83 $\mu\text{g/ml}$; Sunarić et al., 2012; Grażyna et al., 2017).

2.5.2.2. *Carotenoides y Vitamina A*

Los carotenoides son importantes en la salud y nutrición humana debido a su función como provitamina A, a sus propiedades antioxidantes y a la biodisponibilidad en la dieta diaria.

Son propiedades antioxidantes en particular de la vitamina A y el β -caroteno la prevención de la oxidación de la fracción de colesterol LDL y la inhibición de la peroxidación lipídica en tejidos con baja presión parcial de oxígeno. En tales condiciones, los carotenoides, en particular el β -caroteno, son inhibidores físicos y

químicos excepcionalmente eficientes del oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) y otros radicales libres de oxígeno (ROS), de manera más efectiva que las vitaminas A, E y C. A una presión parcial alta de oxígeno, por ejemplo, en el epitelio respiratorio, el β -caroteno y la vitamina A pueden ejercer efectos prooxidativos, y su autooxidación inicializa la peroxidación de lípidos estructurales (Müller et al., 2011; Fiedor y Burda, 2014; Grażyna et al., 2017).

Se han recopilado una gran cantidad de datos, a través de una gran serie de estudios epidemiológicos, de intervención y clínicos, principalmente de experimentos con β -caroteno, licopeno, luteína y zeaxantina, que respaldan la observación de que la ingesta adecuada de alimentos ricos en carotenoides o suplementos de carotenoides pueden reducir significativamente el riesgo de algunas enfermedades crónicas. Por lo tanto, los efectos beneficiosos de la administración de carotenoides se han confirmado en el caso de trastornos cardiovasculares y fotosensibles, así como en enfermedades relacionadas con los ojos (Fiedor y Burda, 2014).

Como antioxidantes de bajo peso molecular, el β -caroteno y la vitamina A son componentes dietéticos importantes que previenen la aterosclerosis, el cáncer y otras enfermedades degenerativas. Sus efectos anticancerígenos se pueden atribuir a la presencia de muchos dobles enlaces conjugados en sus moléculas (en especial en los carotenoides), que absorben el oxígeno singlete. Debido a su capacidad para absorber oxígeno singlete, los carotenoides protegen eficazmente el ADN contra la oxidación. La vitamina A, en particular el ácido retinoico, un metabolito del β -caroteno capaz de modular los niveles de múltiples proteínas celulares protege al cuerpo contra las primeras etapas del cáncer, mientras que el β -caroteno en dosis adecuadas previene la progresión neoplásica (Palozza et al., 2002; Sharoni et al., 2012; Tanaka et al., 2012; Grażyna et al., 2017).

A pesar de su bajo porcentaje en la leche, los carotenoides (β -caroteno y luteína) están involucrados en las propiedades sensoriales de los productos lácteos a través de sus propiedades colorantes y antioxidantes (Agabriel et al., 2007). Las concentraciones de vitamina A y β -caroteno varían bajo el efecto de varios factores relacionados con los animales (raza, parto, etapa fisiológica, nivel de ingesta) y más aún bajo el efecto de su alimentación (cantidad de caroteno en la dieta; Nozière et al., 2006; Calderón et al., 2007). Los niveles más altos de vitamina A (0,150-1,5 mg/100 g) se encuentran en quesos maduros y mantequilla, mientras que la leche, el requesón y el yogur contienen cantidades significativamente menores de vitamina A (0,015-0,150 mg/100 g; Grażyna et al., 2017).

2.5.3. MicroARN

Los microARN son ARN pequeños endógenos no codificantes con 18–25 nucleótidos, implicados en la regulación de la expresión génica postranscripcional mediante emparejamiento de bases con ARN mensajero (ARNm) para inducir su degradación o para inhibir su traducción (Bartel, 2004; Bartel, 2009). Se les atribuyen muchas funciones biológicas, ya que están involucrados en muchos procesos celulares como la proliferación y diferenciación celular, la muerte celular (apoptosis), el desarrollo del sistema inmunológico y las respuestas inmunitarias (Ambros, 2004; Williams, 2008; Ameres y Zamore, 2013). Se ha demostrado que regulan la expresión de hasta el 60 % de los genes codificadores dentro de las células (Friedman et al., 2009). La expresión desregulada de los microARN debido a una biogénesis aberrante, ha sido asociada con el desarrollo de diferentes enfermedades como lo son varios tipos de cánceres humanos (Stahlhut Espinosa y Slack, 2006; Esquela-Kerscher y Slack, 2006), la aparición y desarrollo de la diabetes (Feng et al., 2016) y trastornos neurodegenerativos como la enfermedad de Alzheimer (Reddy et al., 2017), sin embargo, visto desde otra perspectiva, esto indica que los microARN pueden funcionar como supresores de tumores y oncogenes y ser utilizados para el diagnóstico y detección de dichas enfermedades.

Se han encontrado microARN en fluidos extracelulares incluyendo la sangre (plasma y suero; Chen et al., 2008), saliva (Michael et al., 2010; Lässer et al., 2011), orina (Hanke et al., 2010; Weber et al., 2010), líquido cefalorraquídeo (Dorval et al., 2013), lágrimas (Weber et al., 2010) y leche (Hata et al., 2010; Kosaka et al., 2010; Zhou et al., 2012; van Herwijnen et al., 2018). Diferentes estudios han indicado la expresión de microARN en la leche humana (Kosaka et al., 2010), bovina (Hata et al., 2010; Chen et al., 2010), porcina (Gu et al., 2012), de cabra (Na et al., 2015) y de dromedarias (Yassin et al., 2016), al igual que una relación directa de un número significativo de microARN derivados de la leche con la regulación del sistema inmune.

El miRNoma de la glándula mamaria (atlas exhaustivo de microARN) ha sido caracterizado en bovinos en lactación (Le Guillou et al., 2014; Mobuchon et al., 2017), y también su regulación tanto por factores intrínsecos como extrínsecos, como la nutrición (García-Segura et al., 2013; Li et al., 2015; Mobuchon et al., 2017) y genética (Billa et al., 2019). De hecho, la leche contiene la mayor concentración de microARN de todos los fluidos corporales (Weber et al., 2010). Se detectaron microARN en diferentes fracciones de la leche, incluidos los exosomas y los glóbulos de grasa de la leche derivados de células epiteliales de la glándula mamaria (Li et al., 2016; Lago-Novais et

al., 2016; Pawlowski et al., 2018). Su encapsulamiento en exosomas les confiere protección contra la degradación y facilitan la captación por endocitosis en las células intestinales, alcanzando la circulación sistémica del consumidor de la leche (Izumi et al., 2012; Zempleni, 2017; Melnick y Schmitz, 2017). La biodisponibilidad y distribución de exosomas transmitidos por los alimentos (leche bovina) a diferentes órganos sugiere que podrían actuar sobre diferentes funciones en los consumidores (Manca et al., 2018).

Diferentes estudios muestran que los principales microARN que se encuentran en la leche de diferentes especies a menudo se superponen con los microARN de la leche humana, lo que sugiere un proceso evolutivo conservado que conduce a la liberación de microARN específicos de la leche (Zempleni et al., 2015; Zempleni et al., 2017; van Herwijnen et al., 2018; Benmoussa y Provost, 2019). El microARN más abundante que se encuentra en los exosomas y los glóbulos grasos de la leche, el miR-148a (con secuencias idénticas en humanos y bovinos), participando críticamente en la regulación epigenética, desempeñando a su vez un papel clave en varios procesos fisiológicos y patofisiológicos, incluyendo la diferenciación de células Th1 y B, enfermedades autoinmunes y tumorigenesis (Friedrich et al., 2017; Melnik y Schmitz, 2017).

Se ha observado que los microARN pueden desempeñar un papel importante en la fisiología y función de las glándulas mamarias, como es el caso del miR-101a, miR-126-3p y miR-206 (Tanaka et al., 2009; Cui et al., 2011; Lee et al., 2013) y en la síntesis y secreción de los componentes de la leche, como el miR-15a implicado en la función de lactancia, cuya sobreexpresión en células epiteliales mamarias bovinas inhibe la expresión de la β -caseína (CSN2) (Li et al., 2012). Sin embargo, datos recientes sugieren que los componentes bioactivos de los alimentos tanto micro como macronutrientes (aminoácidos, carbohidratos, ácidos grasos, vitaminas y fitoquímicos) afectan el perfil de expresión o la función de los microARN (García-Segura et al., 2013).

Debido a su uso potencial como herramientas funcionales, de diagnóstico y pronóstico en la evaluación y el manejo de enfermedades, los microARN de la leche han cobrado particular interés (Melnik y Schmitz, 2017, Markkandan et al., 2018; Tomé-Carneiro et al., 2018). La expresión de microARN en la leche bovina ha sido relacionada con diferentes enfermedades o con su desarrollo, como en el caso de las infecciones de las glándulas mamarias; especialmente mastitis (Lai et al., 2017a, Lai et al., 2017b; Cai et al., 2018), infección por estafilococos (Sun et al., 2015) y tuberculosis (Iannaccone et al., 2018). En humanos, estudios demuestran la existencia de un vínculo entre los microARN de la leche y enfermedades como el cáncer (Do Canto et al., 2016; Hesari et

al., 2018) y el desarrollo del sistema inmunitario en el recién nacido durante la lactancia (Carney et al., 2017; Perri et al., 2018). Por lo tanto, los microARN han sido explorados en la leche por su potencial como biomarcadores (García-Segura et al., 2013; Gustafson et al., 2016; Benmoussa y Provost, 2019) y como controles de calidad de la leche comercial (Oh et al., 2017).

CAPÍTULO 3

Objetivos y planteamiento experimental

3. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL

El objetivo general de la tesis doctoral es identificar biomarcadores específicos en la leche de vaca que posibiliten la autenticación de su origen en función del sistema de producción para su posible tipificación en base a una alimentación rica en pastos y forrajes.

Los objetivos específicos a seguir para alcanzar el objetivo general son:

1. Examinar la efectividad del método de suministro del forraje: pastoreo, corte y acarreo (zero-grazing) o ensilado, sobre el rendimiento de la leche y los perfiles de ácidos grasos, antioxidantes y microARN de la leche con el fin de ser utilizados como biomarcadores del sistema de alimentación.
2. Evaluar la influencia de la inclusión en la dieta, con y sin pastoreo, de leguminosas con creciente implantación en la cornisa cantábrica sobre la producción y composición de la leche, especialmente en el perfil de ácidos grasos, antioxidantes y microARN.

Para alcanzar estos objetivos, se ha llevado a cabo este trabajo en el Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA) de Villaviciosa (Asturias), en condiciones experimentales controladas, haciendo uso, de todos los medios disponibles para su realización; lo que incluye el del rebaño de vacas en lactación, el cual será sometido a diferentes condiciones de manejo (pastoreo o estabulación, que implican ejercicio físico o no) y alimentación (forraje fresco y tipo de ensilado) de forma consecutiva y sobre el que se monitorizarán los niveles de expresión de los biomarcadores en estudio.

En el primer experimento, que está enfocado al cumplimiento del objetivo específico 1, para caracterizar los biomarcadores en leche cruda de animales mantenidos en diferentes sistemas de producción, se realizó un ensayo *in vivo* con vacas en lactación, contrastando tres modos de aporte de la hierba: 1) pastoreo permanente, 2) estabulación permanente y corte y acarreo de hierba diario *ad libitum*, 3) estabulación permanente y ensilado de hierba *ad libitum*, obtenido con forraje procedente de los cortes de 2016 y 2017 de las praderas establecidas con pastos permanentes para hierba fresca y pastoreo.

Para la consecución del objetivo específico 2, en el segundo experimento, para determinar el efecto del tipo de ensilado sobre la capacidad discriminante de los

marcadores en leche cruda de animales mantenidos en diferentes sistemas de producción, se realizó un ensayo *in vivo* con vacas en lactación, con tratamientos experimentales que consistían en la oferta de diferentes raciones completas mezcladas de ensilado (raigrás, habas y guisantes) *ad libitum*, en estabulación o pastoreo continuo con oferta de dos horas tras cada ordeño de las raciones de los ensilados obtenidos con los forrajes de los cultivos de invierno de la rotación 2017 y 2018.

En esta Memoria de Tesis se presentan los resultados relativos a la influencia de las diferentes condiciones de manejo y alimentación sobre el rendimiento, composición y calidad de la leche, especialmente sobre la expresión de los perfiles de ácidos grasos, antioxidantes y microARN, como potenciales biomarcadores del origen y sistema de alimentación del vacuno lechero.

CAPÍTULO 4

Efecto del modo de aporte de la hierba en pastoreo, fresca en corte y acarreo o ensilada, sobre la capacidad discriminante de los marcadores del sistema de alimentación

4. EFECTO DEL MODO DE APORTE DE LA HIERBA EN PASTOREO, FRESCA EN CORTE Y ACARREO O ENSILADA, SOBRE LA CAPACIDAD DISCRIMINANTE DE LOS MARCADORES DEL SISTEMA DE ALIMENTACIÓN.

4.1. INTRODUCCIÓN

La optimización de la producción de leche incluye un uso racional de los forrajes, el respeto por el medio ambiente y ofrecer una mejor calidad a los consumidores. La producción de leche basada en pastos y forrajes se extiende ampliamente por todo el Arco Atlántico, con el fin de maximizar el rendimiento de leche por hectárea. Hoy en día, no solo el valor nutricional, sino también otros componentes de la leche (ácidos grasos y vitaminas) han despertado interés debido a su relevancia por mejorar la salud de los consumidores a largo plazo y en la plusvalía de la leche y sus productos derivados. La preocupación de los consumidores por los alimentos de origen animal y sus métodos de producción implican que el concepto de "calidad" de los alimentos ahora incluye, además del valor nutricional, el sabor, el aroma y el color, otros indicadores relacionados con aspectos éticos como el bienestar animal y el impacto ambiental del sistema de producción (Luykx y Van Ruth, 2008). Los consumidores asumen que una alimentación del ganado lechero basada en pastos es más natural y está más en línea con los requisitos de bienestar animal que los sistemas más intensivos. Conocer el sistema de producción puede determinar la elección del consumidor en el momento de la compra (Valenti et al., 2013). Por lo tanto, Monahan et al. (2010) indican la necesidad de investigar biomarcadores que permitan asociar la composición de la leche con los alimentos para el ganado y, por lo tanto, permitan la trazabilidad "de la granja a la mesa" de acuerdo con su sistema de producción y origen geográfico. Factores relacionados con la nutrición, la alimentación y el manejo de los rebaños lecheros pueden producir cambios que se pueden observar a corto plazo. La presencia de antioxidantes liposolubles y ácidos grasos se ha propuesto como biomarcadores para la autenticación de la leche producida a base de pastos, ya que dependen de factores externos que diferencian el sistema de producción, la dieta, el ejercicio y el bienestar animal (Moloney et al., 2014).

Muchos estudios muestran que la leche producida a partir de sistemas de pastoreo tiene características diferentes en sus componentes, que la leche producida a partir de sistemas de estabulación permanente (Coppa et al., 2013; Kusché et al., 2015; Elgersma, 2015). Los forrajes frescos son una importante fuente natural de antioxidantes, vitaminas y ácidos grasos en las dietas de rumiantes, y sus

concentraciones en el forraje tienen una relación importante con la composición y la calidad de la leche y los productos lácteos (Elgersma et al., 2013).

La calidad nutricional de la grasa láctea se basa en gran medida en su perfil de ácidos grasos, que desempeña un papel clave en muchas funciones vitales y tiene un impacto directo en la salud de los consumidores (Belury, 2002). En general, el contenido de ácidos grasos de la leche cambia en cantidad y calidad dependiendo de factores relacionados principalmente con la dieta y, en menor medida, con el animal y el medio ambiente (Hernández-Ortega et al., 2014; Schwendel et al., 2015; Morales-Almaráz et al., 2018), por lo que el contenido de grasa y el perfil de ácidos grasos pueden ser un indicador de la dieta de los animales (Morales-Almaráz et al., 2011) y el sistema de manejo (Vicente et al., 2017).

El impacto positivo de los antioxidantes liposolubles (carotenoides y tocoferoles) en la salud humana ha sido ampliamente revisado (Bendich, 1993; Schneider, 2005; Willcox et al., 2004). Los antioxidantes de la grasa de la leche tienen un papel importante en el mantenimiento del equilibrio prooxidante/antioxidante en el cuerpo humano (Tijerina-Sáenz et al., 2009). Se han encontrado niveles más altos de antioxidantes (α -tocoferol, β -caroteno y retinol) en la leche de vacas que consumen pasto fresco en comparación con dietas ricas en concentrado o ensilado (Havemose et al., 2004; Agabriel et al., 2007).

En general, el interés por el impacto de los microARN de la leche en la salud y las enfermedades aumenta constantemente a lo largo de los años. La evidencia recopilada sobre la leche bovina sugiere su uso potencial como biomarcador para el diagnóstico temprano de infecciones y posiblemente para monitorear el estado de salud de las vacas (Benmoussa y Provost, 2019). Además, los perfiles de microARN permiten determinar alteraciones en la dieta de las madres (García-Segura et al., 2013; Li et al., 2015; Mobuchon et al., 2017) o, en la transferencia de microARN al recién nacido (Melnik y Schmitz, 2017; Zemleni et al., 2017), puede alterar la bioactividad potencial de los microARN de la leche. Importantes cambios en la expresión de los perfiles de microARN han generado información sobre la leche materna humana, demostrando la actividad moduladora de la inmunidad de la gran mayoría de los microARN (Hata et al., 2010; Kosaka et al., 2010; Izumi et al., 2012; Zhou et al., 2012; Munch et al., 2013; Chen et al., 2014; Melnik et al., 2014; Na et al., 2015; Benmoussa et al., 2016; Cui et al., 2017; Zemleni et al., 2019), con algunos de estos sobreexpresados durante el desarrollo del cáncer (Golan-Gerstl et al., 2017; Do Canto et al., 2016) o en algunas otras enfermedades (Mobuchon et al., 2017).

Las condiciones del clima oceánico en el Arco Atlántico favorecen la producción de pastos y forrajes. El forraje, fresco o conservado, es una parte esencial de las dietas de las vacas lecheras. Los sistemas de alimentación basados en la utilización de recursos forrajeros propios, podrían ser una alternativa para solventar el actual problema de rentabilidad de la producción de leche. Los modelos basados en el pastoreo permiten ahorrar costes de alimentación en las granjas (Soder y Rotz, 2001; Peyraud y Delegard, 2013). Hanson et al. (2013) constataron que las granjas lecheras en la región del Atlántico medio de EEUU basadas en el pastoreo extensivo eran más rentables que las granjas lecheras en estabulación. Sin embargo, no todos los animales tienen la posibilidad de pastar, ya sea por falta de superficie disponible o por dificultades de manejo, por lo que muchos granjeros tienen que adoptar un sistema de corte y transporte de la hierba al pesebre (Martínez-García et al., 2013). El coste de alimentación con este manejo se incrementa en un 25% respecto al pastoreo (Pincay-Figueroa et al., 2016) debido al coste de cortar, transportar y distribuir la hierba desde las praderas a las cuadras, así como al incremento de los costes de oportunidad de la mano de obra (Velarde-Guillén et al., 2019).

El objetivo del presente estudio fue examinar la efectividad del método de suministro del forraje: pastoreo, corte y acarreo (zero-grazing) o ensilado, sobre el rendimiento de la leche y los perfiles de ácidos grasos, antioxidantes y microARN de la leche con el fin de ser utilizados como biomarcadores del sistema de alimentación.

4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1. Lugar Experimental

El experimento se realizó en la Unidad de Leche del Área de Nutrición, Pastos y Forrajes del Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA) en Villaviciosa (Asturias, España), geográficamente localizada a una Latitud 43° 28' 20", Longitud 5° 26' 10" y una altitud de 10 msnm. Con una extensión total de 23 ha, la finca experimental del SERIDA posee 13 ha destinadas a pastos permanentes y 9 ha que son utilizadas en la rotación de cultivos forrajeros.

4.2.2. Diseño Experimental

Para caracterizar los biomarcadores en leche cruda de animales mantenidos en diferentes sistemas de producción, se realizó un ensayo *in vivo* con vacas en el segundo tercio de lactación, entre el 26 de abril y el 26 de junio de 2017. Se estudiaron tres tratamientos en los que se contrastaron tres modos de aporte de la hierba: 1) pastoreo permanente, 2) estabulación permanente y corte y acarreo de la hierba ofertada *ad libitum*, 3) estabulación permanente y ensilado de hierba *ad libitum*, obtenido con forraje procedente de los cortes de 2016 y 2017 de las praderas establecidas con pastos permanentes para hierba fresca y pastoreo.

El ensayo se llevó a cabo siguiendo un diseño cross-over, con tres periodos de 19 días cada uno, que se distribuyeron en 13 días de adaptación y seis días de toma de muestras y mediciones.

Se seleccionaron 18 vacas Holstein con un peso vivo medio inicial de 624 ± 69 kg, $2,5 \pm 1,5$ lactaciones, 108 ± 53 días de lactación y una producción media diaria de $30,3 \pm 7,1$ kg de leche. Las vacas se distribuyeron homogéneamente en tres grupos de seis vacas cada uno, según el número de lactaciones, los días de lactación, el peso vivo inicial y la producción de leche. Se ordeñaron dos veces al día (07:00 h y 19:00 h) por medio de un sistema automático de ordeño con un distribuidor integrado de pienso suplementario.

Todos los tratamientos fueron complementados con un pienso suplementario distribuido en el ordeño a fin de cubrir las necesidades nutricionales de las vacas. La oferta del mismo, estaba ajustada a un máximo de 6 kg de pienso por vaca al día. Se procedió a pesar los animales del ensayo el primer y último día de la semana de muestreo y a evaluar su condición corporal.

El pastoreo se realizó con un manejo rotacional en praderas polifitas naturalizadas de 1 ha aproximadamente de extensión. Durante el ensayo, estas fueron asignadas al grupo de animales correspondiente al tratamiento de pastoreo y rotadas en la fase experimental durante el periodo de adaptación, teniendo en cuenta, la disponibilidad de forraje de las mismas. En la fase de toma de muestras se utilizaron dos parcelas específicas con composición botánica y disponibilidad de hierba similar. En cuanto, a la hierba de corte se hizo uso de una misma pradera durante los tres periodos del ensayo, en donde se segó diariamente la materia fresca ofrecida al grupo de dicho tratamiento. El ensilado de hierba utilizado provenía de los cortes de ensilado realizados en el año agronómico 2016-2017 en las mismas parcelas utilizadas para pastoreo y corte y acarreo.

4.2.3. Producción de Leche y Control de Ingestión

La producción diaria de leche de cada ordeño (mañana y tarde) fue registrada individualmente en cada vaca mediante el robot de ordeño y gestionada a través del software DelPro™ 5.3 VMS de DeLaval para gestión del rebaño.

4.2.3.1. Ingestión de Forraje en Pesebre

Los controles de ingestión del forraje en la cuadra fueron realizados diariamente durante el periodo de muestreo de manera individual, haciendo uso de un sistema de monitorización de la ingestión voluntaria, a través de 12 balanzas (Mettler Toledo IND 425-CC300, Greifensee, Suiza) con una capacidad máxima de 300 kg y una exactitud de ± 100 g, instaladas en la zona de alimentación de la estabulación, basándose en un diseño propuesto por Bach et al. (2004). Se colocó un cajón de fibra de vidrio de 150 L de capacidad sobre el plato de cada balanza, en el cual se servía la oferta diaria de la hierba fresca o ensilada ofrecida. Cada comedero tenía situado sobre la parte superior derecha un lector de presencia (CP-15 de Circontrol, Barcelona, España) con un radio de lectura máximo de 15 cm, utilizado para detectar el paso de un transponder (TAG CT-50 de Vicic, Circontrol) colocado en la oreja derecha de cada uno de los animales del ensayo, permitiendo determinar así la entrada y salida de las vacas en cada comedero y el tiempo utilizado para comer de cada animal. Al mismo tiempo, cada balanza registraba simultáneamente las variaciones de peso durante el tiempo de permanencia de cada vaca en el puesto de alimentación.

4.2.3.2. Ingestión de Hierba en Pastoreo

El consumo de forraje fresco de los animales en pastoreo fue estimado haciendo uso del método de rendimiento animal establecido por Maccoon et al. (2003), mediante la siguiente ecuación:

$$MSI_{\text{hierba}} = (EN_L - EN_{\text{pienso}}) / EN_{\text{hierba}} \quad [\text{Ecuación 1}]$$

Donde,

MSI_{hierba} : Materia seca ingerida de pasto (kg MS/día).

EN_L : Requerimientos de energía neta total para lactación (Mcal/día).

EN_{pienso} : Aporte de energía diario del pienso (Mcal/día).

EN_{hierba} : Contenido energético de la hierba consumida en pastoreo (Mcal/día).

Los requerimientos de energía neta total del ganado lechero se estimaron aplicando las ecuaciones de predicción del NRC (2001), incluyendo las necesidades de energía neta en Mcal/día para:

Energía Neta de Mantenimiento (EN_m):

Se calculó basándose en el peso vivo (PV) del animal y el número de partos:

$$EN_m = k (0,08 \times PV^{0,75}) \quad [\text{Ecuación 2}]$$

Donde k representa la constante con valor: 1,2 para vacas de primer parto; 1,1 para vacas de segundo parto y 1 para vacas con 3 o más partos y $PV^{0,75}$ representa el peso metabólico del animal.

Energía Neta de Gestación (EN_g):

$$EN_g = \frac{\left[(0,00318 \times D - 0,0352) \times \left(\frac{PTN}{45} \right) \right]}{0,218} \quad [\text{Ecuación 3}]$$

Donde, D son los días de gestación y PTN el peso del ternero al nacimiento en kg.

Energía Neta de Producción de Leche (EN_l):

$$EN_l = \text{kg leche día} \times [0,3512 + (0,0962 \times \% \text{ grasa en leche})] \quad [\text{Ecuación 4}]$$

Energía Neta de Cambio de Peso Corporal (EN_{pv}):

Por cada kilogramo de PV ganado durante el periodo experimental, se adiciona a los requerimientos totales 5,12 Mcal. Por el contrario, en caso de pérdida de peso se sustraen de las necesidades 4,92 Mcal por cada kg PV perdido.

Energía Neta por la Actividad de Pastoreo (EN_p):

Este cálculo se realizó haciendo uso de la ecuación propuesta por Rochinotti (1998) en Kcal/día:

$$EN_p = 1,2 \text{ kcal} * \text{horas de pastoreo} \times PV^{0,75} \quad \text{[Ecuación 5]}$$

Energía Neta por Actividad de Desplazamiento (EN_d):

Calculado usando la estimación sugerida en el modelo del AFRC (1993):

$$EN_d = \frac{0,62 \text{ cal}}{\text{kg PV} \times \text{distancia (metros)}} \quad \text{[Ecuación 6]}$$

Se tomó en consideración un recorrido medio diario de 1 km para los animales en pastoreo.

Energía Neta Total de Lactación

El requerimiento de energía neta total (EN_L) representa el sumatorio de todas las necesidades de energía de las estimaciones anteriores en Mcal/día.

$$EN_L = EN_m + EN_g + EN_l + EN_{pv} + EN_p + EN_d \quad \text{[Ecuación 7]}$$

La Energía Neta para Lactación a través del consumo de forraje puede ser estimada por la diferencia de los requerimientos de EN_L menos la energía consumida con el pienso suplementario.

La estimación de la EN_L de los alimentos se realizó según se describe a continuación:

a) Forraje Fresco

Se determinó la Digestibilidad *in vivo* de la Materia Orgánica (DMO, %), predicha por el método de fibra neutro detergente-celulasa propuesto por Riveros y Argamenteoría (1987); estimada a partir de la Digestibilidad de la Materia Orgánica (DEMO, %), el contenido de Fibra Neutro Detergente y de Proteína Bruta (FND y PB, % sobre MS).

$$\text{DMO} = 5,76 + (0,57 \times \text{DEMO}) + (0,36 \times \text{FND}) + (0,5 \times \text{PB}) \quad [\text{Ecuación 8}]$$

La Energía Metabolizable (EM) se estimó según el modelo de MAFF (1984), donde el coeficiente de Digestibilidad de la Materia Orgánica (DMO) se expresa como porcentaje de Materia Orgánica Digestible (MOD).

$$\text{EM} = k \times \text{MOD} \quad [\text{Ecuación 9}]$$

Donde k es una constante que para forrajes frescos tiene un valor de 0,16 y la MOD se calcula con la siguiente ecuación:

$$\text{MOD} = \% \text{ Materia Orgánica} \times \left(\frac{\text{DMO}}{100} \right) \quad [\text{Ecuación 10}]$$

Finalmente, la Energía Neta (EN) aportada por el forraje fresco se estimó haciendo uso de la ecuación de predicción del NRC (1989):

$$\text{EN} = (0,1569 \times \text{EM}) - 0,07 \quad [\text{Ecuación 11}]$$

b) Pienso Suplementario

La estimación de la Energía Neta se realizó aplicando la misma ecuación utilizada para forraje fresco (Ecuación 10).

La EM para el pienso se determinó, a través, del promedio de la EM calculada por las ecuaciones propuestas según el MAFF (1984) y según el ADAS (1985).

$$\text{EM} = (\text{EMMAFF} + \text{EMADAS})/2 \quad [\text{Ecuación 12}]$$

Donde la EMMAFF fue estimada a partir de la Proteína (PB), el Extracto Etéreo (EE), la Fibra Bruta (FB) y los Materiales Extractivos Libres de Nitrógeno (MELN), todos expresados en porcentaje sobre MS:

$$\text{EM}_{\text{MAFF}} = 10 * (0,012 \times \text{PB} + 0,031 \times \text{EE} + 0,005 \times \text{FB} + 0,014 \times \text{MELN}) \quad [\text{Ecuación 13}]$$

Para lo cual se calculó la MELN a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{MELN} = 100 - (\text{PB} + \text{EE} + \text{FB} + \text{CEN}) \quad [\text{Ecuación 14}]$$

Donde: CEN = Cenizas (en % sobre MS)

Para calcular la EMADAS se utilizaron de igual manera la PB, EE, FB y las CEN, expresadas en porcentaje sobre materia seca:

$$EM_{ADAS} = 11,78 + (0,0654 \times PB) + (0,0665 \times EE^2) - (0,0414 \times EE \times FB) - (0,018 \times CEN) \quad \text{[Ecuación 15]}$$

4.2.3.3. Ingestión del Pienso Suplementario

El pienso suplementario se ofertaba en la estación automática de alimentación instalada en el robot de ordeño (VMS v.2006, Delaval, Suecia). Cada vaca portaba un collar con trasponder por lo que las ingestiones individuales quedaban registradas en el sistema automático de alimentación.

4.2.4. Toma de Muestras

4.2.4.1. Praderas

Al inicio del periodo de muestreo se realizó un muestreo de las praderas utilizadas por las vacas en pastoreo, para el control de producción el día previo a la entrada de los animales en la misma y el día de su salida para determinar los rechazos, siguiendo la metodología descrita por Martínez-Fernández et al. (2018), para forrajes verdes, bajo pastoreo rotacional. Esta técnica consiste en lanzar 5 veces al azar de manera longitudinal una vara metálica de 2 m de largo y procediendo a segar a ras en cada lanzamiento con tijeras mecánicas cortacéspedes de 10 cm de ancho el largo de la misma, acumulando en una bolsa la hierba recogida en el m² segado. Las muestras de forraje de cada parcela se pesaron para estimar la disponibilidad de materia fresca por hectárea. La muestra se dividió en dos submuestras. La primera se secó para determinar su materia seca, para estimar su rendimiento (kg MS/ha) y posteriormente fue molida a través de un molino Fritsch Pulverisette 25 (Fritsch GmbH, Idar-Oberstein, Alemania) a un tamaño de partículas de 0,75 mm para determinar su valor nutritivo. La segunda submuestra fue congelada a -20°C para su posterior análisis de ácidos grasos y antioxidantes.

Se cuantificó la frecuencia de aparición de especies vegetales, así como la proporción de biomasa que aportaban. Se calculó el Índice de Shannon (H') para medir la biodiversidad de especies mediante la ecuación:

$$H' = - \sum_{i=1}^h p_i \log_2 p_i \quad \text{[Ecuación 16]}$$

Donde h es el número de especies identificadas, pi es el número de individuos de una especie respecto al número de todos los individuos de todas las especies.

Un valor $H' < 2$ indica un índice bajo de biodiversidad y $H' > 3$ una alta biodiversidad.

La distribución de la abundancia de especies o equitabilidad (E) fue calculada según:

$$E = \frac{D - D_{\min}}{D_{\max} - D_{\min}} \quad \text{[Ecuación 17]}$$

Siendo D el índice de diversidad calculado como:

$$H' = - \sum_{i=1}^h p_i^2 \quad \text{[Ecuación 18]}$$

Donde pi es el número de individuos de una especie respecto al número total de individuos de todas las especies, D_{\min} el índice de diversidad menor calculado y D_{\max} el índice de diversidad mayor encontrado.

4.2.4.2. *Ensilado de Hierba, Hierba Fresca en corte y acarreo y Pienso Suplementario*

Se tomó diariamente durante el periodo de muestreo una muestra de ensilado de hierba y de hierba fresca cortada antes de ser repartido en los comederos. El tamaño de la muestra fue de 2 kg aproximadamente para garantizar su representatividad y se congeló cada día hasta el final del periodo experimental, tras el que se descongelaron para ser posteriormente mezcladas en una única muestra final por tratamiento. Dicha muestra final, se dividió en dos submuestras: la primera de ellas para obtener un análisis del valor nutritivo y la segunda para determinar el perfil de ácidos grasos y antioxidantes que fueron envasadas al vacío (Tecnotrip EV-15-1CD, Terrasa, España) y se congelaron a -20 °C hasta el análisis posterior.

Las muestras de ensilados y corte y acarreo fueron secadas a 60 °C durante 24 horas para poder así determinar su contenido de materia seca (de la Roza-Delgado et al., 2002) y se molieron posteriormente para su análisis, en un molino Fritsch Pulverisette 25 con un tamiz de 0,75 mm de diámetro.

El pienso suplementario fue muestreado una vez al inicio de cada periodo, tomando una muestra de 1 kg que fue molida por un molino Fritsch Pulverisette 14 a 1 mm de diámetro para su posterior análisis.

4.2.4.3. *Leche*

Durante la semana de muestreo se tomaron diariamente muestras individuales de 40 ml de leche en botes de propileno, en cada uno de los ordeños de mañana y tarde. Las muestras fueron obtenidas por un muestreador automático acoplado al robot de ordeño, el cual hace una mezcla homogénea y proporcional de la producción de cada vaca durante el ordeño. Las muestras destinadas al análisis de antioxidantes se tomaron los días uno y dos del periodo de muestreo, las destinadas a determinar los microARN los días dos y tres, las tomadas para el análisis de la composición química los días tres y cuatro y las destinadas al análisis de ácidos grasos los días cuatro y cinco. A las muestras tomadas para la determinación de su composición química y para analizar el perfil de ácidos grasos se les adicionó para su conservación 0,13 ml de azidol; bacteriostático elaborado con 0,075 % (p/v) de cloramfenicol, 1,8 % (p/v) de azida sódica, 4,5 % (p/v) ácido trisódico y 0,035 % (p/v) de azul bromofenol. No se adicionó conservante al resto de las muestras de leche.

Las muestras tomadas para análisis de ácidos grasos, antioxidantes y microARN tomadas en cada ordeño (mañana y tarde) se mezclaron proporcionalmente en función de la leche producida en los respectivos ordeños. Posteriormente se tomaron alícuotas, proporcionales a la producción de cada vaca para conformar una única muestra por tratamiento y periodo. Las muestras destinadas al análisis de ácidos grasos y antioxidantes fueron congeladas a -20 °C hasta su análisis. Las muestras destinadas al análisis de microARN fueron centrifugadas inmediatamente para la separación de fases (grasa y células) y se les añadió QIAzol para su posterior conservación a -80 °C. Las muestras destinadas a la determinación de la composición química fueron analizadas inmediatamente.

4.2.5. **Determinaciones Analíticas**

4.2.5.1. *Alimentos*

Los alimentos (forrajes verdes, ensilado y pienso) fueron analizados en el Laboratorio de Nutrición Animal del SERIDA (Laboratorio Oficial del Principado de Asturias para Análisis de Alimentos Destinados al Ganado), acreditado por la Entidad Nacional de Acreditación (ENAC) conforme a los criterios establecidos en la norma UNE-EN-ISO/EC 17025 (nº de expediente LE/930).

El contenido de Materia Seca (MS), Cenizas (CEN), Proteína Bruta (PB), Fibra Neutro Detergente (FND), Fibra Ácido Detergente (FAD) y Digestibilidad Enzimática de la Materia Orgánica (DEMO) de los forrajes verdes y ensilados fue determinado por espectroscopia del infrarrojo cercano (NIRS), empleando un equipo NIRSystem 5000 (FOSS NIRSystem. Silver Spring, MD, EEUU). En el pienso se realizaron las mismas determinaciones, exceptuando la DEMO y determinando además la Fibra Bruta (FB), Extracto Etéreo (EE) y almidón, con el mismo equipo NIRS, empleando las ecuaciones de predicción desarrolladas en el Laboratorio de Nutrición Animal del SERIDA, para ambos tipos de muestra.

La determinación de la composición de ácidos grasos de los alimentos (pasto fresco, ensilado y pienso) se llevó a cabo en el Laboratorio Interprofesional Galego de Análise do Leite (LIGAL, Abegondo, A Coruña). Los ácidos grasos fueron simultáneamente extraídos y metilados mediante el procedimiento propuesto por Sukhija y Palmquist (1988) con modificaciones. La esterificación de los ácidos grasos se realizó añadiendo 1 ml de tolueno y 1 ml de patrón externo C19:0 (1 mg/ml) a 250 mg de muestra, seguido de la adición de 3 ml de disolución de ácido clorhídricometanólico (preparado a partir de acetil cloruro y metanol). Tras la agitación en vórtex, las muestras se incubaron durante 2 horas en un baño de agua a 65 °C. Posteriormente la solución se enfrió a temperatura ambiente y se le añadieron 5 ml de disolución de carbonato potásico al 6 %, 2 ml de hexano, 1 g de sulfato sódico anhidro y 2 g de carbón activado. Finalmente, las muestras se centrifugaron durante 5 min (2500 rpm, 20 °C) y la fase orgánica se evaporó en corriente de nitrógeno hasta obtener un residuo aceitoso que se disolvió en 0,8 ml de hexano y se congeló hasta su análisis por cromatografía de gases.

Los ésteres metílicos de los ácidos grasos se separaron, identificaron y cuantificaron utilizando un equipo TRACE GC Ultra (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU) con detector de ionización de llama (FID), utilizando una columna capilar de sílice fusionada de 100 m a 0,25 mm i.d. (SP-2560 Capillary GC Column, Sigma Aldrich Inc., Saint Louis, MO, EEUU). El helio se utilizó como gas portador con un flujo de 0,6 ml/min. La temperatura del inyector y del detector fue de 250 °C y 260 °C, respectivamente. El volumen de inyección fue de 1 µL. La temperatura inicial de la columna se fijó a 140 °C durante 5 min; incrementando posteriormente de 140 a 200 °C a 4 °C/min durante 5 min; para luego subirla de 200 a 240 °C a 3 °C/min durante 5 min y, finalmente, manteniéndose así durante 38 min. Cada ácido graso se cuantificó mediante calibración interna utilizando como patrones internos los ácidos 9:0, 17:1, 19:0 y 20:2 metilados.

La determinación de la composición de antioxidantes de los alimentos fue realizada también en el LIGAL. La extracción/purificación de los carotenoides (xantofilas y carotenos) y vitaminas en los alimentos y la leche se realiza siguiendo metodologías diferentes, mientras que la identificación y cuantificación, son similares. Las muestras una vez tomadas fueron inmediatamente empacadas al vacío y congeladas (-20 °C) y analizadas de acuerdo con la metodología propuesta por Chauveau Duriot et al. (2010), basada en los métodos previamente descritos por Cardinault et al. (2008). Las muestras fueron picadas con ayuda de nitrógeno líquido en una picadora Robot Coupe R6 (Vincennes, Francia). El procesamiento de muestras se realizó con luz tenue, utilizando vidrio opaco. Se añadió butilhidroxitolueno (0,1 % v/v) como antioxidante, NaHCO₃ como agente neutralizante, y 10 ppm de echinenona y 3 ppm de tocoferol como estándares internos. Los componentes lipofílicos se extrajeron lavando tres veces con acetona. Los analitos fueron extraídos con éter de petróleo, la fase orgánica se evaporó bajo corriente de nitrógeno y el residuo seco se saponificó con KOH en MeOH (5,5 %, p/v) durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después de la centrifugación a 1000 × g durante 5 min a temperatura ambiente, la fase orgánica se recogió, se evaporó de nuevo y se reconstituyó en la fase móvil. Finalmente, se filtró a través de un filtro de jeringa (Acrodisc Syringe Filter GHP, 25 µm, 0,2 m, Waters, MA, EEUU) y se transfirió a un vial de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). Un HPLC Alliance 2695 (Waters, MA, EEUU) equipado con dos detectores serie, UV-Vis y fluorescencia, se utilizó para la detección y separación simultánea de xantofilas, carotenos y vitaminas A y E. La separación de antioxidantes se llevó a cabo utilizando una columna de fase inversa RP C18 Kinetex 2,6 µm 4,6 x 150 mm (Phenomenex, Torrance, CA, EEUU). La muestra y la columna se mantuvieron refrigeradas a 10 °C y 13 °C, respectivamente. La elución de componentes en la columna se realizó utilizando un flujo de 0,6 ml/min y un gradiente cuaternario de fase móvil. La cuantificación se llevó a cabo utilizando modelos de calibración externos, cuantificando los antioxidantes liposolubles de acuerdo con el factor de recuperación de ambos estándares internos.

4.2.5.2. Leche

Los componentes mayoritarios de la leche (proteína, grasa, lactosa, extracto seco magro y urea) fueron determinados en el Laboratorio Interprofesional Lechero y Agroalimentario de Asturias (LILA, Llanera, Asturias) mediante el uso de equipos de reflectancia de infrarrojo medio (MilkoScan FT 6000, Foss A/S, Hillerød, Dinamarca).

El perfil de ácidos grasos presentes en la leche fue analizado en el Laboratorio Interprofesional Gallego de Análisis de Leche (LIGAL, Abegondo, A Coruña). La grasa

de la leche se extrajo siguiendo los estándares de la norma ISO 14156 / IDF172 (2001) y la norma ISO 15884 / IDF182 (2002) para los ésteres metílicos de los ácidos grasos (después de una metilación básica usando KOH metanólico). Los ésteres metílicos de los ácidos grasos se analizaron por cromatografía de gases (GC) equipada con un detector de ionización de llama (FID) y una columna capilar BPX70 (120 m x 0,25 mm i.d., 0,25 µm de espesor de película). El programa de temperatura del horno de columna para la separación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos se adaptó de la metodología descrita por Kramer et al. (2002), que permitió la resolución e identificación de los isómeros C18:1 *trans*-6, *trans*-9, C18:1 *trans*-10, C18:1 *trans*-11 y C18:1 *trans*-12 y el CLA *cis*-9, *trans*-11 entre una serie de 45 ácidos grasos en total.

La cuantificación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos se basó en el área de pico y el cálculo utilizando tres patrones internos: nonanoato de metilo (C9:0) y *cis*-10-heptadecenoato de metilo (C17:1 *cis*-10) adquiridos en Sigma-Aldrich (Merk KGaA, Darmstadt, Alemania) y metil *trans*-10, *cis*-12-octadecadienoato (CLA *trans*-10, *cis*-12) adquirido en Matreya LLC (StateCollege, PA, EEUU) de acuerdo con el amplio rango de concentración dentro del perfil de ácidos grasos. Además, se utilizó como patrón el nonadecanoato de metilo (C19:0) adquirido en Fluka (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, EEUU).

El análisis de antioxidantes se realizó en el LIGAL. Las muestras de leche una vez descongeladas desde el día anterior, fueron atemperadas en baño de agua a 34 °C, antes de la extracción simultánea de carotenoides y vitaminas (A y E). Los antioxidantes fueron determinados haciendo uso de la metodología propuesta por Gentili et al. (2013). Los extractos finales de ambas matrices para su posterior análisis cromatográfico fueron evaporados para secarlos y ser después reconstituidos en la fase móvil antes de ser inyectados en el sistema de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), equipado con una matriz de fotodiodos y detectores de fluorescencia de exploración. La separación simultánea de carotenoides y vitaminas se realizó en una columna RP dC18 Kinetex (150 mm x 4,6 mm de diámetro interno x 2,6 µm de espesor de película). La fase móvil consistió en un gradiente cuaternario de acetonitrilo (A), metanol con acetato de amonio (50 mM) (B), agua (C) y diclorometano (D). Los carotenoides se detectaron a 450 nm utilizando la matriz de fotodiodos, mientras que la detección de vitamina E y vitamina A se realizó por fluorescencia con excitación-emisión a 295-330 nm y 330-480 nm, respectivamente. Se preparó una mezcla de soluciones individuales en fase móvil y se construyeron curvas de calibración estándar externas para cuantificar los carotenoides y las vitaminas de cada matriz. Las concentraciones también fueron

ajustadas por los factores de recuperación de los dos patrones, echinenona y δ -tocoferol.

La determinación de la expresión de microARN en la leche se realizó en el SERIDA. La muestra destinada al análisis de microARN se procesó separando la grasa y las células somáticas, ya que la bibliografía demuestra que los microARN de la leche son diferentes dependiendo de la fracción de ésta que se analice (Li et al., 2016). Para separar estas fracciones se procedió a centrifugar durante 20 min a 4200 x g a una temperatura de 4 °C, formándose así, tres fracciones, de las cuales la capa superior es la grasa, la del medio el suero y la inferior las células somáticas. El suero fue desechado por su similitud en perfiles de microARN a la grasa (Li et al., 2016) y ésta fue conservada en QIAzol (4ml) a -80 °C hasta su análisis. La fase de células somáticas fue lavada y centrifugada dos veces con PBS (phosphate buffered saline) durante 20 min y conservada en QIAzol (1ml) a -80 °C hasta su análisis.

El ARN total fue extraído según el protocolo mirVana miRNA Isolation Kit (Life Technologies, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EEUU). Se extrajo el ARN a partir de 2 ml de grasa y 1 ml de células conservadas en QiAzol, siguiendo las instrucciones del fabricante. El protocolo consiste básicamente en añadir 200 μ l de miRNA Homogenate Additive, mezclar la muestra e incubar en hielo durante 10 minutos. A continuación, se añaden 2 ml de AcidPhenol:Chloroform (5:1), se mezcla y se centrifuga durante 5 minutos a un máximo de velocidad de 10000 x g, a temperatura ambiente, para separar la fase acuosa de la orgánica. El sobrenadante se pasa a otro tubo nuevo sin perturbar la interfase y se le añade un volumen de 2,5 ml (equivalente a 1,25 del volumen inicial de la muestra de grasa) de etanol 100 % a temperatura ambiente, y se hace pasar todo el contenido por las columnas por centrifugación. Después de filtrar toda la mezcla (muestra/etanol), se lava 2 veces la columna con miRNA wash Solution. Finalmente, la columna se transfiere a tubos nuevos, se añade 100 μ l de Nuclease Free Water precalentada a 95 °C para eluir el ARN de la columna, mediante una centrifugación durante 20 a 30 segundos. El ARN recolectado se etiqueta correctamente y se conserva a -80 °C.

Los microARN candidatos como normalizadores y diferenciadores se seleccionaron por dos vías diferentes:

- ✓ Por secuenciación en un estudio previo de investigación (Abou el Qassim, 2017): bta-mir30a, bta-mir107, bta-mir133, bta-mir181, bta-mir197, bta-mir215, bta-mir369, bta-mir574, bta-mir2284, bta-mir2285 y bta-mir7863.

- ✓ Por bibliografía que los vincula con cambios de expresión relacionados a: la dieta, bta-mir10b, bta-mir21_5 y bta-mir29b (Muroya et al., 2016), bta-mir103 (Romao et al., 2012; Tudisco et al., 2019), bta-mir148a y bta-mir451 (Muroya et al., 2015); a su presencia en secuencias idénticas en la leche bovina y humana, bta-mir155 y bta-mir148a (Melnik y Schmitz, 2019).

La expresión de los microARN se estimó por PCR a tiempo real (qPCR), donde es necesario convertir los microARN a ADN complementario para poder llevarla a cabo. Todo esto se realizó siguiendo el protocolo que se muestra a continuación:

Preparación del cDNA

Se usó el protocolo TaqMan Advanced cDNA Synthesis Kit (ThermoFisher Scientific, 2016). Se justifica el uso de esta técnica por ser adaptada a los tipos de muestras que usamos, disponibilidad de equipamiento (GeneAmp PCR System 9700, StepOneReal-Time PCR System) y ser el más usado en la bibliografía consultada (Jin et al., 2015). Este protocolo consiste en 4 etapas que serán descritas a continuación.

ThePoly(A) TailingReaction

“Thepoly(A) tailing reaction” consiste en la modificación del microARN maduro, añadiendo una cola poly(A) en el extremo 3', mediante la poly(A) polimerasa. Se descongelan en hielo las muestras de ARN total extraído previamente y los reactivos de la síntesis de cDNA, se agitan suavemente y se centrifugan brevemente para mezclar y eliminar las burbujas. En un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml se preparan los reactivos para esta primera etapa, se añade 0,5 µl de 10X Poly(A) Buffer, 0,5 µl de ATP, 0,3 µl de Poly(A)Enzyme, y 1,7 µl de RNase-free water, estos volúmenes corresponden a una muestra, luego se extrapolan según el número de muestras a preparar incluyendo un 10 % más. Esta mezcla se agita brevemente para mezclar bien los contenidos. Se añaden 2 µl de la muestra a cada pocillo de una placa de reacción y se agregan 3 µl de la Poly(A) Reaction Mix a cada uno. El volumen total de la mezcla debe ser 5 µl en cada pocillo y se coloca en un termociclador convencional (GeneAmp PCR System 9700, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, EEUU), luego se incuba según el ciclo estándar descrito en la tabla 4.1.

Tabla 4.1. Protocolo programado en el Termociclador GeneAmp PCR System 9700 para la Poly(A) Tailing Reaction

Etapa	Temperatura	Tiempo
Polyadenylation	37 °C	45 minutos
Stop reaction	65 °C	10 minutos
Hold	4 °C	Hold

The Adaptor Ligation Reaction

Después de añadir la cola poly(A) en el extremo 3', se añade en el extremo 5' un adaptador que actúa como sitio de unión del cebador (Primer) para la etapa "miR-Amp Reaction". Se procede a preparar la mezcla de los reactivos como en la etapa anterior, añadiendo 3 µl de 5X DNA Ligas Buffer, 4,5 µl de 50 % PEG 8000, 0,6 µl de 25X Ligation Adaptor, 1,5 µl de RNA Ligas y 0,4 µl de RNase-free water. Estos volúmenes se extrapolan al número total de muestras, incluyendo un 10 % más. Se añaden 10 µl de esta mezcla a cada uno de los pocillos de la etapa anterior. El volumen total de la mezcla debe ser 15 µl, se agita bien y se incuba según el programa estándar descrito en la tabla 4.2. en el termociclador convencional GeneAmp PCR System 9700.

Tabla 4.2. Protocolo programado en el Termociclador GeneAmp PCR System 9700 para la Adaptor ligation.

Etapa	Temperatura	Tiempo
Ligation	16 °C	60 minutos
Hold	4 °C	Hold

The Reverse Transcription (RT) Reaction

El Cebador (Universal RT primer) se une a la cola poly(A) 3', y la transcripción inversa del microARN se activa. Se prepara en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml la mezcla suficiente de los siguientes reactivos para las muestras requeridas, 6 µl de 5X RT Buffer, 1,2 µl de dNTPMix (25 mM each), 1,5 µl de 20X Universal RT Primer, 3 µl de 10X RT EnzymeMix y 3,3 µl de RNase-free water. Se procede a añadir 15 µl de esta mezcla a la anterior, para obtener 30 µl en total en cada uno de los pocillos correspondientes a cada muestra. Se mezcla bien el contenido de cada pocillo y se incuba en un termociclador convencional GeneAmp PCR System 9700 según el programa descrito en la tabla 4.3.

Tabla 4.3. Protocolo programado en el Termociclador GeneAmp PCR System 9700 para la Reverse Transcription Reaction.

Etapa	Temperatura	Tiempo
Reverse transcription	42 °C	15 minutos
Stop reaction	85 °C	5 minutos
Hold	4 °C	Hold

En este momento se puede pasar a la cuarta etapa o guardar esta mezcla a -20 °C hasta por 2 meses.

The miR-Amp Reaction

Se mezclan los siguientes reactivos en un tubo de centrifuga, 25 µl de 2X miR-Amp Master Mix, 2,5 µl de 20X miR-Amp Primer Mix y 17,5 µl de RNase-free water. Se añaden 45 µl de la mezcla a cada uno de los pocillos de una nueva placa de reacción, a la cual, se procederá a agregar 5 µl de la etapa anterior correspondiente a cada muestra. Se mezcla bien el contenido de cada tubo y se incuba en un termociclador convencional (GeneAmp PCR System 9700) según el programa estándar descrito en la tabla 4.4.

Tabla 4.4. Protocolo programado en el Termociclador GeneAmp PCR System 9700 para la mirAmp Reaction.

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Enzyme activation	95 °C	5 minutos	1
Denature	95 °C	3 segundos	14
Extend	60 °C	30 segundos	
Stop reaction	99 °C	10 minutos	1
Hold	4 °C	Hold	1

PCR a tiempo real (qPCR)

Se prepara una dilución 1:10 de la plantilla de cDNA que resulta de la etapa “miR-Amp reaction”. Se prepara la mezcla requerida para las muestras a partir de 10 µl de TaqMan Fast Advanced Master Mix (2X, Life Technologies, 1 µl de TaqMan Advanced Assay (20X) y 4 µl de RNase-free water. Se mezcla bien y luego se añaden 15 µl a cada pocillo de la de la placa de reacción de la PCR, a los que se le agregan 5 µl de las muestras de la plantilla de cDNA diluida. La reacción se lleva a cabo en un

termociclador a tiempo real (StepOnePlus Real-Time PCR Systems) según el programa descrito en la Tabla 4.5.

Tabla 4.5. Protocolo programado en el Termociclador StepOnePlus Real-Time PCR Systems para la qPCR a tiempo real

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Enzyme activation	95 °C	20 segundos	1
Denature	95 °C	1 segundo	40
Anneal/Extent	60 °C	20 segundos	

Se hacen dos réplicas de cada muestra de cada uno de los microARN seleccionados en cada PCR. La expresión de cada muestra para cada microARN resultará de las dos réplicas, normalizada con la media aritmética de la expresión de los microARN normalizadores seleccionados. Estos análisis se harán utilizando el programa Qbase+.

4.2.6. Análisis Estadístico

Los datos de las variables de ingestión de la materia seca, producción, composición química y concentración de ácidos grasos, antioxidantes y expresión de microARN de la leche obtenidos en el ensayo *in vivo* fueron analizados conforme a un análisis de varianza (ANOVA) a través de un diseño cuadrado latino 3x3, utilizando un modelo de regresión lineal generalizado, en el que el modo de aporte de la hierba (pastoreo, corte y acarreo y ensilado de hierba) fue considerado como un efecto fijo y el periodo y el animal como efectos aleatorios, siguiendo el siguiente modelo:

$$Y = \mu + \text{Grupo} + \text{Periodo} + \text{Manejo} + e$$

Se consideran diferencias significativas cuando P tenía un valor inferior a 0,05 ($p < 0,05$). Los análisis estadísticos se realizaron usando el paquete estadístico R (R Core Team, 2017).

4.3. RESULTADOS

4.3.1. Composición Botánica e Índices de Diversidad Florística de las parcelas de pastoreo.

La composición botánica de las parcelas utilizadas para el pastoreo y corte y acarreo durante el ensayo de alimentación se muestra en la Tabla 4.6. Las parcelas presentan una amplia gama de gramíneas: (*Poa trivialis* L., *Lolium perenne* L., *Dactylis glomerata* L., *Holcus lanatus* L., *Festuca arundinacea* Scherb., *Agrostis capillaries* L. y *Trisetum flavescens* P. Beauv.), leguminosas: (*Trifolium repens* L.), especies de la familia Ranunculaceae: *Ranunculus bulbosus* L., *Ranunculus acris* L., especies de la familia Asteraceae: *Taraxacum officinale* Weber, *Carlina* sp. y otras especies: *Bromus hordeaceus* L., *Cerastium fontanum* Baumg., *Geranium molle* L., *Poa pratensis* L., *Galium verum* L., *Phleum pratense* L., *Bellis perennis* L., *Carex* sp., *Potentilla erecta* Raeusch., *Tragopogon pratensis* L., *Veronica chamaedrys* L., *Cerastium glomeratum* Thuill., *Lactuca* sp., *Dianthus monspessulanus* L. y *Sonchus oleraceus* L. No había hierba en flor y la proporción de material vegetal muerto fue de 4,81%. *D. glomerata*, *P. trivialis*, *L. Perenne*, *T. repens* y *T. officinale* fueron las especies que aparecieron con mayor frecuencia, en más del 60 % de las muestras. Sin embargo, un cuarto de la biomasa vegetal estaba constituido por *P. trivialis*. El conjunto de *P. trivialis*, *D. glomerata*, *L. perenne*, *H. lanatus* y *T. repens* agrupaban más del 80% de la biomasa disponible.

Las variables de diversidad indican que son parcelas con muy poca variedad, con sólo una media de 8,5 especies por 0,25 m². El índice de Shannon fue de 1,3 con una equitabilidad de 0,6 como media, lo que quiere decir una escasa biodiversidad y que la contribución de biomasa está mal repartida, existiendo un desequilibrio entre especies.

Tabla 4.6. Características de las praderas destinadas al pastoreo de las vacas en producción durante el ensayo 2017.

	Frecuencia de Aparición (%)	Biomasa (%)
<i>Agrostis capillaris</i>	50,00	1,68
<i>Carex</i> sp.	11,10	0,12
<i>Bromus hordeaceus</i>	11,13	0,76
<i>Dactylis glomerata</i>	88,87	14,26
<i>Holcus lanatus</i>	38,87	14,87
<i>Festuca arundinacea</i>	38,90	2,48
<i>Lolium perenne</i>	72,20	16,38
<i>Phleum pratense</i>	11,10	0,15
<i>Poa pratensis</i>	11,10	0,27
<i>Poa trivialis</i>	66,67	23,15
<i>Trisetum flaccescens</i>	5,57	1,21
<i>Trifolium repens</i>	61,10	11,80
<i>Cerastium fontanum</i>	16,67	0,62
<i>Cerastium glomeratum</i>	11,10	0,07
<i>Bellis perennis</i>	33,33	0,14
<i>Carlina</i> sp.	5,57	1,11
<i>Dianthus monspessulanus</i>	5,57	0,03
<i>Galium verum</i>	5,57	0,18
<i>Geranium molle</i>	11,10	0,37
<i>Potentilla erecta</i>	5,57	0,12
<i>Lactuca</i> sp.	5,57	0,04
<i>Ranunculus acris</i>	22,23	1,34
<i>Ranunculus bulbosus</i>	33,33	2,26
<i>Sonchus oleraceus</i>	5,57	0,02
<i>Taraxacum officinale</i>	77,77	1,56
<i>Tragopogon pratensis</i>	5,57	0,11
<i>Veronica chamaedrys</i>	11,10	0,11
Necromasa	100,00	4,81

4.3.2. Composición Química de los Alimentos

4.3.2.1. Valor Nutritivo y Aporte Energético

En la Tabla 4.7. se muestran los valores medios de la composición nutritiva de los diferentes alimentos utilizados durante el ensayo. De media, el ensilado de hierba

tenía una mayor MS, FAD y FND que la hierba cortada servida en pesebre y la hierba de pastoreo. Por ello, su digestibilidad de la MO y contenido energético fue menor. El promedio de proteína bruta y la energía neta de lactación en la hierba de pastoreo son mayores que en la hierba cortada servida en pesebre y el ensilado de hierba. El pienso suplementario presentó un alto valor proteico y energético pues su función era suplir los déficits previstos de proteína y energía del forraje.

Tabla 4.7. Composición química y energía neta de lactación de los alimentos.

	Pastoreo	Corte y Acarreo	Ensilado de Hierba	Pienso
Materia Seca (%)	21,18	24,04	30,52	87,71
Materia Orgánica (% MS)	87,45	91,15	89,47	91,43
Proteína Bruta (% MS)	15,12	10,82	9,86	20,33
Almidón (% MS)	ND	ND	ND	38,57
Fibra Neutro Detergente (% MS)	57,40	58,97	67,87	19,31
Fibra Ácido Detergente (% MS)	28,43	28,96	39,19	9,35
Digestibilidad de la Materia Orgánica (% MS)	68,59	63,72	57,77	ND
Energía Metabolizable (MJ/kg MS)	9,60	9,29	8,27	12,74
Energía Neta para Lactación (Mcal/kg MS)	1,44	1,39	1,23	1,93

MS: Materia seca; ND: No determinado.

4.3.2.2. Contenido en Ácidos Grasos

En la Tabla 4.8. se muestran los valores medios de los AG de los diferentes alimentos utilizados durante el estudio. Debido a un problema en la conservación de muestras no fue posible determinar el perfil de AG de la hierba usada en corte y acarreo. El forraje, fresco o conservado, tuvo un perfil poliinsaturado de ácidos grasos. En el forraje fresco predominan el ácido alfa-linolénico (ALA), seguido del linoleico (LA) y del palmítico, con valores medios de 49,05, 16,50 y 18,19%, respectivamente. Por otro lado, el ensilado de hierba mantuvo el perfil con una predominancia de los ácidos grasos poliinsaturados de la hierba, pero con una proporción más baja en el contenido de ALA y un incremento en la proporción de LA y palmítico, con valores medios de 26,76, 28,22 y 19,97%, respectivamente. La proporción de AG en el perfil se encuentra estrechamente relacionada con la época de muestreo y/o la madurez del pasto. La grasa del pienso tuvo un alto nivel de insaturación, con una elevada proporción de linoleico (39,15%) y oleico (28,09%). En todos los alimentos, el AG saturado que se encuentra en mayor proporción es el ácido palmítico, superando el 25% en el pienso y con valores cercanos al 20% en los forrajes.

Tabla 4.8. Perfil de ácidos grasos de los alimentos (g/100g de ácidos grasos).

Ácidos Grasos	Pastoreo	Corte y Acarreo	Ensilado de Hierba	Pienso
10:1 <i>cis</i> -9	0,28	ND	0,06	0,02
11:0	0,21	ND	0,84	0,01
12:0	0,70	ND	1,12	0,18
13:0	0,86	ND	0,88	0,01
14:0	0,62	ND	0,80	0,49
15:0	0,14	ND	0,33	0,05
15:1 <i>cis</i> -10	1,33	ND	1,14	0,00
16:0	18,19	ND	19,97	25,33
16:1(n9) <i>cis</i> -7 + 16:1 <i>trans</i> -9	2,31	ND	1,43	0,05
16:1(n7) <i>cis</i> -9	0,27	ND	1,16	0,14
17:0	0,28	ND	0,51	0,10
18:0	1,98	ND	2,61	2,77
18:1 <i>cis</i> -9	3,74	ND	8,98	28,09
18:2n6 <i>cis</i> -12	16,50	ND	28,22	39,15
18:3n6	0,11	ND	0,19	0,05
18:3n3	49,05	ND	26,76	2,37
20:0	0,73	ND	0,87	0,29
20:1 <i>cis</i> -9	0,24	ND	0,32	0,25
20:1 <i>cis</i> -11	0,31	ND	0,50	0,35
21:0	0,17	ND	0,32	0,05
22:0	1,08	ND	1,49	0,13
23:0	0,15	ND	0,35	0,03
24:0	0,65	ND	1,05	0,09
24:1n9	0,11	ND	0,10	0,01
∑ AGS	25,75	ND	31,14	29,52
∑ AGMI	8,58	ND	13,69	28,91
∑ AGPI	65,67	ND	55,17	41,56
Ratio AGPI:AGS	2,55	ND	1,77	1,41
Ratio n6:n3	0,34	ND	1,05	16,54

ND: No determinado; AGS: Ácidos grasos saturados; AGMI: Ácidos grasos monoinsaturados; AGPI: Ácidos grasos poliinsaturados; LA: Linoleico; LNA: Linolénico

4.3.2.3. Contenido en Antioxidantes

Los valores medios en vitamina E y carotenoides (xantofilas y carotenos) de las muestras de hierba, ensilado de hierba y pienso tomadas se muestran en la Tabla 4.9. Al igual que el caso de los AG, no fue posible determinar el perfil de antioxidantes en la hierba de corte y acarreo por problemas en la conservación de muestras. El pasto fresco mostró un contenido marcadamente superior en vitamina A, E y carotenoides al ensilado de hierba, lo que demuestra el efecto de la madurez y el presecado del forraje en el campo sobre la reducción de la concentración de estos compuestos antioxidantes. El pienso mostró valores mucho más pobres en carotenoides, sin embargo, se observó que es una fuente de vitamina E por su contenido en α -tocoferol y γ -tocoferol.

Tabla 4.9. Perfil de antioxidantes de los alimentos (mg/kg MS)

Antioxidantes	Pastoreo	Corte y Acarreo	Ensilado de Hierba	Pienso
Neoxantina	14,97	ND	0,44	0,04
Violaxantina	13,28	ND	0,29	<LOQ
Anteraxantina	1,58	ND	0,95	0,01
Luteina	62,45	ND	23,79	0,43
Zeaxantina	3,21	ND	1,49	0,07
B-Criptoxantina	0,57	ND	0,18	0,04
Σ - <i>trans</i> - β -Carotenos	30,81	ND	7,17	0,09
9- <i>cis</i> - β -Carotenos	6,28	ND	2,13	0,06
13- <i>cis</i> - β -Carotenos	3,44	ND	0,82	0,08
α -tocoferol	9,64	ND	8,45	2,83
γ -tocoferol	1,60	ND	1,03	4,29

ND: No determinado; LOQ: Limite de cuantificación

4.3.3. Variables de Producción

En la tabla 4.10. se muestran los resultados del peso vivo inicial y final y el consumo medio de los alimentos en los tratamientos estudiados. Entre los tratamientos estudiados no se observaron diferencias significativas en la variación de peso, aunque el tratamiento de pastoreo provocó un incremento numérico de peso mayor que los otros tratamientos.

La ingesta de materia seca de forraje fue mayor ($p < 0,001$) en el sistema de pastoreo que en estabulación, tanto con hierba fresca como ensilada. No hubo diferencias en el consumo de materia seca de concentrado entre los tratamientos. De

Efecto del modo de aporte de la hierba en pastoreo, fresca en corte y acarreo o ensilada, sobre la capacidad discriminante de los marcadores del sistema de alimentación

este modo, los tratamientos en estabulación no compensaron su menor ingestión total de MS, con 14,7 kg MS/día frente a 18,1 kg/día en pastoreo ($p < 0,001$).

Tabla 4.10. Peso vivo corporal y consumos de materia seca de las vacas en función de la ración ofertada.

	Pastoreo	Corte y Acarreo	Ensilado de Hierba	eer	D
Peso Vivo Inicial (kg)	651	654	651	72,6	0,985
Peso Vivo Final (kg)	658	658	652	73,42	0,961
Incremento Peso (kg/d)	1,28	0,58	0,23	1,638	0,161
Consumos (kg de MS/día por vaca):					
Forraje	14,34 ^a	11,54 ^b	10,54 ^b	2,398	0,000
Concentrado	3,75	3,66	3,56	0,622	0,670
Total MSI	18,08 ^a	15,20 ^b	14,10 ^b	2,440	0,000

eer: Error estándar residual; D: Dieta; MS: Materia seca; MSI: Materia seca ingerida; ^{a, b, c} Letras distintas indican diferencias significativas: al valor de p indicado.

4.3.4. Producción y Composición de la Leche

La tabla 4.11. muestra la producción de leche y su composición según el sistema de alimentación. La producción fue diferente entre los sistemas de alimentación ($p < 0,001$). La mayor producción de leche se observó en el sistema de alimentación de pastoreo, con valores intermedios en el corte y acarreo y el más bajo en el ensilado de hierba. Además, la leche de pastoreo tenía mayor proporción de proteína, lactosa, sólidos no grasos y urea ($p < 0,001$) que la de las vacas estabuladas. No hubo diferencias en la proporción de grasa entre los sistemas de alimentación.

Tabla 4.11. Producción y composición de la leche de acuerdo al sistema de alimentación.

	Pastoreo	Corte y Acarreo	Ensilado de Hierba	eer	D
Leche (kg/d)	23,4 ^a	18,1 ^b	14,0 ^c	3,57	0,000
Grasa (g/kg)	35,8	33,7	36,1	3,18	0,057
Proteína (g/kg)	32,1 ^a	29,1 ^b	27,8 ^b	2,90	0,000
Lactosa (g/kg)	45,7 ^a	41,0 ^b	41,7 ^b	2,56	0,000
ESM (g/kg)	83,9 ^a	77,8 ^b	76,3 ^b	3,79	0,000
Urea (mg/kg)	281 ^a	200 ^b	215 ^b	40,3	0,000
Células (x1000/mL)	456	419	313	514,5	0,691

eer: Error estándar residual; D: Dieta; ^{a, b, c} Letras distintas indican diferencias significativas: al valor de p indicado.

4.3.4.1. Perfil de Ácidos Grasos de la Leche

El perfil lipídico de la leche de las vacas en función del modo de aporte de la hierba se detalla en la Tabla 4.12. Los ácidos grasos (AG) mayoritarios presentes en la leche fueron el ácido palmítico (C16:0), oleico (C18:1 *cis*-9), esteárico (C18:0) y mirístico (C14:0), constituyendo todos ellos aproximadamente el 69,16; 60,01 y 73,29% para los tratamientos de pasto, corte y acarreo y ensilado de hierba, respectivamente.

En el contenido total de AG de cadena corta (C6:0 - C13:0) y media (C14:0 - C17:0) solo se observaron diferencias significativas ($p < 0,001$) en el ácido caproico (C6:0) y el ácido pentadecanoico (15:0 anteiso) en la leche producida en los diferentes tratamientos.

En los AG de cadena larga (C18:0 o más átomos de C), la leche proveniente de las dietas a base de ensilado de pastoreo y corte y acarreo presentó diferencias significativas respecto a la proveniente de ensilado de hierba. Los tratamientos estudiados no afectan el nivel de saturación de la grasa de la leche, aunque la leche producida en pastoreo tendió a una mayor proporción de AGPI (4,78 g/100g AG) que los tratamientos con corte y acarreo (4,11 g/100g AG) y ensilado de hierba (4,13 g/100g AG) ($p = 0,063$). Las vacas en pastoreo presentaron una mayor proporción de ácido ruménico ($p < 0,01$) y ácido vaccénico ($p < 0,05$), con una ratio C18:1 *trans*-11/C18:1 *trans*-10 de 18,34 vs 13,08 y 10,35 para vacas en pastoreo, corte y acarreo y ensilaje de hierba, respectivamente, $p < 0,05$). La leche producida a base de ensilado de hierba presentó una mayor proporción de ácido linoleico (C18:2 n-6) que en el sistema de pastoreo ($p < 0,05$), mientras que no hubo diferencias entre tratamientos en las proporciones de ácido linolénico.

Efecto del modo de aporte de la hierba en pastoreo, fresca en corte y acarreo o ensilada, sobre la capacidad discriminante de los marcadores del sistema de alimentación

Tabla 4.12. Perfil de ácidos grasos (g/100 g ácidos grasos) según el sistema de alimentación.

	Pastoreo	Corte y Acarreo	Ensilado de Hierba	eer	D
4:0	5,57	5,36	5,31	0,286	0,546
6:0	1,84 ^a	1,89 ^a	1,71 ^b	0,053	0,035
8:0	0,97	0,99	0,85	0,061	0,088
10:0	2,07	2,11	1,71	0,223	0,167
10:1 <i>cis</i> -9	0,06	0,06	0,05	0,005	0,053
11:0	0,03	0,02	0,01	0,009	0,017
12:0	2,14	2,45	1,97	0,271	0,169
13:0	0,09	0,09	0,08	0,009	0,495
14:0	9,82	10,14	8,98	0,699	0,226
14:0 iso	0,22	0,20	0,21	0,010	0,178
14:1 <i>cis</i> -9	1,00	1,13	0,92	0,104	0,145
15:0	1,21	1,24	1,17	0,046	0,249
15:0 iso	0,46	0,47	0,42	0,035	0,214
15:0 anteiso	0,74 ^a	0,71 ^a	0,59 ^b	0,040	0,021
15:1 <i>cis</i> -10	0,01	0,01	0,01	0,003	0,772
16:0	27,86	30,73	29,94	1,031	0,060
16:1n7 <i>cis</i> -9	1,80	2,17	2,20	0,180	0,091
17:0	0,58	0,64	0,65	0,028	0,086
18:0	9,89	9,57	8,85	0,746	0,324
18:1 <i>trans</i> -6 + 18:1 <i>trans</i> -9	0,50 ^a	0,41 ^b	0,39 ^b	0,024	0,012
18:1 <i>trans</i> -10	0,27 ^a	0,21 ^b	0,20 ^b	0,025	0,036
18:1 <i>trans</i> -11	5,08 ^a	2,77 ^b	2,01 ^b	0,745	0,016
18:1 <i>trans</i> -12	0,20 ^a	0,15 ^b	0,14 ^b	0,015	0,018
18:1n9 <i>cis</i> -9	21,59	21,97	25,52	1,521	0,061
18:1n7 <i>cis</i> -11	0,37 ^b	0,44 ^b	0,57 ^a	0,051	0,019
18:1 <i>cis</i> -12	0,06 ^b	0,06 ^{ab}	0,07 ^a	0,004	0,043
18:2 <i>trans</i> -9 + 18:2 <i>trans</i> -12	0,07 ^a	0,07 ^a	0,05 ^b	0,003	0,002
18:2 <i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12	1,16 ^b	1,38 ^a ^b	1,60 ^a	0,124	0,031
18:2 (CLA) <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11	2,29 ^a	1,37 ^b	1,05 ^b	0,218	0,005
Otros isómeros CLA	0,21	0,24	0,24	0,015	0,090

Tabla 4.12. Perfil de ácidos grasos (g/100 g ácidos grasos) según el sistema de alimentación (continuación).

	Pastoreo	Corte y Acarreo	Ensilado de Hierba	eer	D
18:3n3	0,55	0,47	0,43	0,070	0,258
18:3n6	0,03	0,03	0,03	0,003	0,099
20:0	0,21 ^b	0,25 ^a	0,27 ^a	0,012	0,008
20:3n3	0,15 ^b	0,22 ^{ab}	0,27 ^a	0,030	0,023
20:5n3	0,01	0,01	0,01	0,006	0,694
20:2n6	0,01 ^c	0,02 ^b	0,03 ^a	0,001	0,000
20:3n6	0,08	0,10	0,10	0,011	0,150
20:4n6	0,01	0,02	0,02	0,004	0,119
20:1n9 <i>cis</i> -11	0,04	0,03	0,05	0,006	0,087
21:0	0,07	0,08	0,08	0,005	0,141
22:0	0,07	0,08	0,07	0,006	0,507
22:5n3	0,10 ^b	0,11 ^b	0,15 ^a	0,012	0,018
22:6n3	0,01	0,01	0,01	0,009	0,984
22:2n6	0,08	0,09	0,10	0,013	0,287
23:0	0,05	0,06	0,05	0,006	0,142
24:0	0,07	0,08	0,07	0,006	0,149
24:1n9	0,01	0,01	0,02	0,004	0,083
∑ AGS	62,81	65,07	62,49	1,479	0,180
∑ AGR	1,43 ^a	1,39 ^a	1,22 ^b	0,053	0,017
∑ AGMI	30,98	29,43	32,16	1,417	0,172
∑ AGMI <i>cis</i>	24,93	25,89	29,41	1,743	0,071
∑ AGMI <i>trans</i>	6,05 ^a	3,53 ^b	2,75 ^b	0,791	0,015
∑ AGPI	4,78	4,11	4,13	0,271	0,063
Ratio AGPI:AGS	0,08	0,06	0,07	0,007	0,145
Ratio AGI:AGS	0,57	0,52	0,58	0,037	0,179
Ratio t11:t10-C18:1	18,34 ^a	13,08 ^b	10,35 ^b	1,912	0,017
∑ n6	1,45 ^b	1,70 ^{ab}	1,92 ^a	0,142	0,037
∑ n3	0,83	0,79	1,00	0,062	0,138
Ratio n6:n3	1,77	2,17	2,10	0,189	0,113

eer: Error estándar residual; D: Dieta; CLA: Ácido linoleico conjugado; AGS: Ácidos grasos saturados; AGR: Ácidos grasos ramificados; AGMI: Ácidos grasos monoinsaturados; AGPI: Ácidos grasos poliinsaturados; ^{a, b, c} Letras distintas indican diferencias significativas: al valor de *p* indicado.

4.3.4.2. Perfil de Antioxidantes de la Leche

El contenido de antioxidantes solubles en grasa según el tipo de sistema de alimentación se muestra en la Tabla 4.13. No se observó ningún efecto del método de alimentación en las vitaminas A y E en la leche. La leche de las vacas en pastoreo tenía una mayor proporción de luteína que la leche de las vacas que recibieron ensilado de hierba ($p < 0,01$), con valores intermedios para el sistema de alimentación de corte y acarreo. La concentración de zeaxantina tendió ($p = 0,052$) a ser mayor en la leche producida con pastoreo respecto a los otros tratamientos. No hubo diferencias entre tratamientos en otros carotenoides y carotenos.

Tabla 4.13. Composición de antioxidantes liposolubles (mg/kg de leche) según el sistema de alimentación.

	Pastoreo	Corte y Acarreo	Ensilado de Hierba	eer	D
Retinol	855,4	852,2	826,9	202,6	0,982
α -Tocoferol	1189	962	1068	237,5	0,538
γ -Tocoferol	17,84	19,92	23,27	3,503	0,239
Luteína	21,93 ^a	15,51 ^b	9,08 ^c	3,192	0,008
Zeaxantina	1,19	0,42	0,47	0,332	0,052
β -Criptoxantina	3,13	1,64	1,55	1,031	0,191
Σ -trans- β -Carotenos	255	184	179	45,61	0,150
9-cis- β -Caroteno	1,73	2,05	1,60	0,775	0,777
13-cis- β -Caroteno	9,52	7,08	6,82	1,540	0,138

eer: Error estándar residual; D: Dieta; ^{a, b, c} Letras distintas indican diferencias significativas: al valor de p indicado.

4.3.4.3. Perfil de microARN de la Leche

4.3.4.3.1. Validación de los Normalizadores

La expresión de un marcador se expresa en ct, que son los ciclos de la pCR a los que la expresión supera un umbral, de tal manera que a mayor ct menor será la expresión de ese marcador.

Todo esto es asumiendo que todas las muestras parten de la misma situación de partida, es decir la expresión de un marcador es directamente proporcional a la cantidad de cDNA molde de partida, por lo tanto, hay que suponer que todas las muestras tienen la misma concentración de molde de la PCR en cada pocillo. Pero esto no es así, con lo que es necesario normalizar ese dato de expresión. Hay múltiples maneras de normalizar, y en este caso hemos elegido normalizar por la media aritmética

de marcadores estables (Hellemans et al., 2007). Eso quiere decir que tenemos dos tipos de marcadores analizados por PCR, a) estables para buscar normalizadores, b) variables o problema. Primero habría que seleccionar los normalizadores para luego usar su expresión para normalizar el dato de expresión de los variables o problema. La selección de los normalizadores lo hacemos con GeNorm. La normalización y estimación de la expresión de los problemas lo hacemos usando Qbaseplus.

Los microARN que no varían independientemente del sistema de producción se seleccionaron como candidatos normalizadores por su menor coeficiente de variación. El análisis de geNorm (Hellemans et al., 2007), se inició con 7 candidatos de referencia para la normalización de los microARN de la grasa y 6 para las células. El valor de estabilidad M, que es inversamente proporcional a la estabilidad de expresión (Figura 4.1 y 4.2), indicó el orden de estabilidad de expresión de los microARN de forma decreciente.

El número óptimo de candidatos de referencia de los calculados en esta situación experimental para la normalización de los microARN de la grasa es 5 (geNorm $V < 0,15$ al comparar un factor de normalización basado en los 5 o 6 objetivos más estables). Como tal, el factor de normalización óptimo se puede calcular como la media geométrica de la expresión de los candidatos de referencia bta-mir181, bta-mir103, bta-mir21_5, bta-mir30a y bta-mir29b.

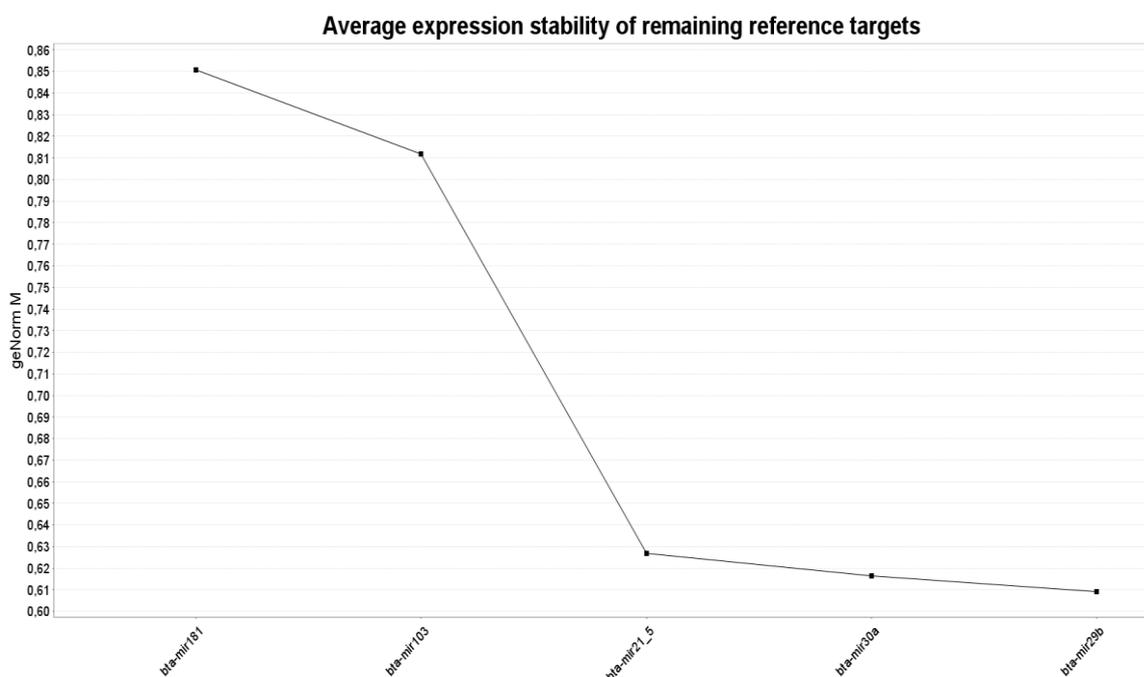


Figura 4.1. Gráfica del promedio de estabilidad de los microARN candidatos a normalizadores en grasa.

En cuanto a los candidatos de referencia de los calculados en esta situación experimental para la normalización de los microARN de las células, no se pudo determinar un número óptimo, ya que la variabilidad entre los factores de normalización secuenciales (basados en los candidatos de referencia menos variables n y $n+1$) es relativamente alta ($geNorm V > 0,15$), por lo cual, se recomienda utilizar los 3 candidatos de referencia (bta-mir29b, bta-mir21_5 y bta-mir148a) con el valor M más bajo, ya que el uso de varios candidatos de referencia (no óptimos en este caso) da como resultado una normalización más precisa en comparación con el uso de un único candidato de referencia no validado.

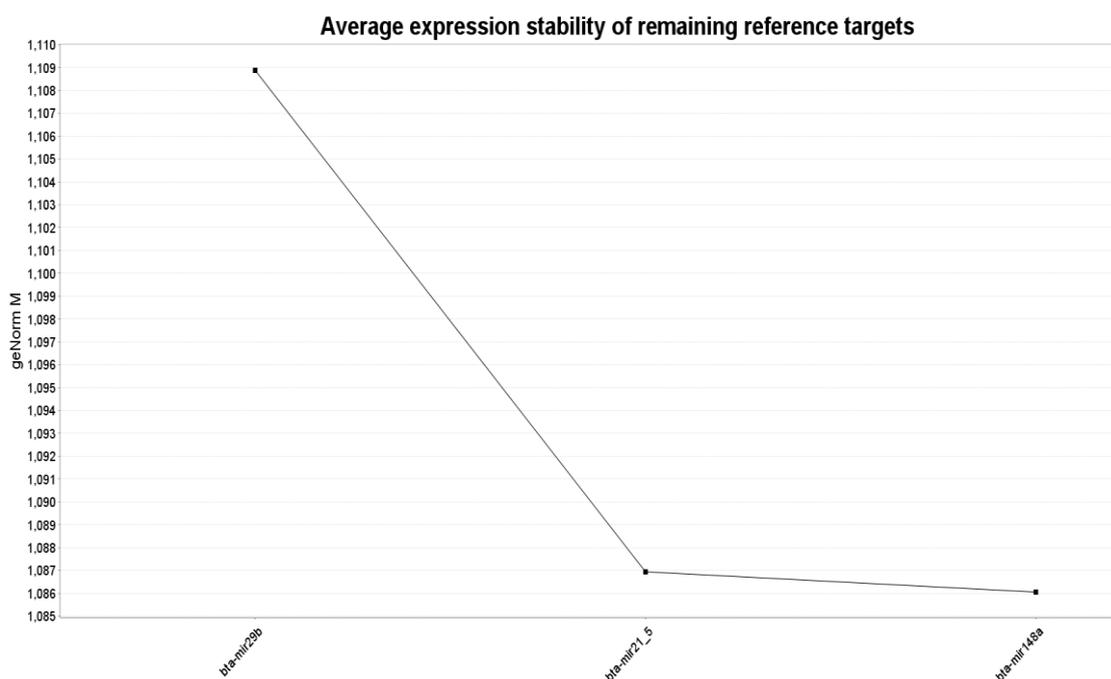


Figura 4.2. Gráfica del promedio de estabilidad de los microARN candidatos a normalizadores en células.

4.3.4.3.2. MicroARN Diferenciadores

La capacidad para diferenciar el modo de aporte de la hierba (pastoreo, corte y acarreo y ensilada) de los microARN de la fracción grasa y de las células de la leche se muestra en las Tablas 4.14 y 4.15, respectivamente. No se observó ningún efecto de diferenciación significativo de la dieta en ninguno de los microARN estudiados en ambas fracciones.

Tabla 4.14. Expresión de microARN en grasa según el sistema de alimentación.

	Pastoreo	Corte y Acarreo	Ensilado de Hierba	eer	D	P
bta-mir10b	1,42	1,29	0,78	1,179	0,531	0,444
bta-mir133	8,44	14,36	7,61	24,070	0,844	0,825
bta-mir148a	0,71	0,65	0,73	0,297	0,867	0,919
bta-mir155	1,75	2,01	1,09	0,892	0,141	0,594
bta-mir215	0,75	0,84	1,04	0,491	0,487	0,352
bta-mir369	0,86	1,07	0,35	0,743	0,175	0,620
bta-mir451	35,28 ^a	2,56 ^b	5,22 ^b	31,860	0,105	0,032
bta-mir7863	1,19	2,81	0,94	2,564	0,280	0,568

eer: Error estándar residual; D: Dieta; P: Pastoreo; ^{a, b, c} Letras distintas indican diferencias significativas: al valor de p indicado.

La leche de las vacas en pastoreo en ambas fracciones de la leche, tenía una mayor proporción de bta-mir451 que la leche de las vacas en estabulación que recibieron forraje verde de corte y acarreo y ensilado de hierba ($p < 0,01$). Asimismo, se observó una tendencia a una mayor expresión del bta-mir574 en la fracción de células de la leche de vacas en pastoreo ($p = 0,072$)

Tabla 4.15. Expresión de microARN en células según el sistema de alimentación.

	Pastoreo	Corte y Acarreo	Ensilado de Hierba	eer	Dieta	Pastoreo
btamir103	1,45	2,02	0,70	1,742	0,338	0,908
bta-mir107	4,38	3,31	2,45	3,205	0,496	0,285
bta-mir155	2,83	2,65	1,19	2,590	0,399	0,432
bta-mir197	1,26	1,43	2,45	2,559	0,609	0,541
bta-mir2284	1,13	1,30	1,08	0,800	0,853	0,866
bta-mir2285	3,07	2,65	3,88	4,593	0,863	0,919
bta-mir3432	1,50	1,57	0,91	1,396	0,591	0,675
bta-mir451	5,85 ^a	0,65 ^b	1,90 ^b	5,147	0,133	0,048
bta-mir574	3,84 ^a	1,86 ^a	1,66 ^a	2,602	0,203	0,072

eer: Error estándar residual; D: Dieta; P: Pastoreo; ^{a, b, c} Letras distintas indican diferencias significativas: al valor de p indicado.

4.4. DISCUSIÓN

El modelo de producción lechero ha cambiado en España en los últimos años hacia una intensificación de la producción con un aumento en los insumos, que no se refleja en un aumento en el precio y la calidad de la leche (Álvarez et al., 2008). Aunque los precios y la disponibilidad de los ingredientes de los alimentos varían según las regiones, en el Arco Atlántico la producción de forrajes utilizados para la alimentación del ganado lechero, es una excelente manera de disminuir los gastos de las dietas (Allen, 2000).

La ingesta de energía es a menudo una limitación primaria para la producción de leche en vacas en pastoreo, porque incluso los pastos de alta calidad pueden tener un bajo contenido de energía neta o haber una limitación de la materia seca ingerida (Bargo et al., 2002). Una buena estrategia de formulación de la dieta debe estar determinada por la disponibilidad de los ingredientes. En este estudio, la hierba se usó como la única fuente de forraje para evitar otros factores de variación. El forraje raramente se ofrece como único alimento para las vacas lecheras lactantes porque la materia seca ingerida (MSI) es generalmente demasiado baja para cumplir con los requerimientos. La capacidad teórica de MSI de vacas lecheras con las características de las usadas en este ensayo es de aproximadamente 21 kg de MS/día (NRC, 2001), con un 70% de forraje en la ración de este tipo de animales (Flores-Calvete et al., 2017). En consecuencia, se ofrecieron diariamente seis kilogramos (base de materia fresca) de concentrado para cumplir con los requisitos de energía para las vacas lecheras de estas características (aproximadamente 210 MJ de energía metabolizable por día; NRC, 2001) y una relación forraje:concentrado de 75:25. Sin embargo, solo las vacas en el tratamiento de pastoreo alcanzaron una ingesta de forraje de hasta 14 kg de MS/día, mientras que los tratamientos en estabulación apenas alcanzaron 11 kg de MS/día. La menor ingesta de materia seca en el tratamiento de ensilado de hierba en relación al tratamiento de pastoreo ha sido señalada previamente (Mohammed et al., 2009). Estos autores comprobaron que la ingesta voluntaria de ensilado es menor que la del forraje del que se produjo. La mayor ingesta de materia seca en el tratamiento de pastoreo en relación con el tratamiento de corte y acarreo podría deberse a que las vacas que pastan tienen una mayor capacidad de seleccionar mejores especies botánicas y las mejores partes de las plantas, rechazando con mayor facilidad el forraje inadecuado, mientras que las vacas en estabulación no tenían esa oportunidad. Por otro lado, en todos los tratamientos, las vacas lecheras consumieron solo la mitad del concentrado ofrecido. El concentrado se ofreció a los animales dos veces al día (7:00 y 19:00 h) coincidiendo con

el momento del ordeño. Este hecho podría haber inducido una acidosis subaguda ruminal que podría provocar una caída en la ingesta de forraje ofrecido posteriormente a pesar de mantener la relación forraje:concentrado. Con estos niveles de ingesta no es posible cumplir con los requerimientos energéticos para las vacas que producen 30 kg de leche/día. El déficit de energía metabolizable se ha cuantificado en 25, 53 y 75 MJ/día para los tratamientos de pastoreo, corte y acarreo y ensilaje de hierba, respectivamente. Por esta razón, se observó la disminución en la producción de leche con respecto a los valores iniciales en el ensayo.

Los modos de aporte de la hierba estudiados en este experimento mostraron una gran variación en la producción y composición de la leche y los perfiles de ácidos grasos y antioxidantes (particularmente en el contenido de luteína), que pueden estar fuertemente relacionados con los compuestos específicos de los alimentos. Las vacas en pastoreo tuvieron una mayor ingesta de energía neta y de materia seca que las vacas estabuladas a las que se les ofrecía corte y acarreo o ensilado de hierba. Esta diferencia en la ingesta tuvo un efecto significativo en la producción y composición de la leche; con una mayor concentración en la leche de las vacas en pastoreo de proteína, lactosa, sólidos no grasos y urea en relación a la leche de las vacas estabuladas. En contraste, otros estudios han mostrado una materia seca ingerida más baja en el pastoreo (Bargo et al., 2003; Lahlou et al., 2014) y una consecuente caída en la producción de leche en vacas en pastoreo en comparación con las vacas estabuladas (Vahmani et al., 2014). Sin embargo, debe tenerse en cuenta que las vacas estabuladas en esos estudios se alimentaban con raciones mixtas totales balanceadas, mientras que en nuestro estudio el pasto o ensilado de hierba era el único ingrediente de la ración. Además, en nuestras condiciones, las vacas en pastoreo, tenían la posibilidad de seleccionar los alimentos, tanto de especies forrajeras como de las partes más deseables de la planta con un valor nutricional posiblemente mejor (Mohammed et al., 2009). Otros autores mostraron que se podría maximizar la ingesta de energía, incluyendo forrajes con una alta digestibilidad de la fibra neutro detergente, que minimizan los efectos de llenado y aumentan el rendimiento en la producción de leche (Oba et al., 2000; Allen, 2000). La concentración de proteína de la leche en vacas en pastoreo no cambió con respecto a la situación inicial, presumiblemente debido a que la ingesta de energía estaba más cerca de los requerimientos, y debido al mayor flujo duodenal de proteína microbiana y aminoácidos totales (Mohammed et al., 2009). Sin embargo, las vacas en pastoreo tienen una mayor concentración de urea en la leche que los tratamientos en estabulación, aunque en todos los casos en el rango normal (Salcedo-Díaz y Villar-Bonet, 2015). Esto puede explicarse porque la alta concentración de proteína en el pasto podría haber aumentado

la tasa de síntesis de proteína microbiana, así como también, la concentración de propionato en el rumen, resultando en un aumento de la proteína de la leche (Couvreur et al., 2006). Esto puede explicarse porque los animales que pastan seleccionarían los primeros brotes verdes y las mejores partes de la planta, que pueden tener una gran degradabilidad ruminal de la proteína (Bargo et al., 2002), por lo que se puede acumular un exceso de urea en el rumen que sería absorbido y excretado por leche.

Es bien sabido, que la concentración de lactosa rara vez está influenciada por la alimentación. Sin embargo, los resultados muestran una mayor concentración de lactosa en la leche de vacas en pastoreo. Una posible explicación podría deberse a que la proporción creciente de forraje, hasta un 80%, puede conducir a la proliferación de bacterias celulolíticas del rumen, lo que conducirá a una mayor producción de ácido propiónico y eventualmente aumentaría la concentración del contenido de lactosa en la leche (Lemosquet et al., 2009). El aumento de propionato es esencial para promover la disponibilidad de energía para la producción de leche y aumentar la síntesis de glucosa y lactosa (El-Zaiat et al., 2019). Además, como la hierba fresca contiene una alta concentración de azúcar se favorece la síntesis del ácido láctico en el rumen que, a su vez, da lugar a un alto contenido de lactosa en la leche (Axelsson, 2004). Según el estudio de Argamentería et al. (2006), un aumento en la energía suministrada en la dieta puede asociarse con el aumento en la proporción de lactosa.

Algunos autores han observado que la leche producida por las vacas en pastoreo tiene mayor contenido de grasa que la leche producida bajo un sistema semi-extensivo o intensivo (Capuano et al., 2014; Frétin et al., 2017), aunque, otros estudios han encontrado resultados contrarios (Bargo et al., 2002; Morales-Almaráz et al., 2011). Entre cientos de ácidos grasos presentes en la grasa de la leche bovina, solo un número limitado es importante por sus propiedades nutricionales, sensoriales o tecnológicas (Kalač y Samková, 2010). Las proporciones típicas de varios ácidos grasos trans-insaturados en la grasa de la leche bovina varían entre el 2% y el 8% del total de ácidos grasos, entre los cuales el gran interés se ha centrado en el ácido trans-vaccénico y los ácidos linoleicos conjugados (CLA), especialmente el ácido ruménico, por ser el isómero de CLA que se encuentra en mayor proporción y sus importantes efectos como antiaterogénico y anticancerígeno en el caso del ácido ruménico (Kalač y Samková, 2010; Parodi, 2004).

Se encontraron variaciones entre los tratamientos en el perfil de ácidos grasos de la leche, una mayor proporción de ácido vaccénico y ácido ruménico, así como una mayor ratio C18:1 *trans*-11/C18:1 *trans*-10, que podría explicarse por la proporción de

forraje fresco en la dieta, lo que denota una mayor ingesta de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) de la hierba fresca del pastoreo (Elgersma et al., 2006). Durante el proceso de marchitamiento y ensilado, se produce un aumento en las pérdidas de ácidos grasos insaturados (AGI) y el total de ácidos grasos totales (AG, Kalač y Samková, 2010). Además, la biohidrogenación del C18:2 n-6 podría verse afectada por el alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados en el rumen (Troegeler-Meynadier et al., 2006) y, como consecuencia, podría tener un aumento con un mayor contenido de estos ácidos grasos (Vicente et al., 2017). Estos resultados muestran que el perfil de ácidos grasos varía según el sistema de alimentación, con una mayor proporción de ácidos grasos insaturados en vacas alimentadas con pastos (Morales-Almaráz et al., 2011). Una relación directa en el incremento de la proporción de ácidos grasos insaturados (AGI) y la disminución en la proporción de ácidos grasos saturados (AGS) está asociada con el aumento de la proporción de pastos frescos en la dieta de las vacas (Allothman et al., 2019). La diferenciación entre la leche de las vacas estabuladas alimentadas con pasto fresco (corte y acarreo) y las vacas en pastoreo al aire libre resulta compleja. El perfil de ácidos grasos de la leche es diferente y puede ser más saludable en vacas en pastoreo que cuando las vacas son alimentadas en estabulación (Capuano et al., 2014). Las menores proporciones de CLA y ácido trans-vaccénico (C18:1 *trans*-11), en la leche de corte y acarreo en comparación con el tratamiento de pastoreo podrían explicarse por la menor ingesta de materia seca. Además, se ha descrito que ocurren pérdidas de AGPI en la hierba inmediatamente después del corte (Kalač y Samková, 2010) por los procesos oxidativos del tejido vegetal y, por lo tanto, se afecta la ingesta de ácidos grasos. Lamentablemente, un problema en la conservación de las muestras de hierba del tratamiento de corte y acarreo ha impedido corroborar este hecho. Otros factores, como el patrón de ingesta o las posibilidades de selección de alimento por parte de la vaca, también podrían desempeñar un papel. En nuestro estudio, se han observado mayores isómeros trans de ácidos grasos monoinsaturados (AGMI) y una mayor proporción en la ratio C18:1 *trans*-11/C18:1 *trans*-10 en la leche de vacas en pastoreo en relación con el tratamiento de corte y acarreo. La ratio C18:1 *trans*-11/C18:1 *trans*-10 aumenta cuando la proporción de forraje fresco aumenta en la dieta (Botana et al., 2018). En consecuencia, se puede proponer la ratio C18:1 *trans*-11/C18:1 *trans*-10 para identificar la leche de vacas alimentadas en pastoreo.

La leche y los productos lácteos son una fuente rica de vitaminas y carotenoides, su contenido está determinado por la dieta del animal (Grażyna et al., 2017). Los antioxidantes liposolubles y las vitaminas presentes en la leche de vaca se derivan

especialmente del forraje verde (Butler et al., 2008; Średnicka-Tober et al., 2016). A pesar de la rica concentración de la leche y los productos lácteos en carotenoides y vitamina A, tiene bajos niveles de vitamina E, sin embargo, ésta juega un papel importante de protección de la grasa contra la autooxidación (Sunarić et al., 2012). Los efectos beneficiosos relacionados con la reducción del estrés oxidativo, que se han demostrado como un factor de riesgo para una amplia gama de procesos de enfermedades crónicas, incluidas las enfermedades cardiovasculares, el cáncer, las enfermedades neurodegenerativas, el deterioro inmunológico y el envejecimiento prematuro, están asociados con el consumo de dietas con alto contenido de antioxidantes (Willcox et al., 2004; Butler et al., 2008). La variabilidad en el contenido de carotenoides y vitaminas en la leche, se ha asociado con la presencia de hierba en la ración y a su vez, sus niveles en el contenido de la hierba están muy relacionados con el marchitamiento y la conservación debido a la exposición a la luz (Agabriel et al., 2007). En este estudio, la pérdida de las muestras de hierba en corte y acarreo ha impedido cuantificar estas pérdidas. Diferentes estudios reportaron que el contenido de β -carotenos y vitaminas liposolubles era incluso cuatro veces mayor en la leche de vacas en pastoreo con relación a la leche de vacas alimentadas con raciones completas mezcladas (TMR) o una alta proporción de concentrado (Nozière et al., 2006; Butler et al., 2008). La leche producida a partir de pastos es de color más amarillo como resultado de la mayor concentración de β -caroteno en la leche (Nozière et al., 2006). Sin embargo, nuestros resultados no mostraron grandes diferencias entre los tratamientos, el caroteno más abundante en la leche fue la luteína, posiblemente porque todos estaban basados en especies botánicas muy similares dada la baja biodiversidad de las praderas.

Los microARN desempeñan un papel crucial en la regulación de la inmunidad innata y adaptativa en humanos y animales (Golan-Gerstl et al., 2017). La evidencia sugiere que los microARN no sólo se sintetizan endógenamente, sino que también podrían obtenerse de fuentes dietéticas, y que los componentes alimentarios alteran la expresión de los genes que sintetizan esos microARN endógenos. Las principales matrices de alimentos para estudios de actividad biológica de los microARN dietéticos incluyen alimentos vegetales y leche de vaca (Cui et al., 2017). En este estudio, no se observaron diferencias significativas entre dietas, sin embargo, al analizar los resultados en función del sistema de manejo en las dietas suministradas (pastoreo vs. estabulación), se mostraron diferencias significativas en el bta-mir451, con una mayor proporción en el sistema de producción en pastoreo. Muroya et al. (2015) observaron un aumento en los niveles de expresión del bta-mir451 en el ganado bovino en pastoreo y sugieren su utilidad como marcador de pastoreo explicada posiblemente por la

adaptación fisiológica del ganado de pastoreo asociadas con la endocitosis, la adhesión focal, la guía de axones y una variedad de señalización intracelular.

Luoreng et al. (2018), observaron una mayor expresión del bta-miR451 en las glándulas mamarias infectadas por *Staphylococcus aureus*, pero una baja expresión en las glándulas mamarias infectadas por *Escherichia coli*, lo que sugiere que desempeña diferentes funciones en los mecanismos reguladores de la mastitis causada por estos dos tipos de bacterias. Además, sugieren que la expresión de este microARN puede diferir dependiendo de la duración de la infección en las glándulas mamarias. En cuanto a esto, pudimos observar en nuestro experimento que la leche de pastoreo presentó un mayor conteo de células somáticas que los tratamientos en estabulación, lo que podría guardar cierta relación con una mayor expresión del bta-mir451 en presencia de pastoreo.

Se ha descrito que el miR-451 humano (has-miR-451) regula la expresión del gen ATF2 que es un tipo de factor de transcripción y funciona como carcinogénesis y supresor de tumores, dependiendo de su ubicación y contexto celular (Sun et al., 2017), además de regular la secreción inflamatoria de citoquinas en la artritis reumatoide (Wang et al., 2015) y la expresión del gen MEF2D que participa en la regulación de las respuestas inflamatorias (Zhu et al., 2017). Posteriores análisis de la funcionalidad de la leche producida en base a pasto, serían necesarios para estudiar estos posibles efectos positivos en la salud del consumidor.

4.5. CONCLUSIONES

En conclusión, la modificación de la composición de la leche está asociada al sistema de alimentación. Es posible distinguir de las vacas en un sistema de alimentación en pastoreo por la variabilidad significativa en el perfil de ácidos grasos, así como el contenido de luteína y bta-mir451. Todos se asociaron a la presencia de hierba fresca en la dieta, especialmente cuando la hierba se consume en pastoreo. Del mismo modo, en las condiciones del experimento, las vacas lecheras en pastoreo tuvieron una mayor producción de leche y una mayor concentración de proteínas, lactosa, sólidos no grasos, urea y luteína, así como en ácidos grasos insaturados y bta-mir451. La ratio C18:1 *trans*-11/C18:1 *trans*-10, la luteína y el microARN bta-mir451 se proponen como biomarcadores para identificar los productos lácteos del sistema de manejo del ganado en pastoreo. Son necesarios más estudios para establecer los valores de la ratio, luteína y bta-mir451 a partir de los cuales permita identificar inequívocamente el tiempo de pastoreo a partir del cual se puede considerar leche producida en base a pastos.

CAPITULO 5

Efecto del tipo de ensilado sobre la capacidad discriminante de los marcadores.

5. EFECTO DEL TIPO DE ENSILADO SOBRE LA CAPACIDAD DISCRIMINANTE DE LOS MARCADORES.

5.1. INTRODUCCIÓN

Es necesario cambiar el diseño y la gestión de nuestros sistemas alimentarios, ya que desde el punto de vista del consumidor, la calidad de la leche y los productos lácteos no se limita al cumplimiento de las medidas sanitarias pertinentes para garantizar la seguridad alimentaria y sus propiedades nutricionales, sino también, a factores clave como la producción suficiente de alimentos y la alimentación sostenible que permitan lograr sistemas de producción ganaderos eficientes y resistentes en materia de recursos, con una carga ambiental mínima y una alta calidad del producto, que genere valor añadido en el mercado y se refleje en la salud del consumidor (Elgersma et al., 2015; Makkar et al., 2016). Esta complejidad requiere la consideración de la sostenibilidad como una cuestión social y exige esfuerzos integrados de una amplia gama de partes interesadas para capitalizar la fuerza de los sistemas de producción ganadera y minimizar el impacto negativo potencial del rápido crecimiento de la demanda y la oferta de productos animales. También es imperativo que esos esfuerzos sean realistas, equitativos y conscientes de las dimensiones ecológicas, socioeconómicas y culturales (Lamminen et al., 2019).

La calidad nutricional de la leche y los productos lácteos puede ser modificada por la dieta animal. La alimentación de las vacas de leche con pastos y forrajes representa la forma más natural, sostenible y económica de conseguir mejorar la calidad de la leche desde el punto de vista nutricional y de la rentabilidad de las ganaderías (Elgersma et al., 2006). Los forrajes frescos afectan las concentraciones de grasas y proteínas de la leche y productos lácteos y también contribuyen a su valor nutritivo, a sus propiedades sensoriales y características físicas. Son una fuente natural importante de vitaminas y ácidos grasos en las dietas de rumiantes, y sus concentraciones en especies forrajeras son importantes para determinar su cantidad y su perfil en la leche y sus derivados (Elgersma et al., 2013).

La autosuficiencia de las proteínas utilizadas en la alimentación animal en Europa es baja. La proteína es uno de los componentes más caros de las dietas animales, con un gran impacto en el coste de producción (Blagojević et al., 2016). Los altos precios, la trazabilidad y la preocupación de los consumidores sobre la deforestación para el cultivo de materias primas para animales y el uso de fuentes de alimento modificados genéticamente, como la harina de soja, han puesto un interés en formas más económicas y ecológicas de producir proteínas locales para los mercados

de alimentos de animales (Puhakka et al., 2016). Borreani et al. (2009), afirman que cultivos anuales de leguminosas como el guisante, las habas o los altramuces utilizados para ensilar son una fuente barata de proteína y almidón para el ganado y pueden mejorar la eficiencia de los sistemas de producción en las explotaciones lecheras, al reducir la necesidad de concentrados.

Las leguminosas tienen un haz convergente de efectos ambientales positivos, incluyendo la fijación de nitrógeno en el suelo, lo que garantiza una menor dependencia de fertilizantes minerales que consumen combustibles fósiles; una mayor diversificación en la rotación de cultivos, que conducen a la disminución de enfermedades, plagas y acumulación de especies arvenses y potencialmente a un aumento de la biodiversidad; un menor uso y contaminación del agua y un mayor secuestro de carbono. Todo esto permite a los productores una reducción de costes de producción y la protección al medio ambiente (Jensen et al., 2010; Preissel et al., 2015; Cellier et al., 2016; Watson et al., 2017).

El haba forrajera (*Vicia faba* L.) es un cultivo versátil que tiene la capacidad de crecer en varias zonas climáticas (Singh et al., 2013) y presenta la mayor capacidad promedio de fijación de N₂ de las principales leguminosas de grano, cultivadas en la estación fría. Como consecuencia, a menudo tiene un alto beneficio en cuanto al nitrógeno fijado al suelo para los próximos cultivos, llegando a generar ahorros sustanciales de hasta 200 kg N/ha en la cantidad de fertilizante necesario para maximizar el rendimiento de los cultivos (Jensen et al., 2010). Además, tiene una alta producción anual de forraje, alta concentración de proteínas y alta digestibilidad y, a diferencia de la mayoría de las leguminosas, el haba forrajera tiene baja capacidad tampón y alto contenido de carbohidratos solubles en agua, que le proporcionan una ensilabilidad aceptable (Martínez-Fernández et al., 2010).

Otra leguminosa a destacar es el guisante forrajero (*Pisum sativum* L.). Martínez-Fernández et al. (2016) ponen de manifiesto resultados que muestran que los forrajes prehenificados de esta leguminosa antes de la elaboración de los ensilados tienen un valor nutritivo superior a las habas forrajeras, con mayor contenido en proteína, menor fibra neutro detergente y mayor digestibilidad de la materia orgánica, lo que implica un aporte energético superior. Con una capacidad tampón igual a la de las habas forrajeras, pero menor contenido de azúcares solubles, los guisantes presentan menos cantidad de sustrato para los microorganismos durante la fermentación láctica y, por lo tanto, tienen una menor ensilabilidad que las habas forrajeras, clasificados en este estudio dentro de la categoría de ensilabilidad media-alta. Piñeiro et al. (2004) evaluaron

diversas variedades de guisante forrajero concluyendo que, si su destino es el ensilado, es preferible elegir variedades precoces para alcanzar un mayor contenido en materia seca en el momento de la cosecha.

Boufaïed et al. (2003), observaron que las gramíneas tienen mayores concentraciones de ácido α -linolénico que las leguminosas y éstas, a su vez, tienen concentraciones más altas de ácidos grasos totales, ácido linoleico y ácido palmítico, que pueden ser directamente transferidos de los forrajes frescos a la leche (Morand-Fehr et al., 2007).

Muroya et al. (2016), señalaron que diferentes condiciones de alimentación (alimentación a base de granos en estabulación frente al pastoreo), pueden modificar la expresión de ciertos microARN, lo que sugiere la influencia de la dieta animal en los perfiles de los microARN.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la influencia de la inclusión en la dieta, con y sin pastoreo, de leguminosas con creciente implantación en la cornisa cantábrica, como son el haba y el guisante, sobre la producción y composición de la leche y la capacidad discriminante de los marcadores en leche cruda de animales mantenidos en diferentes sistemas de producción.

5.2. MATERIALES Y MÉTODOS

5.2.1. Lugar Experimental

Se llevó a cabo un ensayo *in vivo* en la Unidad de Leche del Área de Nutrición, Pastos y Forrajes del Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA) de Villaviciosa (Asturias, España), geográficamente localizada a una Latitud 43° 28' 20", Longitud 5° 26' 10" y una altitud de 10 msnm. Con una extensión total de 23 ha, la finca experimental del SERIDA posee 13 ha destinadas para pastos permanentes y 9 ha que son utilizadas en la rotación de cultivos estacionales.

Para determinar el efecto del tipo de ensilado sobre la capacidad discriminante de los marcadores en leche cruda de animales mantenidos en diferentes sistemas de producción, se realizó un ensayo *in vivo* con vacas en el segundo tercio de lactación. El ensayo se llevó a cabo entre el 05 de marzo de 2018 y el 07 de mayo de 2018, con tratamientos experimentales que consistían en la oferta de diferentes raciones completas mezcladas elaboradas con ensilado y suministradas *ad libitum* en estabulación o pastoreo continuo complementado con oferta de dos horas tras cada ordeño de las raciones mezcladas completas de ensilado, obtenidos en los cortes de 2017 y 2018 en las praderas establecidas con pastos permanentes para hierba fresca y pastoreo.

5.2.2. Diseño Experimental

El ensayo se llevó a cabo siguiendo un diseño cross-over, con tres periodos de 19 días cada uno, que se distribuyeron en 13 días de adaptación y seis días de toma de muestras y mediciones.

Se seleccionaron un total de 18 vacas Holstein con un peso vivo medio inicial de 645 ± 79 kg, $2,2 \pm 1,5$ lactaciones, 89 ± 40 días de lactación y una producción media diaria de $30,6 \pm 4,3$ kg de leche. Los animales fueron distribuidos homogéneamente en seis grupos de tres vacas cada uno, según el número de lactaciones, los días, el peso vivo inicial y la producción de leche. Se ordeñaron dos veces al día (07:00 h y 19:00 h) por medio de un sistema automático de ordeño con un distribuidor integrado de pienso suplementario.

Se estudiaron seis tratamientos en los que se contrastaron seis manejos:

- 1) Estabulación permanente y ración completa mezclada de ensilado de raigrás italiano *ad libitum*,

- 2) Estabulación permanente y ración completa mezclada de ensilado de habas *ad libitum*,
- 3) Estabulación permanente y ración completa mezclada de ensilado de guisantes *ad libitum*,
- 4) Pastoreo continuo y oferta de dos horas tras cada ordeño de ración completa mezclada de ensilado de raigrás italiano,
- 5) Pastoreo continuo y oferta de dos horas tras cada ordeño de ración completa mezclada de ensilado de habas y,
- 6) Pastoreo continuo y oferta de dos horas tras cada ordeño de ración completa mezclada de ensilado de guisantes.

Las seis raciones fueron isoenergéticas e isonitrogenadas. Todos los tratamientos fueron complementados con un pienso suplementario distribuido en el ordeño a fin de cubrir las necesidades nutricionales de las vacas. La oferta del mismo, estaba ajustada a un máximo de 3 kg de pienso por vaca al día. Se procedió a pesar los animales del ensayo el primer y último día de la semana de muestreo y a evaluar su condición corporal.

Los animales asignados a los grupos de pastoreo (4, 5 y 6), lo realizaron en una pradera polifita naturalizada de 1 ha de superficie. Los ensilados utilizados en las raciones completas mezclada provenían de los cortes realizados en el año agronómico 2017 y 2018 en las parcelas utilizadas para pastoreo.

5.2.3. Producción de Leche y Control de Ingestión

5.2.3.1 Ingestión de TMR

Los controles de ingestión de alimento fueron realizados diariamente durante el periodo de muestreo de manera individual, haciendo uso de un sistema de monitorización de ingestión voluntaria, a través de 12 balanzas (Mettler Toledo IND 425-CC300) con una capacidad máxima de 300 kg y una exactitud de ± 100 g, instaladas en la zona de alimentación de la estabulación, basándose en un diseño propuesto por Bach et al., (2004). Se colocó un cajón de fibra de vidrio de 150 L de capacidad sobre el plato de cada balanza, en el cual, se servía la oferta diaria de forraje ensilado. Cada comedero tenía situado sobre la parte superior derecha un lector de presencia (CP-15 de Circontrol) con un radio de lectura máximo de 15 cm, utilizado para detectar el paso de un transponder (TAG CT-50 de Vicic, Circontrol) colocado en la oreja derecha de cada

uno de los animales del ensayo, permitiendo determinar así la entrada y salida de las vacas en cada comedero y el tiempo utilizado para comer de cada animal. Al mismo tiempo, cada balanza registraba simultáneamente las variaciones de peso durante el tiempo de permanencia de cada vaca en el puesto de alimentación.

5.2.3.2. Ingestión de Pienso Suplementario

El pienso suplementario se ofertaba en la estación automática de alimentación instalada en el robot de ordeño (VMS v.2006, Delaval, Suecia). Cada vaca portaba un collar con trasponder por lo que las ingestiones individuales quedaban registradas en el sistema automático de alimentación.

5.2.3.3. Ingestión de Hierba

El consumo de forraje fresco de los animales en pastoreo fue estimado haciendo uso del método de rendimiento animal establecido por Macoon et al. (2003), determinándolo a partir de los requerimientos de energía neta (EN_L) y de los aportes de energía del pienso suplementario aportado durante el ordeño, todo esto haciendo uso de las ecuaciones de predicción del NRC (2001), como se describe el apartado 4.2.3.3. de la presente tesis.

5.2.4. Toma de Muestras y Análisis

5.2.4.1. Praderas

Las parcelas de pastoreo se muestrearon el día anterior a que comenzasen a ser pastoreadas por las vacas, siguiendo la metodología desarrollada por Martínez-Fernández et al (2018) y descrita con anterioridad en el apartado 4.2.4.1. Adicionalmente, la hierba en el tratamiento de pastoreo también se muestreó tres días del período experimental por el método de pastoreo simulado (hand-plucking), que consiste en la estimación mediante la selección del bocado, la ingesta de alimentos y la calidad nutritiva de la dieta mediante la simulación observada en las vacas (De Vries, 1995). Ambas muestras se dividieron en dos submuestras. La primera se secó para determinar su materia seca, para estimar su rendimiento (kg MS/ha) y posteriormente fue molida a través de un molino Fritsch Pulverisette a un tamaño de partículas de 0,75 mm para determinar su valor nutritivo. La segunda submuestra fue congelada a -20°C para su posterior análisis de ácidos grasos y antioxidantes.

5.2.4.2. *Ensilado de Raigrás, Ensilado de Habas, Ensilado de Guisantes, Raciones TMR y Pienso Suplementario*

La toma de muestras de los ensilados quedó descrita en la sección 4.2.4.2. Las raciones TMR, elaboradas diariamente, se muestrearon durante los seis días de muestreo antes de ser distribuidas en los comederos. Se tomaron muestras en diferentes puntos, para garantizar su homogeneidad y representatividad y se congelaron desde su obtención hasta el final del periodo experimental, donde, se descongelaron para ser posteriormente mezcladas en una única muestra final por tratamiento. Dicha muestra final, se dividió en dos submuestras: la primera de ellas para obtener un análisis del valor nutritivo y la segunda para determinar el perfil de ácidos grasos y antioxidantes que fueron envasadas al vacío (Tecnotrip EV-15-1CD, Terrasa, España) y se congelaron a -20 °C hasta el análisis posterior.

La toma de muestras de pienso suplementario y leche se realizó como lo descrito en los apartados 4.2.4.2 y 4.2.4.3.

Las determinaciones analíticas de los alimentos y la leche se realizaron de acuerdo a lo especificado en el apartado 4.2.5.

5.2.5. **Análisis Estadístico**

Los datos de las variables de ingestión de la materia seca, producción, composición química y concentración de ácidos grasos, antioxidantes y microARN de la leche obtenidos en el ensayo *in vivo* fueron analizados conforme a un análisis de varianza (ANOVA) a través de un diseño cuadrado latino 3*3, siguiendo un modelo de regresión lineal generalizado, en el que el tipo de ensilado con o sin pastoreo (ensilado de raigrás, ensilado de habas y ensilado de guisantes) fue considerado como un efecto fijo y el periodo y el animal como efectos aleatorios, siguiendo el siguiente modelo:

$$Y = \mu + \text{Grupo} + \text{Periodo} + \text{Manejo} + \text{Ensilado} + (\text{Manejo} * \text{Ensilado}) + e$$

Se consideran diferencias significativas cuando P tenía un valor inferior a 0,05 ($p < 0,05$). Los análisis estadísticos se realizaron usando el paquete estadístico R (R Core Team, 2017).

5.3. RESULTADOS

5.3.1. Composición Botánica e Índices de Diversidad Florística de las Parcelas de Pastoreo

La composición botánica de la parcela utilizada para el pastoreo durante el ensayo de alimentación se muestra en la Tabla 5.1. La parcela presenta una amplia gama de gramíneas: (*Lolium perenne* L., *Poa* sp., *Bromus* sp., *Agrostis* sp., *Dactylis glomerata* L.), leguminosas: (*Trifolium repens* L.) y otras especies: (*Cerastium arvense* L., *Veronica chamaedrys* L., *Taraxacum* sp., *Geranium molle* L., *Bellis* sp., *Malva* sp., *Sonchus* sp., *Ranunculus* sp.). No había hierba en flor y la proporción de material vegetal muerto según el muestreo de pastoreo simulado fue de 2,49 %. *Agrostis* sp., *Lolium perenne*, *Bromus* sp. y *Poa* sp. fueron las especies que aparecieron con mayor frecuencia. Sin embargo, la mitad de la biomasa vegetal estaba constituido por *Agrostis* sp.

Tabla 5.1. Características de las praderas destinadas al pastoreo de las vacas en producción durante el ensayo 2018.

Especies	Muestreo Siega (%)	Muestreo Pastoreo Simulado (%)
Especies Sembradas		
<i>Lolium perenne</i>	2,77	6,52
<i>Trifolium repens</i>	0,45	0,65
Materia muerta	20,28	2,49
Flora Arvense		
<i>Poa</i> sp.	10,80	5,43
<i>Bromus</i> sp.	0,27	6,23
<i>Agrostis</i> sp.	51,93	51,64
<i>Dactylis glomerata</i>	0,00	0,67
<i>Cerastium arvense</i>	0,21	1,79
<i>Veronica</i>	0,00	0,27
<i>Taraxacum</i> sp.	3,67	5,10
<i>Geranium molle</i>	0,59	0,00
<i>Bellis</i> sp.	0,80	1,23
<i>Ranunculus</i> sp.	1,89	4,54
<i>Malva</i> sp.	0,00	1,69
<i>Sonchus</i> sp.	0,00	2,38
Otras gramíneas	0,21	0,00
Otras dicotiledóneas	0,19	0,46
Restos no identificables	5,96	8,91

Comparando ambos tipos de muestreo, se observó que las vacas en pastoreo realizaron una selección de especies. Así, incrementaron la proporción de especies como el *Lolium perenne* L., *Bromus sp.*, *Taraxacum sp.* y *Ranunculus sp.*, mientras que había menos proporción de *Poa sp.* y materia muerta.

5.3.2. Composición Química de los Ensilados y de la Dieta

5.3.2.1. Valor Nutritivo y Aporte Energético

El valor nutritivo y el contenido energético de los ensilados elaborados con los forrajes de invierno (raigrás italiano y habas forrajeras y guisantes), se muestran en la tabla 5.2.

Tabla 5.2. Valor nutritivo, aporte energético y parámetros fermentativos de los ensilados.

	Ensilado Raigrás	Ensilado Habas	Ensilado Guisantes
Valor nutritivo y aporte energético			
Materia Seca (% MS)	19,21	30,67	26,25
Materia Orgánica (% MS)	89,15	86,97	84,38
Proteína Bruta (% MS)	12,22	16,26	20,89
Fibra Neutro Detergente (% MS)	57,22	46,96	42,53
Fibra Ácido Detergente (% MS)	33,56	31,28	34,07
Digestibilidad de la Materia Orgánica (%)	68,04	70,21	75,16
Energía Metabolizable (MJ/kg MS)	9,70	9,77	10,14
Energía Neta para Lactación (Mcal/kg MS)	1,45	1,46	1,52
Parámetros fermentativos			
pH	3,87	4,33	4,81
N amoniacal (% NH ₃ /NT)	7,35	7,95	15,04
Ácido láctico (% MS)	7,41	8,59	8,92
Ácido acético (% MS)	3,98	1,69	2,07
Ácido butírico (% MS)	1,55	<LOQ	<LOQ

MS: Materia seca; NT: Nitrógeno total; LOQ: Limite de cuantificación

En la tabla 5.3 se muestra el valor nutritivo y el contenido energético de las raciones completas mezcladas de los ensilados elaborados con los forrajes de invierno (raigrás italiano y habas forrajeras y guisantes), del forraje verde de la parcela de pastoreo según el muestreo de siega y pastoreo simulado y del pienso.

Como estaba previsto, las tres raciones completas mezcladas fueron isoenergéticas e isonitrogenadas.

Tabla 5.3. Composición química y estimación energía neta de lactación de la ración completa mezclada (TMR), del forraje verde de la parcela de pastoreo y del pienso.

	TMR-R	TMR-H	TMR-G	FV S	FV HP	Pienso
Materia Seca (% MS)	36,06	40,63	38,86	15,62	16,17	87,66
Materia Orgánica (% MS)	90,51	89,86	88,43	87,27	90,52	92,24
Proteína Bruta (% MS)	14,62	14,51	15,63	15,90	18,6	22,55
Almidón (% MS)	17,42	18,76	19,5	ND	ND	37,65
Fibra Neutro Detergente (% MS)	42,40	41,53	37,63	49,96	44,04	20,22
Fibra Ácido Detergente (% MS)	26,81	24,96	23,75	21,84	21,6	8,37
Energía Metabolizable (MJ/kg MS)	10,39	10,43	10,48	9,94	10,74	12,93
Energía Neta para Lactación (Mcal/kg MS)	1,56	1,57	1,57	1,49	1,62	1,96

TMR-R: Ración completa mezclada; TMR-H: Ración completa mezclada habas; TMR-G: Ración completa mezclada guisantes; FV S: Forraje verde siega; FV HP: Forraje verde pastoreo simulado; MS: Materia Seca

5.3.2.2. Contenido en Ácidos Grasos

Los ácidos grasos (AG) mayoritarios presentes en las TMR elaboradas con ensilado de raigrás, habas, guisantes, en el pasto fresco y en el pienso, fueron el ácido palmítico (C16:0), oleico (C18:1 *cis*-9), linoleico (C18:2 *cis*-9, *cis*-12) y linolénico (C18:3 *cis*-9, *cis*-12, *cis*-15), constituyendo el 93,00; 92,08; 91,57; 87,48 y 94,94%, respectivamente (Tabla 5.4). Cerca del 50 % de los AG del forraje verde son en forma de ácido linolénico.

Tabla 5.4. Perfil de ácidos grasos de los alimentos (g/100g de ácidos grasos).

	TMR-R	TMR-H	TMR-G	FV	Pienso
10:1 <i>cis</i> -9	0,03	0,04	0,02	0,28	0,02
11:0	0,11	0,40	1,04	0,21	0,01
12:0	0,31	0,27	0,29	0,70	0,18
13:0	0,25	0,18	0,20	0,86	0,01
14:0	0,48	0,47	0,51	0,62	0,49
15:0	0,09	0,10	0,11	0,14	0,05
15:1 <i>cis</i> -10	0,33	0,23	0,28	1,33	0,00
16:0	16,91	17,79	19,29	18,19	25,33
16:1n9 <i>cis</i> -7 + 16:1 <i>trans</i> -9	0,48	0,47	0,46	2,31	0,05
16:1n7 <i>cis</i> -9	0,48	0,43	0,41	0,27	0,14
17:0	0,18	0,19	0,18	0,28	0,10
18:0	1,95	2,16	2,38	1,98	2,77
18:1 <i>cis</i> -9	22,32	21,80	21,89	3,74	28,09
18:2n6 <i>cis</i> -12	38,05	39,94	40,32	16,50	39,15
18:3n6	0,06	0,13	0,11	0,11	0,05
18:3n3 <i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12, <i>cis</i> -15	15,72	12,55	10,07	49,05	2,37
20:0	0,50	0,57	0,60	0,73	0,29
20:1 <i>cis</i> -9	0,44	0,87	0,08	0,24	0,25
20:1 <i>cis</i> -11	0,22	0,23	0,51	0,31	0,35
21:0	0,10	0,11	0,13	0,17	0,05
22:0	0,48	0,48	0,50	1,08	0,13
23:0	0,09	0,10	0,13	0,15	0,03
24:0	0,38	0,41	0,44	0,65	0,09
24:1n9	0,06	0,09	0,06	0,11	0,01
Σ AGS	21,82	23,23	25,79	25,75	29,52
Σ AGMI	24,36	24,15	23,71	8,58	28,91
Σ AGPI	53,83	52,61	50,50	65,67	41,56
Ratio AGPI:AGS	2,47	2,27	1,96	2,55	1,41
Ratio n6:n3	2,42	3,18	4,00	0,34	16,54

TMR-R: Ración completa mezclada; TMR-H: Ración completa mezclada habas; TMR-G: Ración completa mezclada guisantes; FV: Forraje verde; AGS: Ácidos grasos saturados; AGR: Ácidos grasos ramificados; AGMI: Ácidos grasos monoinsaturados; AGPI: Ácidos grasos poliinsaturados.

5.3.2.3. Contenido en Antioxidantes

En la Tabla 5.5. se muestran los valores medios en vitaminas E y carotenoides (xantofilas y carotenos) de las muestras tomadas durante el ensayo de primavera 2018 de las raciones completas mezcladas, el pasto fresco y el pienso.

Tabla 5.5. Perfil de antioxidantes de los alimentos (mg/kg MS).

	TMR-R	TMR-H	TMR-G	FV	Pienso
Neoxantina	0,99	0,7	0,61	14,97	0,04
Violaxantina	0,39	0,31	0,46	13,28	<LOQ
Anteraxantina	1,05	0,76	0,66	1,58	0,01
Luteína	25,83	16,4	20,49	62,45	0,43
Zeaxantina	2,07	1,51	2,82	3,21	0,07
B-Criptoxanthin	0,1	0,1	0,1	0,57	0,04
Σ - <i>trans</i> - β -Carotenos	5,28	3,15	2,4	30,81	0,09
9- <i>cis</i> - β -Carotenos	1,76	1,1	0,5	6,28	0,06
13- <i>cis</i> - β -Carotenos	0,6	0,44	0,34	3,44	0,08
α -tocoferol	7,22	6,91	7,11	9,64	2,83
γ -tocoferol	3,46	3,34	2,83	1,6	4,29

TMR-R: Ración completa mezclada; TMR-H: Ración completa mezclada habas; TMR-G: Ración completa mezclada guisantes; FV: Forraje verde; LOQ: Limite de cuantificación

5.3.3. Variables de Producción

En la tabla 5.6 se muestran los resultados del peso vivo inicial y final y el consumo medio de los alimentos en los tratamientos en estabulación y pastoreo estudiados. Los tratamientos estudiados no mostraron diferencias significativas en la variación de peso.

Los consumos de materia seca de las raciones TMR fueron similares en las vacas en estabulación y en las de pastoreo, con una media de 19,57 y 9,53 kg de MS al día, respectivamente. El consumo de pienso suplementario fue mayor ($p < 0,05$) en las vacas con los tratamientos en estabulación, aunque se pudo observar un alto consumo en las vacas en pastoreo que incluían la TMR de guisantes respecto a las otras dos TMR en este manejo. El consumo diario de hierba en pastoreo fue más elevado ($p < 0,001$) con el tratamiento de la TMR de habas forrajeras. Estas diferencias en el consumo de hierba provocaron que el consumo de materia seca total mostrase diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,01$), siendo mayor en los animales alimentados con las TMR en pastoreo frente a los animales estabulados.

Tabla 5.6. Peso vivo corporal (Kg), variación de peso (kg/día) y consumos de materia seca (kg/día) de las vacas en función de la ración ofertada.

	Estabulación TMR			Pastoreo + TMR			eer	D	P	D*P
	R	H	G	R	H	G				
Peso Vivo Inicial	653,9	654,6	652,7	648,6	654,3	646,9	73,6	1,000	0,851	0,992
Peso Vivo Final	658,2	657,2	655,2	648,8	664,2	652,3	73,4	0,999	0,930	0,944
Incremento Peso	0,72	0,44	0,43	0,04	1,65	0,91	2,157	0,708	0,573	0,422
Consumos:										
TMR	18,65 ^a	19,94 ^a	20,12 ^a	9,24 ^b	9,48 ^b	9,88 ^b	4,321	0,000	0,000	0,928
Concentrado	2,78 ^a	2,82 ^a	2,80 ^a	2,59 ^c	2,60 ^c	2,68 ^b	0,074	0,000	0,000	0,195
Pastoreo HP	0,00 ^c	0,00 ^c	0,00 ^c	12,17 ^b	16,24 ^a	10,47 ^b	4,205	0,000	0,000	0,118
Total MSI	21,43 ^b	22,76 ^{ab}	22,92 ^{ab}	24,00 ^{ab}	28,32 ^a	23,04 ^{ab}	5,714	0,187	0,084	0,367

TMR-R: Ración completa mezclada; TMR-H: Ración completa mezclada habas; TMR-G: Ración completa mezclada guisantes; P: Pastoreo; eer: Error estándar residual; D: Dieta; HP: Hand-plucking; MSI: Materia seca ingerida; ^{a, b, c} Letras distintas indican diferencias significativas: $p < 0,05$.

5.3.4. Producción y Composición de la Leche

En la tabla 5.7 se presentan los valores de producción y composición de la leche producida por las vacas alimentadas con los diferentes tratamientos durante el ensayo, con la presencia o no del pastoreo. La producción diaria total de leche y el contenido de grasa no se vieron afectados por los diferentes tratamientos, aunque con el pastoreo se observó una tendencia a una mayor producción de leche (30,1 kg/día vs 28,2 kg/día con y sin pastoreo respectivamente, $p < 0,1$). Sin embargo, el contenido de proteínas y urea disminuyó en el manejo con pastoreo ($p < 0,001$). Del mismo modo, con la inclusión del ensilaje de leguminosas, la concentración de proteína disminuyó ($p < 0,01$) y la urea aumentó ($p < 0,001$) en la leche, especialmente en los animales estabulados. El manejo con pastoreo provocó un incremento significativo en las células somáticas de la leche.

Tabla 5.7. Producción y composición de la leche de acuerdo al sistema de alimentación.

	Estabulación TMR			Pastoreo + TMR			eer	D	P	D*P
	R	H	G	R	H	G				
Leche (kg/d)	28,3	28,5	27,9	30,2	30,1	30,1	4,16	0,706	0,096	0,983
Grasa (g/kg)	4,1	4,4	4,3	4,1	4,1	4,2	0,38	0,564	0,177	0,512
Proteína (g/kg)	3,8 ^a	3,6 ^{ab}	3,6 ^{abc}	3,5 ^{bc}	3,5 ^c	3,5 ^{bc}	0,16	0,004	0,001	0,280
Lactosa (g/kg)	4,8	4,7	4,8	4,8	4,8	4,8	0,14	0,784	0,389	0,480
ESM (g/kg)	9,3 ^a	9,2 ^{ab}	9,2 ^{ab}	9,1 ^b	9,1 ^b	9,1 ^b	0,18	0,025	0,003	0,397
Urea (mg/kg)	253 ^{bcd}	272 ^{bc}	325 ^a	234 ^d	238 ^{cd}	278 ^b	33,42	0,000	0,000	0,474
Células (x1000/mL)	39,9	65,9	42,2	138,1	173,3	196,4	194,20	0,357	0,028	0,898

TMR-R: Ración completa mezclada; TMR-H: Ración completa mezclada habas; TMR-G: Ración completa mezclada guisantes; P: Pastoreo; eer: Error estándar residual; D: Dieta; ^{a, b, c} Letras distintas indican diferencias significativas: al valor de *p* indicado

5.3.4.1. Perfil de Ácidos Grasos de la Leche

En la tabla 5.8 se exponen los valores medios del perfil de AG en la leche de vacas alimentadas con diferentes raciones completas mezcladas y en los dos tipos de manejo. Se observaron fuertes cambios relacionados con el consumo de diferentes tipos de ensilado en la dieta y el manejo con y sin pastoreo, con una mayor concentración de ácidos grasos saturados (AGS) en los tratamientos sin pastoreo (69,89 g/100g AG vs 64,98 g/100g AG, $p < 0,001$) y una mayor concentración en los tratamientos con leguminosas de ácidos grasos monoinsaturados (AGMI): 27,03 g/100g AG y 26,19 g/100g AG vs 25,81g/100g AG para Habas, Guisante y Raigrás respectivamente, $p < 0,001$, poliinsaturados (AGPI): 4,20 g/100g AG y 4,11 g/100g AG vs 3,94 g/100g AG para Habas, Guisante y Raigrás respectivamente, $p < 0,001$, y en la suma de CLA (1,42 g/100g AG y 1,34 g/100g AG vs 1,25 g/100g AG para Habas, Guisante y Raigrás respectivamente, $p < 0,001$, así como en la ratio C18:1 *trans*-11/C18:1 *trans*-10, 8,31, 7,66 vs 7,08, para las dietas con guisantes, habas y raigrás respectivamente, $p < 0,001$.

Tabla 5.8. Perfil de ácidos grasos (g/100 g ácidos grasos) de acuerdo al sistema de alimentación.

	Estabulación TMR			Pastoreo + TMR			eer	D	P	D*P
	R	H	G	R	H	G				
4:0	5,08 ^a	5,23 ^a	5,31 ^a	4,57 ^{ab}	4,33 ^b	4,17 ^{ab}	0,381	0,056	0,004	0,678
6:0	2,44 ^{ab}	2,41 ^{ab}	2,48 ^a	2,22 ^{bc}	2,13 ^c	2,22 ^{bc}	0,125	0,028	0,001	0,926
8:0	1,30 ^a	1,23 ^{ab}	1,28 ^{ab}	1,22 ^{ab}	1,18 ^b	1,19 ^b	0,050	0,093	0,011	0,818
10:0	3,16	2,87	2,93	3,03	2,88	2,92	0,184	0,417	0,619	0,766
10:1 <i>cis</i> -9	0,46	0,41	0,46	0,40	0,43	0,41	0,035	0,220	0,067	0,201
11:0	0,10	0,08	0,08	0,09	0,07	0,07	0,016	0,323	0,545	0,989
12:0	3,94	3,41	3,58	3,76	3,58	3,62	0,279	0,328	0,817	0,546
12:0 iso	0,14	0,11	0,12	0,12	0,12	0,11	0,020	0,658	0,529	0,498
12:0 anteiso	0,03 ^b	0,04 ^b	0,04 ^b	0,05 ^a	0,05 ^a	0,05 ^a	0,004	0,000	0,000	0,141
12:1	0,18	0,15	0,16	0,17	0,17	0,16	0,022	0,812	0,865	0,538
13:0	0,16	0,14	0,13	0,14	0,13	0,13	0,023	0,706	0,431	0,929
13:0 iso	0,17 ^{abc}	0,20 ^{ab}	0,21 ^a	0,15 ^c	0,17 ^{bc}	0,16 ^{bc}	0,018	0,038	0,005	0,602
14:0	12,11	11,48	11,55	11,82	12,01	12,08	0,549	0,609	0,347	0,365
14:0 iso	0,27 ^b	0,29 ^b	0,27 ^b	0,33 ^a	0,34 ^a	0,33 ^a	0,019	0,001	0,000	0,788
14:1 <i>cis</i> -9	1,29	1,13	1,23	1,11	1,21	1,16	0,109	0,390	0,275	0,171
14:0 anteiso	0,59 ^b	0,62 ^b	0,59 ^b	0,72 ^a	0,73 ^a	0,70 ^a	0,042	0,003	0,000	0,888
15:0	1,23	1,17	1,16	1,19	1,17	1,16	0,097	0,957	0,785	0,917
15:0 iso	0,39 ^b	0,49 ^a	0,47 ^a	0,38 ^b	0,39 ^b	0,38 ^b	0,033	0,004	0,001	0,087
15:1 <i>cis</i> -10	0,00	0,00	0,01	0,00	0,01	0,00	0,002	0,143	0,124	0,098
16:0	34,05 ^a	31,61 ^a	32,88 ^a	27,44 ^b	27,80 ^b	28,26 ^b	1,422	0,001	0,000	0,263
16:1 <i>cis</i> -7 + 18:1 <i>trans</i>	0,18 ^b	0,18 ^b	0,16 ^b	0,24 ^a	0,23 ^a	0,22 ^a	0,018	0,002	0,000	0,735
16:1 <i>cis</i> -9	2,04	1,87	1,94	1,61	1,69	1,65	0,274	0,367	0,042	0,740
16:0 iso	0,01	0,01	0,01	0,02	0,01	0,02	0,004	0,399	0,175	0,725
16:1 <i>cis</i> -11	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,003	0,920	0,589	0,625
16:0 anteiso	0,37 ^c	0,42 ^{ab}	0,39 ^{bc}	0,43 ^a	0,43 ^a	0,41 ^{ab}	0,021	0,021	0,006	0,144
17:0	0,48	0,51	0,51	0,51	0,51	0,51	0,020	0,469	0,243	0,356
17:1 <i>cis</i> -9	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,17	0,019	0,994	0,605	0,986

Tabla 5.8. Perfil de ácidos grasos (g/100 g ácidos grasos) de acuerdo al sistema de alimentación (continuación).

	Estabulación TMR			Pastoreo + TMR			eer	D	P	D*P
	R	H	G	R	H	G				
18:0	6,71 ^b	8,22 ^a	7,63 ^{ab}	8,89 ^a	8,17 ^a	8,11 ^{ab}	0,778	0,090	0,039	0,077
18:1 <i>trans</i> -4 + 18:1 <i>trans</i> -5	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,002	0,771	0,289	0,669
18:1 <i>trans</i> -6 + 18:1 <i>trans</i> -9	0,40 ^b	0,49 ^a	0,44 ^{ab}	0,45 ^{ab}	0,48 ^a	0,45 ^{ab}	0,041	0,222	0,377	0,421
18:1 <i>trans</i> -10	0,28	0,31	0,27	0,29	0,29	0,27	0,029	0,540	0,962	0,630
18:1 <i>trans</i> -11	0,86 ^d	1,12 ^c	0,93 ^{cd}	3,22 ^b	3,42 ^{ab}	3,54 ^a	0,138	0,000	0,000	0,158
18:1 <i>trans</i> -12	0,25 ^c	0,32 ^a	0,25 ^c	0,27 ^{abc}	0,30 ^{ab}	0,27 ^{bc}	0,027	0,050	0,686	0,472
18:1 <i>trans</i> -13 + 18:1 <i>trans</i> -14	0,32	0,35	0,33	0,33	0,34	0,28	0,038	0,386	0,338	0,502
18:1n9 <i>cis</i> -9	15,80 ^d	17,29 ^{bc}	16,79 ^{cd}	18,28 ^{ab}	18,42 ^a	17,87 ^{ab}	0,590	0,002	0,000	0,114
18:1 <i>cis</i> -10 + 18:1 <i>trans</i> -15	0,22	0,24	0,22	0,23	0,25	0,24	0,029	0,856	0,399	0,885
18:1n7 <i>cis</i> -11	0,56	0,55	0,50	0,58	0,56	0,53	0,052	0,577	0,440	0,951
18:1 <i>cis</i> -12	0,22 ^{ab}	0,26 ^a	0,26 ^a	0,16 ^b	0,18 ^b	0,16 ^b	0,032	0,009	0,001	0,598
18:1 <i>trans</i> -16	0,21 ^c	0,30 ^b	0,24 ^c	0,34 ^{ab}	0,37 ^a	0,31 ^b	0,025	0,000	0,000	0,130
18:2 <i>trans</i> -9, <i>trans</i> -12	0,04 ^b	0,05 ^b	0,04 ^b	0,07 ^a	0,08 ^a	0,08 ^a	0,009	0,001	0,000	0,934
18:2 <i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12	1,65	1,83	1,81	1,49	1,51	1,54	0,176	0,129	0,012	0,729
c9.t11-CLA	0,54 ^c	0,60 ^c	0,52 ^c	1,48 ^b	1,67 ^a	1,67 ^{ab}	0,100	0,000	0,000	0,236
Otros isómeros CLA	0,17 ^c	0,22 ^a	0,19 ^b	0,19 ^b	0,23 ^a	0,19 ^b	0,013	0,001	0,065	0,297
CLA <i>trans</i> , <i>trans</i>	0,03 ^b	0,03 ^b	0,03 ^b	0,08 ^a	0,09 ^a	0,07 ^a	0,011	0,000	0,000	0,311
18:3n3	0,35 ^b	0,37 ^b	0,34 ^b	0,56 ^a	0,56 ^a	0,56 ^a	0,051	0,000	0,000	0,830
18:3n6	0,04	0,04	0,05	0,04	0,04	0,04	0,006	0,476	0,111	0,916
20:0	0,16	0,25	0,21	0,22	0,16	0,15	0,065	0,403	0,360	0,176
20:1 <i>cis</i> -9	0,00 ^c	0,01 ^{bc}	0,00 ^c	0,02 ^{ab}	0,02 ^a	0,02 ^a	0,005	0,001	0,000	0,831
20:1n9 <i>cis</i> -11	0,03 ^b	0,05 ^{ab}	0,03 ^b	0,04 ^{ab}	0,06 ^a	0,04 ^b	0,011	0,031	0,016	0,847
20:3n3	0,26 ^a	0,24 ^a	0,26 ^a	0,19 ^b	0,17 ^b	0,17 ^b	0,015	0,000	0,000	0,636
20:5n3	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,003	0,888	0,649	0,881

Tabla 5.8. Perfil de ácidos grasos (g/100 g ácidos grasos) de acuerdo al sistema de alimentación (continuación).

	Estabulación TMR			Pastoreo + TMR			eer	D	P	D*P
	R	H	G	R	H	G				
20:2n6	0,02	0,03	0,02	0,02	0,02	0,02	0,005	0,398	0,264	0,532
20:3n6	0,15a	0,15a	0,15a	0,10b	0,10b	0,09b	0,018	0,002	0,000	0,717
20:4n6	0,02ab	0,03a	0,02b	0,02b	0,02b	0,02b	0,004	0,044	0,048	0,163
21:0	0,05	0,05	0,05	0,06	0,05	0,05	0,005	0,203	0,405	0,051
22:0	0,03d	0,05b	0,05c	0,06a	0,06a	0,06b	0,003	0,000	0,000	0,000
22:5n3	0,09	0,08	0,10	0,10	0,09	0,09	0,012	0,644	0,842	0,432
22:6n3	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,006	0,813	0,905	0,876
22:2n6	0,05 ^{bc}	0,04 ^c	0,04 ^c	0,07 ^a	0,06 ^{ab}	0,07 ^a	0,009	0,004	0,000	0,607
23:0	0,03 ^c	0,03 ^{abc}	0,03 ^{bc}	0,04 ^{abc}	0,04 ^a	0,04 ^{ab}	0,005	0,041	0,005	0,979
24:0	0,04	0,05	0,05	0,05	0,05	0,04	0,009	0,225	0,530	0,172
24:1n9	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,004	0,777	0,852	0,433
∑ AGS	71,05 ^a	68,80 ^a	69,83 ^{ab}	65,29 ^c	64,35 ^c	65,31 ^c	1,128	0,000	0,000	0,552
∑ AGR	1,97 ^b	2,17	2,09 ^{ab}	2,21 ^a	2,24 ^a	2,16 ^{ab}	0,098	0,073	0,023	0,290
∑ AGMI	23,53 ^b	25,29 ^b	24,48 ^b	28,08 ^a	28,76 ^a	27,90 ^a	0,937	0,000	0,000	0,527
∑ AGMI <i>cis</i>	20,76 ^b	21,92 ^{ab}	21,58 ^{ab}	22,55 ^a	22,93 ^a	22,19 ^a	0,719	0,048	0,007	0,390
∑ AGMI <i>trans</i>	2,37 ^c	2,95 ^b	2,52 ^{bc}	5,06 ^a	5,36 ^a	5,26 ^a	0,260	0,000	0,000	0,521
AGMI <i>cis</i> + <i>trans</i>	0,40 ^{bc}	0,42 ^{abc}	0,38 ^c	0,47 ^a	0,47 ^a	0,46	0,034	0,037	0,002	0,816
∑ AGPI	3,44 ^b	3,74 ^b	3,59 ^b	4,43 ^a	4,65 ^a	4,63 ^a	0,249	0,000	0,000	0,915
∑ CLA	0,74 ^c	0,85 ^c	0,75 ^c	1,76 ^b	1,99 ^a	1,93 ^{ab}	0,107	0,000	0,000	0,415
∑ n6	1,98 ^{ab}	2,17 ^a	2,13 ^{ab}	1,81 ^b	1,81 ^b	1,86 ^{ab}	0,180	0,112	0,010	0,682
∑ n3	0,72 ^{bc}	0,71 ^c	0,71 ^c	0,86 ^a	0,84 ^{ab}	0,84 ^{ab}	0,060	0,023	0,001	0,990
Ratio AGPI:AGS	0,05 ^b	0,05 ^b	0,05 ^b	0,07 ^a	0,07 ^a	0,07 ^a	0,004	0,000	0,000	0,956
Ratio n6:n3	2,74 ^a	3,05 ^a	2,99 ^a	2,13 ^b	2,16 ^b	2,22 ^b	0,186	0,000	0,000	0,450
Ratio AGI:AGS	0,38 ^b	0,42 ^b	0,40 ^b	0,50 ^a	0,52 ^a	0,50 ^a	0,023	0,000	0,000	0,652
Ratio 18:1 <i>trans</i> - 11: C18:1 <i>trans</i> - 10	3,15 ^c	3,66 ^c	3,36 ^c	11,01 ^b	11,65 ^b	13,26 ^a	0,661	0,000	0,000	0,040

TMR-R: Ración completa mezclada; TMR-H: Ración completa mezclada habas; TMR-G: Ración completa mezclada guisantes; P: Pastoreo; eer: Error estándar residual; D: Dieta; CLA: Ácido linoleico conjugado; AGS: Ácidos grasos saturados; AGR: Ácidos grasos ramificados; AGMI: Ácidos grasos monoinsaturados; AGPI: Ácidos grasos poliinsaturados; ^{a, b, c} Letras distintas indican diferencias significativas: al valor de *p* indicado.

5.3.4.2. Perfil de Antioxidantes de la Leche

El contenido de antioxidantes liposolubles según el sistema de alimentación se muestra en la Tabla 5.9. No se observaron diferencias significativas en la vitamina A (retinol) debido al tipo de sistema de alimentación. Sin embargo, se observaron diferencias significativas en la vitamina E (tocoferol) debido al efecto del pastoreo. La leche de las vacas de pastoreo tenía una mayor concentración de luteína y β -criptoxantina que las vacas que solo se alimentaban en estabulación ($p < 0,01$). Aunque no hubo diferencias en la concentración de carotenos entre los tratamientos, se observó una proporción más elevada en vacas en pastoreo.

Tabla 5.9. Composición de antioxidantes liposolubles (mg/kg de leche) según el sistema de alimentación.

	Estabulación TMR			Pastoreo + TMR			eer	D	P	D*P
	R	H	G	R	H	G				
Retinol	852,41	746,82	893,10	771,00	721,03	827,20	233,300	0,698	0,611	0,978
α -Tocoferol	1005,05	1170,53	1180,74	1372,41	1412,15	1644,63	303,000	0,231	0,031	0,820
γ -Tocoferol	89,62 ^{bc}	98,97 ^{ab}	128,67 ^a	59,50 ^d	66,92 ^{cd}	61,44 ^{cd}	16,300	0,003	0,000	0,135
Luteína	7,67 ^b	11,09 ^b	8,53 ^b	25,72 ^a	30,39 ^a	21,48 ^{ab}	7,449	0,014	0,001	0,744
Zeaxantina	0,71	0,76	0,57	1,84	1,67	1,76	0,795	0,227	0,017	0,948
β -Criptoxantina	1,83 ^b	1,51 ^b	1,39 ^b	3,09 ^a	3,55 ^a	3,33 ^a	0,583	0,002	0,083	0,480
Σ - <i>trans</i> - β -Caroteno	148,50	149,66	119,42	217,45	241,99	244,99	69,490	0,194	0,015	0,782
9- <i>cis</i> - β -Caroteno	0,92 ^b	1,08 ^b	0,57 ^b	1,35 ^{ab}	2,03 ^{ab}	2,72 ^a	0,831	0,082	0,013	0,233
13- <i>cis</i> - β -Caroteno	3,30	3,90	2,38	6,22	6,75	7,55	2,635	0,181	0,015	0,696

TMR-R: Ración completa mezclada; TMR-H: Ración completa mezclada habas; TMR-G: Ración completa mezclada guisantes; P: Pastoreo; eer: Error estándar residual; D: Dieta; ^{a, b, c} Letras distintas indican diferencias significativas: al valor de p indicado.

5.3.4.3. Perfil de microARN de la Leche

La validación de los normalizadores utilizados en el análisis de los resultados obtenidos en este experimento, se explica en el apartado 4.3.4.3.1, donde los candidatos más óptimos de referencia para la fracción de la grasa y de las células obtenidos, son usados de igual manera en este estudio.

La capacidad para diferenciar la influencia de la inclusión en la dieta, con o sin pastoreo, de diferentes tipos de ensilados (raigrás, haba forrajera y guisantes) de los microARN de la fracción grasa y de las células de la leche se muestra en las Tablas 5.10 y 5.11, respectivamente. No se observó ningún efecto de diferenciación significativo de la dieta en ninguno de los microARN estudiados en la fracción de la grasa, sin

embargo, el bta-mir451 es capaz de diferenciar entre tratamientos en estabulación o pastoreo (Tabla 5.10).

Tabla 5.10. Composición de microARN en grasa según el sistema de alimentación.

	Estabulación TMR			Pastoreo + TMR			eer	D	P	D*P
	R	H	G	R	H	G				
btamir148a	1,44	1,40	1,22	1,40	1,45	1,29	0,454	0,867	0,887	0,923
btamir155	1,31	1,56	0,89	1,71	1,68	1,73	1,578	0,854	0,299	0,795
btamir215	1,33	1,20	1,57	1,04	1,14	1,86	0,824	0,299	0,935	0,579
btamir369	2,46	4,69	5,31	3,60	1,70	2,68	4,103	0,411	0,207	0,257
btamir451	1,94 ^{ab}	0,94 ^b	1,07 ^{ab}	4,00 ^{ab}	10,45 ^a	7,97 ^{ab}	9,110	0,153	0,016	0,467
btamir7863	1,33	1,41	1,51	1,05	0,92	1,40	0,914	0,715	0,226	0,821

TMR-R: Ración completa mezclada; TMR-H: Ración completa mezclada habas; TMR-G: Ración completa mezclada guisantes; P: Pastoreo; eer: Error estándar residual; D: Dieta; ^{a, b, c} Letras distintas indican diferencias significativas: al valor de p indicado.

Diferencias significativas se observaron entre dietas con una mayor proporción del bta-mir451 en los tratamientos con ensilado de guisante ($p < 0,01$) en ambos tipos de manejo. Además, se observaron diferencias significativas del bta-mir103 ($p < 0,05$) y bta-mir155 ($p < 0,01$) y del bta-mir451 ($p < 0,01$) al comparar la leche de las vacas en pastoreo con la leche de las vacas en estabulación ($p < 0,01$).

Tabla 5.11. Composición de microARN en células según el sistema de alimentación.

	Estabulación TMR			Pastoreo + TMR			eer	D	P	D*P
	R	H	G	R	H	G				
btamir103	1,03	0,99	1,23	1,99	2,16	1,70	1,347	0,304	0,026	0,727
btamir107	0,56	0,85	0,72	1,07	1,30	0,94	0,839	0,510	0,101	0,855
btamir155	0,80	0,80	0,97	1,59	1,67	1,63	0,961	0,132	0,004	0,948
btamir197	3,60	1,79	0,65	6,97	1,30	2,73	7,135	0,479	0,402	0,712
btamir2284	2,65	1,29	0,76	2,05	0,99	1,37	2,474	0,603	0,888	0,745
btamir2285	0,49	2,56	0,73	5,35	1,70	8,32	9,080	0,414	0,116	0,370
btamir3432	25,27	3,31	1,41	2,40	1,36	4,83	28,310	0,443	0,366	0,347
btamir451	1,31	0,51	2,19	4,84	5,06	6,26	3,341	0,002	0,000	0,899
btamir574	2,19	2,15	1,75	1,50	2,78	2,81	2,096	0,717	0,544	0,433

TMR-R: Ración completa mezclada; TMR-H: Ración completa mezclada habas; TMR-G: Ración completa mezclada guisantes; P: Pastoreo; eer: Error estándar residual; D: Dieta; ^{a, b, c} Letras distintas indican diferencias significativas: al valor de p indicado.

5.4. DISCUSIÓN

Existe un creciente interés en el uso de las leguminosas forrajeras en Europa debido a la necesidad de los productores de adaptar la gestión de los modelos de producción animal a las condiciones económicas y políticas cambiantes y a la demanda de una sociedad interesada en productos de mejor calidad con sistemas de producción con un reducido impacto en el medio ambiente (Peeters et al., 2006). La suplementación proteica de las vacas lecheras es esencial y representa un desafío la búsqueda de formas más económicas y ecológicas de alimentos proteicos para la nutrición animal, con miras a la disminución de costes de producción (Puhakka et al., 2016; Ramin et al., 2017). Las leguminosas son vistas como una alternativa de reducir la compra de insumos, principalmente fertilizantes nitrogenados, por su capacidad para aumentar la calidad y el rendimiento de los cultivos posteriores, por sus múltiples beneficios medioambientales, pero también, porque promueven la disminución en el uso de concentrados proteicos para alimentación animal (Peeters et al., 2006; Preissel et al., 2015).

El haba forrajera (*Vicia faba* L.) y los guisantes (*Pisum Sativum* L.), son leguminosas de grano que ofrecen la posibilidad de aumentar la autosuficiencia proteica local en áreas donde las posibilidades de otros cultivos proteicos son limitadas, para el ganado monogástrico y rumiante (Rinne et al., 2020). El alto contenido de humedad de las leguminosas en el momento óptimo para su aprovechamiento hace que estos cultivos no sean adecuados para el ensilado directo y, por lo tanto, requieren un período de presecado, con el fin de disminuir la producción de efluentes y de esta manera reducir las pérdidas de materia seca. Además, el presecado beneficia la fermentación, ya que una materia seca más alta afecta el crecimiento de microorganismos deseables y la tasa de fermentación (Borreani et al., 2009).

Las proteínas de las leguminosas forrajeras, en particular el haba forrajera y los guisantes, están sujetas a una degradación rápida y extensa en el rumen (Blagojević et al., 2016). Cabe destacar que las leguminosas contienen concentraciones apreciables de taninos condensados en forma de proantocianidinas y cuyo papel en la nutrición animal es controvertido. Las concentraciones bajas a moderadas precipitan las proteínas vegetales solubles y las protegen así contra la degradación del rumen, pero si las proteínas están demasiado unidas a los taninos no se digieren en el intestino delgado, es decir una alta concentración de taninos condensados, tiende a disminuir la digestibilidad de la proteína. Sin embargo, los niveles más bajos de taninos condensados, que se encuentran típicamente en algunas leguminosas, se consideran

beneficiosos para los rumiantes al proteger las proteínas de la hidrólisis en el rumen y aumenta la absorción de aminoácidos en el intestino delgado (McDonald et al., 2011; Rinne et al., 2020). También se ha demostrado que disminuyen significativamente tanto las emisiones de metano como las infecciones por nematodos en rumiantes debido a la actividad antihelmíntica (Novobilsky et al., 2013; Jayanegara et al., 2015; Hatew et al., 2016). En algunos trabajos han sido relacionados con la disminución de la ingestión voluntaria. Estudios realizados por Jiménez-Calderón et al. (2020) con raciones elaboradas con un intercultivo de haba-colza, mostraron una reducción significativa en la ingestión voluntaria en comparación con raciones elaboradas con raigrás italiano. Sin embargo, el efecto de los taninos depende de la concentración, y esta a su vez de la especie, variedad y órgano de la planta (Baizán et al., 2018).

Diferentes estudios señalan un mayor potencial de ingestión de materia seca en el ensilado de leguminosas y un incremento en la producción de leche en comparación con el ensilado de hierba (Frame et al., 1998; Steinshamn, 2010). Estas diferencias han sido relacionadas con una tasa de digestión de la fibra más rápida en el rumen y posiblemente una mejora en el equilibrio entre aminoácidos y energía metabolizable en los nutrientes absorbidos (Ramin et al., 2017). Las leguminosas tienen una menor concentración de fibra neutro detergente y una mayor tasa de degradación de la fibra neutro detergente digerible en el rumen y de lignina que las gramíneas, es por esto que, las leguminosas tienen una digestibilidad de la materia orgánica *in vitro* similar al nivel más bajo de la fibra neutro detergente potencialmente digerible de los pastos (Weisbjerg y Søgaard 2008). Estas diferencias en el contenido de la fibra de la pared celular y la estructura química de la fibra son probablemente las razones de la superioridad del ensilado de leguminosas (Steinshamn, 2010). Los estudios de fermentación del rumen han demostrado que las diferencias descritas anteriormente dan como resultado un menor llenado y una mayor tasa de paso del rumen, lo que explica una mayor capacidad de ingesta en las leguminosas que en las gramíneas (Dewhurst et al., 2003, Kuoppala et al., 2009). En este estudio, no se observaron diferencias significativas en la producción y en el consumo de las raciones que incluyeron ensilado de leguminosas en la ración en comparación con la ración que incluyó ensilado de raigrás italiano, mientras que el consumo fue ligeramente mayor en los tratamientos que incluían pastoreo, al igual que una tendencia a una mayor producción de leche (30,1 kg/d vs 28,2 kg/d con y sin pastoreo respectivamente).

Steinshamn (2010) señaló un menor contenido de grasa láctea en dietas a base de ensilado de leguminosas que con dietas a base de pasto, lo que puede deberse a isómeros de ácidos grasos producidos durante la biohidrogenación del rumen. Algunos

ácidos grasos intermediarios en la vía de biohidrogenación inhiben la síntesis de grasa láctea (Bauman y Griinari, 2003, Bauman et al. 2008), y algunos autores han reportado mayores concentraciones de estos productos intermedios en la leche de vacas alimentadas con leguminosas (Vanhatalo et al., 2007). Los ácidos grasos de cadena larga inhiben la síntesis *ex novo* de los ácidos grasos de la leche y, por lo tanto, contribuye a reducir el contenido de grasa de la leche. El contenido en grasa de la leche en nuestro experimento no se vio afectada por los diferentes tratamientos a base de ensilados de leguminosas o raigrás, tanto con o sin pastoreo.

Los contenidos en proteína y urea disminuyeron con el pastoreo. Asimismo, la inclusión de ensilado de leguminosas incrementó la de urea en la leche, especialmente en los animales estabulados. Las altas cantidades de sustancias fácilmente fermentables, como el almidón y los azúcares solubles, pueden disminuir el pH ruminal y aumentar las concentraciones de ácidos grasos volátiles en el rumen, afectando negativamente a la actividad microbiana (Mould et al., 1983). Un mayor contenido de almidón en las raciones a base de ensilados de leguminosas pudo haber aumentado la digestión del almidón en el intestino delgado, incrementando en consecuencia la absorción de glucosa del intestino y una mayor concentración de glucosa en sangre para la síntesis de proteínas (Puhakka et al., 2016). De igual manera, existe una correlación positiva entre la concentración de propiónico y la proteína en la leche (Rook, 1979) debido a que favorece la disponibilidad de aminoácidos.

El contenido de urea en la leche es un reflejo del consumo de proteína dietética y del metabolismo ruminal, así como del funcionamiento del hígado y el riñón (Wittwer et al., 1999; Salcedo-Díaz y Villar-Bonet, 2015) de manera que, niveles elevados de este parámetro pueden ser atribuidos a un exceso de proteína en la dieta o a una ineficiente utilización de la misma (Vicente, 2002). El contenido en urea de la leche procedente de la ración elaborada con ensilado de guisantes fue mayor que la de las otras dietas, estos valores se encontraron por encima del rango considerado como óptimo (210 y 320 mg urea/L) según Salcedo-Díaz y Villar-Bonet (2015). Factores como la relación proteína/energía de la dieta o la relación proteína no degradable/degradable en el rumen pueden afectar al contenido de urea en leche (Baker et al., 1995). En trabajos similares (Jiménez-Calderón, 2017; Baizán, 2019) en los que se utilizaron ensilados de haba forrajera también se obtuvieron como resultado concentraciones de urea más elevadas que las observadas en la leche producida con ensilados de raigrás italiano, por lo que un nivel alto de urea en la leche también puede estar relacionado al uso de ensilados de leguminosas que presentan mayores contenidos en nitrógeno amoniacal.

Las concentraciones de lactosa y el conteo de células, sin diferencias entre tratamientos, se mantuvieron dentro de los valores recomendados.

En los pastos frescos, el C18:3 n-3 representa entre el 50 y el 75% de su contenido total de ácidos grasos (Hawke, 1973); el C18:2 n-6 y el ácido palmítico (C16:0) son los siguientes más abundantes (McDonald et al., 2011). En el raigrás, el C18:3 n-3 representa entre el 55 y el 66% de los ácidos grasos totales (Bauchart et al., 1985). Boufaïed et al., (2003) encontraron que los pastos tienen mayores concentraciones de C18:3 n-3 que las leguminosas y éstas a su vez, tienen mayores concentraciones de ácidos grasos, C18:2 n-6 y C16:0. Sin embargo, observaron una gran variación dentro de las familias *Poaceae* y *Fabaceae*. Estos resultados guardan estrecha relación con los resultados obtenidos en las praderas utilizadas para pastoreo en este estudio, donde el ácido linoléico constituyó el 49 % del total de AG cuantificados y el perfil de AG encontrados se mantuvo similar en los otros ácidos grasos mayoritarios de la hierba, como son los ácidos palmítico y linoleico. En los perfiles de las raciones completas mezcladas volvieron a destacar los ácidos linoleico, oleico, palmítico y linoléico, que alcanzaron de promedio una suma total próxima al 92 % de todos los AG presentes.

La concentración y composición de ácidos grasos de la leche, están estrechamente relacionadas con la dieta suministrada a los animales (Kalač y Samková, 2010; Morales-Almaráz et al., 2011). Las diferencias de las raciones en este experimento se pueden reflejar en los perfiles de ácidos grasos de la leche, donde se pone en evidencia que el forraje verde es la principal fuente de ácidos grasos poliinsaturados de la dieta de los rumiantes (Khan et al., 2012).

En el perfil de ácidos grasos de la leche se observaron fuertes cambios relacionados con el consumo de diferentes tipos de ensilado en la dieta y al manejo con y sin pastoreo. Una mayor concentración de ácidos grasos saturados (AGS) se pudo observar en los tratamientos sin pastoreo, donde el ácido palmítico, que ha sido relacionado con el aumento en el riesgo de enfermedades cardiovasculares (Praagman et al., 2016), presentó una menor concentración en las raciones a base de ensilados, y el ácido oleico, que promueve efectos favorables para la salud humana como antiaterogénico (Alothman et al., 2019), se vio beneficiado con un aumento en su concentración en las mismas raciones. Una mayor concentración en la leche producida en los tratamientos con leguminosas de ácidos grasos monoinsaturados (AGMI) y poliinsaturados (AGPI), concuerda con el incremento en la proporción de estos ácidos en la leche de vacas alimentadas con ensilado de leguminosas (trébol rojo) en comparación con el ensilado de hierba, respuestas que se asociaron con reducciones

concomitantes en concentraciones de C10:0 a C16:0 (Vanhatalo et al., 2007). La biohidrogenación del rumen de los ácidos grasos poliinsaturados puede verse reducida en las dietas de leguminosas debido a la reducción de la lipólisis mediada por la acción de la enzima polifenol oxidasa presente en las plantas, un requisito previo de la hidrogenación microbiana del rumen de los ácidos grasos insaturados (Lee et al. 2003), lo que puede explicar los niveles mejorados de ácidos grasos poliinsaturados, en la leche de vacas alimentadas con ensilado de leguminosas. Por otro lado, el aumento de la tasa de paso del rumen en las leguminosas hace menos extensa la biohidrogenación, aumentando las proporciones de ácidos grasos poliinsaturados (Dewhurst et al., 2003; Larsen et al., 2012). En este estudio, se observó que cuando se sustituye el ensilado de raigrás italiano por ensilado de leguminosas, especialmente con haba forrajera, la grasa de la leche tiene una mayor proporción de ácidos grasos insaturados y que, además, la práctica del pastoreo en la alimentación de las vacas influye directamente en la composición de la leche, mejorando su calidad al aumentar la proporción de la suma de CLA, en particular el ácido ruménico, así como la ratio C18:1 *trans*-11/C18:1 *trans*-10, proporcionando de esta manera un perfil de ácidos grasos más saludable para el consumidor, ya que se le atribuyen efectos beneficiosos potenciales debido a sus actividades anticarcinogénicas, antiaterogénicas, inmunomoduladoras, efectos protectores contra la obesidad y la diabetes (Yang et al., 2015). La hierba verde consumida por los animales es especialmente rica en ácido linolénico, que es ampliamente biohidrogenado en el rumen a ácido vaccénico (C18:1 *trans*-11) y finalmente a ácido esteárico (C18:0). El ácido vaccénico a su vez se desatura en la glándula mamaria para producir el isómero predominante naturalmente del CLA, el ácido ruménico y el ácido esteárico se desatura en ácido oleico (Elgersma, 2015). Existe una fuerte relación entre las concentraciones de ácido ruménico y ácido vaccénico en la leche de vaca, con una concentración de ácido vaccénico de 2 a 2,5 veces la de ácido ruménico (Elgersma et al., 2006). Las concentraciones de CLA en la leche de vacas alimentadas con pastos pueden ser dos (Kelly et al., 1998) a cinco (Dhiman et al., 1999) veces superiores a las de las vacas a las que se les da TMR.

Los ácidos grasos linoleico y linolénico son los precursores de las series omega-6 (araquidónico) y omega-3 (eicosapentaenoico, docosapentaenoico y docosahexaenoico), denominados ácidos grasos esenciales, ya que no son sintetizados por el cuerpo humano y son fundamentales para el desarrollo y el crecimiento, además de desempeñar un papel clave en la prevención y manejo de enfermedades coronarias y ser antiinflamatorios, antitrombóticos y antiaterogénicos, además exhiben propiedades neuroprotectoras, apoyando el envejecimiento saludable (Patterson et al., 2012; Dyall,

2015). Una proporción elevada de la relación n-6/n-3 conlleva un mayor riesgo de diabetes tipo 2, aumento de las enfermedades coronarias y obesidad (Thorsdottir et al., 2004; Simopoulos, 2013; Simopoulos, 2016). La relación n-6/n-3 en la leche de vaca se representa esencialmente por las concentraciones de los dos isómeros más abundantes el ácido linoleico vs. ácido linolénico. Una relación n-6/n-3 más baja es indicativa de una dieta basada en forraje (Elgersma, 2015) y de un perfil lipídico más saludable. En este estudio, la relación más baja correspondió a la leche producida con ensilado de raigrás y una vez más queda demostrado que la presencia del pastoreo guarda relación directa con las concentraciones encontradas en el experimento.

El forraje verde contiene vitaminas liposolubles con propiedades antioxidantes, como el α -tocoferol y β -caroteno (provitamina A, Ballet et al., 2000), y antioxidantes como la luteína (Elgersma et al., 2013), que pueden ser directamente transferidas a la leche (Morand-Fehr et al., 2007). Los antioxidantes desde el punto de vista de los mecanismos de estrés oxidativo, presentan efectos beneficiosos relacionados con una amplia gama de procesos de enfermedades crónicas y agudas, como las enfermedades cardiovasculares, el cáncer, las enfermedades neurodegenerativas y otras enfermedades (Willcox et al., 2004; Grażyna et al., 2017). La leche de las vacas alimentadas con pasto contiene altos niveles de antioxidantes como el α -tocoferol (vitamina E) y β -caroteno (Agabriel et al., 2007; Slots et al., 2009). Havemose et al. (2004) observaron que la leche de vacas alimentadas con ensilado de hierba tenía mayores concentraciones de antioxidantes β -caroteno, luteína, zeaxantina y α -tocoferol que la leche de vacas alimentadas con ensilado de maíz. Lindqvist et al. (2012) y Mogensen et al. (2012) demostraron que el contenido de α -tocoferol de la leche está determinado principalmente por el contenido de α -tocoferol en el forraje. En el contenido de antioxidantes liposolubles en este estudio no se observaron diferencias significativas en la vitamina A debido al tipo de sistema de alimentación. Sin embargo, se observaron diferencias significativas en la vitamina E debido al efecto del pastoreo. La leche de las vacas en pastoreo tenía una mayor concentración de luteína y β -criptoxantina que las vacas alimentadas solo con ensilados. Aunque, no hubo diferencias en la concentración de carotenos entre los tratamientos, se observó una mayor proporción en las vacas en pastoreo. Diferentes estudios han informado que el contenido de β -carotenos y vitaminas liposolubles era incluso cuatro veces mayor en la leche de las vacas en pastoreo que en la leche de vacas alimentadas con una TMR o una alta proporción de concentrado (Nozière et al., 2006; Butler et al., 2008).

Se sabe que los microARN regulan la expresión génica mediante emparejamiento de bases con sus secuencias complementarias de ARN mensajeros

que conducen a la inhibición de la transcripción y afectan a varios procesos fisiológicos (Bartel et al., 2009; Romao et al., 2011). Se les atribuyen múltiples funciones biológicas, dentro de las cuales están relacionados con la apoptosis, la regulación de la inmunidad innata y adaptativa en humanos y animales y con algunas enfermedades como el cáncer, diabetes y trastornos neurodegenerativos (Ameres & Zamore, 2013; Golan-Gerstl et al., 2017; Mobuchon et al., 2017; Reddy et al., 2017). La dieta es conocida por afectar muchos rasgos fenotípicos en rumiantes como la tasa de crecimiento y la calidad y composición de la leche y carne (Romao et al., 2012), los microARN se sintetizan endógenamente, sin embargo, se piensa que podrían obtenerse de fuentes dietéticas, y que los componentes alimentarios alteran la expresión de los genes que sintetizan esos microARN endógenos (Cui et al., 2017). En este estudio, en la fracción grasa de la leche no se observaron diferencias significativas entre dietas, sin embargo, al analizar los resultados en función del sistema de manejo en las dietas suministradas (pastoreo vs. estabulación), se encontraron diferencias significativas en el bta-mir451, con una mayor proporción en el sistema de producción en pastoreo. En cuanto a la fracción de células de la leche, se observaron diferencias significativas entre tratamientos en el bta-mir451 y en función del sistema de manejo en las dietas suministradas (pastoreo vs. estabulación) en el bta-mir103, bta-mir155 y bta-mir451. Romao et al. (2012) encontraron un aumento en la regulación del bta-mir103 en novillos alimentados con dieta alta en grasas, lo que sugiere que un cambio en el contenido de grasa dietética puede alterar su expresión y desempeñar un papel regulador en el tejido adiposo bovino. En contraste, Tudisco et al., (2019) no encontraron influencia en la expresión del miRNA103 en cabras alimentadas en pastoreo. Este microARN se une al ARNm de la cavernolina-1, un factor que regula la sensibilidad a la insulina (Trajkovski et al., 2011). Por su lado el bta-mir155 se encuentra expresado de manera idéntica en los exosomas de la leche humana y bovina y está relacionado con el sistema inmunitario (Oh et al., 2017) y con enfermedades como cáncer de mama, carcinoma hepatocelular asociado a la hepatitis C, linfoma difuso de células B grandes, enfermedad de Parkinson, cáncer de próstata (Melnik y Schmitz, 2019). En estudios realizados por Muroya et al. (2015) y Luoreng et al. (2018), se señala un aumento en la expresión del bta-mir451 en el ganado bovino en pastoreo y en las glándulas mamarias infectadas por *Staphylococcus aureus*, respectivamente. Esto sugiere su utilidad como marcador molecular de pastoreo y en los mecanismos reguladores de la mamitis. En el humano regula la expresión del gen ATF2 relacionado con la supresión de tumores (Sun et al., 2017), además de regular la secreción inflamatoria de citoquinas en la artritis reumatoide (Wang et al., 2015) y las respuestas inflamatorias a través de la expresión del gen MEF2D (Zhu et al., 2017).

5.5. CONCLUSIONES

Las vacas lecheras de pastoreo tienden a tener una mayor ingesta de materia seca y una mayor producción de leche y tienen una menor concentración de proteína, así como un menor contenido de urea que las vacas lecheras en estabulación. Estos resultados demuestran que los perfiles de ácidos grasos, antioxidantes y algunos microARN están relacionados con la alimentación de las vacas. Cuando se sustituye el ensilado de raigrás italiano por ensilado de leguminosas, la grasa de la leche tiene una mayor proporción de ácidos grasos insaturados, especialmente con la inclusión de ensilado de haba en la ración. La práctica del pastoreo en la alimentación de las vacas influye directamente en la composición de la leche, mejorando su calidad al disminuir la proporción de AGS e incrementar el contenido en AGI, AGMI, AGPI y CLA, proporcionando de esta manera un perfil de ácidos grasos más saludable. De igual manera, las concentraciones de antioxidantes se vieron influenciadas por la dieta con una mayor proporción de luteína y β -criptoxantina en la leche de las vacas de pastoreo sin influencia del tipo de ensilado. Los microARN bta-mir103, bta-mir155 y bta-mir451 son capaces de diferenciar la leche producida en base a pastos con independencia de la ración base.

CAPITULO 6

Recapitulación final y futuras líneas de investigación.

6. RECAPITULACIÓN FINAL Y FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

6.1. RECAPITULACIÓN FINAL

Los modelos de producción lecheros están en un constante cambio, una buena gestión de los recursos y la optimización de la producción son claves para la autosostenibilidad de los sistemas de producción ganaderos. Como se ha podido observar a lo largo de la realización de la presente Tesis Doctoral, la utilización de pastos y forrajes en la alimentación del ganado lechero, no solo puede representar una excelente manera de disminuir los costes de alimentación, sino también es una vía importante para modificar la composición de la leche, asociada al sistema de alimentación. Los resultados obtenidos confirman que es posible distinguir la leche de las vacas que están bajo un sistema de producción en pastoreo o a base de pastos y forrajes por la variabilidad significativa en los perfiles de ácidos grasos, antioxidantes y por la expresión de algunos microARN.

Cuando se comparó el modo de aporte de la hierba en pastoreo, fresca en corte y acarreo o ensilada en la alimentación de las vacas lecheras, se pudo observar la estrecha relación que guarda con la modificación de la composición de la leche con mayores proporciones en el contenido de ácidos grasos de interés como el ácido ruménico y ácido vaccénico y con una ratio C18:1 *trans*-11/C18:1 *trans*-10 de 18,34 vs 13,08 y 10,35 para vacas en pastoreo, corte y acarreo y ensilado. Sin embargo, una caída en la producción relacionada con un déficit de energía metabolizable, deja claro que el uso del pasto fresco o ensilado como único ingrediente de la ración no cumple con los requerimientos nutricionales y/o energéticos para las vacas que producen 30 kg de leche/día como las utilizadas en este estudio.

La suplementación proteica de las vacas lecheras es una parte esencial de un modelo de producción animal rentable, el uso de leguminosas como cultivo de invierno en lugar de raigrás italiano aporta mayor cantidad de proteína en la ración y permite alcanzar niveles de producción óptimos, con una disminución en el uso de los concentrados para la alimentación animal y una menor dependencia de fertilizantes nitrogenados, todo esto con un reducido impacto ambiental. El uso de leguminosas forrajeras como alternativa sostenible al raigrás italiano se sustenta por un mayor aprovechamiento de los recursos generados en la explotación, lo que puede representar una opción para el desarrollo sostenible de los sistemas de producción de leche.

Una de las principales ventajas encontradas en la utilización de ensilados de leguminosas (habas o guisantes) como base de la ración en relación con el ensilado de raigrás italiano es que además de no afectar la ingestión voluntaria y mantener los niveles de producción de las vacas lecheras, son capaces de mejorar la calidad y composición de la leche, a través de una mejora en los perfiles de ácidos grasos de la grasa de la leche con una mayor proporción de ácidos grasos monoinsaturados (AGMI): 27,03 g/100g AG y 26,19 g/100g AG vs 25,81g/100g AG para Habas, Guisante y Raigrás respectivamente, $p < 0,001$, poliinsaturados (AGPI): 4,20 g/100g AG y 4,11 g/100g AG vs 3,94 g/100g AG para Habas, Guisante y Raigrás respectivamente, $p < 0,001$, y en la suma de CLA (1,42 g/100g AG y 1,34 g/100g AG vs 1,25 g/100g AG para Habas, Guisante y Raigrás respectivamente, $p < 0,001$, así como en la ratio C18:1 *trans*-11/C18:1 *trans*-10, 8,31, 7,66 vs 7,08, para las dietas con guisantes, habas y raigrás respectivamente, $p < 0,001$. Sin embargo, el empleo del pastoreo en los sistemas de alimentación de las vacas ejerce una influencia mucho más directa y marcada en la composición y calidad de la leche, al disminuir la proporción de AGS e incrementar el contenido en AGI, CLA y las concentraciones de antioxidantes con una mayor proporción de luteína y β -criptoxantina sin influencia del tipo de ensilado y regulando la expresión de microARN como el bta-mir451.

En los ensayos realizados se observó que la presencia del pastoreo en la alimentación de las vacas es una fuente natural de ácidos grasos y vitaminas en la dieta y que sus concentraciones son importantes para determinar su cantidad y su perfil en la leche, mejorando su calidad al disminuir la proporción de AGS e incrementar el contenido en AGI, AGMI, AGPI y CLA, proporcionando de esta manera un perfil de ácidos grasos más saludable, a la vez que se incrementaron las concentraciones de antioxidantes con una mayor proporción de luteína en la leche de las vacas de pastoreo y aumentando la expresión del microARN bta-mir451. Señalado como un marcador prometedor para una posible certificación de la leche en base a pasto al igual que la ratio C18:1 *trans*-11/C18:1 *trans*-10.

6.2. FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

Gracias a los ensayos realizados en la presente tesis podemos decir que la modificación de la composición de la leche está estrechamente asociada al sistema de alimentación, a la presencia de pastos y forrajes y más directamente a la presencia de la práctica de pastoreo, proponiendo así, como posibles biomarcadores para identificar la leche del sistema de manejo del ganado en pastoreo, la ratio C18:1 *trans*-11/C18:1 *trans*-10 y el bta-mir451. Por ello, son necesarios más estudios que permitan establecer el valor de la ratio y la expresión del bta-mir451 a partir de los cuales se pueda identificar inequívocamente el tiempo de pastoreo a partir del cual se puede considerar una leche producida en base a pastos.

CAPITULO 7

Conclusiones.

7. CONCLUSIONES.

A partir del trabajo experimental desarrollado en la presente Tesis Doctoral y de la evaluación de los resultados obtenidos, podemos concluir que:

Es posible distinguir un sistema de alimentación en pastoreo, ya que muestra inequívocamente una mejora en la composición del perfil de ácidos grasos aumentando la proporción del ácido vaccénico y ruménico y de antioxidantes liposolubles como la luteína, relacionados a la presencia de la hierba fresca en la dieta, especialmente consumida en pastoreo y en menor medida, al uso de hierba fresca en corte y acarreo o al uso de ensilado de hierba.

Cuando se sustituye el ensilado de raigrás italiano por ensilado de leguminosas (Haba o guisante), la grasa de la leche tiene una mayor proporción de ácidos grasos insaturados, especialmente con la inclusión de ensilado de haba en la ración. La práctica del pastoreo en la alimentación conjuntamente con una adecuada suplementación energética de la dieta con raciones completas mezcladas a base de ensilados de leguminosas (haba o guisante) y un moderado nivel de concentrado permite mantener un rendimiento óptimo en la producción lechera con una mejora en la calidad de la composición de la leche, al aumentar la proporción de AGI, AGMI, AGPI y CLA y antioxidantes liposolubles como la luteína y β -criptoxantina, proporcionando de esta manera perfiles más saludables para los consumidores.

Mediante el presente trabajo, se ha demostrado que la modificación de la composición de la leche está asociada al sistema de alimentación y que el uso de leguminosas como el haba forrajera y los guisantes son alternativas viables al raigrás italiano, que resultan más sostenibles para el medio ambiente al reducir el uso de insumos por su capacidad fijadora de nitrógeno y como fuente proteica para la alimentación del ganado, al mismo tiempo que son capaces de modificar el perfil de ácidos grasos y antioxidantes liposolubles de la leche, haciendo de ésta un producto más saludable para los consumidores. A su vez, la presencia de la práctica de pastoreo en la alimentación influye directamente en la composición de la leche, mejorando su perfil de ácidos grasos y antioxidantes y aumentando la expresión del bta-mir451.

La presencia del pastoreo en la alimentación del ganado lechero aumenta la expresión del bta-mir451 e incrementa la ratio C18:1 *trans*-11/C18:1 *trans*-10 y la proporción de luteína, por lo cual se proponen como biomarcadores para identificar los productos lácteos del sistema de manejo del ganado en pastoreo.

CAPITULO 8

Bibliografía.

8. BIBLIOGRAFÍA.

- Abou el Qassim, L. (2017). Variaciones de los perfiles de microRNA en la leche cruda de vaca según el sistema de alimentación.
- Acevedo, M. J. D. (2007). Consumo de la leche de llama (*Lama glama*) en los Andes Peruanos. *Ciencia y Desarrollo*, 8, 5-18.
- ADAS (1985). Compound feed evaluation for the ruminants. Technical Bulletin 85/21. Ministry of Agricultural, Fisheries and Food. Reading, UK. pp. 2.
- AFRC (1993). Energy and protein requirements of ruminants. Agricultural and Food Research Council. CAB International, Wallingford, UK.
- Agabriel C., Cornu A., Journal C., Sibra C., Grolier P., Martin B. (2007). Tanker milk variability according to farm feeding practices: vitamins A and E, carotenoids, color, and terpenoids. *Journal of Dairy Science* 90, 4774-4896.
- Agence Nationale de Sécurité Sanitaire Alimentation Environnement Travail (ANSES). (2011) Actualisation des apports nutritionnels conseillés pour les acides gras. Rapport d'Expertise Collective, Edition scientifique, Maisons-Alfort, 323 p.
- Agudelo Gómez, D. A., Bedoya Mejía, O. (2009). Composición nutricional de la leche de ganado vacuno. *Red Revista Lasallista de Investigación*.
- Allen, M. S. (2000). Effects of diet on short-term regulation of feed intake by lactating dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 83(7), 1598-1624.
- Allothman, M., Hogan, S. A., Hennessy, D., Dillon, P., Kilcawley, K. N., O'Donovan, M., Tobin, J., Fenelon, M. A., O'Callaghan, T. F. (2019). The "grass-fed" milk story: understanding the impact of pasture feeding on the composition and quality of bovine milk. *Foods*, 8 (8), 350.
- Alsaweed, M., Hartmann, P. E., Geddes, D. T., Kakulas, F. (2015). MicroRNAs in breastmilk and the lactating breast: potential immunoprotectors and developmental regulators for the infant and the mother. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12(11), 13981-14020.
- Altieri, M. A. H., Liebman, S., Magdoff, M., Norgaard, F., Sikor, R., Thomas, O. (1999). *Agroecología: Bases científicas para una agricultura sustentable*. Nordan-Comunidad, 165 p.
- Álvarez, A., del Corral, J., Solís, D., Pérez, J. A. (2008). Does intensification improve the economic efficiency of dairy farms?. *Journal of Dairy Science*, 91(9), 3693-3698.
- Ambros, V. (2004). The functions of animal microRNAs. *Nature*, 431(7006), 350-355.
- Ameres, S. L., Zamore, P. D. (2013). Diversifying microRNA sequence and function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14(8), 475-488.

- Argamentería, A., Vicente, F., Martínez-Fernández, A., Cueto, M. A., Roza-Delgado, B. (2006). Influence of partial total mixed rations amount on the grass voluntary intake by dairy cows. *Grassland Science in Europe*, 11, 161-163.
- Axelsson, L. (2004). Lactic acid bacteria: classification and physiology. *Food Science and Technology-New York-Marcel Dekker-*, 139, 1-66.
- Bach A., Iglesias C., Busto I. (2004). Technical note: A computerized system for monitoring feeding behaviour and individual feed intake of dairy cattle. *Journal of Dairy Science*. 87: 4207-4209.
- Baizán S., Vicente F., Barhoumi N., Feito I., Rodríguez L., Martínez-Fernández A. (2018). Efecto de la inclusión de ensilado de haba forrajera en la dieta de vacuno lechero sobre la ingestión voluntaria y la producción y composición de la leche. *ITEA*, 114 (4): 353-367.
- Baizán González, S. (2019). Diversificación de cultivos forrajeros para la alimentación de vacuno lechero en la Cornisa Cantábrica.
- Baker L.D, Ferguson J.D., Chalupa W. (1995). Responses in urea and true protein of milk to different protein feeding schemes for dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 78: 2424-2434.
- Bakircioglu, D., Topraksever, N., Yurtsever, S., Kizildere, M., Kurtulus, Y. B. (2018). Investigation of macro, micro and toxic element concentrations of milk and fermented milks products by using an inductively coupled plasma optical emission spectrometer, to improve food safety in Turkey. *Microchemical Journal*, 136, 133-138.
- Baldi, A., Pinotti, L. (2008). Lipophilic microconstituents of milk. In *Bioactive components of milk* (pp. 109-125). Springer, New York, NY.
- Ballet, N., Robert, J. C., Williams, P. E. V. (2000). 19 Vitamins in Forages. *Forage Evaluation in Ruminant Nutrition*, 399-431.
- Barbosa, R. S., Fischer, V., Ribeiro, M. E. R., Zanela, M. B., Stumpf, M. T., Kolling, G. J., Schafhäuser Júnior, J., Barros, L. E., do Egito, A. S. (2012). Electrophoretic characterization of proteins and milk stability of cows submitted to feeding restriction. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 47(4), 621-628.
- Bargo, F., Muller, L. D., Delahoy, J. E., Cassidy, T. W. (2002). Performance of high producing dairy cows with three different feeding systems combining pasture and total mixed rations. *Journal of Dairy Science*, 85(11), 2948-2963.
- Bargo, F., Muller, L. D., Kolver, E. S., Delahoy, J. E. (2003). Invited review: Production and digestion of supplemented dairy cows on pasture. *Journal of Dairy Science*, 86(1), 1-42.
- Bartel, D. P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 136(2), 215-233.

- Bauman, D. E., Griinari, J. M. (2003). Nutritional regulation of milk fat synthesis. *Annual Review of Nutrition*, 23(1), 203-227.
- Bauman, D. E., Perfield, J. W., Harvatine, K. J., Baumgard, L. H. (2008). Regulation of fat synthesis by conjugated linoleic acid: lactation and the ruminant model. *The Journal of Nutrition*, 138(2), 403-409.
- Bauchart, D., Vérité, R., Remond, B. (1984). Long-chain fatty acid digestion in lactating cows fed fresh grass from spring to autumn. *Canadian Journal of Animal Science*, 64(5), 330-331.
- Belury, M. A. (2002). Dietary conjugated linoleic acid in health: physiological effects and mechanisms of action. *Annual Review of Nutrition*, 22(1), 505-531.
- Bendich, A. (1993). Physiological role of antioxidants in the immune system. *Journal of Dairy Science*, 76(9), 2789-2794.
- Benmoussa, A., Provost, P. (2019). Milk microRNAs in health and disease. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18(3), 703-722.
- Benmoussa, A., Lee, C. H. C., Laffont, B., Savard, P., Laugier, J., Boilard, E., Gilbert, C., Fliss, I., Provost, P. (2016). Commercial dairy cow milk microRNAs resist digestion under simulated gastrointestinal tract conditions. *The Journal of Nutrition*, 146(11), 2206-2215.
- Besle, J. M., Viala, D., Martin, B., Pradel, P., Meunier, B., Berdagué, J. L., Fraise, D., Lamaison, J. L., Coulon, J. B. (2010). Ultraviolet-absorbing compounds in milk are related to forage polyphenols. *Journal of Dairy Science*, 93(7), 2846-2856.
- Bilandžić, N., Sedak, M., Đokić, M., Božić, Đ., Solomun-Kolanović, B., Varenina, I. (2015). Differences in macro-and microelement contents in milk and yoghurt. *Archives of Biological Sciences*, 67(4), 1391-1397.
- Billa, P. A., Faulconnier, Y., Ye, T., Chervet, M., Le Provost, F., Pires, J. A. A., Leroux, C. (2019). Deep RNA-Seq reveals miRNome differences in mammary tissue of lactating Holstein and Montbéliarde cows. *BMC Genomics*, 20(1), 621.
- Bionaz, M., Hurley, W., Loor, J. (2012). Milk protein synthesis in the lactating mammary gland: Insights from transcriptomics analyses. *Milk Protein*, 285-324.
- Blagojević, M., Đorđević, N., Bora, D., Marković, J., Vasić, T., Milenković, J., Petrović, M. (2017). Determination of green forage and silage protein degradability of some pea (*Pisum sativum* L.) + oat (*Avena sativa* L.) mixtures grown in Serbia. *Tarım Bilimleri Dergisi*, 23(4), 415-422.
- Blanco, G., Blanco, A. (2017). *Medical Biochemistry*. Academic Press.
- Borreani, G., Chion, A. R., Colombini, S., Odoardi, M., Paoletti, R., Tabacco, E. 2009. Fermentative profiles of field pea (*Pisum sativum*), faba bean (*Vicia faba*) and white lupin (*Lupinus albus*) silages as affected by wilting and inoculation. *Animal Feed Science and Technology*, 151: 316-323.

- Bouamra-Mechemache, Z., Chaaban, J. (2012). Is the Protected Designation of Origin (PDO) policy successful in sustaining rural employment?. In *Local Agri-food Systems in a Global World: Market, Social and Environmental Challenges* (Vol. 243, No. 257, pp. 243-257). Cambridge Scholars Publishing in association with GSE Research.
- Boufaïed, H., Chouinard, P. Y., Tremblay, G. F., Petit, H. V., Michaud, R., Bélanger, G. (2003). Fatty acids in forages. I. Factors affecting concentrations. *Canadian Journal of Animal Science*, 83(3), 501-511.
- Butler G., Nielsen J.H., Slots T., Seal C., Eyre M.D., Sanderson R., Leifert C. (2008) Fatty acid and fat-soluble antioxidant concentrations in milk from high-and low-input conventional and organic systems: seasonal variation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 88, 1431–1441.
- Cai, M., He, H., Jia, X., Chen, S., Wang, J., Shi, Y., Liu, B., Xiao, W., Lai, S. (2018). Genome-wide microRNA profiling of bovine milk-derived exosomes infected with *Staphylococcus aureus*. *Cell Stress and Chaperones*, 23(4), 663-672.
- Calderón, F., Chauveau-Duriot, B., Pradel, P., Martin, B., Graulet, B., Doreau, M., Nozière, P. (2007). Variations in carotenoids, vitamins A and E, and color in cow's plasma and milk following a shift from hay diet to diets containing increasing levels of carotenoids and vitamin E. *Journal of Dairy Science*, 90(12), 5651-5664.
- Calvache, I., Navas, A. (2012). Factores que influyen en la composición nutricional de la leche. *Revista Científica Animal*, 5, 73-85.
- Calvo, M. V., Castro-Gómez, P., García-Serrano, A. M., Rodríguez Alcalá, L. M., Juárez, M., Fontecha, F. J. (2014). Grasa láctea: una fuente natural de compuestos bioactivos.
- Canfora, E. E., Jocken, J. W., Blaak, E. E. (2015). Short-chain fatty acids in control of body weight and insulin sensitivity. *Nature Reviews Endocrinology*, 11(10), 577.
- Cánovas, A., Rincón, G., Bevilacqua, C., Islas-Trejo, A., Brenaut, P., Hovey, R. C., Boutinaud, M., Morgenthaler, C., VanKlompenberg, M. K., Martin, P., Medrano, J. F. (2014). Comparison of five different RNA sources to examine the lactating bovine mammary gland transcriptome using RNA-Sequencing. *Scientific Reports*, 4(1), 1-7.
- Capuano, E., Boerrigter-Eenling, R., Elgersma, A., Van Ruth, S. M. (2014). Effect of fresh grass feeding, pasture grazing and organic/biodynamic farming on bovine milk triglyceride profile and implications for authentication. *European Food Research and Technology*, 238(4), 573-580.
- Cardinault, N., Lyan, B., Doreau, M., Chauveau, B., Rock, E., Grolier, P. (2008). Development of a method to determine carotenoid composition of fresh forages. *Canadian Journal of Plant Science*, 88(6), 1057-1064.

- Carney, M. C., Tarasiuk, A., DiAngelo, S. L., Silveyra, P., Podany, A., Birch, L. L., Paul, I. M., Kelleher, S., Hicks, S. D. (2017). Metabolism-related microRNAs in maternal breast milk are influenced by premature delivery. *Pediatric Research*, 82(2), 226-236.
- Castillo, C., Pereira, V., Abuelo, Á., Hernández, J. (2013). Effect of supplementation with antioxidants on the quality of bovine milk and meat production. *The Scientific World Journal*, 2013.
- Cellier, P., Odoux, J. F., Thiebeau, P., Vertes, F. (2016, March). Ce que les légumineuses fourragères et prairiales apportent à l'environnement. In *Les Journées de l'AFPF* (pp. 247-p).
- Cerón, J. M., Correa, J. H. (2005). *Bioquímica, nutrición y alimentación de la vaca*. Medellín: Universidad de Antioquia.
- Chauveau-Duriot, B., Doreau, M., Nozière, P., Graulet, B. (2010). Simultaneous quantification of carotenoids, retinol, and tocopherols in forages, bovine plasma, and milk: validation of a novel UPLC method. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 397, 777-790.
- Chen, X., Ba, Y., Ma, L., Cai, X., Yin, Y., Wang, K., Guo, J., Zhang, Y., Chen, J., Guo, X., Li, Q., Li, X., Wang, W., Zhang, Y., Wang, J., Jiang, X., Xiang, Y., Xu, C., Zheng, P., Zhang, J., Li, R., Zhang, H., Shang, X., Gong, T., Ning, G., Wang, J., Zen, K., Zhang, J., Zhang, C. H. (2008). Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Research*, 18(10), 997-1006.
- Chen, X., Gao, C., Li, H., Huang, L., Sun, Q., Dong, Y., Tian, C., Gao, S., Dong, H., Guan, D., Hu, X., Zhao, S., Li, L., Zhu, L., Yan, Q., Zhang, J., Zen, K., Chen-Yu Zhang, C. (2010). Identification and characterization of microRNAs in raw milk during different periods of lactation, commercial fluid, and powdered milk products. *Cell Research*, 20(10), 1128-1137.
- Chen, T., Xi, Q. Y., Ye, R. S., Cheng, X., Qi, Q. E., Wang, S. B., Shu, G., Wang, L. N., Zhu, X. T., Jiang, Q. Y., Zhang, Y. L. (2014). Exploration of microRNAs in porcine milk exosomes. *BMC Genomics*, 15(1), 100.
- Chilliard, Y., Glasser, F., Enjalbert, F., Ferlay, A., Bernard, L., F., Rouel, J., Doreau, M. (2007). Diet, rumen biohydrogenation and nutritional quality of cow and goat milk fat. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109, 828-855.
- Claeys, W. L., Verraes, C., Cardoen, S., De Block, J., Huyghebaert, A., Raes, K., Dewettinck, K., Herman, L. (2014). Consumption of raw or heated milk from different species: An evaluation of the nutritional and potential health benefits. *Food Control*, 42, 188-201.
- Clark, J. H., Klusmeyer, T. H., Cameron, M. R. (1992). Microbial protein synthesis and flows of nitrogen fractions to the duodenum of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 75(8), 2304-2323.

- Colette, C., Monnier, L. (2011). Acides gras: Classification, fonction et équilibre entre les différentes familles. *Médecine des Maladies Métaboliques*, 5(3), pp 237-245.
- Collomb, M., Bütikofer, U., Sieber, R., Jeangros, B., Bosset, J. O. (2002). Correlation between fatty acids in cows' milk fat produced in the Lowlands, Mountains and Highlands of Switzerland and botanical composition of the fodder. *International Dairy Journal*, 12(8), 661-666.
- Conway, V., Gauthier, S. F., Pouliot, Y. (2014). Buttermilk: much more than a source of milk phospholipids. *Animal Frontiers*, 4(2), 44-51.
- COPAE 2012. (Consejo de Producción Agraria Ecológica de Asturias). http://copaeastur.org/index.php?option=com_content&view=article&id=43%3Aproduccion-ganaderia&catid=17%3Aproduccion&Itemid=59&lang=es (Consultado el día 24 de julio de 2017).
- Coppa, M., Ferlay, A., Chassaing, C., Agabriel, C., Glasser, F., Chilliard, Y., Borreani, G., Barcarolo, R., Baars, T., Kusche, D., Harstad, O. M., Verbič, J., Golecký, J., Martin, B. (2013). Prediction of bulk milk fatty acid composition based on farming practices collected through on-farm surveys. *Journal of Dairy Science*. 96: 4197-4211.
- Coppa, M., Martin, B., Agabriel, C., Chassaing, C., Sibra, C., Constant, I., Graulet, B., Andueza, D. (2012). Authentication of cow feeding and geographic origin on milk using visible and near-infrared spectroscopy. *Journal of Dairy Science*, 95(10), 5544-5551.
- Coppa, M., Martin, B., Pradel, P., Leotta, B., Priolo, A., Vasta, V. (2011). Effect of a hay-based diet or different upland grazing systems on milk volatile compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(9), 4947-4954.
- Couvreur, S., Hurtaud, C., Lopez, C., Delaby, L., Peyraud, J. L. (2006). The linear relationship between the proportion of fresh grass in the cow diet, milk fatty acid composition, and butter properties. *Journal of Dairy Science*, 89(6), 1956-1969.
- Craninx, M., Steen A., Van Laar, H., Van Nespen, T., Martin-Tereso, J., De Baets, B., Fievez, V. (2008). Effect of lactation stage on the odd- and branched-chain milk fatty acids of dairy cattle under grazing and indoor conditions. *Journal of Dairy Science*. 91: 2662-2677.
- Cui, J., Zhou, B., Ross, S. A., Zemleni, J. (2017). Nutrition, microRNAs, and human health. *Advances in Nutrition*, 8(1), 105-112.
- Cui, W., Li, Q., Feng, L., Ding, W. (2011). MiR-126-3p regulates progesterone receptors and involves development and lactation of mouse mammary gland. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 355(1-2), 17-25.
- Danezis, G. P., Tsagkaris, A. S., Camin, F., Brusica, V., Georgiou, C. A. (2016). Food authentication: Techniques, trends & emerging approaches. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 85, 123-132.

- Davis, H., Chatzidimitriou, E., Leifert, C., Butler, G. (2020). Evidence That Forage-Fed Cows Can Enhance Milk Quality. *Sustainability*, 12(9), 3688.
- de la Fuente, M. A. (1998). Changes in the mineral balance of milk submitted to technological treatments. *Trends in Food Science & Technology*, 9(7), 281-288.
- de la Roza-Delgado B., Martínez-Fernández A., Argamentoría-Gutiérrez A. (2002). Determinación de materia seca en pastos y forrajes a partir de la temperatura de secado para análisis. *Pastos*, 32: 91-104.
- De Vries, M. W. (1995). Estimating forage intake and quality in grazing cattle: a reconsideration of the hand-plucking method. *Rangeland Ecology & Management/Journal of Range Management Archives*, 48(4), 370-375.
- Del Estado, B. O. Decreto 2484/1967, de 21 de septiembre, por el que se aprueba el texto del Código Alimentario Español.
- Dewhurst, R. J., Fisher, W. J., Tweed, J. K., Wilkins, R. J. (2003). Comparison of grass and legume silages for milk production. 1. Production responses with different levels of concentrate. *Journal of Dairy Science*, 86(8), 2598-2611.
- Dewhurst, R. J., Shingfield, K. J., Lee, M. R., Scollan, N. D. (2006). Increasing the concentrations of beneficial polyunsaturated fatty acids in milk produced by dairy cows in high-forage systems. *Animal Feed Science and Technology*, 131(3-4), 168-206.
- Dhiman, T. R., Anand, G. R., Satter, L. D., Pariza, M. W. (1999). Conjugated linoleic acid content of milk from cows fed different diets. *Journal of Dairy Science*, 82(10), 2146-2156.
- Di Domenico, M., Di Giuseppe, M., Rodríguez, J. W., Cammà, C. (2017). Validation of a fast real-time PCR method to detect fraud and mislabeling in milk and dairy products. *Journal of Dairy Science*, 100(1), 106-112.
- Dian, P. H. M., Chauveau-Duriot, B., Prado, I. N., Prache, S. (2007). A dose-response study relating the concentration of carotenoid pigments in blood and reflectance spectrum characteristics of fat to carotenoid intake level in sheep. *Journal of Animal Science*, 85(11), 3054-3061.
- Dillon, P., Berry, D. P., Evans, R. D., Buckley, F., Horan, B. (2006). Consequences of genetic selection for increased milk production in European seasonal pasture based systems of milk production. *Livestock Science*, 99(2), 141-158.
- Dilzer, A., Park, Y. (2012). Implication of conjugated linoleic acid (CLA) in human health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52(6), 488-513.
- Do Canto, L. M., Marian, C., Willey, S., Sidawy, M., Da Cunha, P. A., Rone, J. D., Li, X., Gusev, Y., Haddad, B. R. (2016). MicroRNA analysis of breast ductal fluid in breast cancer patients. *International Journal of Oncology*, 48(5), 2071-2078.

- Dorval, V., Nelson, P. T., Hebert, S. S. (2013). Circulating microRNAs in Alzheimer's disease: The search for novel biomarkers. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 6 (24).
- Dyall, S. C. (2015). Long-chain omega-3 fatty acids and the brain: a review of the independent and shared effects of EPA, DPA and DHA. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 7, 52.
- Elgersma, A., Tamminga, S., Ellen, G. (2006). Modifying milk composition through forage. *Animal Feed Science and Technology* 131 207–225.
- Elgersma, A., Søegaard, K., Jensen, S.K. (2013) Fatty acids, α -tocopherol, β -carotene, and lutein contents in forage legumes, forbs, and a grass–clover mixture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61, 11913-11920.
- Elgersma, A. (2015). Grazing increases the unsaturated fatty acid concentration of milk from grass-fed cows: A review of the contributing factors, challenges and future perspectives. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 117(9), 1345-1369.
- El-Zaiat, H. M., Kholif, A. E., Mohamed, D. A., Matloup, O. H., Anele, U. Y., Sallam, S. M. (2019). Enhancing lactational performance of Holstein dairy cows under commercial production: malic acid as an option. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(2), 885-892.
- Esquela-Kerscher, A., Slack, F. J. (2006). Oncomirs—microRNAs with a role in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 6(4), 259-269.
- European Union. (2002). Regulation (EC) No. 178/2002 of the European Parliament and of the Council of 28 January 2002 laying down the general principles and requirements of food law, establishing the European Food Safety Authority and laying down procedures in matters of food safety. *Official Journal of the European Communities*, L 031(1.2), 1e24.
- Farrell Jr, H. M., Malin, E. L., Brown, E. M., Qi, P. X. (2006). Casein micelle structure: What can be learned from milk synthesis and structural biology?. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 11(2-3), 135-147.
- Faulkner, H., O'Callaghan, T. F., McAuliffe, S., Hennessy, D., Stanton, C., O'Sullivan, M. G., Kerry, J. P., Kilcawley, K. N. (2018). Effect of different forage types on the volatile and sensory properties of bovine milk. *Journal of Dairy Science*, 101(2), 1034-1047.
- Feng, J., Xing, W., Xie, L. (2016). Regulatory roles of microRNAs in diabetes. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(10), 1729.
- Ferlay A., Agabriel C., Sibra C., Journal C., Martin B., Chilliard Y. (2008). Tanker milk variability in fatty acids according to farm feeding and husbandry practices in a French semi-mountain area. *Dairy Science and Technology*. 88: 193-215.

- Fiedor, J., Burda, K. (2014). Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease. *Nutrients*, 6(2), 466-488.
- Fong, B. Y., Norris, C. S., MacGibbon, A. K. (2007). Protein and lipid composition of bovine milk-fat-globule membrane. *International Dairy Journal*, 17(4), 275-288.
- Fontecha, J., Juárez, M. Avances científicos sobre el papel de la grasa láctea en la alimentación. En: *Avances en Alimentación, Nutrición y Dietética*. Madrid: Editorial Nemira 2012. p. 117-34.
- Frame, J., Charlton, J. F. L., Laidlaw, A. S. (1998). *Temperate forage legumes*. Cab International.
- Frétin, M., Ferlay, A., Verdier-Metz, I., Fournier, F., Montel, M. C., Farruggia, A., Delbes, C., Martin, B. (2017). The effects of low-input grazing systems and milk pasteurisation on the chemical composition, microbial communities, and sensory properties of uncooked pressed cheeses. *International Dairy Journal*, 64, 56-67.
- Friedman, R. C., Farh, K. K. H., Burge, C. B., Bartel, D. P. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Research*, 19(1), 92-105.
- Friedrich, M., Pracht, K., Mashreghi, M. F., Jäck, H. M., Radbruch, A., Seliger, B. (2017). The role of the miR-148/-152 family in physiology and disease. *European Journal of Immunology*, 47(12), 2026-2038.
- Gabryszuk, M., Słoniewski, K., Sakowski, T. (2008). Macro-and microelements in milk and hair of cows from conventional vs. organic farms. *Animal Science Papers and Reports*, 26(3), 199-209.
- Gao, H. N., Zhao, S. G., Zheng, N., Zhang, Y. D., Wang, S. S., Zhou, X. Q., Wang, J. Q. (2017). Combination of histidine, lysine, methionine, and leucine promotes β -casein synthesis via the mechanistic target of rapamycin signaling pathway in bovine mammary epithelial cells. *Journal of Dairy Science*, 100(9), 7696-7709.
- Garcia, C., Duby, C., Catheline, D., Toral, P. G., Bernard, L., Legrand, P., Rioux, V. (2017). Synthesis of the suspected trans-11, cis-13 conjugated linoleic acid isomer in ruminant mammary tissue by FADS3-catalyzed Δ 13-desaturation of vaccenic acid. *Journal of Dairy Science*, 100(1), 783-796.
- García, C., Montiel, R. L. A., Borderas, T. F. (2014). Grasa y proteína de la leche de vaca: componentes, síntesis y modificación. *Archivos de Zootecnia*, 63, 85-105.
- García-Segura, L., Pérez-Andrade, M., Miranda-Ríos, J. (2013). The emerging role of MicroRNAs in the regulation of gene expression by nutrients. *Lifestyle Genomics*, 6(1), 16-31.
- Gentili, A., Caretti, F., Bellante, S., Ventura, S., Canepari, S., Curini, R. (2013). Comprehensive profiling of carotenoids and fat-soluble vitamins in milk from

- different animal species by LC-DAD-MS/MS hyphenation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(8), 1628-1639.
- German, J. B., Dillard, C. J. (2006). Composition, structure and absorption of milk lipids: a source of energy, fat-soluble nutrients and bioactive molecules. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46(1), 57-92.
- GISPERT, C. (2002). *Enciclopedia Práctica de la Agricultura y Ganadería*. Ediciones Océano, Barcelona, ES. pp 831-975.
- Gobierno de la Rioja 2016. <http://www.larioja.org/agricultura/es/calidad-agroalimentaria/agricultura-ecologica/ganaderia-ecologica> (Consultado el día 24 de julio de 2017).
- Gohil, K., Oommen, S., Vasu, V. T., Aung, H. H., Cross, C. E. (2007). Tocopherol transfer protein deficiency modifies nuclear receptor transcriptional networks in lungs: modulation by cigarette smoke in vivo. *Molecular Aspects of Medicine*, 28(5-6), 453-480.
- Golan-Gerstl, R., Elbaum Shiff, Y., Moshayoff, V., Schechter, D., Leshkowitz, D., Reif, S. (2017). Characterization and biological function of milk-derived miRNAs. *Molecular Nutrition & Food Research*, 61(10), 1700009.
- Gómez, D. A. A., Mejía, O. B. (2005). Composición nutricional de la leche de ganado vacuno. *Revista Lasallista de Investigación*, 2(1), 38-42.
- Grażyna, C., Hanna, C., Adam, A., Magdalena, B. M. (2017). Natural antioxidants in milk and dairy products. *International Journal of Dairy Technology*, 70(2), 165-178.
- Grenon, C., Fournier, S., Goulet, J. (2004). Lait de qualité. In *Symposium sur les Bovins laitiers*. Centre de Référence en Agriculture et Agroalimentaire du Québec (CRAAQ)(Canada).
- Griinari, J. M., Corl, B. A., Lacy, S. H., Chouinard, P. Y., Nurmela, K. V. V., Bauman, D. E. (2000). Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by $\Delta 9$ -desaturase. *The Journal of Nutrition*, 130(9), 2285-2291.
- Gu, Y., Li, M., Wang, T., Liang, Y., Zhong, Z., Wang, X., Zhou, Q., Chen, L., Lang, Q., He, Z., Chen, X., Gong, J., Gao, X., Li, X., Lv, X. (2012). Lactation-related microRNA expression profiles of porcine breast milk exosomes. *PloS One*, 7(8), e43691.
- Guilloteau, P., Martin, L., Eeckhaut, V., Ducatelle, R., Zabielski, R., Van Immerseel, F. (2010). From the gut to the peripheral tissues: the multiple effects of butyrate. *Nutrition Research Reviews*, 23(2), 366-384.
- Gulati, A., Galvin, N., Lewis, E., Hennessy, D., O'Donovan, M., McManus, J. J., Fenelon, M. A., Guinee, T. P. (2018). Outdoor grazing of dairy cows on pasture versus indoor feeding on total mixed ration: Effects on gross composition and mineral content of milk during lactation. *Journal of Dairy Science*, 101(3), 2710-2723.

- Gulati, A., Hennessy, D., O'Donovan, M., McManus, J. J., Fenelon, M. A., Guinee, T. P. (2019). Dairy cow feeding system alters the characteristics of low-heat skim milk powder and processability of reconstituted skim milk. *Journal of Dairy Science*, 102(10), 8630-8647.
- Gustafson, D., Tyryshkin, K., & Renwick, N. (2016). microRNA-guided diagnostics in clinical samples. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 30(5), 563-575.
- Halliwell, B. (2012). Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutrition reviews*, 70(5), 257-265.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. (2015). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, USA.
- Hamann, J., Krömker, V. (1997). Potential of specific milk composition variables for cow health management. *Livestock Production Science*, 48(3), 201-208.
- Hamer, H. M., Jonkers, D. M. A. E., Venema, K., Vanhoutvin, S. A. L. W., Troost, F. J., Brummer, R. J. (2008). The role of butyrate on colonic function. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 27(2), 104-119.
- Hanke, M., Hoefig, K., Merz, H., Feller, A. C., Kausch, I., Jocham, D., Warnecke, J. M., Sczakiel, G. (2010). A robust methodology to study urine microRNA as tumor marker: MicroRNA-126 and microRNA-182 are related to urinary bladder cancer. *Urologic Oncology*, 28(6), 655–661.
- Hanson, J. C., Johnson, D. M., Lichtenberg, E., Minegishi, K. (2013). Competitiveness of management-intensive grazing dairies in the mid-Atlantic region from 1995 to 2009. *Journal of Dairy Science*, 96(3), 1894-1904.
- Harvatine, K. J., Bauman, D. E. (2006). SREBP1 and thyroid hormone responsive spot 14 (S14) are involved in the regulation of bovine mammary lipid synthesis during diet-induced milk fat depression and treatment with CLA. *The Journal of Nutrition*, 136(10), 2468-2474.
- Harvatine, K. J., Boisclair, Y. R., Bauman, D. E. (2009). Recent advances in the regulation of milk fat synthesis. *Animal: An International Journal of Animal Bioscience*, 3(1), 40.
- Hata, T., Murakami, K., Nakatani, H., Yamamoto, Y., Matsuda, T., Aoki, N. (2010). Isolation of bovine milk-derived micro vesicles carrying mRNAs and microRNAs. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 396(2), 528–533.
- Hatew, B., Stringano, E., Mueller-Harvey, I., Hendriks, W. H., Carbonero, C. H., Smith, L. M. J., Pellikaan, W. F. (2016). Impact of variation in structure of condensed tannins from sainfoin (*O nobrychis viciifolia*) on in vitro ruminal methane production and fermentation characteristics. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 100(2), 348-360.

- Haug, A., Høstmark, A. T., Harstad, O. M. (2007). Bovine milk in human nutrition—a review. *Lipids in Health and Disease*, 6(1), 25.
- Havemose, M. S., Weisbjerg, M.R., Bredie, W. L. P., Nielsen, J. H. (2004) Influence of feeding different types of roughage on the oxidative stability of milk. *International Dairy Journal* 14, 563-570.
- Hawke, J. C., in Butler, G. W., Bailey, R. W. (1973). Chemistry and biochemistry of herbage. *Lipids*, 213-263.
- Heck, J. M. L., van Valenberg, H. J. F., Dijkstra, J., van Hooijdonk, A. C. M. (2009). Seasonal variation in the Dutch bovine raw milk composition. *Journal of Dairy Science*. 92: 4745-4755.
- Heine, R. G., AlRefaee, F., Bachina, P., De Leon, J. C., Geng, L., Gong, S., Madrazo, J. A., Ngamphaiboon, J., Ong, C., Rogacion, J. M. (2017). Lactose intolerance and gastrointestinal cow's milk allergy in infants and children—common misconceptions revisited. *World Allergy Organization Journal*, 10(1), 41.
- Heinrichs, J., Jones, C., Bailey, K. (2016). Milk components: understanding the causes and importance of milk fat and protein variation in your dairy herd. <https://extension.psu.edu/milk-components-understanding-milk-fat-and-protein-variation-in-your-dairy-herd> (Consultado el día 27 de enero de 2020)
- Hellemans, J., Mortier, G., De Paepe, A., Speleman, F., Vandesompele, J. (2007). qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biology*, 8(2), 1-14.
- Heneghan, H.M.; Miller, N.; Lowery, A.J.; Sweeney, K.J.; Newell, J.; Kerin, M.J. (2010). Circulating microRNAs as novel minimally invasive biomarkers for breast cancer. *Annals Surgery*, 251, 499–505.
- Hernández-Ortega, M., Martínez-Fernández, A., Soldado, A., González, A., Arriaga-Jordán, C.M. Argamentería, A., de la Roza-Delgado, B., Vicente, F. (2014). Effect of total mixed ration composition and daily grazing pattern on milk production, composition and fatty acids profile of dairy cows. *Journal of Dairy Research* 81, 471- 478.
- Hervás, G., Frutos, P., Toral, P. G. (2020). Endogenous synthesis of milk cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid in dairy ewes: Quantification using ¹³C-labeled vaccenic acid and comparison with estimates based on cobalt administration. *Journal of Dairy Science*, 103(1), 368-378.
- Hesari, A., Golrokh Moghadam, S. A., Siasi, A., Rahmani, M., Behboodi, N., Rastgar-Moghadam, A., Ferns, G. A., Ghasemi, F., Avan, A. (2018). Tumor-derived exosomes: Potential biomarker or therapeutic target in breast cancer?. *Journal of Cellular Biochemistry*, 119(6), 4236-4240.
- Horký, P. (2015). Effect of selenium on its content in milk and performance of dairy cows in ecological farming. *Potravinárstvo Slovak Journal of Food Sciences*, 9(1), 324-329.

- Iannaccone, M., Cosenza, G., Pauciullo, A., Garofalo, F., Proroga, Y. T., Capuano, F., Capparelli, R. (2018). Milk microRNA-146a as a potential biomarker in bovine tuberculosis.
- ISO 15884/IDF182 (2002). Milk Fat. Preparation of Fatty Acid Methyl Esters.
- ISO14156/IDF172 (2001). Milk and Milk Products.Extraction Methods for Lipids and Liposoluble Compounds.
- Izumi, H., Kosaka, N., Shimizu, T., Sekine, K., Ochiya, T., Takase, M. (2012). Bovine milk contains microRNA and messenger RNA that are stable under degradative conditions. *Journal of Dairy Science*, 95(9), 4831-4841.
- Janssen, C. I., Kiliaan, A. J. (2014). Long-chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFA) from genesis to senescence: the influence of LCPUFA on neural development, aging, and neurodegeneration. *Progress in Lipid Research*, 53, 1-17.
- Jayanegara, A., Goel, G., Makkar, H. P., Becker, K. (2015). Divergence between purified hydrolysable and condensed tannin effects on methane emission, rumen fermentation and microbial population in vitro. *Animal Feed Science and Technology*, 209, 60-68.
- Jenkins, T. C., McGuire, M. A. (2006). Major advances in nutrition: impact on milk composition. *Journal of Dairy Science*, 89(4), 1302-1310.
- Jenness, R. (1986). Symposium: species variation in mammary gland function. *Journal Dairy Science*, 69, 869-885.
- Jensen, R.G. (2002). The composition of bovine milk lipids: January 1995 to December 2000. *Journal of Dairy Science*, 85: 295-350.
- Jensen, E. S., Peoples, M. B., Hauggaard-Nielsen, H. (2010). Faba bean in cropping systems. *Field Crops Research*, 115(3), 203-216.
- Jiménez-Calderón, J. D., Vicente, F., Carballal, A., Martínez-Fernández, A. (2017). Estado reproductivo de las ganaderías de vacuno lechero en el Principado de Asturias (España). *ITEA-Información Técnica Económica Agraria*, 113, 347-358.
- Jiménez-Calderón J. D. (2017). Producción sostenible de leche de vaca mediante pastoreo y cultivos forrajeros obtenidos con fertilización orgánica. Tesis Doctoral, Universidad de Zaragoza, España. 216 pp.
- Jiménez-Calderón, J. D., Martínez-Fernández, A., Soldado, A., González, A., Vicente, F. (2020). Faba bean-rapeseed silage as substitute for Italian ryegrass silage: effects on performance and milk quality of grazing dairy cows. *Animal Production Science*, 60(7), 913-922.
- Jin, X. L., Wei, Z. H., Liu, L., Liu, H. Y., Liu, J. X. (2015). Comparative studies of two methods for miRNA isolation from milk whey. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B*, 16(6), 533-540.

- Juárez, M., Fontecha, F. J. (2009). Componentes bioactivos de la grasa láctea.
- Kalač, P., Samková, E. (2010). The effects of feeding various forages on fatty acid composition of bovine milk fat: A review. *Czech Journal of Animal Science*, 55(12), 521-537.
- Kalač, P. (2012). Carotenoids, ergosterol and tocopherols in fresh and preserved herbage and their transfer to bovine milk fat and adipose tissues: A review. *Journal of Agrobiology*, 29(1), 1-13.
- Kaskous, S., Pfaffl, M. W. (2017). Bioactive properties of minor camel milk ingredients- An overview. *Journal of Camel Practice and Research*, 24(1), 15-26.
- Kelly, M. L., Kolver, E. S., Bauman, D. E., Van Amburgh, M. E., Muller, L. D. (1998). Effect of intake of pasture on concentrations of conjugated linoleic acid in milk of lactating cows. *Journal of Dairy Science*, 81(6), 1630-1636.
- Khan, N. A., Cone, J. W., Fievez, V., Hendriks, W. H. (2012). Causes of variation in fatty acid content and composition in grass and maize silages. *Animal Feed Science and Technology*, 174(1-2), 36-45.
- Khan, N. A., Cone, J. W., Pellikaan, W. F., Khan, M. A., Struik, P. C., Hendriks, W. H. (2011). Changes in fatty acid content and composition in silage maize during grain filling. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(6), 1041-1049.
- Kilcawley, K. N., Faulkner, H., Clarke, H. J., O'Sullivan, M. G., Kerry, J. P. (2018). Factors influencing the flavour of bovine milk and cheese from grass based versus non-grass-based milk production systems. *Foods*, 7(3), 37.
- Kolver, E. S. (2003). Nutritional limitations to increased production on pasture-based systems. *Proceedings of the Nutrition Society*, 62(2), 291-300.
- Kosaka, N., Izumi, H., Sekine, K., Ochiya, T. (2010). MicroRNA as a new immune-regulatory agent in breast milk. *Silence*, 1(1), 7.
- Kramer J.K.G., Blackadar, C. B., Zhou, J. (2002). Evaluation of Two GC Columns (60-m SUPELCOWAX 10 and 100-m CP Sil 88) for Analysis of Milkfat with Emphasis on CLA, 18:1, 18:2 and 18:3 Isomers, and Short- and Long-Chain FA. *Lipids* 37, No 8, 823–835.
- Kucuk, O., Hess, B. W., Ludden, P. A., Rule, D. C. (2001). Effect of forage: concentrate ratio on ruminal digestion and duodenal flow of fatty acids in ewes. *Journal of Animal Science*, 79(8), 2233-2240.
- Kuoppala, K., Ahvenjärvi, S., Rinne, M., Vanhatalo, A. (2009). Effects of feeding grass or red clover silage cut at two maturity stages in dairy cows. 2. Dry matter intake and cell wall digestion kinetics. *Journal of Dairy Science*, 92(11), 5634-5644.
- Kusche D., Kuhnt K., Ruebesam K., Rohrer C., Nierop A.F., Jahreis G., Baars T. (2015). Fatty acid profiles and antioxidants of organic and conventional milk from low- and high-input systems during outdoor period. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 95, 529-539.

- Lacroix, C., Verret, P., Paquin, P. (1996). Regional and seasonal variations of nitrogen fractions in commingled milk. *International Dairy Journal*, 6(10), 947-961.
- Lago-Novais, D., Pawlowski, K., Pires, J. A. A., Mobuchon, L., Bes, S., Martin, P., Leroux, C. (2016). 0849 Milk fat globules as a source of mammary microRNA. *Journal of Animal Science*, 94(suppl_5), 408-409.
- Lahlou, M. N., Kanneganti, R., Massingill, L. J., Broderick, G. A., Park, Y., Pariza, M. W., Ferguson, J. D., Wu, Z. (2014). Grazing increases the concentration of CLA in dairy cow milk. *Animal*, 8(7), 1191-1200.
- Lai, Y. C., Fujikawa, T., Ando, T., Kitahara, G., Koiwa, M., Kubota, C., Miura, N. (2017a). Rapid communication: MiR-92a as a housekeeping gene for analysis of bovine mastitis-related microRNA in milk. *Journal of Animal Science*, 95(6), 2732-2735.
- Lai, Y. C., Fujikawa, T., Maemura, T., Ando, T., Kitahara, G., Endo, Y., Yamato, O., Koiwa, M., Kubota, C., Miura, N. (2017b). Inflammation-related microRNA expression level in the bovine milk is affected by mastitis. *PloS One*, 12(5), e0177182.
- Lamminen, M., Halmemies-Beauchet-Filleau, A., Kokkonen, T., Vanhatalo, A., Jaakkola, S. (2019). The effect of partial substitution of rapeseed meal and faba beans by *Spirulina platensis* microalgae on milk production, nitrogen utilization, and amino acid metabolism of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 102(8), 7102-7117.
- Larsen M. K., Nielsen J. H., Butler G., Leifert C., Slots T., Kristiansen G. H., Gustafsson H. (2010). Milk quality as affected by feeding regimens in a country with climatic variation. *Journal of Dairy Science*. 93: 2863-2873.
- Larsen, M. K., Fretté, X. C., Kristensen, T., Eriksen, J., Søegaard, K., Nielsen, J. H. (2012). Fatty acid, tocopherol and carotenoid content in herbage and milk affected by sward composition and season of grazing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(14), 2891-2898.
- Lässer, C., Alikhani, V. S., Ekström, K., Eldh, M., Paredes, P. T., Bossios, A., Sjöstrand, M., Gabrielsson, S., Lötvall, J., Valadi, H. (2011). Human saliva, plasma and breast milk exosomes contain RNA: Uptake by macrophages. *Journal of Translational Medicine*, 9(9).
- Lawless, N.; Reinhardt, T.A.; Bryan, K.; Baker, M.; Pesch, B.; Zimmerman, D.; Zuelke, K.; Sonstegard, T.; O'Farrelly, C.; Lippolis, J.D. & Lynn, D. J. (2014). MicroRNA regulation of bovine monocyte inflammatory and metabolic networks in an in vivo infection model. *G3 (Bethesda)*, 4, 957–971.
- Le Guillou, S., Marthey, S., Laloë, D., Laubier, J., Mobuchon, L., Leroux, C., Le Provost, F. (2014). Characterization and comparison of lactating mouse and bovine mammary gland miRNomes. *PloS One*, 9(3), e91938.

- Lee, M. R. F., Harris, L. J., Dewhurst, R. J., Merry, R. J., Scollan, N. D. (2003). The effect of clover silages on long chain fatty acid rumen transformations and digestion in beef steers. *Animal Science*, 76(3), 491-501.
- Lee, M. J., Yoon, K. S., Cho, K. W., Kim, K. S., Jung, H. S. (2013). Expression of miR-206 during the initiation of mammary gland development. *Cell and Tissue Research*, 353(3), 425-433.
- Lee, M. R., Tweed, J. K., Dewhurst, R. J., Scollan, N. D. (2006). Effect of forage: concentrate ratio on ruminal metabolism and duodenal flow of fatty acids in beef steers. *Animal Science*, 82, 31-40.
- Legrand, P. (2007). Les acides gras: Structures, fonctions, apports nutritionnels conseillés. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 42, 7-12.
- Legrand, P., Rioux, V. (2015). Specific roles of saturated fatty acids: Beyond epidemiological data. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 117(10), 1489-1499.
- Leiber, F., Kreuzer, M., Nigg, D., Wettstein, H. R., Leo Scheeder, M. R. (2005). A study on the causes for the elevated n-3 fatty acids in cows' milk of alpine origin. *Lipids*, 40(2), 191-202.
- Lemosquet, S., Delamaire, E., Lapierre, H., Blum, J. W., Peyraud, J. L. (2009). Effects of glucose, propionic acid, and nonessential amino acids on glucose metabolism and milk yield in Holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 92(7), 3244-3257.
- Li, H. M., Wang, C. M., Li, Q. Z., Gao, X. J. (2012). MiR-15a decreases bovine mammary epithelial cell viability and lactation and regulates growth hormone receptor expression. *Molecules*, 17(10), 12037-12048.
- Li, R., Beaudoin, F., Ammah, A. A., Bissonnette, N., Benchaar, C., Zhao, X., Lei, C., Ibeagha-Awemu, E. M. (2015). Deep sequencing shows microRNA involvement in bovine mammary gland adaptation to diets supplemented with linseed oil or safflower oil. *BMC Genomics*. 16: 884.
- Li, R., Dudemaine, P. L., Zhao, X., Lei, C., Ibeagha-Awemu, E. M. (2016). Comparative analysis of the miRNome of bovine milk fat, whey and cells. *PloS One*, 11(4), e0154129.
- Lindmark Månsson, H. (2008). Fatty acids in bovine milk fat. *Food & Nutrition Research*, 52(1), 1821.
- Lindqvist, H., Nadeau, E., Jensen, S. K. (2012). Alpha-tocopherol and β -carotene in legume-grass mixtures as influenced by wilting, ensiling and type of silage additive. *Grass and Forage Science*, 67(1), 119-128.
- Lock, A. L., Bauman, D. E. (2004). Modifying milk fat composition of dairy cows to enhance fatty acids beneficial to human health. *Lipids*, 39(12), 1197-1206.

- Loor, J. J., Ueda, K., Ferlay, A., Chilliard, Y., Doreau, M. (2004). Biohydrogenation, duodenal flow, and intestinal digestibility of trans fatty acids and conjugated linoleic acids in response to dietary forage: concentrate ratio and linseed oil in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 87(8), 2472-2485.
- Lordan, R., Tsoupras, A., Mitra, B., Zabetakis, I. (2018). Dairy fats and cardiovascular disease: do we really need to be concerned?. *Foods*, 7(3), 29.
- Luoreng, Z. M., Wang, X. P., Mei, C. G., Zan, L. S. (2018). Comparison of microRNA profiles between bovine mammary glands infected with *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *International Journal of Biological Sciences*, 14(1), 87.
- Lüscher A., Mueller-Harvey I., Soussana J. F., Rees R. M., Peyraud J. L. (2014). Potential of legume-based grassland-livestock systems in Europe: a review. *Grass and Forage Science*. 69: 206-228.
- Luykx, D. M., Van Ruth, S. M. (2008). An overview of analytical methods for determining the geographical origin of food products. *Food Chemistry*, 107(2), 897-911.
- Macdonald K. A., Verkerk G. A., Thorrold B. S., Pryce J. E., Penno J. W., McNaughton L. R., Burton L. J., Lancaster J. A. S., Williamson J. H., Holmes C. W. (2008). A comparison of three strains of Holstein-Friesian grazed on pasture and managed under different feed allowances. *Journal of Dairy Science*. 91: 1693-1707.
- MacGibbon, H. A. K., Cucco, D. C. (Eds.). (2007). *Advanced dairy chemistry volume 2: lipids (Vol. 2)*. Springer Science & Business Media: Berlin/Heidelberg, Germany, 2007; pp1-42.
- Machado, C. F., Morris, S. T., Hodgson, J., Fathalla, M. (2005). Seasonal changes of herbage quality within a New Zealand beef cattle finishing pasture.
- Macon B., Sollenberger L. E., Moore J. E., Staples C. R., Fike J. H., Portier K. M. (2003). Comparison of three techniques for estimating the forage intake of lactating dairy cows on pasture. *Journal of Animal Science*. 81: 2357-2366.
- MAFF (1984). *Energy allowances and feeding systems for ruminants*. London, UK. Reference Book 433. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food.
- MAGRAMA 2014. (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente). http://www.mapama.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/informacion-ambiental-indicadores-ambientales/BPIA_2013_Ficha_web_Agricultura_Ganader%C3%ADa_Ecol%C3%B3gica_tcm7-341481.pdf (Consultado el día 24 de julio de 2017).
- MAGRAMA. (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente). *Calidad Diferenciada*. <https://www.mapa.gob.es/es/alimentacion/temas/calidad-diferenciada/> (Consultado el día 31 de agosto de 2020).
- Makkar, H. P. (2016). Animal nutrition in a 360-degree view and a framework for future R&D work: towards sustainable livestock production. *Animal Production Science*, 56(10), 1561-1568.

- Manca, S., Upadhyaya, B., Mutai, E., Desaulniers, A. T., Cederberg, R. A., White, B. R., Zemleni, J. (2018). Milk exosomes are bioavailable and distinct microRNA cargos have unique tissue distribution patterns. *Scientific Reports*, 8(1), 11321.
- Marín, C. E. (1996). Sistema de explotación ganadera: notas en torno a su concepto. *Lurralde: Investigación y espacio*, (19), 89-104.
- Markkandan, K., Ahn, K., Lee, D. J., Kim, T. I., Dang, C., Hong, S. E., Yoon, H. B., Lim, H. J., Hong, C. P. (2018). Profiling and identification of pregnancy-associated circulating microRNAs in dairy cattle. *Genes & Genomics*, 40(10), 1111-1117.
- Martínez, M. A. E. (2011). *El libro Blanco de la Leche y los Productos Lácteos*. Editorial Litho Offset. Año de edición.
- Martínez-Fernández, A. (1995). Determinaciones analíticas para el conocimiento del valor nutritivo de un alimento. Importancia de la preparación de la muestra para su análisis. *Nuevas tendencias. Pastos y productos ganaderos*. EA China, A. Barquin (Ed). Tenerife, España, Editorial Piensos Biona.
- Martínez-Fernández, A., Soldado, A., Vicente, F., Martínez, A., de la Roza-Delgado, B. (2010). Wilting and inoculation of *Lactobacillus buchneri* on intercropped triticale-fava silage: effects on nutritive, fermentative and aerobic stability characteristics.
- Martínez-Fernández, A., Vicente, F., de la Roza-Delgado, B., Soldado, A., García, J., Alonso, J. M., Peláez, M. (2016). Importancia del uso de aditivos en la calidad y estabilidad de los ensilados de leguminosas. *Innovación sostenible en pastos: hacia una agricultura de respuesta al cambio climático*. MD Báez et al, 87-92.
- Martínez-Fernández, A., Baizán, S., Jiménez-Calderón, J. D., González, C., Carballal, A. (2018). Protocolos de muestreo para la predicción del rendimiento de forrajes y cultivos forrajeros. *Vaca Pinta*, 5: 74-80.
- Martínez-García, C. G., Dorward, P., Rehman, T. (2013). Factors influencing adoption of improved grassland management by small-scale dairy farmers in central Mexico and the implications for future research on smallholder adoption in developing countries. *Livestock Science*, 152(2-3), 228-238.
- Martini, M., Altomonte, I., Licitra, R., Salari, F. (2018). Nutritional and nutraceutical quality of donkey milk. *Journal of Equine Veterinary Science*, 65, 33-37.
- McCarty, M. F., DiNicolantonio, J. J. (2014). Are organically grown foods safer and more healthful than conventionally grown foods?. *British Journal of Nutrition*, 112(10), 1589-1591.
- McCusker, M. M., Grant-Kels, J. M. (2010). Healing fats of the skin: the structural and immunologic roles of the ω -6 and ω -3 fatty acids. *Clinics in Dermatology*, 28(4), 440-451.
- McDonald, P., Edwards, R. A., Greenhalgh, J. F. D., Morgan, C. A., Sinclair, L. A., Wilkinson, R. G. (2011). *Animal Nutrition*. Essex.

- Melnik, B. C., John, S. M., Schmitz, G. (2014). Milk: an exosomal microRNA transmitter promoting thymic regulatory T cell maturation preventing the development of atopy?. *Journal of Translational Medicine*, 12(1), 43.
- Melnik, B. C., Schmitz, G. (2017). MicroRNAs: Milk's epigenetic regulators. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 31(4), 427-442.
- Melnik, B. C., Schmitz, G. (2019). Exosomes of pasteurized milk: potential pathogens of Western diseases. *Journal of Translational Medicine*, 17(1), 1-33.
- Mensink, R. P., Zock, P. L., Kester, A. D., Katan, M. B. (2003). Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: a meta-analysis of 60 controlled trials. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 77(5), 1146-1155.
- Michael, A., Bajracharya, S. D., Yuen, P. S., Zhou, H., Star, R. A., Illei, G. G., Alevizos, I. (2010). Exosomes from human saliva as a source of microRNA biomarkers. *Oral Diseases*, 16(1), 34-38.
- Mitani, T., Kobayashi, K., Ueda, K., Kondo, S. (2015). Discrimination of "grazing milk" using milk fatty acid profile in the grassland dairy area in Hokkaido. *Animal Science Journal*, 87(2), 233–241.
- Mobuchon, L., Le Guillou, S., Marthey, S., Laubier, J., Laloe, D., Bes, S., Le Provost, F., Leroux, C. (2017). Sunflower oil supplementation affects the expression of miR-20a-5p and miR-142-5p in the lactating bovine mammary gland. *PLoS One*, 12(12), e0185511.
- Mobuchon, L., Marthey, S., Boussaha, M., Le Guillou, S., Leroux, C., Le Provost, F. (2015). Annotation of the goat genome using next generation sequencing of microRNA expressed by the lactating mammary gland: comparison of three approaches. *BMC Genomics*, 16(1), 285.
- Mogensen, L., Kristensen, T., Søgaard, K., Jensen, S. K., Sehested, J. (2012). Alfa-tocopherol and beta-carotene in roughages and milk in organic dairy herds. *Livestock Science*, 145(1-3), 44-54.
- Mohammed, R., Stanton, C. S., Kennelly, J. J., Kramer, J. K. G., Mee, J. F., Glimm, D. R., O'Donovan, M., Murphy, J. J. (2009). Grazing cows are more efficient than zero-grazed and grass silage-fed cows in milk rumenic acid production. *Journal of Dairy Science*, 92(8), 3874-3893.
- Mohan, M. S., O'Callaghan, T. F., Kelly, P., Hogan, S. A. (2020). Milk fat: opportunities, challenges and innovation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-33.
- Moloney, A. P., Monahan, F. J., Schmidt, O. (2014). Quality and authenticity of grassland products. *The Future of European Grasslands*, 19: 509-520.
- Monahan, F. J., Moloney, A. P., Downey, G., Dunne, P. G., Schmidt, O., Harrison, S. M. (2010). Authenticity and traceability of grassland production and products. In *Grassland in a changing world. Proceedings of the 23rd General Meeting of the*

- European Grassland Federation, Kiel, Germany, 29th August–2nd September (pp. 401-414).
- Montowska, M., Pospiech, E. (2012). Is authentication of regional and traditional food made of meat possible?. *Critical reviews in food science and nutrition*, 52(6), 475-487.
- Morales-Almaráz, E., de la Roza-Delgado, B., Soldado, A., Martínez-Fernández, A., González, A., Domínguez-Vara, I. A., Vicente, F. (2018) Parity and grazing-time effects on milk fatty acid profile in dairy cows. *Animal Production Science*, 58, 1233-1238.
- Morales-Almaráz, E., de la Roza-Delgado, B., González, A., Soldado, A., Rodríguez, M. L., Peláez, M., Vicente, F. (2011). Effect of feeding system on unsaturated fatty acid level in milk of dairy cows. *Renewable Agriculture and Food Systems*, 26: 224-229.
- Morand-Fehr, P., Fedele, V., Decandia, M., Le Frileux, Y. (2007). Influence of farming and feeding systems on composition and quality of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*, 68(1-2), 20-34.
- Mould, F. L., Ørskov, E. R., Mann, S. O. (1983). Associative effects of mixed feeds. I. Effects of type and level of supplementation and the influence of the rumen fluid pH on cellulolysis in vivo and dry matter digestion of various roughages. *Animal Feed Science and Technology*, 10(1), 15-30.
- Müller, L., Fröhlich, K., Böhm, V. (2011). Comparative antioxidant activities of carotenoids measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP), ABTS bleaching assay (α TEAC), DPPH assay and peroxy radical scavenging assay. *Food Chemistry*, 129(1), 139-148.
- Munch, E. M., Harris, R. A., Mohammad, M., Benham, A. L., Pejerrey, S. M., Showalter, L., Hu, M., Shope, C. D., Maningat, P. D., Gunaratne, P. H., Haymond, M., Aagaard, K. (2013). Transcriptome profiling of microRNA by Next-Gen deep sequencing reveals known and novel miRNA species in the lipid fraction of human breast milk. *PloS One*, 8(2), e50564.
- Muroya, S., Ogasawara, H., Hojito, M. (2015). Grazing affects exosomal circulating microRNAs in cattle. *PLoS One*, 10(8), e0136475.
- Muroya, S., Shibata, M., Hayashi, M., Oe, M., Ojima, K. (2016). Differences in circulating microRNAs between grazing and grain-fed wagyu cattle are associated with altered expression of intramuscular microRNA, the potential target PTEN, and Lipogenic genes. *PLoS One*, 11(9), e0162496.
- Na, R. S., E, G. X., Sun, W., Sun, X.W., Qiu, X. Y., Chen, L. P., Huang, Y. F. (2015). Expressional analysis of immune-related miRNAs in breast milk. *Genetics and Molecular Research Journal*, 14(3), 11371–11376.
- Nantapo, C. T. W., Muchenje, V., Hugo, A. (2014). Atherogenicity index and health-related fatty acids in different stages of lactation from Friesian, Jersey and

- Friesianx Jersey cross cow milk under a pasture-based dairy system. *Food chemistry*, 146, 127-133.
- Ng-Kwai-Hang, K. F., Hayes, J. F., Moxley, J. E., Monardes, H. G. (1984). Variability of test-day milk production and composition and relation of somatic cell counts with yield and compositional changes of bovine milk. *Journal of Dairy Science*, 67(2), 361-366.
- Niki, E. (2014). Role of vitamin E as a lipid-soluble peroxy radical scavenger: in vitro and in vivo evidence. *Free Radical Biology and Medicine*, 66, 3-12.
- Novobilský, A., Stringano, E., Carbonero, C. H., Smith, L. M. J., Enemark, H. L., Mueller-Harvey, I., Thamsborg, S. M. (2013). In vitro effects of extracts and purified tannins of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) against two cattle nematodes. *Veterinary Parasitology*, 196(3-4), 532-537.
- Nozière, P., Graulet B., Lucas, A., Martin, B., Grolier, P., Doreau, M. (2006) Carotenoids for ruminants: from forages to dairy products. *Animal Feed Science and Technology* 131, 418–450.
- NRC (1989). Nutrient requirements of dairy cattle. 6th revised edition. Update 1989. National Academy Press, Washington, DC.
- NRC (2001). Nutrient requirements of dairy cattle. 7th revised edition. National Research Council, National Academy Press, Washington, DC.
- Nudda, A., Battacone, G., Boaventura Neto, O., Cannas, A., Francesconi, A. H. D., Atzori, A. S., Pulina, G. (2014). Feeding strategies to design the fatty acid profile of sheep milk and cheese. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 43(8), 445-456.
- Numpaque, M., Şanlı, T., Anli, E. A. (2019). Diversity of Milks Other Than Cow, Sheep, Goat and Buffalo: In Terms of Nutrition and Technological Use. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 7(12), 2047-2053.
- O'Callaghan, T. F., Faulkner, H., McAuliffe, S., O'Sullivan, M. G., Hennessy, D., Dillon, P., Kilcawley, K. N., Stanton, C., Ross, R. P. (2016a). Quality characteristics, chemical composition, and sensory properties of butter from cows on pasture versus indoor feeding systems. *Journal of Dairy Science*, 99(12), 9441-9460.
- O'Callaghan, T. F., Hennessy, D., McAuliffe, S., Kilcawley, K. N., O'Donovan, M., Dillon, P., Ross, R. P., Stanton, C. (2016b). Effect of pasture versus indoor feeding systems on raw milk composition and quality over an entire lactation. *Journal of Dairy Science*, 99(12), 9424-9440.
- O'Callaghan, T. F., Hennessy, D., McAuliffe, S., Sheehan, D., Kilcawley, K., Dillon, P., Ross, R. P., Stanton, C. (2018). The effect of cow feeding system on the composition and quality of milk and dairy products. *Sustainable meat and milk production from grasslands*, 762.
- O'Callaghan, T. F., Vázquez-Fresno, R., Serra-Cayuela, A., Dong, E., Mandal, R., Hennessy, D., McAuliffe, S., Dillon, P., Wishart, D. S., Stanton, C., Ross, R. P.

- (2018). Pasture feeding changes the bovine rumen and milk metabolome. *Metabolites*, 8(2), 27.
- O'Callaghan, T. F., Sugrue, I., Hill, C., Ross, R. P., Stanton, C. (2019). Nutritional aspects of raw milk: a beneficial or hazardous food choice. In *Raw Milk* (pp. 127-148). Academic Press.
- Oba, M., Allen, M. S. (2000). Effects of brown midrib 3 mutation in corn silage on productivity of dairy cows fed two concentrations of dietary neutral detergent fiber: 1. Feeding behavior and nutrient utilization. *Journal of Dairy Science*, 83(6), 1333-1341.
- O'Callaghan, T. F., Mannion, D. T., Hennessy, D., McAuliffe, S., O'Sullivan, M. G., Leeuwendaal, N., Beresford, T.P., Dillon, P., Kilcawley, K. N., Sheehan, J. J., Ross, R. P., Stanton, C. (2017). Effect of pasture versus indoor feeding systems on quality characteristics, nutritional composition, and sensory and volatile properties of full-fat Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, 100(8), 6053-6073.
- Oh, S., Park, M. R., Ryu, S., Maburutse, B., Kim, J. U., Kim, Y. (2017). Quantitative analysis of milk-derived microRNAs and microbiota during the manufacturing and ripening of soft cheese. *Journal of microbiology and biotechnology*, 27(9), 1566-1575.
- OIE 2016. (Organización Mundial de Sanidad Animal) http://www.oie.int/index.php?id=169&L=2&htmfile=chapitre_aw_dairy_cattle.htm (Consultado el día 27 de febrero de 2017).
- Ozrenk, E., Inci, S. S. (2008). The effect of seasonal variation on the composition of cow milk in Van Province. *Pakistan Journal of nutrition*, 7(1), 161-164.
- Paccard, P., Chenais, F., Brunschwig, P. (2006). Maîtrise de la matière grasse du lait par l'alimentation des vaches laitières. Etude bibliographique et simulations technico-économiques. Collection Résultats, Paris, 33 p.
- Palladino R. A., Buckley F., Prendiville R., Murphy J. J., Callan J., Kenny D. A. (2010). A comparison between Holstein-Friesian and Jersey dairy cows and their F1 hybrid on milk fatty acid composition under grazing conditions. *Journal of Dairy Science*. 93: 2176-2184.
- Palmquist, D. L. (2009). Omega-3 fatty acids in metabolism, health, and nutrition and for modified animal product foods. *The Professional Animal Scientist*, 25(3), 207-249.
- Palmquist, D. L., Lock, A. L., Shingfield, K. J., Bauman, D. E. (2005). Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants and humans. *Advances in Food and Nutrition Research*, 50, 179-217.
- Palmquist, D.L. Milk Fat: Origin of Fatty Acids and Influence of Nutritional Factors Thereon. In *Advanced Dairy Chemistry Volume 2 Lipids*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2006; pp. 43–92.

- Palozza, P., Serini, S., Torsello, A., Boninsegna, A., Covacci, V., Maggiano, N., Ranelletti, F. O., Wolf, F. I., Calviello, G. (2002). Regulation of cell cycle progression and apoptosis by β -carotene in undifferentiated and differentiated HL-60 leukemia cells: Possible involvement of a redox mechanism. *International Journal of Cancer*, 97(5), 593-600.
- Pariza, M. W. (2004). Perspective on the safety and effectiveness of conjugated linoleic acid. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79(6), 1132S-1136S.
- Parodi, P. W. (2004). Milk fat in human nutrition. *Australian Journal of Dairy Technology*, 59(1), 3-59.
- Patterson, E., Wall, R., Fitzgerald, G. F., Ross, R. P., Stanton, C. (2012). Health implications of high dietary omega-6 polyunsaturated fatty acids. *Journal of Nutrition and Metabolism*, 2012.
- Pawlowski, K., Billa, P. A., Faulconnier, Y., Bes, S., Pires, J., Leroux, C. (2018, September). Comparison of miRNome from cow milk fat fraction and mammary gland tissue. In 10. International Symposium on the Nutrition of Herbivores (ISNH10) (Vol. 9). Cambridge University Press.
- Peeters, A., Parente, G., Le Gall, A. (2006). Temperate legumes: key-species for sustainable temperate mixtures. *Sustainable Grassland Productivity*. Lloverás J., A. Gonzales-Rodriguez, O. Vazquez-Yañez, J. Pineiro, O. Santamaría, L. Olea and MJ Poblaciones (Eds. j, *Grassland Science in Europe* vol 11 205-220.
- Perri, M., Lucente, M., Cannataro, R., De Luca, I. F., Gallelli, L., Moro, G., De Sarro, G., Caroleo, M. C., Cione, E. (2018). Variation in immune-related microRNAs profile in human milk amongst lactating women. *MicroRNA*, 7(2), 107-114.
- Peyraud, J. L., Delaby, L. (2001). Ideal concentrate feeds for grazing dairy cows-responses to supplementation in interaction with grazing management and grass quality. In: *Recent advances in animal nutrition*. Garnsworthy PC, Wiseman J. (Eds). Nottingham University Press, UK. PP. 203.
- Peyraud, J. L., Delagarde, R. (2013). Managing variations in dairy cow nutrient supply under grazing. *Animal*, 7(s1), 57-67.
- Piccand V., Cutullic E., Meier S., Schori F., Kunz P. L., Roche J. R., Thomet P. (2013). Production and reproduction of Fleckvieh, Brown Swiss, and 2 strains of Holstein-Friesian cows in a pasture-based, seasonal-calving dairy system. *Journal of Dairy Science*. 96: 5352-5363.
- Pihlanto, A. (2006). Antioxidative peptides derived from milk proteins. *International Dairy Journal*, 16(11), 1306-1314.
- Pilarczyk, B., Pilarczyk, R., Tomza-Marciniak, A., Kowieska, A., Wojcik, J., Sablik, P., Tylkowska, A., Hendzel, D. (2011). Selenium concentrations in the serum and milk of cows from organic and conventional farms in West Pomerania. *Tierärztliche Umschau*, 66(6), 248-253.

- Piñeiro, J., Díaz, N., SANTOALLA, M. C., Suárez, R., Fernández, J. (2004). Variedades de guisantes para forraje. Siembras de otoño. Actas de la XLIV Reunión Científica de la SEEP, 405-409.
- Pokorny, J., Yanishlieva, N., Gordon, M. (2001). Antioxidantes de los Alimentos. Aplicaciones Prácticas. Editorial Acribia. Zaragoza, España.
- Praagman, J., Beulens, J. W., Alsema, M., Zock, P. L., Wanders, A. J., Sluijs, I., Van Der Schouw, Y. T. (2016). The association between dietary saturated fatty acids and ischemic heart disease depends on the type and source of fatty acid in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition–Netherlands cohort, 2. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 103(2), 356-365.
- Prache, S. (2009). Diet authentication in sheep from the composition of animal tissues and products. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 38(SPE), 362-370.
- Prache, S., Martin, B., Nozière, P., Engel, E., Besle, J. M., Ferlay, A., Micol, D., Cornu, A., Cassar-Malek, I., Andueza, D. (2007). Authentification de l'alimentation des ruminants à partir de la composition de leurs produits et tissus. *Productions Animales-Paris-Institut National de la Recherche Agronomique*, 20(4), 295.
- Prache, S., Priolo, A., Grolier, P. (2003). Persistence of carotenoid pigments in the blood of concentrate-finished grazing sheep: its significance for the traceability of grass-feeding. *Journal of Animal Science*, 81(2), 360-367.
- Preissel, S., Reckling, M., Schläfke, N., Zander, P. (2015). Magnitude and farm-economic value of grain legume pre-crop benefits in Europe: a review. *Field Crops Research*, 175, 64-79.
- Prieto-Manrique, E., Mahecha-Ledesma, L., Angulo-Arizala, J., Vargas-Sánchez, J. E. (2016). Efecto de la suplementación lipídica sobre ácidos grasos en leche de vaca, énfasis en ácido ruménico. *Agronomía Mesoamericana*, 27(2), 421-437.
- Pritchard, C. C., Cheng, H. H., Tewari, M. (2012). MicroRNA profiling: approaches and considerations. *Nature Reviews Genetics*, 13(5), 358-369.
- Puhakka, L., Jaakkola, S., Simpura, I., Kokkonen, T., Vanhatalo, A. (2016). Effects of replacing rapeseed meal with fava bean at 2 concentrate crude protein levels on feed intake, nutrient digestion, and milk production in cows fed grass silage-based diets. *Journal of Dairy Science*, 99(10), 7993-8006.
- R Core Team (2017) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical computing, Vienna, Austria. Disponible en: <https://www.r-project.org/> (Consultado el día 11 de noviembre de 2020).
- Ramin, M., Höjer, A., Hetta, M. (2017). The effects of legume seeds on the lactation performance of dairy cows fed grass silage-based diets.
- Reddy, P. H., Tonk, S., Kumar, S., Vijayan, M., Kandimalla, R., Kuruva, C. S., Reddy, A. P. (2017). A critical evaluation of neuroprotective and neurodegenerative MicroRNAs in Alzheimer's disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 483(4), 1156-1165.

- Reganold, J. P., Wachter, J. M. (2016). Organic agriculture in the twenty-first century. *Nature Plants*, 2, 15221.
- Rezaei, R., Wu, Z., Hou, Y., Bazer, F. W., Wu, G. (2016). Amino acids and mammary gland development: nutritional implications for milk production and neonatal growth. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 7(1), 20.
- Rinne, M., Leppä, M. M., Kuoppala, K., Koivunen, E., Kahala, M., Jalava, T., Salminen, J. P., Manni, K. (2020). Fermentation quality of ensiled crimped faba beans using different additives with special attention to changes in bioactive compounds. *Animal Feed Science and Technology*, 114497.
- Riveros E., Argamentería A. (1987). Métodos enzimáticos de la predicción de la digestibilidad in vivo de la materia orgánica de forrajes. I. Forrajes verdes. II. Henos. III. Ensilados y pajas. *Avances en Producción Animal*. 12: 49-75.
- Rochinotti, D. (1998). Model components of forage-fed cattle systems: Energy expenditure of grazing cattle and prediction of intake in dairy cows. Ph.D. Diss., University of Florida, Gainesville.
- Romao, J. M., Jin, W., He, M., McAllister, T. (2012). Altered microRNA expression in bovine subcutaneous and visceral adipose tissues from cattle under different diet. *PloS One*, 7(7), e40605.
- Roy, B., Brahma, B., Ghosh, S., Pankaj, P. K., Mandal, G. (2011). Evaluation of milk urea concentration as useful indicator for dairy herd management: A review. *Asian Journal of Animal Veterinary Advances*, 6(1), 1-19.
- Rychlik, T., Szwengiel, A., Bednarek, M., Arcuri, E., Montet, D., Mayo, B., Nowak, J., Czarnecki, Z. (2017). Application of the PCR-DGGE technique to the fungal community of traditional Wielkopolska fried ripened curd cheese to determine its PGI authenticity. *Food Control*, 73, 1074-1081.
- Salcedo-Díaz, G., Villar-Bonet, A. (2015). Interpretación del contenido de urea en leche. Claves para su minimización en las explotaciones de Cantabria. CIFA, Gobierno de Cantabria, Santander, España. pp. 58.
- Santos, J. E. P. (2002). Feeding for milk composition. In Proc. VI International Congress on Bovine Medicine, Spanish Association of Specialists in Bovine Medicine (ANEMBE), Santiago de Compostela, Spain (pp. 163-172).
- Sharoni, Y., Linnewiel-Hermoni, K., Khanin, M., Salman, H., Veprik, A., Danilenko, M., Levy, J. (2012). Carotenoids and apocarotenoids in cellular signaling related to cancer: a review. *Molecular Nutrition & Food Research*, 56(2), 259-269.
- Schären, M., Jostmeier, S., Ruesink, S., Hüther, L., Frahm, J., Bulang, M., Meyer, U., Rehage, J., Isselstein, J., Breves, G., Dänicke, S. (2016). The effects of a ration change from a total mixed ration to pasture on health and production of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 99(2), 1183-1200.

- Schneider, C. (2005). Chemistry and biology of vitamin E. *Molecular Nutrition & Food Research*, 49(1), 7-30.
- Schwendel, B. H., Wester, T. J., Morel, P. C. H., Tavendale, M. H., Deadman C., Shadbolt N. M., Otter D. E. (2015). Organic and conventionally produced milk- An evaluation of factors influencing milk composition. *Journal of Dairy Science*. 98: 721-746.
- Serrano, E., Mantecón, A. (2003). Bases para un desarrollo ganadero sostenible: la consideración de la producción animal desde una perspectiva sistémica y el estudio de la diversidad de las explotaciones. *Estudios Agrosociales y Pesqueros*, 199: 159-191.
- Shahbazkia, H. R., Aminlari, M., Tavasoli, A., Mohamadnia, A. R., Cravador, A. (2010). Associations among milk production traits and glycosylated haemoglobin in dairy cattle; importance of lactose synthesis potential. *Veterinary Research Communications*, 34(1), 1-9.
- Shingfield, K. J., Wallace, R. J. (2014). Synthesis of conjugated linoleic acid in ruminants and humans.
- Shu, X., Fang, Z., Guan, Y., Chen, X., Loo, J. J., Jia, H., Dong, J., Wang, Y., Zuo, R., Liu, G., Li, X., Li, X. (2020). High levels of fatty acids inhibit β -casein synthesis through suppression of the JAK2/STAT5 and mTOR signaling pathways in mammary epithelial cells of cows with clinical ketosis. *Journal of Dairy Research*, 1-8.
- Silveri, L.; Tilly, G.; Vilotte, J.L.; Le Provost, F. (2006). MicroRNA involvement in mammary gland development and breast cancer. *Reproduction Nutrition Development*, 46, 549–556.
- Simopoulos, A. P. (2013). Dietary omega-3 fatty acid deficiency and high fructose intake in the development of metabolic syndrome, brain metabolic abnormalities, and non-alcoholic fatty liver disease. *Nutrients*, 5(8), 2901-2923.
- Simopoulos, A. P. (2016). An increase in the omega-6/omega-3 fatty acid ratio increases the risk for obesity. *Nutrients*, 8(3), 128.
- Singh, A. K., Bharati, R. C., Pedpati, A. (2013). An assessment of faba bean (*Vicia faba* L.) current status and future prospect. *African Journal of Agricultural Research*, 8(50), 6634-6641.
- Slots, T., Butler, G., Leifert, C., Kristensen, T., Skibsted, L. H., Nielsen, J. H. (2009). Potentials to differentiate milk composition by different feeding strategies. *Journal of Dairy Science*, 92(5), 2057-2066.
- Soder, K. J., Rotz, C. A. (2001). Economic and environmental impact of four levels of concentrate supplementation in grazing dairy herds. *Journal of Dairy Science*, 84(11), 2560-2572.

- Soyeurt, H., Dardenne, P., Gillon, A., Croquet, C., Vanderick, S., Mayeres, P., Bertozzi, C., Gengler, N. (2006). Variation in fatty acid contents of milk and milk fat within and across breeds. *Journal of Dairy Science*. 89: 4858-4865.
- Soyeurt, H., Dehareng, F., Mayeres, P., Bertozzi C., Gengler, N. (2008). Variation of Δ -9 desaturase activity in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*.91: 3211-3224.
- Spitsberg, V. L. (2005). Invited review: Bovine milk fat globule membrane as a potential nutraceutical. *Journal of Dairy Science*, 88(7), 2289-2294.
- Sraïri, M. T., Hamama, A. (2006). Qualité globale du lait cru de vache au Maroc. Transfert de Technologie en Agriculture, Bulletin Mensuel d'Information et de Liaison du PNTA, (137).
- Średnicka-Tober, D., Barański, M., Seal, C. J., Sanderson, R., Benbrook, C., Steinshamn, H., Gromadzka-Ostrowska, J., Rembiałkowska, E., Skwarło-Sońta, K., Eyre, M., Cozzi, G., Larsen, M. K., Jordon, T., Niggli, U., Sakowski, T., Calder, P. C., Burdge, G. C., Sotiraki, S., Stefanakis, A., Stergiadis, S., Yolcu, H., Chatzidimitriou, E., Butler, G., Stewart, G., Leifert, C. (2016). Higher PUFA and n-3 PUFA, conjugated linoleic acid, α -tocopherol and iron, but lower iodine and selenium concentrations in organic milk: a systematic literature review and meta-and redundancy analyses. *British Journal of Nutrition*, 115(6), 1043-1060.
- Spitsberg, V. L. (2005). Invited review: Bovine milk fat globule membrane as a potential nutraceutical. *Journal of Dairy Science*, 88(7), 2289-2294.
- Stahlhut Espinosa, C. E., Slack, F. J. (2006). The role of microRNAs in cancer. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 79(3-4), 131-140.
- Steinfeld, H., Gerber, P., Wassenaar, T., Castel, V., Rosales, M., De Haan, C. (2009). *La larga sombra del ganado: Problemas Ambientales y Opciones*. FAO.
- Steinfeld, H., Mooney, H. A., Schneider, F., Neville, L. E. (Eds.). (2013). *Livestock in a Changing Landscape, Volume 1: Drivers, consequences, and responses*. Island Press.
- Steinshamn, H. (2010). Effect of forage legumes on feed intake, milk production and milk quality—a review. *Animal Science Papers and Reports*, 28(3), 195-206.
- Stergiadis S., Seal C. J., Leifert C., Eyre M. D., Larsen M. K., Butler G. (2013). Variation in nutritionally relevant components in retail Jersey and Guernsey whole milk. *Food Chemistry*. 139: 540-548.
- Stoop W. M., Bovenhuis H., Heck J. M. L., van Arendonk J. A. M. (2009). Effect of lactation stage and energy status on milk fat composition of Holstein-Friesian cows. *Journal of Dairy Science*. 92: 1469-1478.
- Su, K. P., Huang, S. Y., Chiu, T. H., Huang, K. C., Huang, C. L., Chang, H. C., Pariante, C. M. (2008). Omega-3 fatty acids for major depressive disorder during pregnancy: results from a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Journal of Clinical Psychiatry*, 69(4), 644.

- Sukhija, P. S., Palmquist, D. L. (1988). Rapid method for determination of total fatty acid content and composition of feedstuffs and feces. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36(6), 1202-1206.
- Sun, J., Aswath, K., Schroeder, S. G., Lippolis, J. D., Reinhardt, T. A., Sonstegard, T. S. (2015). MicroRNA expression profiles of bovine milk exosomes in response to *Staphylococcus aureus* infection. *BMC Genomics*, 16(1), 1-10.
- Sun, X., Lou, L., Zhong, K., Wan, L. (2017). MicroRNA-451 regulates chemoresistance in renal cell carcinoma by targeting ATF-2 gene. *Experimental Biology and Medicine*, 242(12), 1299-1305.
- Sunarić, S., Živković, J., Pavlović, R., Kocić, G., Trutić, N., Živanović, S. (2012). Assessment of α -tocopherol content in cow and goat milk from the Serbian market. *Hemijaska Industrija*, 66(4), 559-566.
- Surra, J. C., Guada, J. A., Balcells, J., Castrillo, C. (1997). Renal and salivary clearance of purine derivatives in sheep. *Animal Science*, 65: 83-91.
- Sutton, J. D. (1989). Altering milk composition by feeding. *Journal of Dairy Science*, 72(10), 2801-2814.
- Svennersten-Sjaunja, K., Olsson, K. (2005). Endocrinology of milk production. *Domestic Animal Endocrinology*, 29(2), 241-258.
- Swanson, D., Block, R., Mousa, S. A. (2012). Omega-3 fatty acids EPA and DHA: health benefits throughout life. *Advances in Nutrition*, 3(1), 1-7.
- Tanaka, T., Haneda, S., Imakawa, K., Sakai, S., Nagaoka, K. (2009). A microRNA, miR-101a, controls mammary gland development by regulating cyclooxygenase-2 expression. *Differentiation*, 77(2), 181-187.
- Tanaka, T., Shnimizu, M., Moriwaki, H. (2012). Cancer chemoprevention by carotenoids. *Molecules*, 17(3), 3202-3242.
- Tarawali, S. A., Keating, J. D. H., Powell, J. M., Hiernaux, P., Lyasse, O., Sanginga, N. (2004). Integrated natural resource management in West African crop–livestock systems. Sustainable crop–livestock production for improved livelihoods and natural resource management in West Africa. IITA (International Institute of Tropical Agriculture), Ibadan, Nigeria, 349-370.
- Tempesta, T., Vecchiato, D. (2013). An analysis of the territorial factors affecting milk purchase in Italy. *Food Quality and Preference*, 27(1), 35-43.
- Thorsdottir, I., Hill, J., Ramel, A. (2004). Omega-3 fatty acid supply from milk associates with lower type 2 diabetes in men and coronary heart disease in women. *Preventive Medicine*, 39(3), 630-634.
- Tijerina-Sáenz A., Innis S. M., Kitts D. D. (2009) Antioxidant capacity of human milk and its association with vitamins A and E and fatty acid composition. *Acta Paediatrica* 98, 1793-1798.

- Tomé-Carneiro, J., Fernández-Alonso, N., Tomás-Zapico, C., Visioli, F., Iglesias-Gutierrez, E., Dávalos, A. (2018). Breast milk microRNAs harsh journey towards potential effects in infant development and maturation. Lipid encapsulation can help. *Pharmacological Research*, 132, 21-32.
- Tornambé, G., Cornu, A., Pradel, P., Kondjoyan, N., Carnat, A. P., Petit, M., Martin, B. (2006). Changes in terpene content in milk from pasture-fed cows. *Journal of Dairy Science*, 89(6), 2309-2319.
- Trajkovski, M., Hausser, J., Soutschek, J., Bhat, B., Akin, A., Zavolan, M., Heim, M. H., Stoffel, M. (2011). MicroRNAs 103 and 107 regulate insulin sensitivity. *Nature*, 474(7353), 649-653.
- Troegeler-Meynadier, A., Bret-Bennis, L., Enjalbert, F. (2006). Rates and efficiencies of reactions of ruminal biohydrogenation of linoleic acid according to pH and polyunsaturated fatty acids concentrations. *Reproduction Nutrition Development*, 46(6), 713-724.
- Tsabouri, S., Douros, K., N Priftis, K. (2014). Cow's milk allergenicity. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Immune, Endocrine & Metabolic Disorders)*, 14(1), 16-26.
- Tudisco, R., Morittu, V. M., Addi, L., Moniello, G., Grossi, M., Musco, N., Grazioli, R., Mastellone, V., Pero, M. E., Lombardi, P., Infascelli, F. (2019). Influence of pasture on stearoyl-coa desaturase and miRNA 103 expression in goat milk: Preliminary results. *Animals*, 9(9), 606.
- Ungerfeld, E. M., Urrutia, N. L., Váscquez-Montúfar, C., Morales, R. (2019). Factors associated with the content of mammary-synthesized fatty acids in milk fat: A meta-analysis. *Journal of Dairy Science*, 102(5), 4105-4117.
- Vahmani, P., Glover, K. E., Fredeen, A. H. (2014). Effects of pasture versus confinement and marine oil supplementation on the expression of genes involved in lipid metabolism in mammary, liver, and adipose tissues of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 97(7), 4174-4183.
- Valenti, B., Martin, B., Andueza, D., Leroux, C., Labonne, C., Lahalle, F., Larroque, H., Brunschwig, P., Lecomte, C., Brochard, M., Ferlay, A. (2013). Infrared spectroscopic methods for the discrimination of cows' milk according to the feeding system, cow breed and altitude of the dairy farm. *International Dairy Journal*, 32(1), 26-32.
- Van Herwijnen, M. J., Driedonks, T. A., Snoek, B. L., Kroon, A. M., Kleinjan, M., Jorritsma, R., Pieterse, C. M., Nolte-'t Hoen, E. N., Wauben, M. H. (2018). Abundantly present miRNAs in milk-derived extracellular vesicles are conserved between mammals. *Frontiers in Nutrition*, 5, 81.
- Van Hulzen, K. J. E., Sprong, R. C., Van der Meer, R., Van Arendonk, J. A. M. (2009). Genetic and nongenetic variation in concentration of selenium, calcium, potassium, zinc, magnesium, and phosphorus in milk of Dutch Holstein-Friesian cows. *Journal of Dairy Science*, 92(11), 5754-5759.

- Vanbergue, E., Delaby, L., Peyraud, J. L., Colette, S., Gallard, Y., Hurtaud, C. (2017). Effects of breed, feeding system, and lactation stage on milk fat characteristics and spontaneous lipolysis in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 100(6), 4623-4636.
- Vanhatalo A., Kuoppala K., Toivonen V., Shingfield K.J. (2007). Effects of forage species and stage of maturity on bovine milk fatty acid composition. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 108: 856-867.
- Vicente, F. (2002). Informe técnico I. relación entre la concentración de urea en leche y el manejo nutricional del ganado vacuno lechero. Oviedo, SERIDA. KRK Ediciones.
- Vicente, F., Santiago, C., Jiménez-Calderón, J. D., Martínez-Fernández, A. (2017). Capacity of milk composition to identify the feeding system used to feed dairy cows. *Journal of Dairy Research*, 84(3), 254-263.
- Waldner, D. N., Stokes, S. R., Jordan, E. R., Loofer, M. L. (2005). Managing milk composition: normal sources of variation. *Acesso em*, 12.
- Wall, R., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., Stanton, C. (2010). Fatty acids from fish: the anti-inflammatory potential of long-chain omega-3 fatty acids. *Nutrition Reviews*, 68(5), 280-289.
- Wang, Z. C., Lu, H., Zhou, Q., Yu, S. M., Mao, Y. L., Zhang, H. J., Zhang, P. C., Yan, W. J. (2015). MiR-451 inhibits synovial fibroblasts proliferation and inflammatory cytokines secretion in rheumatoid arthritis through mediating p38MAPK signaling pathway. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 8(11), 14562.
- Watson, C. A., Reckling, M., Preissel, S., Bachinger, J., Bergkvist, G., Kuhlman, T., Lindström, K., Nemecek, T., Topp, C. F., Vanhatalo, A., Zander, P., Murphy-Bokern, D., Stoddard, F. L. (2017). Grain legume production and use in European agricultural systems. In *Advances in Agronomy* (Vol. 144, pp. 235-303). Academic Press.
- Weber, J. A., Baxter, D. H., Zhang, S., Huang, D. Y., How Huang, K., Jen Lee, M., Galas, D. J., Wang, K. (2010). The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clinical Chemistry*, 56(11), 1733-1741.
- Weisbjerg, M. R., Søgaard, K. (2008). Feeding value of legumes and grasses at different harvest times. In *Biodiversity and animal feed: future challenges for grassland production. Proceedings of the 22nd General Meeting of the European Grassland Federation, Uppsala, Sweden, 9-12 June 2008* (pp. 513-515). Swedish University of Agricultural Sciences.
- Westwood, C. T., Lean, I. J., Kellaway, R. C. (1998). Indications and implications for testing of milk urea in dairy cattle: a quantitative review. Part 1. Dietary protein sources and metabolism. *New Zealand Veterinary Journal*, 46(3), 87-96.

- Willcox, J. K., Ash, S. L., Catignani, G. L. (2004). Antioxidants and prevention of chronic disease. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(4), 275-295.
- Williams, A. E. (2008). Functional aspects of animal microRNAs. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(4), 545.
- Wittwer F.G, Gallardo P., Reyes J., Opitz H. (1999). Bulk milk urea concentrations and their relationship with cow fertility in grazing dairy herds in Southern Chile. *Preventive Veterinary Medicine*, 38: 159-166.
- Yang, B., Chen, H., Stanton, C., Ross, R. P., Zhang, H., Chen, Y. Q., Chen, W. (2015). Review of the roles of conjugated linoleic acid in health and disease. *Journal of Functional Foods*, 15, 314-325.
- Yassin, A. M., Abdel Hamid, M. I., Farid, O. A., Amer, H., Warda, M. (2016). Dromedary milk exosomes as mammary transcriptome nano-vehicle: Their isolation, vesicular and phospholipidomic characterizations. *Journal of Advanced Research*, 7(5), 749–756.
- Zempleni, J. (2017). Milk exosomes: beyond dietary microRNAs. *Genes & Nutrition*, 12(1), 12.
- Zempleni, J., Aguilar-Lozano, A., Sadri, M., Sukreet, S., Manca, S., Wu, D., Zhou, F., Mutai, E. (2017). Biological activities of extracellular vesicles and their cargos from bovine and human milk in humans and implications for infants. *The Journal of Nutrition*, 147(1), 3-10.
- Zempleni, J., Baier, S. R., Howard, K. M., Cui, J. (2015). Gene regulation by dietary microRNAs. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 93(12), 1097-1102.
- Zempleni, J., Sukreet, S., Zhou, F., Wu, D., Mutai, E. (2019). Milk-derived exosomes and metabolic regulation. *Annual Review of Animal Biosciences*, 7, 245-262.
- Zhou, Q., Li, M., Wang, X., Li, Q., Wang, T., Zhu, Q., Zhou, X., Wang, X., Gao, X., Li, X. (2012). Immune-related microRNAs are abundant in breast milk exosomes. *International Journal of Biological Sciences*, 8(1), 118.
- Zhu, H. X., Shi, L., Zhang, Y., Zhu, Y. C., Bai, C. X., Wang, X. D., Zhou, J. B. (2017). Myocyte enhancer factor 2D provides a cross-talk between chronic inflammation and lung cancer. *Journal of Translational Medicine*, 15(1), 65.

CAPITULO 9

Producción científica.

9. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

9.1. ARTÍCULOS EN REVISTAS SCI

De La Torre-Santos, S.; Royo, L.J.; Martínez-Fernández, A.; Chocarro, C.; Vicente, F. The Mode of Grass Supply to Dairy Cows Impacts on Fatty Acid and Antioxidant Profile of Milk. *Foods* 2020, 9, 1256.

The Mode of Grass Supply to Dairy Cows Impacts on Fatty Acid and Antioxidant Profile of Milk

Senén De La Torre-Santos¹, Luis J. Royo¹, Adela Martínez-Fernández¹, Cristina Chocarro² and Fernando Vicente^{1,*}

¹Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA), Carretera AS-267, PK. 19, Villaviciosa, 33300 Asturias, Spain; senendelatorre@gmail.com (S.D.L.T.-S.); lroyo@serida.org (L.J.R.); admartinez@serida.org (A.M.-F.)

²ETSEA, Universitat de Lleida, C/Rovira Roure 177, 25198 Lleida, Spain; cristina.chocarro@udl.cat

* Correspondence: fvicente@serida.org

Abstract: The optimization of milk production includes a rational use of forages, respect for the environment and offers the best quality to consumers. Milk production based on grass and forages produces healthier milk and it is widely spread throughout the Atlantic arc to maximize milk yield per hectare. However, the mode of offering the grass can have a major influence on milk composition. The aim of this study was to evaluate the effect of grass supply mode (grazing, zero-grazing or ensiling) on dairy cows' performance, with particular reference to fatty acids and fat-soluble antioxidants concentration. A three by three Latin square experiment was performed with 18 dairy cows. Experimental treatments consisted of exclusive feeding with grass silage and zero-grazing, both offered ad libitum indoors, or grazing for 24 h. The results showed that grazing cows had a higher dry matter intake and greater milk yield than cows feeding on grass silage and zero-grazing, as well as higher concentrations of protein, lactose, nonfat-solids and urea in milk than housed cows. Milk fat from grazing cows had a higher proportion of unsaturated fatty acids than from cows feeding on grass silage and zero-grazing, with significant differences in the proportion of vaccenic and rumenic acids. The 18:1 trans-11 to 18:1 trans-10 ratio is proposed as biomarker to identify the milk produced from the management system of grazing cattle. Milk from grazing cows had a greater proportion of lutein than cows eating grass silage, with the zero-grazing system having intermediate values. In conclusion, the mode of grass supply affects fatty acid and antioxidant profiles of milk.

Keywords: grass silage; zero-grazing; grazing; milk; antioxidants; fatty acids

9.2. COMUNICACIONES A CONGRESOS

9.2.1. Congresos Internacionales

De La Torre S., Vicente F. and Royo L. (2018). Dairy cows eating grass produce milk with a higher proportion of fat-soluble antioxidants. 27th General Meeting of the European Grassland Federation. Del 17 al 21 de junio de 2018. Cork, Irlanda. En: B. Horan et al. (eds.) Sustainable meat and milk production from grasslands. pp. 422-424. Póster.

De La Torre S., Vicente F., Martínez-Fernández A. and Royo L. (2020). Effect of silage type and combination with grazing on antioxidants profile of cow milk. 28th General Meeting of the European Grassland Federation. Del 19 al 21 de octubre de 2020. Helsinki, Finlandia. En: Meeting the future demands for grassland production Grassland Science in Europe, volume 25. pp. 234-236.

L. Abou el Qassim, L.J. Royo, A. Martínez-Fernández, A. Soldado, S. de la Torre, S. Forcada, S. Baizán, and F. Vicente. (2020). Is possible to certify raw milk from grass-fed cows using miRNA? 28th General Meeting of the European Grassland Federation. Del 19 al 21 de octubre de 2020. Helsinki, Finlandia. En: Meeting the future demands for grassland production Grassland Science in Europe, volume 25. pp. 212-214.

Sánchez-Vera A., Martínez-Fernández A., Elouadaf D., De La Torre S., Soldado A. and Vicente F. (2020). Effect of legume silage in the diet of dairy cows on the slurry composition to be used as fertilizer. 28th General Meeting of the European Grassland Federation. Del 19 al 21 de octubre de 2020. Helsinki, Finlandia. En: Meeting the future demands for grassland production Grassland Science in Europe, volume 25. pp. 550-552.

9.2.2. Congresos Nacionales

De La Torre S., Vicente F. and Royo L. (2018). Influencia del modo de aporte de la hierba sobre el perfil de ácidos grasos de la leche de vaca. 57ª Reunión Científica de la Sociedad Española de Pastos. Del 25 al 29 de junio de 2018. Teruel, España. En: Conectando Tradición e Innovación. Pastoralismo y Vías Pecuarias. Libro de resúmenes. pp. 21.

Abou el Qassim L., Vicente F., De La Torre S., Jiménez-Calderón JD., Baizán S., Soldado A., Martínez-Fernández A., and Royo L. (2018). ¿Es posible certificar la leche producida en ecológico utilizando microARN?. XIX Reunión Nacional de Mejora Genética Animal. Del 14 al 15 de junio de 2018. León, España.

S. De La Torre-Santos, Vicente F., Martínez-Fernández A. and Royo L. (2019). Influencia del tipo de ensilado sobre el perfil de ácidos grasos de la leche de vaca. XVIII Jornadas sobre Producción Animal, AIDA. Del 7 al 8 de mayo de 2019. Zaragoza, España. En: Actas de las XVIII Jornadas sobre Producción Animal. pp. 200-202.

Fernando Vicente, Adela Martínez-Fernández, Luis J. Royo, Ana Soldado, Rocío Rosa, Silvia Baizán, José D. Jiménez-Calderón, Loubna Abou el Qassim, Senén De La Torre-Santos, Sergio Forcada, Douâa Elouadaf, Alejandra Sánchez-Vera. (2020). La composición del purín utilizado como fertilizante orgánico está influenciada por el origen y el nivel de la proteína de la ración. VIII Workshop Remedia. Del 22 al 23 de septiembre de 2020. En: Economía circular como catalizador de la sostenibilidad medioambiental del sector primario español. Libro de Abstracts VIII REMEDIA WORKSHOP. pp. 85.

9.2.3. Artículos Divulgativos

De La Torre S., Abou el Qassim L., Vicente F., and Royo L. (2018). Antioxidantes y ácidos grasos en la leche de vaca según el tipo de alimentación. Tecnología Agroalimentaria (SERIDA), volumen 20. pp. 2-9.