



**CSIC**  
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



Instituto de Ganadería de Montaña (IGM)

SUPLEMENTACIÓN DE LA DIETA DE OVEJAS LECHERAS  
CON TANINOS O LÍPIDOS MARINOS: EFECTO SOBRE LA  
BIOHIDROGENACIÓN Y EL MICROBIOMA BACTERIANO  
RUMINAL, Y LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE  
LA LIPOGÉNESIS MAMARIA

David Carreño Yugueros

Diciembre 2017



SUPLEMENTACIÓN DE LA DIETA DE OVEJAS LECHERAS CON TANINOS O  
LÍPIDOS MARINOS: EFECTO SOBRE LA BIOHIDROGENACIÓN Y EL  
MICROBIOMA BACTERIANO RUMINAL, Y LA REGULACIÓN  
TRANSCRIPCIONAL DE LA LIPOGÉNESIS MAMARIA

*DIET SUPPLEMENTATION WITH TANNINS OR MARINE LIPIDS IN DAIRY  
SHEEP: EFFECT ON RUMINAL BIOHIDROGENATION AND BACTERIAL  
MICROBIOME, AND TRANSCRIPTIONAL REGULATION OF MAMMARY  
LIPOGENESIS*

Memoria de Tesis Doctoral presentada por

David Carreño Yugueros

dirigida por

Dra. Pilar de Frutos Fernández

y Dr. Gonzalo Hervás Angulo

para acceder al grado de Doctor, dentro del programa de Doctorado  
"Ciencias Veterinarias y de los Alimentos" de la Universidad de León.

León, diciembre de 2017



El autor de esta memoria ha disfrutado de una ayuda del Programa de Formación de Personal Investigador (FPI; BES-2012-054972) del Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO).

El MINECO, a través de los Proyectos AGL2011-23700 y AGL2014-54587 (cofinanciado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional), ha aportado la mayor parte de la financiación necesaria para llevar a cabo los trabajos que componen esta memoria. La Junta de Castilla y León también ha contribuido gracias al Proyecto CSI023U13.



Deseo expresar mi agradecimiento a todas las personas e instituciones que han puesto a nuestra disposición sus conocimientos y los medios necesarios para la realización de este trabajo.





## **CONTENIDOS**



# ÍNDICE

	Página
CONTENIDOS .....	i
<b>Índice</b> .....	iii
<b>Índice en inglés (Index)</b> .....	vii
<b>Abreviaciones</b> .....	xi
<b>Abreviaciones en inglés (Abbreviations)</b> .....	xiii
RESUMEN .....	1
RESUMEN EN INGLÉS ( <i>Summary</i> ).....	9
INTRODUCCIÓN .....	15
<b>Planteamiento de la tesis</b> .....	17
<b>Referencias</b> .....	21
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	25
<b>1. Origen de los lípidos de la leche de los rumiantes</b> .....	27
1.1. Metabolismo lipídico en el rumen.....	27
1.1.1. Microorganismos ruminales implicados en el metabolismo lipídico ruminal.....	29
1.1.2. Procesos metabólicos .....	35
1.2. Síntesis de lípidos en la glándula mamaria .....	40
1.2.1. Síntesis de ácidos grasos de novo .....	41
1.2.2. Captación de ácidos grasos circulantes en el torrente sanguíneo .....	43
1.2.3. Desaturación de los ácidos grasos .....	44
1.2.4. Esterificación de los ácidos grasos .....	45
1.2.5. Síntesis y secreción del glóbulo graso .....	45
1.2.6. Factores de transcripción implicados en la regulación nutricional de la lipogénesis mamaria .....	46
<b>2. Efecto de la alimentación sobre la composición de la grasa de la leche</b> .....	50
2.1. Efecto de la suplementación de la dieta con taninos.....	51
2.2. Efecto de la suplementación de la dieta con aceites vegetales .....	54
2.3. Efecto de la suplementación de la dieta con lípidos de origen marino.....	55
<b>3. Síndrome de baja grasa en la leche</b> .....	57
3.1. La teoría de la biohidrogenación .....	59
3.2. Regulación de la fluidez de la grasa láctea .....	61
3.3. Regulación transcripcional de la lipogénesis mamaria.....	62
<b>4. Referencias</b> .....	64

<b>PRUEBA I – Capacidad in vitro de diferentes tipos y dosis de extractos de taninos para modular la biohidrogenación ruminal de ovejas .....</b>	<b>81</b>
<b>Resumen .....</b>	<b>83</b>
<b>1. Introducción .....</b>	<b>84</b>
<b>2. Materiales y métodos .....</b>	<b>86</b>
2.1. Animales, dietas y taninos .....	86
2.2. Experimentos in vitro .....	87
2.2.1. Experimento 1 .....	87
2.2.2. Experimento 2 .....	88
2.3. Análisis químicos .....	89
2.4. Extracción de ADN y análisis mediante T-RFLP .....	90
2.5. Cálculos y análisis estadísticos .....	91
<b>3. Resultados .....</b>	<b>92</b>
3.1. Perfil de ácidos grasos de la digesta ruminal (Experimento 1) .....	92
3.2. Fermentación ruminal y comunidad bacteriana (Experimento 2) .....	98
<b>4. Discusión .....</b>	<b>100</b>
<b>5. Conclusiones .....</b>	<b>104</b>
<b>6. Referencias .....</b>	<b>104</b>
<b>PRUEBA II – Efecto de la adición de EPA, DPA y DHA a la dieta sobre el microbioma bacteriano ruminal de vacas y ovejas. Comparación in vitro .....</b>	<b>109</b>
<b>Resumen .....</b>	<b>111</b>
<b>1. Introducción .....</b>	<b>112</b>
<b>2. Materiales y métodos .....</b>	<b>114</b>
2.1. Animales y dietas .....	114
2.2. Cultivos no renovados de microorganismos ruminales .....	116
2.3. Secuenciación masiva mediante la plataforma <i>Ion Torrent</i> .....	117
2.3.1. Extracción de ADN y cuantificación .....	117
2.3.2. Amplificación por PCR y purificación .....	117
2.3.3. Preparación de la librería de ADN y secuenciación en <i>Ion Torrent</i> .....	118
2.4. Análisis estadístico .....	119
<b>3. Resultados y discusión .....</b>	<b>120</b>
<b>4. Conclusiones .....</b>	<b>137</b>
<b>5. Referencias .....</b>	<b>138</b>

<b>PRUEBA III – Represión de los genes implicados en la lipogénesis mamaria en el síndrome de baja grasa en la leche inducido por el consumo de aceite de pescado en ovejas lecheras.....</b>	<b>143</b>
<b>Resumen.....</b>	<b>145</b>
<b>1. Introducción.....</b>	<b>146</b>
<b>2. Materiales y métodos.....</b>	<b>147</b>
2.1. Animales, dietas experimentales y manejo.....	147
2.2. Medidas y recogida de muestras.....	148
2.2.1. Dietas.....	148
2.2.2. Leche.....	148
2.2.3. Biopsias.....	149
2.3. Análisis de laboratorio.....	150
2.3.1. Dietas.....	150
2.3.2. Leche.....	151
2.3.3. Tejido mamario. Aislamiento de ARN y PCR cuantitativa.....	151
2.4. Análisis estadísticos.....	152
<b>3. Resultados.....</b>	<b>154</b>
3.1. Rendimiento productivo y composición de la leche.....	154
3.2. Composición de ácidos grasos de la leche.....	154
3.3. Abundancias de ARNm de los genes candidatos.....	158
<b>4. Discusión.....</b>	<b>159</b>
<b>5. Conclusiones.....</b>	<b>166</b>
<b>6. Referencias.....</b>	<b>167</b>
<b>7. Material suplementario.....</b>	<b>171</b>
<b>DISCUSIÓN GENERAL.....</b>	<b>179</b>
<b>Referencias.....</b>	<b>185</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>189</b>
<b>CONCLUSIONES EN INGLÉS (CONCLUSIONS).....</b>	<b>193</b>



# INDEX

	Page
CONTENTS.....	i
<b>Index in Spanish</b> .....	iii
<b>Index</b> .....	vii
<b>Abbreviations in Spanish</b> .....	xi
<b>Abbreviations</b> .....	xiii
SUMMARY IN SPANISH.....	1
SUMMARY.....	9
INTRODUCTION .....	15
<b>Outline of the thesis</b> .....	17
<b>References</b> .....	21
LITERATURE REVIEW .....	25
<b>1. Origin in ruminants milk lipids</b> .....	27
1.1. Rumen lipid metabolism .....	27
1.1.1. Rumen microorganisms involved in ruminal lipid metabolism .....	29
1.1.2. Metabolic processes.....	35
1.2. Lipids synthesis in the mammary gland .....	40
1.2.1. <i>De novo</i> fatty acid synthesis .....	41
1.2.2. Uptake of plasma fatty acids .....	43
1.2.3. Desaturation of fatty acids .....	44
1.2.4. Esterification of fatty acids .....	45
1.2.5. Synthesis and secretion of milk fat globules .....	45
1.2.6. Transcription factors involved in the nutritional regulation of mammary lipogenesis.....	46
<b>2. Effect of feeding on milk fat composition</b> .....	50
2.1. Effect of diet supplementation with tannins.....	51
2.2. Effect of diet supplementation with plant oils .....	54
2.3. Effect of diet supplementation with marine lipids.....	55
<b>3. Milk fat depression</b> .....	57
3.1. Biohydrogenation theory.....	59
3.2. Milk fat fluidity regulation.....	61
3.3. Transcriptional regulation of mammary lipogenesis.....	62
<b>4. References</b> .....	64

<b>TRIAL I – Ability of different types and doses of tannin extracts to modulate <i>in vitro</i> ruminal biohydrogenation in sheep</b> .....	81
<b>Abstract</b> .....	83
<b>1. Introduction</b> .....	84
<b>2. Materials and methods</b> .....	86
2.1. Animals, diet and tannins .....	86
2.2. <i>In vitro</i> experiments .....	87
2.2.1. Experiment 1 .....	87
2.2.2. Experiment 2 .....	88
2.3. Chemical analysis .....	89
2.4. DNA extraction and T-RFLP analysis .....	90
2.5. Calculations and statistical analysis .....	91
<b>3. Results</b> .....	92
3.1. FA composition of ruminal digesta (Experiment 1) .....	92
3.2. Rumen fermentation and bacterial community (Experiment 2) .....	98
<b>4. Discussion</b> .....	100
<b>5. Conclusions</b> .....	104
<b>6. References</b> .....	104
<b>TRIAL II –Effect of EPA, DPA and DHA dietary addition on rumen bacterial microbiome of cows and ewes. <i>In vitro</i> Comparison.</b> .....	109
<b>Abstract</b> .....	111
<b>1. Introduction</b> .....	112
<b>2. Materials and methods</b> .....	114
2.1. Animals and diets .....	114
2.2. Batch cultures of rumen microorganisms .....	116
2.3. Ion Torrent Next Generation sequencing .....	117
2.3.1. DNA extraction and quantification .....	117
2.3.2. PCR amplification and purification .....	117
2.3.3. Amplicon pooled libraries preparation and Ion Torrent sequencing .....	118
2.4. Statistical analysis .....	119
<b>3. Results and discussion</b> .....	120
<b>4. Conclusions</b> .....	137
<b>5. References</b> .....	138



---

<b>TRIAL III – Fish oil-induced milk fat depression and associated downregulation of mammary lipogenic genes in dairy ewes .....</b>	<b>143</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>145</b>
<b>1. Introduction .....</b>	<b>146</b>
<b>2. Materials and methods .....</b>	<b>147</b>
2.1. Animals, experimental diets and management.....	147
2.2. Measurements and sampling procedures .....	148
2.2.1. Diets.....	148
2.2.2. Milk.....	148
2.2.3. Biopsies.....	149
2.3. Laboratory Analysis.....	150
2.3.1. Diets.....	150
2.3.2. Milk.....	151
2.3.3. Mammary tissue, RNA isolation and quantitative PCR. ....	151
2.4. Statistical analysis .....	152
<b>3. Results.....</b>	<b>154</b>
3.1. Animal performance and milk composition.....	154
3.2. Milk fatty acid composition .....	154
3.3. mRNA abundance of candidate genes .....	158
<b>4. Discussion .....</b>	<b>159</b>
<b>5. Conclusions.....</b>	<b>166</b>
<b>6. References .....</b>	<b>167</b>
<b>7. Supplementary material.....</b>	<b>171</b>
<b>GENERAL DISCUSSION .....</b>	<b>179</b>
<b>References .....</b>	<b>185</b>
<b>CONCLUSIONS IN SPANISH .....</b>	<b>189</b>
<b>CONCLUSIONS.....</b>	<b>193</b>



## ABREVIACIONES

ADN.....	ácido desoxirribonucleico
AG.....	ácido graso
AGV .....	ácidos grasos volátiles
ARN .....	ácido ribonucleico
ARNm.....	ácido ribonucleico mensajero
ARNr.....	ácido ribonucleico ribosómico
BH .....	biohidrogenación
CLA.....	ácido linoleico conjugado
DHA.....	ácido docosahexaenoico
DPA.....	ácido docosapentaenoico
EPA .....	ácido eicosapentaenoico
eed.....	error estándar de la diferencia
EDTA .....	ácido etilendiaminotetraacético
FAD.....	fibra ácido detergente
FND.....	fibra neutro detergente
LA.....	ácido linoleico
LNA .....	ácido linolénico
MFD .....	síndrome de baja grasa en la leche
MS .....	materia seca
NGS.....	secuenciación de nueva generación
OA.....	ácido oleico
OTU .....	unidades taxonómicas operacionales
P.....	probabilidad
PCoA.....	análisis de las coordenadas principales
PCR .....	reacción en cadena de la polimerasa
PUFA .....	ácidos grasos poliinsaturados
PV .....	peso vivo
RA .....	ácido ruménico
SA.....	ácido esteárico
SCD .....	estearoil-CoA desaturasa o $\Delta^9$ -desaturasa
S. Obs.....	especies observadas
Sp.....	especie (Prueba II)
spp.....	especies (Revisión bibliográfica)
Tto .....	tratamiento (Prueba II)
TAE .....	disolución tampón de Tris-acetato-EDTA
TC.....	taninos condensados
TG.....	triglicéridos
TH .....	taninos hidrolizables
TMR .....	ración completa mezclada
T-RFLP.....	polimorfismo de la longitud de los fragmentos terminales de restricción
UFA.....	ácido graso monoinsaturado
VA.....	ácido vaccénico
VLDL .....	lipoproteínas de muy baja densidad



## ABBREVIATIONS

A	.....	cumulative gas production
ADF	.....	acid detergent fibre
AFR	.....	average fermentation rate
BCFA	.....	branched-chain fatty acids
BH	.....	biohydrogenation
BW	.....	body weight
<i>c</i>	.....	fractional fermentation rate
CHE	.....	chestnut
CLA	.....	conjugated linoleic acid
CP	.....	crude protein
d	.....	day
D	.....	diet (Trial III)
DIM	.....	days in milk
DM	.....	dry matter
DMD	.....	dry matter disappearance
DMI	.....	dry matter intake
DNA	.....	deoxyribonucleic acid
ED	.....	extent of degradation in the rumen
FA	.....	fatty acid
FAME	.....	fatty acid methyl esters
FO	.....	fish oil
GC	.....	gas chromatography
GC-MS	.....	gas chromatography-mass spectrometry
GRA	.....	grape
<i>iv</i> TSD	.....	<i>in vitro</i> true substrate digestibility
MFD	.....	milk fat depression
NDF	.....	neutral detergent fibre
ns	.....	non-significant
OBCFA	.....	odd- and branched-chain fatty acids
OM	.....	organic matter
P	.....	probability
PCR	.....	polymerase chain reaction
PUFA	.....	polyunsaturated fatty acids
QUE	.....	quebracho
qPCR	.....	quantitative polymerase chain reaction
RNA	.....	ribonucleic acid
RT-qPCR	.....	reverse transcription quantitative polymerase chain reaction
SED	.....	standard error of the difference
SEM	.....	standard error of the mean
T	.....	time (Trial III)
TMR	.....	total mixed ration
T-RF	.....	terminal restriction fragment
T-RFLP	.....	terminal restriction fragment length polymorphism
VFA	.....	volatile fatty acids



## RESUMEN





Debido a la creciente demanda de alimentos saludables por parte de los consumidores, el estudio del metabolismo lipídico en el rumen y la glándula mamaria de los rumiantes de aptitud lechera ha cobrado una especial relevancia en las últimas décadas. No obstante, la información en pequeños rumiantes es aún escasa, a pesar de que el consumo de productos lácteos derivados de ovino y caprino es destacable y continúa aumentando con el tiempo.

Diversos estudios han mostrado que la calidad nutricional de la leche, y más concretamente su perfil lipídico, puede mejorarse de forma natural y efectiva mediante cambios en la alimentación del ganado. En este sentido, algunos trabajos han propuesto la adición de taninos o lípidos marinos a la dieta de rumiantes para inhibir el último paso de la biohidrogenación ruminal (BH) y permitir así una mayor acumulación de *trans*-11 18:1 que servirá de sustrato para la síntesis en la glándula mamaria del *cis*-9 *trans*-11 ácido linoleico conjugado (CLA) que aparecerá después en la leche.

Existe una importante controversia en la literatura sobre la capacidad de los taninos para modular la BH y, consecuentemente, el perfil lipídico de los productos derivados de rumiantes (e. g., leche), lo que podría estar relacionado con el tipo y dosis de tanino utilizado en cada estudio.

Por ello, en la primera prueba de esta tesis (Prueba I) se estudió el efecto de cuatro extractos de taninos comerciales (quebracho, uva, roble y castaño) a cuatro dosis (2, 4, 6 y 8% MS) con el objetivo de seleccionar un tratamiento capaz de modular la BH de los ácidos grasos (AG) insaturados de la dieta, sin afectar negativamente a la fermentación ruminal. Se llevaron a cabo dos ensayos *in vitro* mediante cultivos no renovados de microorganismos ruminales, utilizando ovejas canuladas como donantes de inóculo. En ambos, el sustrato de incubación, similar a la dieta ofertada a los animales (TMR; 50:50), se suplementó con aceite de girasol al 2% MS. El primero de los ensayos siguió un diseño 4 x 4 + 1 (i. e., 4 tipos de taninos x 4 dosis de cada uno de ellos + 1 control). El efecto del tratamiento sobre el perfil lipídico del contenido ruminal se analizó mediante cromatografía de gases. A partir de sus resultados, se realizó un segundo ensayo para asegurar que

la dosis y el tipo seleccionado no afectaría negativamente a la fermentación ruminal. Para ello, se analizó el impacto sobre la cinética de producción de gas, extensión de la degradación, digestibilidad verdadera in vitro, pH, concentraciones de amoníaco y ácidos grasos volátiles, así como sobre la comunidad bacteriana (mediante T-RFLP). Los datos mostraron que todos los tipos y dosis de taninos analizados son capaces de modular la BH in vitro de los AG insaturados de la dieta. Sin embargo, la alta dosis requerida en algunos casos podría anular su uso en condiciones reales de explotación. El extracto de roble a una dosis práctica (2% MS) permitió aumentar la concentración en el rumen de 18:3 n-3, 18:2 n-6, *trans*-11 18:1 y PUFA totales, y reducir la de *trans*-10 18:1 y 18:0, sin afectar negativamente a los parámetros de fermentación ruminal estudiados. Tampoco se observaron cambios relevantes sobre la estructura y diversidad de la comunidad bacteriana, pero sí se vieron afectados algunos fragmentos terminales de restricción compatibles con especies no cultivadas de la familia *Lachnospiraceae*. Aunque los resultados de este trabajo señalan que la utilización del extracto de taninos de roble podría ser una estrategia nutricional prometedora, son necesarios más estudios que permitan examinar si estos efectos positivos son extrapolables a condiciones in vivo.

La suplementación de la dieta de rumiantes de aptitud lechera con lípidos marinos es otra estrategia eficaz para aumentar el contenido en la leche de algunos AG insaturados con propiedades bioactivas, debido principalmente al potente efecto inhibitor de los PUFA n-3 de cadena muy larga sobre el último paso de la BH en el rumen. Sin embargo, el efecto individual de estos PUFA no ha sido apenas estudiado y se desconoce todavía qué bacterias ruminales estarían implicadas en el proceso de BH. Con el objetivo de estudiar el impacto de la adición de ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido docosapentaenoico (DPA) y ácido docosahexaenoico (DHA), al 2% MS, sobre la comunidad bacteriana del rumen, se llevó a cabo un ensayo in vitro (Prueba II) mediante cultivos no renovados de microorganismos ruminales. Además, dado que podrían existir importantes diferencias interespecíficas en relación al metabolismo lipídico en animales

rumiantes, un segundo objetivo fue comparar la respuesta a los PUFA n-3 tras 24 h de incubación con inóculos procedentes de vacas y ovejas canuladas. El efecto de los tratamientos sobre el microbioma bacteriano se analizó mediante la plataforma de secuenciación masiva de última generación *Ion Torrent*. El dendrograma y el Análisis de Coordenadas Principales (PCoA), basados en las distancias Bray-curtis, mostraron una marcada separación de las dos especies de rumiantes y de los tratamientos PUFA n-3. La estructura de la comunidad bacteriana del rumen de ovejas y vacas se vio claramente afectada al suplementar la dieta con EPA y DHA. En cambio, el DPA no ocasionó una respuesta relevante en el ovino y en el vacuno esta fue menor que la observada con EPA y DHA, lo que sugiere una menor contribución de este PUFA n-3 al efecto global de los lípidos marinos. En relación a la composición de la comunidad bacteriana del rumen, la adición de EPA, DPA y DHA dio lugar a cambios relevantes en la abundancia relativa de diversos filos, familias y géneros de bacterias potencialmente relacionados con la BH ruminal, como *Anaerovorax*, *Barnesiella*, *Butyrivibrio*, *Prevotella*, *Ruminobacter*, *Ruminococcus* y *Succinivibrio*. Aunque la mayoría de los cambios debidos a estos PUFA fueron comparables en vacuno y en ovino, se observaron algunas diferencias entre ambas especies de rumiantes. Por ejemplo, la abundancia relativa de *Hallella*, *Megasphaera*, *Phocaeicola*, *Ruminococcus*, *Ruminobacter* y *Tannerella* únicamente se vio afectada en vacuno, mientras que la de *Oscillibacter* y *Paraprevotella* solo lo hizo en ovino. Los resultados de esta prueba muestran también la complejidad del ecosistema microbiano en rumiantes y subrayan la necesidad de profundizar en su estudio para conocer qué poblaciones bacterianas estarían verdaderamente implicadas en la BH ruminal en vacas y ovejas.

Además de estos estudios sobre el efecto de moduladores de la BH del rumen, se llevó a cabo una última prueba experimental de nutrigenómica (Prueba III) centrada en el metabolismo lipídico en la glándula mamaria. La suplementación de la dieta de rumiantes con lípidos de origen marino puede afectar negativamente al rendimiento productivo de los animales al causar el denominado síndrome de baja grasa en la leche (MFD). En el ganado vacuno se ha

observado una clara relación entre la MFD y la represión de varios genes implicados en el metabolismo lipídico en la glándula mamaria debida a algunos componentes de la dieta. En cambio, en pequeños rumiantes la información es aún muy escasa e inconsistente.

Con el fin de esclarecer esta relación en ovejas lecheras, se planteó la tercera prueba para estudiar el efecto de la suplementación de la dieta con lípidos marinos sobre el perfil lipídico de la leche y la abundancia de ARNm de los principales genes implicados en la lipogénesis mamaria. Para ello, doce ovejas en lactación fueron divididas en dos grupos, que recibieron una TMR (50:50) sin suplementar (Control) o suplementada con aceite de pescado (FO) al 1,7% MS. El perfil de AG de la leche y la abundancia de ARNm de los genes candidatos, cuantificada a partir de muestras de tejido glandular mamario obtenidas mediante biopsia, se analizaron en tres momentos diferentes: antes del inicio del ensayo, tras una semana de consumo de la dieta FO y al final del periodo experimental (transcurrido un mes). Como era de esperar, la suplementación con FO modificó el perfil de AG de la leche e indujo MFD. Las reducciones en el porcentaje y la producción de grasa láctea no se detectaron durante la primera semana, pero al cabo de un mes alcanzaron un 25 y 22%, respectivamente, en comparación con el Control. Sin embargo, a los 7 días ya se observaron en el grupo FO incrementos en la concentración de algunos AG con posible o demostrado efecto antilipogénico (e. g., *trans*-10, *cis*-12 y *trans*-9, *cis*-11 18:2, *cis*-9 16:1, *cis*-11 18:1 y cetoácidos) que se mantuvieron estables hasta el final del experimento. Estos cambios estuvieron acompañados de la reducción en la abundancia de ARNm de genes que codifican enzimas lipogénicas. La naturaleza coordinada de la represión génica afectó a la mayor parte de las vías metabólicas implicadas en la lipogénesis mamaria. Entre ellas, podrían señalarse la activación de ácidos grasos (*ACSS1*), síntesis de novo (*ACACA* y *FASN*), captación y transporte (*LPL* y *FABP3*), desaturación (*SCD1*) y esterificación (*AGPAT6*), lo que podría indicar la existencia de un regulador central de la síntesis de grasa en la glándula mamaria. Sin descartar la posible contribución de otros factores de transcripción, como *PPARG*, los resultados

---

sugieren que *SREBF1* podría jugar un papel relevante en el desarrollo de la depresión de la grasa láctea inducida por lípidos marinos en el ovino de leche. Del resto de factores de transcripción estudiados, *INSIG1* podría estar relacionado con la represión de *SREBF1*, mientras que *SCAP* o *THRSP* no se vieron afectados por la suplementación con FO, como tampoco lo hizo la abundancia de ARNm de otros genes candidatos, como *CD36*, *GPAM*, *DGAT1*, *LPIN1* y *XDH*. En general, los resultados secundan la posible relación entre los cambios en la concentración de algunos AG potencialmente antilipógenicos y la abundancia de ARNm de los genes candidatos estudiados, y sugieren que la MFD inducida por el consumo de lípidos marinos en ovejas lecheras estaría mediada por mecanismos de regulación transcripcional.

En conjunto, los resultados de la tesis doctoral ponen de manifiesto la complejidad de los factores implicados en la regulación nutricional del metabolismo lipídico en el rumen y en la glándula mamaria. Además, subrayan la importancia de continuar esta línea de investigación con el objetivo final de desarrollar estrategias nutricionales que mejoren el perfil lipídico de la leche de oveja sin afectar negativamente al rendimiento productivo de los animales.



## **SUMMARY**





Due to consumers' demands for healthier food, research in ruminal and mammary gland lipid metabolism has gained special relevance during the last decades. However, the information available in small ruminants is still scarce, despite the fact that the consumption of dairy products derived from ewes and goats is remarkable and continues to increase over time.

Several studies have reported that the nutritional quality of sheep milk, and more specifically its fatty acid (FA) profile, can naturally and effectively be improved by changes in animal feeding. In this regard, some studies have proposed the addition of tannins or marine lipids to the diet of ruminants in order to inhibit the last step of ruminal biohydrogenation (BH). This would allow a greater accumulation of *trans*-11 18:1 that will serve as a substrate for de novo synthesis of *cis*-9 *trans*-11 conjugated linoleic acid (CLA) in the mammary gland.

The ability of tannins to interfere with ruminal BH and modulate the FA profile of ruminant-derived products is rather controversial, which is probably related to the type of tannin and the dosage rate.

Therefore, the first *in vitro* study (Trial I) was conducted to analyse the effect of four commercial tannin extracts (from chestnut, oak, quebracho and grape) at four doses [20, 40, 60 and 80 g/kg diet dry matter (DM)] with the aim of selecting an effective treatment to modulate the BH of unsaturated FA without conferring a negative response in ruminal fermentation. Two *in vitro* assays with batch cultures of rumen microorganisms, using cannulated ewes as donors of rumen inocula, were performed. The incubated substrate (a total mixed ration similar to that fed to the animals; 50:50) was supplemented with 2% DM of sunflower oil. The first experiment followed a 4 × 4 + 1 design (*i.e.*, 4 types of tannins × 4 doses of each one, and a control), and treatment effects on the FA composition of the ruminal digesta were examined by gas chromatography. On the basis of these results, the second experiment was conducted to make sure that the selected dose and type of tannin would not impair rumen fermentation. To this end, gas production kinetic parameters, extent of degradation, *in vitro* true substrate digestibility, pH, and ammonia and VFA concentrations, as well as the bacterial community (by T-RFLP)

were examined. All tannin extracts were able to modulate the *in vitro* BH of unsaturated FA. However, the high dose required in many cases suggests that their efficacy would be rather limited in terms of animal feeding. On the other hand, the oak tannin extract, at 2% incubated DM, increased total PUFA, 18:3n-3, 18:2n-6 and *trans*-11 18:1, and decreased *trans*-10 18:1 and 18:0 rumen concentrations without eliciting any negative response in ruminal fermentation. Although this treatment had no discernible effects on the bacterial community structure and diversity, a few terminal restriction fragments compatible with uncultured *Lachnospiraceae* species were affected. These results suggest that oak tannin extract could be a promising feeding strategy. Nonetheless, further studies are necessary to examine if these positive effects can be extrapolated to *in vivo* conditions.

Another effective strategy proposed to enhance the milk content of some bioactive unsaturated FA is the addition of marine lipids to the diet of dairy ruminants, due to the strong inhibitory effect of their n-3 PUFA on the last step of ruminal BH. However, the effect of individual n-3 PUFA on rumen microbiota has rarely been studied and it is still uncertain which rumen bacteria are involved in the BH of dietary PUFA. Therefore, to study the impact of the addition of 20:5 n-3 (eicosapentaenoic acid; EPA), 22:5 n-3 (docosapentaenoic acid; DPA), and 22:6 n-3 (docosahexaenoic acid; DHA), at 2% incubated dry matter, on the rumen bacterial community, an *in vitro* assay (Trial II) was conducted using batch cultures of rumen microorganisms. In addition, since there could be differences regarding lipid metabolism between ruminant species, a second objective was to compare the response to n-3 PUFA in *in vitro* cultures with inocula collected from cannulated cows and sheep. Treatment effects on bacterial microbiome were analysed, after 24 hours of incubation, using Ion Torrent Next Generation Sequencing (NGS). Dendrogram and Principal Coordinate Analysis (PCoA), both based on Bray-curtis distances, showed a clear separation between ruminant species and responses to n-3 PUFA treatments. Bacterial community structure in the rumen of sheep and cows was clearly affected by diet supplementation with

EPA and DHA. In contrast, DPA did not modify it in sheep and showed a lower effect compared to EPA and DHA in cattle, suggesting a low contribution of this FA to the action of marine lipids. Regarding the bacterial community composition, relevant alterations due to PUFA addition were observed within the major ruminal phyla, families and genera, namely *Anaerovorax*, *Barnesiella*, *Butyrivibrio*, *Prevotella*, *Ruminobacter*, *Ruminococcus* and *Succinivibrio*, which might be related to a potential role in different pathways of rumen FA metabolism. Although most changes due to the added PUFA were comparable in bovine and ovine, there were also variations exclusive to each ruminant species. For example, the relative abundance of *Hallella*, *Megasphaera*, *Phocaecicola*, *Ruminococcus*, *Ruminobacter* and *Tannerella* only changed in cows, while *Oscillibacter* and *Paraprevotella* were only affected in sheep. The results underline the complexity of the rumen microbial ecosystem and the need for further research to better understand which rumen bacteria are truly involved in the BH in cows and sheep.

Additionally to these *in vitro* assays about inhibitors of ruminal BH, a nutrigenomics experiment (Trial III), focused on the study of mammary lipid metabolism, was performed. It is known that diet supplementation with marine lipids negatively affects animal performance by inducing milk fat depression (MFD) and several reports in dairy cows have shown a relationship between MFD and alterations caused in lipogenic gene expression by dietary nutrients. However, information in small ruminants is not only scarce but also inconsistent.

Therefore, this last experiment was conducted in dairy ewes to study the effect of a diet inducing MFD on milk FA composition and mRNA abundance of key candidate genes involved in mammary lipogenesis. Twelve lactating Assaf ewes were randomly assigned to 2 treatments consisting of a total mixed ration based on alfalfa hay and concentrates (50:50), without supplementation (Control) or with 1.7% DM of fish oil (FO). Profiles of milk FA and mRNA abundance of candidate genes in biopsied mammary tissue were examined in three different sampling times: before starting the treatments and after 1 week and 1 month on the diets. As expected, FO induced MFD and modified milk FA composition.

Compared with the Control, reductions in milk fat concentration and yield were not detected on day 7, but reached up to 25 and 22%, respectively, on day 30. However, increases in confirmed or putative antilipogenic FA (*trans*-10 *cis*-12 and *trans*-9 *cis*-11 18:2, *cis*-9 16:1, *cis*-11 18:1 and oxo-FA) were already established on the early stage of the treatment and lasted until the end of the feeding period.

These changes were accompanied by decreases in the mRNA abundance of genes encoding lipogenic enzymes. The coordinated nature of the downregulation, which tended to affect most studied metabolic pathways, including FA activation (*ACSS1*), *de novo* synthesis (*ACACA* and *FASN*), uptake and transport (*LPL* and *FABP3*), desaturation (*SCD1*) and esterification (*AGPAT6*), supports the involvement of a central regulator of milk fat synthesis. In this regard, without ruling out the potential contribution of *PPARG*, our results suggest that *SREBF1* would have a relevant role in the MFD syndrome in sheep fed FO. Among the other studied transcription factors, the tendency to a downregulation of *INSIG1* was associated with that of *SREBF1*, whereas no variation was detected for *SCAP* or *THRSP*. Fish oil had no significant effects on the transcript abundance of *CD36*, *GPAM*, *DGAT1*, *LPIN1* and *XDH*. Overall, changes in potential antilipogenic FA and mRNA abundance of candidate lipogenic genes support a relationship between them and suggest that FO-induced MFD in dairy ewes would be mediated by transcriptional mechanisms.

In general, the results of this doctoral thesis highlight the complexity of the key factors involved in the nutritional regulation of lipid metabolism in the rumen and in the mammary gland. In addition, they underline the need for further research to develop innovative nutritional strategies able to improve the milk FA profile of ewes without adversely affecting the animal performance.

## INTRODUCCIÓN



## PLANTEAMIENTO DE LA TESIS

Debido a la creciente demanda de alimentos saludables por parte de los consumidores, en las últimas décadas una parte importante de la investigación realizada en nutrición de rumiantes se ha dirigido hacia el metabolismo lipídico. Se sabe que la grasa de la leche y de los productos lácteos contiene compuestos bioactivos potencialmente beneficiosos para las personas, tales como los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) n-3, entre los que destacaría el DHA, ácido docosahexaenoico, o el ácido linoleico conjugado, CLA (Chilliard et al., 2003; Lock y Bauman, 2004; Shingfield et al., 2013). Por ello, el estudio del metabolismo lipídico en el rumen y la glándula mamaria de los rumiantes de aptitud lechera ha cobrado una especial relevancia.

La mayor parte de la investigación realizada se ha llevado a cabo en el vacuno, por ser la especie con un mercado más amplio de su leche. Sin embargo, el consumo de productos lácteos derivados de pequeños rumiantes, ovino y caprino, no es nada despreciable y continúa aumentando con el tiempo (Park y Haenlein, 2006; FAO STAT, 2017).

En el equipo de investigación en el que se ha realizado esta tesis doctoral, hace años que se investiga en el metabolismo lipídico en ovejas lecheras y se han publicado un buen número de artículos que están contribuyendo a asentar las bases de esta línea en el ovino (e. g., Hervás et al., 2008; Toral et al., 2010, 2012; Bichi et al., 2013; Suárez-Vega et al., 2017, Frutos et al., 2017).

Siendo aún numerosos los interrogantes pendientes de responder, para esta tesis se seleccionaron los tres siguientes temas:

1. El primero se centró en la búsqueda de estrategias nutricionales que permitan modular la composición de ácidos grasos de los productos de los rumiantes hacia un perfil más atractivo para los consumidores. Con este objetivo, en el equipo se habían realizado algunos estudios sobre la utilización de taninos para modificar la BH ruminal de los AG insaturados de la dieta (e. g., Toral et al., 2011 y 2013). Estos trabajos se basaban fundamentalmente en la hipótesis de que

dichos compuestos fenólicos eran capaces de inhibir el último paso de la BH (Vasta et al., 2009; Buccioni et al., 2011, Vasta y Luciano, 2011). Esto tiene una implicación práctica incuestionable, ya que permite la acumulación en el rumen de *trans*-11 18:1, metabolito que en la glándula mamaria actuará como precursor del *cis*-9, *trans*-11 CLA (Shingfield et al., 2008; Frutos et al., 2014). Sin embargo, este efecto, que se había observado principalmente *in vitro*, no parecía ser significativo en los ensayos *in vivo* (Kronberg et al., 2007; Benchaar y Chouinard, 2009; Cabiddu et al., 2009 o los trabajos del grupo ya citados). Además, estas diferencias no se limitaban a las pruebas *in vitro* vs. las *in vivo*, sino que se extendían también dentro de cada tipo, lo cual apunta a que la enorme diversidad en las características estructurales y, consecuentemente, en la reactividad de cada tipo de taninos (Mueller-Harvey, 2006) pudiera ser la responsable de la variabilidad encontrada en la literatura. También podrían intervenir en esta variabilidad el hecho de que la acción de los taninos sea dependiente de la dosis y la dificultad para seleccionar concentraciones que afecten beneficiosamente a un determinado parámetro sin perjudicar a otros (e. g., al rendimiento de los animales; Makkar, 2003; Benchaar et al., 2008).

Por lo tanto, este estudio se realizó para analizar el efecto de diferentes tipos y dosis de taninos con el objetivo de seleccionar un tratamiento efectivo para modular la BH de los PUFA de la dieta sin afectar negativamente al proceso de fermentación ruminal.

2. El segundo tema continuó con el estudio de moduladores de la BH ruminal, pero desde un enfoque diferente. Uno de los primeros objetivos de suplementar la dieta de rumiantes lecheros con lípidos marinos era aumentar el contenido lácteo de PUFA n-3 de cadena muy larga, principalmente DHA, ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosapentaenoico (DPA), en los cuales la leche es muy pobre y los aceites de pescado o las microalgas marinas muy ricos (Fievez et al., 2003; Kim et al., 2008; Toral et al., 2010). Sin embargo, la tasa de transferencia de estos ácidos grasos del alimento a la leche es muy baja, debido a su elevada desaparición en el rumen (Loor et al., 2005a; Shingfield et al., 2012). Por ello, el



principal objetivo del empleo de lípidos marinos suele estar más relacionado con la modulación del metabolismo ruminal y la inhibición del último paso de la BH (algo similar a lo ya mencionado para los taninos) de los AG de 18 carbonos (Boeckert et al., 2008b; Toral et al., 2010) para así incrementar el contenido de *cis*-9, *trans*-11 CLA en la leche (Boeckert et al., 2008a, Bichi et al., 2013). Se sabe que los lípidos marinos ejercen este efecto a través de la influencia de sus PUFA n-3 en el metabolismo ruminal, y más específicamente en su microbiota (AbuGhazaleh y Jenkins, 2004; Maia et al., 2007). Aun así, persisten numerosas incertidumbres sobre sus diferencias (por ejemplo, cuáles son más o menos tóxicos para los microorganismos implicados en la BH o por qué el DPA desaparece en menor proporción en el rumen que el DHA y el EPA). Dilucidar estos interrogantes facilitaría el uso de diferentes suplementos para modular la BH ruminal de forma eficiente de cara a mejorar el perfil lipídico de la leche.

Es interesante señalar que aunque la aplicación de técnicas de biología molecular de nueva generación está permitiendo un importante avance en el conocimiento de la estructura y diversidad del ecosistema ruminal, sigue habiendo una gran incertidumbre acerca de las poblaciones bacterianas con un papel relevante en el proceso de BH (Toral et al., 2012; Huws et al., 2011; Zened et al., 2013).

Por otra parte, aunque en comparaciones indirectas (i. e., basadas en los perfiles de ácidos grasos de la leche y el rumen) se han detectado importantes diferencias en el metabolismo lipídico en el rumen de ovejas y vacas que consumen grasas vegetales (Loor et al., 2005b; Atkinson et al., 2006; Shingfield et al., 2013), dichas diferencias no resultan tan claras cuando las dietas de ambas especies se suplementan con aceites marinos (Boeckert et al., 2008a; Or-Rashid et al., 2008; Toral et al., 2012). Sin embargo, sorprendentemente, una comparación directa de vacas y cabras señaló una mayor sensibilidad de la microbiota del caprino a la acción de los lípidos marinos (Toral et al., 2016). Que nosotros sepamos, no existe ningún estudio comparativo equiparable entre vacas y ovejas.

Por todo ello, el segundo estudio se llevó a cabo con los siguientes objetivos principales: por un lado, investigar los efectos de EPA, DPA y DHA sobre la estructura y composición de la microbiota bacteriana del rumen y por otro, comparar la respuesta del ovino con la del vacuno.

3. El tercer tema versó sobre nutrigenómica, disciplina bastante reciente que está experimentando un desarrollo espectacular y que examina el impacto de la nutrición (o de determinados componentes o derivados de la dieta) sobre los procesos fisiológicos mediante cambios en la expresión de los genes. En el campo del metabolismo lipídico, la mayor parte de los estudios se han realizado *in vitro* o con modelos murinos, aunque también se han publicado algunos en vacuno, ligados fundamentalmente al síndrome de baja grasa en la leche (MFD; Bauman et al., 2011; Loor et al., 2013; Bionaz et al., 2015). Sin embargo, son aún muy limitados en pequeños rumiantes.

Este síndrome, definido en general como una depresión de la grasa láctea en ausencia de efectos negativos sobre la producción de leche u otros componentes (proteína, lactosa...) se ha investigado mucho en vacas lecheras, por ser estas muy sensibles a los factores dietarios que lo producen (e. g., alta proporción de concentrado o de almidón, o suplementación con aceites; Peterson et al., 2003; Shingfield et al., 2013). Ovejas y cabras, por el contrario, son bastante más resistentes, aunque también lo sufren cuando su dieta contiene aceites de origen marino (Chilliard et al., 2007; Bichi et al., 2013; Toral et al., 2015). En el ovino, aunque la importancia de profundizar en la MFD es incuestionable cuando se valora su implicación en el rendimiento quesero de la leche (Casals et al., 1999; Ramos y Juárez, 2011), la información sobre una posible regulación transcriptómica de este síndrome, ligada a la nutrición, es muy escasa (Bichi et al., 2013; Hussein et al., 2013; Ticiani et al., 2016). Además, a los pocos artículos existentes, se une cierta inconsistencia entre ellos.

Por lo tanto, el último estudio de esta tesis doctoral se realizó con el objetivo de investigar, en ovejas lecheras, si la depresión de la grasa láctea inducida por la suplementación de su dieta con aceites marinos (concretamente, con aceite de

pescado), podría estar relacionada con cambios en la expresión de los principales genes candidatos implicados en la lipogénesis mamaria. Al mismo tiempo, para tratar de explicar las variaciones observadas en las conclusiones de trabajos previos, se planteó la hipótesis de que los mencionados cambios se detectarían mejor en las primeras fases del proceso y peor cuanto más avanzara el tiempo.

Inmediatamente después de este apartado de introducción, se presenta una Revisión bibliográfica en la cual se describe en detalle el estado del conocimiento sobre los diferentes puntos aquí tratados. A continuación, la disertación recoge tres capítulos, en formato de artículos de investigación, correspondientes a los tres estudios que se acaban de señalar (Pruebas I, II y III). A estos les sigue una pequeña discusión conjunta y un capítulo final de conclusiones.

## REFERENCIAS

- AbuGhazaleh, A. A., and Jenkins, T. C. 2004. Docosahexaenoic acid promotes vaccenic acid accumulation in mixed ruminal cultures when incubated with linoleic acid. *J. Dairy Sci.* 87:1047-1050.
- Atkinson, R. L., Scholljegerdes, E. J., Lake, S. L., Nayigihugu, V., Hess, B. W., and Rule, D. C. 2006. Site and extent of digestion, duodenal flow, and intestinal disappearance of total and esterified fatty acids in sheep fed a high-concentrate diet supplemented with high-linoleate safflower oil. *J. Anim. Sci.* 84:387-396.
- Bauman, D. E., Harvatine, K. J., and Lock, A. L. 2011. Nutrigenomics, rumen-derived bioactive fatty acids, and the regulation of milk fat synthesis. *Ann. Rev. Nutr.* 31:299-319.
- Benchaar, C., and Chouinard, P. Y. 2009. Assessment of the potential of cinnamaldehyde, condensed tannins, and saponins to modify milk fatty acid composition of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 92:3392-3396.
- Benchaar, C., McAllister, T. A., and Chouinard, P. Y. 2008. Digestion, ruminal fermentation, ciliate protozoal populations, and milk production from dairy cows fed cinnamaldehyde, quebracho condensed tannin, or *Yucca schidigera* saponin extracts. *J. Dairy Sci.* 91:4765-4777.
- Bichi, E., Hervás, G., Toral, P. G., Loor, J. J., and Frutos, P. 2013. Milk fat depression induced by dietary marine algae in dairy ewes: Persistency of milk fatty acid composition and animal performance responses. *J. Dairy Sci.* 96:524-532.
- Bionaz, M., Osorio, J., and Loor, J. J. 2015. Triennial Lactation Symposium: Nutrigenomics in dairy cows: Nutrients, transcription factors, and techniques. *J. Anim. Sci.* 93:5531-5553.
- Boeckaert, C., Vlaeminck, B., Dijkstra, J., Issa-Zacharia, A., Van Nespen, T., Van Straalen, W., and Fievez, V. 2008a. Effect of dietary starch or micro algae supplementation on

- rumen fermentation and milk fatty acid composition of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 91:4714-4727.
- Boeckaert, C., Vlaeminck, B., Fievez, V., Maignien, L., Dijkstra, J., and Boon, N. 2008b. Accumulation of *trans* C-18:1 fatty acids in the rumen after dietary algal supplementation is associated with changes in the *Butyrivibrio* community. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:6923-6930.
- Buccioni, A., Minieri, S., Rapaccini, S., Antongiovanni, M., and Mele, M. 2011. Effect of chestnut and quebracho tannins on fatty acid profile in rumen liquid- and solid-associated bacteria: an in vitro study. *Animal* 5:1521-1530.
- Cabiddu, A., Molle, G., Decandia, M., Spada, S., Fiori, M., Piredda, G., and Addis, M. 2009. Responses to condensed tannins of flowering sulla (*Hedysarum coronarium* L.) grazed by dairy sheep. Part 2: Effects on milk fatty acid profile. *Livest. Sci.* 123:230-240.
- Casals, R., Caja, G., Such, X., Torre, C., and Calsamiglia, S. 1999. Effects of calcium soaps and rumen undegradable protein on the milk production and composition of dairy ewes. *J. Dairy Res.* 66:177-191.
- Chilliard, Y., Ferlay, A., Rouel, J., and Lamberet, G. 2003. A review of nutritional and physiological factors affecting goat milk lipid synthesis and lipolysis. *J. Dairy Sci.* 86:1751-1770.
- Chilliard, Y., Glasser, F., Ferlay, A., Bernard, L., Rouel, J., and Doreau, M. 2007. Diet, rumen biohydrogenation and nutritional quality of cow and goat milk fat. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 109:828-855.
- FAOSTAT, 2017. <http://www.fao.org/faostat/es/#data> (Fecha de acceso: 13 de febrero de 2017).
- Fievez, V., Dohme, F., Danneels, M., Raes, K., and Demeyer, D. 2003. Fish oils as potent rumen methane inhibitors and associated effects on rumen fermentation in vitro and in vivo. *Anim. Feed Sci. Technol.* 104:41-58.
- Frutos, P., Toral, P. G., and Hervás, G. 2017. Individual variation of the extent of milk fat depression in dairy ewes fed fish oil: milk fatty acid profile and mRNA abundance of candidate genes involved in mammary lipogenesis. *J. Dairy Sci.* 100:9611-9622.
- Frutos, P., Toral, P. G., Ramos-Morales, E., Shingfield, K. J., Belenguer, A., and Hervás, G. 2014. Oral administration of cobalt acetate alters milk fatty acid composition, consistent with an inhibition of stearoyl-coenzyme A desaturase in lactating ewes. *J. Dairy Sci.* 97:1036-1046.
- Hervás, G., Luna, P., Mantecón, A. R., Castañares, N., de la Fuente, M. A., Juárez, M., and Frutos, P. 2008. Effect of diet supplementation with sunflower oil on milk production, fatty acid profile and ruminal fermentation in lactating dairy ewes. *J. Dairy Res.* 75:399-405.
- Hussein, M., Harvatine, K. H., Weerasinghe, W. M. P. B., Sinclair, L. A., and Bauman, D. E. 2013. Conjugated linoleic acid-induced milk fat depression in lactating ewes is accompanied by reduced expression of mammary genes involved in lipid synthesis. *J. Dairy Sci.* 96:3825-3834.
- Huws, S. A., Kim, E. J., Lee, M. R. F., Scott, M. B., Tweed, J. K. S., Pinloche, E., Wallace, R. J., and Scollan, N. D. 2011. As yet uncultured bacteria phylogenetically classified as *Prevotella*, *Lachnospiraceae incertae sedis* and unclassified *Bacteroidales*, *Clostridiales* and

- Ruminococcaceae* may play a predominant role in ruminal biohydrogenation. *Environm. Microb.* 13:1500-1512.
- Kim, E. J., Huws, S. A., Lee, M. R. F., Wood, J. D., Muetzel, S. M., Wallace, R. J., and Scollan, N. D. 2008. Fish oil increases the duodenal flow of long chain polyunsaturated fatty acids and *trans*-11 18:1 and decreases 18:0 in steers via changes in the rumen bacterial community. *J. Nutr.* 138:889-896.
- Kronberg, S. L., Scholljegerdes, E. J., Barcelo-Coblijn, G., and Murphy, E. J. 2007. Flaxseed treatments to reduce biohydrogenation of alpha-linolenic acid by rumen microbes in cattle. *Lipids* 42:1105-1111.
- Lock, A. L., and Bauman, D. E. 2004. Modifying milk fat composition of dairy cows to enhance fatty acids beneficial to human health. *Lipids* 39:1197-1206.
- Loor, J. J., Bionaz, M., and Drackley, J. K. 2013. Systems physiology in dairy cattle: nutritional genomics and beyond. *Ann. Rev. Anim. Biosci.* 1:365-392.
- Loor, J. J., Doreau, M., Chardigny, J. M., Ollier, A., Sebedio, J. L., and Chilliard, Y. 2005a. Effects of ruminal or duodenal supply of fish oil on milk fat secretion and profiles of *trans*-fatty acids and conjugated linoleic acid isomers in dairy cows fed maize silage. *Anim. Feed Sci. Technol.* 119:227-246.
- Loor, J. J., Ferlay, A., Ollier, A., Ueda, K., Doreau, M., and Chilliard, Y. 2005b. High-concentrate diets and polyunsaturated oils alter *trans* and conjugated isomers in bovine rumen, blood, and milk. *J. Dairy Sci.* 88:3986-3999.
- Maia, M. R. G., Chaudhary, L. C., Figueres, L., and Wallace, R. J. 2007. Metabolism of polyunsaturated fatty acids and their toxicity to the microflora of the rumen. *Anton. Leeuw. Int. J. G.* 91:303-314.
- Makkar, H. P. S. 2003. Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. *Small Rumin. Res.* 49:241-256.
- Mueller-Harvey, I. 2006. Review. Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. *J. Sci. Food Agric.* 86:2010-2037.
- Or-Rashid, M. M., Kramer, J. K. G., Wood, M. A., and McBride, B. W. 2008. Supplemental algal meal alters the ruminal *trans*-18:1 fatty acid and conjugated linoleic acid composition in cattle. *J. Anim. Sci.* 86:187-196.
- Park, Y. W., and Haenlein, G. F. W. 2006. Overview of milk of non-bovine mammals. In: *Handbook of milk of non-bovine mammals*. Haenlein, G. F. W. (ed.). Blackwell Publishing Professional, Oxford, UK, and Ames, IA, USA, pp: 1-9.
- Peterson, D. G., Matitashvili, E. A., and Bauman, D. E. 2003. Diet-induced milk fat depression in dairy cows results in increased *trans*-10, *cis*-12 CLA in milk fat and coordinate suppression of mRNA abundance for mammary enzymes involved in milk fat synthesis. *J. Nutr.* 133:3098-3102.
- Ramos, M., and Juarez, M. 2011. Sheep Milk. In: *Encyclopedia of Dairy Sciences 2nd Edition*. Fuquay, F. W. (eds.). Academic Press, San Diego, CA, USA, pp: 494-502.
- Shingfield, K. J., Äröla, A., Ahvenjärvi, S., Vanhatalo, A., Toivonen, V., Griinari, J. M., and Huhtanen, P. 2008. Ruminal infusions of cobalt-EDTA reduce mammary  $\Delta^9$ -desaturase index and alter milk fatty acid composition in lactating cows. *J. Nutr.* 138:710-717.

- Shingfield, K. J., Bonnet, M., and Scollan, N. D. 2013. Recent developments in altering the fatty acid composition of ruminant-derived foods. *Animal* 7:s1:132-162.
- Shingfield, K. J., Kairenius, P., Äröla, A., Paillard, D., Muetzel, S., Ahvenjärvi, S., Vanhatalo, A., Huhtanen, P., Toivonen, V., Griinari, J. M., and Wallace, R. J. 2012. Dietary fish oil supplements modify ruminal biohydrogenation, alter the flow of fatty acids at the omasum, and induce changes in the ruminal *Butyrivibrio* population in lactating cows. *J. Nutr.* 142:1437-1448.
- Suárez-Vega, A., Toral, P.G., Gutiérrez-Gil, B., Hervás, G., Arranz, J.J. and Frutos, P. 2017. Elucidating fish oil-induced milk fat depression in dairy sheep: Milk somatic cell transcriptome analysis. *Sci. Rep.* 7:45905.
- Ticiani, E., Urio, M., Ferreira, R., Harvatine, K. J., and De Oliveira, D. E. 2016. Transcriptional regulation of acetyl-CoA carboxylase  $\alpha$  isoforms in dairy ewes during conjugated linoleic acid induced milk fat depression. *Animal* 10:1677-1683.
- Toral, P. G., Belenguer, A., Shingfield, K. J., Hervás, G., Toivonen, V., and Frutos, P. 2012. Fatty acid composition and bacterial community changes in the rumen fluid of lactating sheep fed sunflower oil plus incremental levels of marine algae. *J. Dairy Sci.* 95:794-806.
- Toral, P. G., Bernard, L., Belenguer, A., Rouel, J., Hervás, G., Chilliard, Y., and Frutos, P. 2016. Comparison of ruminal lipid metabolism in dairy cows and goats fed diets supplemented with starch, plant oil, or fish oil. *J. Dairy Sci.* 99:301-316.
- Toral, P. G., Chilliard, Y., Rouel, J., Leskinen, H., Shingfield, K. J., and Bernard, L. 2015. Comparison of the nutritional regulation of milk fat secretion and composition in cows and goats. *J. Dairy Sci.* 98:7277-7297.
- Toral, P. G., Hervás, G., Belenguer, A., Bichi, E., and Frutos, P. 2013. Effect of the inclusion of quebracho tannins in a diet rich in linoleic acid on milk fatty acid composition in dairy ewes. *J. Dairy Sci.* 96:431-439.
- Toral, P. G., Hervás, G., Bichi, E., Belenguer, A., and Frutos, P. 2011. Tannins as feed additives to modulate ruminal biohydrogenation: Effects on animal performance, milk fatty acid composition and ruminal fermentation in dairy ewes fed a diet containing sunflower oil. *Anim. Feed Sci. Technol.* 164:199-206.
- Toral, P. G., Shingfield, K. J., Hervás, G., Toivonen, V., and Frutos, P. 2010. Effect of fish oil and sunflower oil on rumen fermentation characteristics and fatty acid composition of digesta in ewes fed a high concentrate diet. *J. Dairy Sci.* 93:4804-4817.
- Vasta, V., and Luciano, G. 2011. The effects of dietary consumption of plants secondary compounds on small ruminants' products quality. *Small Ruminant Research* 101:150-159.
- Vasta, V., Makkar, H. P. S., Mele, M., and Priolo, A. 2009. Ruminal biohydrogenation as affected by tannins in vitro. *Br. J. Nutr.* 102:82-92.
- Zened, A., Combes, S., Cauquil, L., Mariette, J., Klopp, C., Bouchez, O., Troegeler-Meynadier, A., and Enjalbert, F. 2013. Microbial ecology of the rumen evaluated by 454 GS FLX pyrosequencing is affected by starch and oil supplementation of diets. *FEMS Microbiol. Ecol.* 83:504-514.

## **REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**





# 1. ORIGEN DE LOS LIPÍDOS DE LA LECHE DE LOS RUMIANTES

La grasa de la leche de los rumiantes contiene gran cantidad de AG distintos, algunos de los cuales poseen actividad biológica reconocida (e. g., el ácido ruménico, RA, u otros CLA). Entre los más de 400 AG que componen la grasa de la leche existen diferencias en la longitud de la cadena carbonada y en el número y orientación de los dobles enlaces (Jensen, 2002). Además, no todos se encuentran en la misma forma; la mayor parte de ellos, aproximadamente el 95%, aparecen esterificados formando triglicéridos, mientras que el 5% restante está constituido por fosfolípidos, ésteres de colesterol, diglicéridos, monoglicéridos y AG libres (Jensen y Newburg, 1995).

El perfil de AG de la leche es el resultado de una compleja interacción entre los nutrientes y el metabolismo ruminal y mamario. En relación a su origen, de forma general se acepta que los AG de cadena corta y media (de 4 a 14 átomos de carbono) y aproximadamente el 50% de los AG de 16 átomos de carbono que aparecen en la leche son sintetizados de novo en la glándula mamaria, a partir fundamentalmente de acetato y  $\beta$ -hidroxibutirato (Barber et al., 1997; Palmquist, 2006). La otra mitad de los AG de 16 átomos de carbono y aquellos de cadena larga (>16 átomos de carbono) son captados de la circulación sanguínea (o derivan de AG captados) procedentes mayoritariamente de los lípidos de la dieta y de los metabolitos de su BH ruminal (Jenkins et al., 2008; Shingfield et al., 2010).

## 1.1. METABOLISMO LIPÍDICO EN EL RUMEN

El aparato digestivo de los animales rumiantes se caracteriza por poseer 4 compartimentos bien diferenciados funcional y anatómicamente (Van Soest, 1994). El rumen, el retículo y el omaso componen las tres cámaras anteriores, preestómagos, especializadas en la fermentación del alimento ingerido gracias a la acción simbiótica de los microorganismos ruminales, para que posteriormente

puedan ser absorbidos los nutrientes necesarios en el estómago glandular, abomaso, y fundamentalmente en el intestino (Van Soest, 1994; Cronjé, 2000; Russel y Rychlik, 2001). El rumen es el de mayor tamaño (80% del volumen total) y funciona como una cámara con un flujo continuo donde se concentra la mayor actividad microbiana (Van Soest, 1994).

El metabolismo de los lípidos de la dieta en el rumen, a diferencia del de otros compuestos como los polisacáridos, no parece ser una actividad esencial para nutrir a los microorganismos que lo colonizan (Lourenço et al., 2010), siendo estos capaces de sintetizar sus propios AG (Garton, 1977). Además, debido a las condiciones anaerobias del rumen, los microorganismos no pueden conseguir energía de los AG de la dieta mediante su  $\beta$ -oxidación (Lourenço et al., 2010). Por lo tanto, el metabolismo de estos compuestos podría parecer un proceso prescindible dentro de la actividad microbiana en el rumen. Sin embargo, es extremadamente importante para el mantenimiento del ecosistema ruminal (Harfoot y Hazlewood, 1997) ya que previene del efecto tóxico de los AG insaturados (Lourenço et al., 2010) que afectarían al crecimiento microbiano (Henderson, 1973; Maia et al., 2010) y, por lo tanto, al proceso fermentativo (Jenkins, 1993; Fievez et al., 2003).

A consecuencia del extenso metabolismo microbiano ruminal, los lípidos que abandonan el rumen son predominantemente AG saturados no esterificados de origen alimentario y microbiano (70% del total), y cantidades variables de fosfolípidos microbianos, glicéridos y esteroides (Noble, 1978; Bauchart, 1993). Datos de vacuno (Given et al., 2006) señalan que únicamente el 10-15% de los PUFA consumidos en la dieta escapan a la BH ruminal. La absorción de los AG tiene lugar principalmente en los enterocitos del tramo medio y final del yeyuno (Noble, 1978); en el interior de las células intestinales, algunos AG son vertidos directamente sin esterificar a la vena porta (Hocquette y Bauchart, 1999) y transportados por el torrente sanguíneo asociados a la albumina sérica. Otros, en cambio, son esterificados para formar triglicéridos y fosfolípidos (Cuvelier et al., 2005) que se unirán a apoproteínas para formar quilomicrones y lipoproteínas de

muy baja densidad (VLDL) que son incorporadas finalmente a la sangre (Palmquist y Jenkins, 1980).

### ***1.1.1. Microorganismos ruminales implicados en el metabolismo lipídico ruminal***

El rumen posee las condiciones apropiadas y estables (temperatura, acidez, anaerobiosis, ambiente reductor, etc.) para el desarrollo de una amplia gama de microorganismos (Kamra, 2005). Estos se encuentran ecológicamente integrados en el animal hospedador, permitiéndole aprovechar parte de los carbohidratos estructurales que contiene la pared de la célula vegetal (e. g., celulosa, hemicelulosa y pectinas; Van Soest, 1994), transformándolos en otros productos como los AG volátiles que constituyen la principal fuente de energía del rumiante (Bergman, 1990). Además, la proteína microbiana puede ser utilizada por el propio animal, siendo éste uno de los principales aportes proteicos (Van Soest, 1994).

Por lo general, a nivel ruminal se observa un ambiente anaeróbico con muy bajo potencial redox (de -250 a -450 mv), temperatura entre 39-41°C y una presión osmótica de 260-340 miliosmoles. El pH se mantiene relativamente estable gracias a la alta capacidad tampón de la saliva y a la absorción de los productos finales de la fermentación a través de la pared celular (Aschenbach et al., 2011). La comunidad microbiana que habita en el rumen se caracteriza por su alta densidad de población y amplia diversidad, encontrándose representantes de los tres dominios en que Woese et al. (1990) distribuyeron los organismos celulares, es decir, de *Bacteria*, de *Archaea* y de *Eucarya* (protozoos y hongos anaerobios), además de presentar virus bacteriófagos (Mackie et al., 2002). El equilibrio entre las diferentes poblaciones microbianas es fundamental para el correcto funcionamiento de la actividad ruminal, estableciéndose relaciones beneficiosas, perjudiciales o competitivas entre ellas (Dehority, 2003).

### *Bacterias*

Cada mililitro de contenido ruminal alberga alrededor de  $10^{10}$ - $10^{11}$  bacterias, que son los microorganismos más abundantes y suponen entre el 50 y el 60% del total de la masa microbiana (Stewart et al., 1997; Mackie et al., 2002). La mayoría de las bacterias son anaerobias estrictas; sin embargo, algunas pueden vivir en presencia de oxígeno e incluso utilizarlo (Van Soest, 1994). Las bacterias se distribuyen en una gran variedad de géneros y especies y han sido clasificadas tradicionalmente en función de sus características morfológicas y bioquímicas (Tabla 1; Hobson y Stewart, 1997) a partir de estudios basados en técnicas de cultivo. De este modo se ha conseguido identificar alrededor de 200 especies cultivables, agrupadas en relación a su actividad metabólica básicamente en celulolíticas, hemicelulolíticas, pectinolíticas, amilolíticas o proteolíticas (Dehority, 2003; Kong et al., 2010; Lee et al., 2012).

En los últimos años se han llevado a cabo numerosos estudios con el fin de identificar y clasificar la compleja diversidad de las poblaciones bacterianas del rumen mediante el uso de técnicas moleculares basadas en el análisis del gen ARNr 16S (Edwards et al., 2004; Jenkins et al., 2008; Fouts et al., 2012). El desarrollo de herramientas de biología molecular ha permitido diferenciar más de 2000 especies mediante la técnica de pirosecuenciación 454 (Fouts et al., 2012; McCann et al., 2014). Ahora bien, la composición de la comunidad bacteriana es aún incierta, pues un amplio porcentaje de las secuencias analizadas no se han podido clasificar filogenéticamente al tratarse de especies no cultivadas o que no se han podido aislar (McSweeney y Mackie, 2012; Castro-Carrera et al., 2014; McCann et al., 2014).

La mayoría de las especies bacterianas existentes en el rumen de animales domésticos pertenecen a los filos *Bacteroidetes* y *Firmicutes*, pudiendo alcanzar entre ambos el 90% del total de bacterias ruminales (Jami y Mizrahi, 2012; Lee et al., 2012; Wu et al., 2012).

Tabla 1. Características funcionales de algunas de las especies de bacterias ruminales que han sido cultivadas.

Clasificación taxonómica <sup>a</sup>	Sustrato <sup>b</sup>	Productos de fermentación <sup>b</sup>
<i>Bacteroidetes</i>		
<i>Prevotellaceae</i>		
<i>Prevotella</i> spp.	PC, XY, AZ	S, A, F, P
<i>Firmicutes</i>		
<i>Lachnospiraceae</i>		
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> <sup>c,d</sup>	AL, CE, HC, PC, AZ	B, F, A, H <sub>2</sub>
<i>Lachnospira multiparus</i>	PC, AZ	L, A, F, H <sub>2</sub>
<i>Clostridiaceae</i>		
<i>Clostridium aminophilum</i> <sup>d</sup>	AA	A, B
<i>Clostridium sticklandii</i>	AA	A, AGVr, B, P
<i>Peptostreptococcaceae</i>		
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	AA	AGVr, A
<i>Ruminococcaceae</i>		
<i>Ruminococcus albus</i>	CE, HC	A, F, E, H <sub>2</sub>
<i>Ruminococcus flavofaciens</i>	CE, HC	S, F, A, H <sub>2</sub>
<i>Veillonellaceae</i>		
<i>Anaerovibrio lipolyticus</i> <sup>c</sup>	GL, AZ	A, S, P
<i>Megasphaera elsdenii</i> <sup>d</sup>	L, AZ	P, A, B, AGVr, H <sub>2</sub>
<i>Selenomonas ruminantium</i>	AL, DX, AZ, L, S	L, A, P, B, F, H <sub>2</sub>
<i>Streptococcaceae</i>		
<i>Streptococcus bovis</i> <sup>d</sup>	AL, AZ	L, A, F, E
<i>Eubacteriaceae</i>		
<i>Eubacterium ruminantium</i>	HC, DX, AZ	A, F, B, L
<i>Proteobacteria</i>		
<i>Succinivibrionaceae</i>		
<i>Ruminobacter amylophilus</i>	AL	S, F, A, E
<i>Succinivibrio dextrinosolvens</i> <sup>d</sup>	PC, DX, AZ	S, A, F, L
<i>Succinomonas amylolytica</i>	AL	S, A, P
<i>Fibrobacteres</i>		
<i>Fibrobacteraceae</i>		
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	CE	S, F, A

<sup>a</sup> clasificación taxonómica en filo, familia, especie.

<sup>b</sup> CE, celulosa; HC, hemicelulosa; DX, dextrinas; AZ, azúcares; AL, almidón; PC, pectina; XY, xilanos; L, lactato; S, succinato; GL, glicerol; AA, aminoácidos; OA, ácidos orgánicos; H<sub>2</sub>, hidrogeno; F, formiato; A, acetato; E, etanol; B, butirato; P, propionato; AGVr, AGV ramificados.

<sup>c</sup> Capacidad lipolítica demostrada in vitro.

<sup>d</sup> Capacidad de biohidrogenar AG demostrada in vitro. Datos extraídos de Hazlewood y Dawson (1979); Russell y Rychlik (2001); Maia et al. (2007); Jarvis y Moore (2010); Prive et al. (2013); y Yokoyama y Davis (1970).

En tercer lugar, en relación a la abundancia, se encuentra generalmente *Proteobacteria* (hasta un 20% del total; Tajima et al., 1999; Jami y Mizhari, 2012), mientras que el resto de filos (e. g., *Spirochaetes*, *Fibrobacteres*, *Actinobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Synergistetes*, *Tenericutes*, *Cyanobacteria*, *TM7*, *Elusimicrobia*, *SR1*, *Fusobacteria* y *Chloroflexi*) aparecen normalmente en porcentajes menores al 1,5% (Jami y Mizhari, 2012; Lee et al., 2012; Wu et al., 2012). La mayor parte de los estudios de secuenciación masiva han sido llevados a cabo en vacuno. En cambio, en ovino existen aún muy pocos acerca de su diversidad microbiana ruminal usando esta tecnología. Entre ellos, por ejemplo, Castro-Carrera et al. (2014) analizaron la comunidad bacteriana en el rumen de ovejas assaf y confirmaron que está compuesta mayoritariamente por el filo *Bacteroidetes* (69-77%), seguido de *Firmicutes* (13-26%) y *Proteobacteria* (1-7%), y menos del 1,5% para el resto de filos.

Aunque las abundancias relativas a nivel de género son muy variables, *Prevotella*, que pertenece al filo *Bacteroidetes*, es comúnmente el más abundante, pudiendo alcanzar hasta el 50% del total de bacterias (Jami y Mizrahi, 2012; Lee et al., 2012). El resto de géneros representan porcentajes inferiores que varían en función del estado fisiológico del animal, el tiempo tras la ingesta y especialmente la dieta consumida (Dehority, 2003; Wu et al., 2012). Las bacterias son además los principales microorganismos implicados en el metabolismo lipídico en el rumen (Jenkins et al., 2008; Lourenço et al., 2010). En este sentido, varios estudios in vitro mostraron que las del grupo *Butyrivibrio*, que incluye a especies de los géneros *Butyrivibrio* y *Pseudobutyrvibrio*, eran las más activas en el proceso de BH (Wallace et al., 2006; Maia et al., 2007). Sin embargo, trabajos posteriores al respecto señalan que ambos géneros podrían no jugar un papel tan relevante como se pensaba y que otros grupos bacterianos (e. g., *Prevotella*, *Lachnospiraceae incertae sedis*, *Succinivibrionaceae* o no clasificados de *Bacteroidales*, *Clostridiales*, *Porphyromonadacea* y *Ruminococcaceae*; Huws et al., 2011, Castro-Carrera et al., 2014) estarían más implicados en el proceso de BH ruminal.

Los principales procesos del metabolismo lipídico en los que participan bacterias ruminales (i. e., lipólisis y BH), se describirán más adelante en el punto 1.1.2.

### *Arqueas*

Estos microorganismos representan entre el 0,3 y el 3,3% de la biomasa ruminal (Wright y Klieve, 2011; Leahy et al., 2013). Las arqueas se han clasificado tradicionalmente en 4 grupos en relación al hábitat donde se encuentran (Chaban et al., 2006): arqueas metanogénicas (las que viven en ambientes anaeróbicos y producen metano), halófilas extremas (las que viven en medios salinos extremos), termoacidófilas (las que subsisten en ambientes calientes y ácidos) e hipertermófilas (aquellas que resisten temperaturas incluso superiores a los 70 °C). De estos cuatro tipos, en el rumen predominan las metanogénicas. Dentro de estas, a raíz de estudios del ARNr 16S, se observó que destacan tres grupos, *Methanobrevibacter* spp, *Methanomicrobium* spp y un grupo de arqueas no cultivadas conocido como clúster C del rumen o, más recientemente, *Methanoplasmatales* (Paul et al., 2012; Leahy et al., 2013). En lo referente a los lípidos, no parece haber indicios de que estén implicadas en su metabolismo (Abecia et al., 2012).

### *Protozoos*

La población de protozoarios en el rumen es menor que la de bacterias, aunque debido a su mayor tamaño individual, sus masas celulares son semejantes (Williams y Coleman, 1997). Existen dos grupos de protozoos en función de su morfología: flagelados y ciliados (Dehority, 1993). El último, ciliados, es el más predominante, con una abundancia aproximada de  $10^4$ - $10^6$  células/mL (Williams y Coleman, 1997), y está formado a su vez por dos subgrupos, en relación a su estructura y metabolismo, comúnmente conocidos como entodiniomorfos y holotricos.

Aunque su presencia en el rumen no es estrictamente necesaria (Dehority, 1993), los protozoos pueden utilizar almidón, celulosa, hemicelulosa, pectina o azúcares solubles (Van Soest, 1994), produciendo en su fermentación AGV e hidrógeno que será posteriormente utilizado por las arqueas metanogénicas

adheridas a su exterior para originar metano (Van Soest, 1994; Mackie et al., 2002). Además, los protozoos pueden ayudar a mantener la estabilidad del ecosistema mediante el reciclaje del nitrógeno (Koenig et al., 2000; Olubobokun et al., 1988), debido a su actividad predatoria de bacterias (Newbold et al., 1996), o el almacenamiento y degradación gradual del almidón (Williams y Coleman, 1997).

El papel de los protozoos en el metabolismo lipídico del rumen no ha sido totalmente esclarecido (Newbold et al., 2015). Por ejemplo, se conoce su implicación en la actividad lipolítica (Newbold et al., 2015), aunque esta sería limitada comparada con la de las bacterias (Jenkins et al., 2008, Lourenço et al., 2010). Respecto a la BH de los AG de la dieta, su participación tampoco es clara (Williams y Coleman, 1992), pero se considera que no serían capaces de biohidrogenar lípidos (Lourenço et al., 2010). Sin embargo, los protozoos contribuyen de manera importante al flujo duodenal de AG insaturados y algunos CLA (Devillard et al., 2006, Yáñez-Ruiz et al., 2006), lo cual podría deberse, en gran parte, a la ingestión de cloroplastos (Huws et al., 2009) y de bacterias con gran actividad biohidrogenadora (Devillard et al., 2006).

### *Hongos*

Se ha calculado que la densidad de estos organismos puede llegar a suponer hasta el 8% del total de la biomasa microbiana ( $10^3$ - $10^6$  células/mL; Orpin y Joblin, 1997). Los hongos aseguran su supervivencia en el rumen adhiriéndose a las partículas de alimento grandes (Orpin y Joblin, 1997) y contribuyen de manera significativa a la ruptura de la fibra mediante la secreción de enzimas celulolíticas y el desarrollo de un extenso rizoide en el interior de las partículas vegetales (Krause et al., 2013). De este modo, facilitan también el acceso de las bacterias con actividad fibrolítica en los puntos de ruptura (Orpin y Joblin, 1997). Aunque su implicación en el metabolismo lipídico parece insignificante, algunos hongos ruminales (e. g., *Neocallimastix frontalis*) son capaces de formar *cis*-9, *trans*-11 CLA a partir de 18:2 n-6 in vitro (Maia et al., 2007). En cualquier caso, su implicación en el proceso de BH es muy pequeña en comparación con la de las bacterias (Maia et al., 2007).



### *Bacteriófagos*

Este grupo representa un porcentaje muy bajo del total de la biomasa ruminal, aunque su cantidad por mL de contenido ruminal asciende a  $10^7$ - $10^9$  fagos (Miller et al., 2012). No existen evidencias de su participación en el metabolismo lipídico y su papel en el rumen consistiría en el mantenimiento y equilibrio de la diversidad microbiana (Miller et al., 2012) mediante la selección de bacterias resistentes a fagos y la transferencia horizontal de genes (Rohwer y Thumber, 2009).

#### **1.1.2. Procesos metabólicos**

Una vez ingerido el alimento, los procesos de masticación y rumia contribuyen a reducir el tamaño de partícula, aumentando además la superficie para la fermentación microbiana. Estos procesos permiten romper la matriz alimenticia, separando las moléculas lipídicas de sus componentes estructurales y dejándolas expuestas a la acción de las lipasas. Estas enzimas hidrolizan rápidamente los enlaces éster entre los AG y los alcoholes (lipólisis) y liberan los AG no esterificados para que posteriormente puedan ser metabolizados (Jenkins et al., 2008). En aquellas dietas ricas en cereales o suplementadas con aceites, los lípidos se encuentran mayoritariamente en forma de triglicéridos, a diferencia de las dietas basadas fundamentalmente en forrajes, en las que priman los galacto-, sulfo- y fosfo-lípidos (Harfoot, 1981). A pesar de que existe cierta actividad lipolítica en el propio material vegetal, que puede mantenerse hasta 5 horas tras la ingesta de alimento (Faruque et al., 1974), son las lipasas microbianas las principales encargadas de llevar a cabo el proceso de lipólisis en el rumen (Harfoot y Hazlewood, 1997; Lourenço et al., 2010). Comenzando por los protozoos, aunque se pensó que podrían tener cierta capacidad lipolítica (Newbold et al., 2015), la dificultad para obtener cultivos puros de estos microorganismos ha impedido discernir si dicha actividad deriva de las bacterias asociadas a estos (Harfoot y Hazlewood, 1997). En cualquier caso, de presentar

lipasas, su actividad estaría más destinada a suplir las necesidades energéticas del protozoo que a la digestión de los lípidos de la dieta (Lourenço et al., 2010).

Las bacterias serían las principales involucradas en la lipólisis ruminal. Entre ellas, *Anaerovibrio lipolyticus* y *Butyrivibrio* spp. han sido consideradas como las más activas (Lourenço et al., 2010). Cuando los animales reciben una dieta rica en concentrado, las lipasas de *A. lipolyticus* dominan el proceso (Privé et al., 2013) pero, debido a su incapacidad de hidrolizar galacto- y fosfo-lípidos, son otras especies (e. g., algunas cepas de *Butyrivibrio*) las principales encargadas de romper las moléculas lipídicas presentes en los forrajes (Hazlewood et al., 1976; Hazlewood y Dawson, 1979). Además, *Butyrivibrio* spp. participan también en el proceso consecutivo de BH ruminal, disminuyendo la toxicidad de los PUFA. El desarrollo de técnicas moleculares ha permitido estimar la relación entre la tasa de lipólisis y la abundancia de *A. lipolyticus* y *Butyrivibrio* spp. en fermentadores in vitro (Fuentes et al., 2009, 2011), aunque sigue siendo una incógnita la posible participación de otros géneros bacterianos (e. g., *Clostridium* y *Propionibacterium*; Jarvis y Moore, 2010; Edwards et al., 2013). Es importante considerar también que la mayor parte de la información disponible sobre el proceso de lipólisis en el rumen se basa en resultados obtenidos in vitro (Boeckeaert et al., 2007; Fuentes et al., 2009, 2011) y, por ejemplo en el caso de *Butyrivibrio fibrisolvens*, no se ha podido relacionar su abundancia en el rumen con la actividad lipolítica in vivo (Halmemies-Beauchet-Filleau et al., 2013).

Puesto que algunos de los AG liberados tras la lipólisis poseen acción bactericida y bacteriostática, más pronunciada cuantos más dobles enlaces presenten (Harfoot y Hazlewood, 1997; Maia et al., 2007), la microbiota ruminal ha desarrollado un mecanismo de destoxificación clave para el mantenimiento del ecosistema: la BH (Harfoot y Hazlewood, 1997). Este proceso combina reacciones de isomerización e hidrogenación de dobles enlaces, por lo que los AG que finalmente pasan al intestino son mayoritariamente saturados (Jenkins et al., 2008; Shingfield et al., 2012). Como ya se ha mencionado, se sabe que los principales microorganismos que participan en el proceso de BH ruminal son las bacterias

(Lourenço et al., 2010). De forma algo simplista, en 1997, Harfoot y Hazelwood clasificaron las bacterias implicadas en este proceso en dos grupos, A y B, en relación con los productos de la BH del 18:2 n-6 (LA, ácido linoleico) y 18:3 n-3 (LNA, ácido linolénico), al ser estos los AG más abundantes en la dieta habitual de los rumiantes (Figura 1).

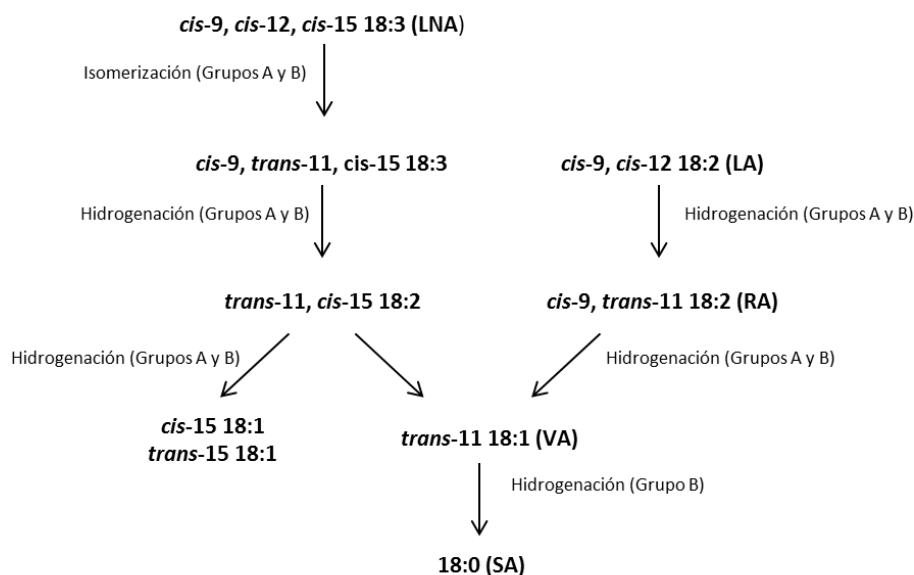


Figura 1. Clasificación de Harfoot y Hazlewood (1997) de los grupos bacterianos implicados en las rutas básicas de biohidrogenación del ácido linoleico y del ácido linolénico.

El grupo A incluye aquellas bacterias responsables de transformar dichos AG solo hasta *trans*-11 18:1 (VA, ácido vaccénico), mientras que el grupo B estaría formado por aquellas que son capaces de convertirlos hasta el producto saturado final, el ácido esteárico (SA, 18:0). Las bacterias más representativas de los grupos A y B serían *B. fibrisolvens* y *B. proteoclasticus*, respectivamente (Harfoot y Hazlewood, 1997; Wallace et al., 2006; Moon et al., 2008).

No obstante, se desconocen aún muchos aspectos acerca del efecto de los AG insaturados sobre la estructura de la comunidad microbiana del rumen. En este sentido, los trabajos relativamente recientes (Belenguer et al., 2010; Huws et al.,

2011; Castro-Carrera et al., 2014) han demostrado que, aunque se ha prestado mucha atención al estudio de cepas potencialmente involucradas en la BH ruminal *in vitro*, estas no parecen ejercer un papel clave en el proceso *in vivo*. Resulta pues más probable que otras bacterias (aún no cultivadas) tengan una mayor relevancia en el metabolismo ruminal de los AG (Boeckert et al., 2008; Belenguer et al., 2010; Lourenço et al., 2010). Puesto que el efecto de la alimentación sobre el perfil lipídico de los productos derivados de los rumiantes está mediado por cambios en estas poblaciones microbianas, en los últimos años se ha prestado especial atención a este aspecto de la nutrición animal (Zened et al., 2013; Castro-Carrera et al., 2014).

Actualmente se sabe que las rutas de la BH son mucho más complejas que las mostradas en la Figura 1 (Shingfield et al., 2010; Honkanen et al., 2012; Shingfield y Wallace, 2014), por ello se presenta también una Figura 2 en la que aparecen, a modo de ejemplo, otras vías metabólicas del 18:2 n-6. A partir de trabajos *in vitro*, se ha demostrado la participación de *Megasphaera elsdenii* y *Propionibacterium acnes* en la formación de algunos metabolitos intermedios del linoleico (e. g., *trans*-10, *cis*-12 18:2; Kim et al., 2002; Wallace et al., 2006). No obstante, esta implicación tampoco se ha podido confirmar *in vivo*. Además, el proceso necesitaría la actuación de algunas especies del grupo *Butyrivibrio* para producir 18:1 y 18:0 (McKain et al., 2010).

También a partir de estudios *in vitro*, se ha comprobado que, además de la BH como mecanismo de destoxicación, existen ciertas bacterias (e. g., *P. acnes*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus bovis* y *Selenomonas ruminantium*) capaces de hidratar algunos AG insaturados (Hudson et al., 1998; Jenkins et al., 2006; Maia et al., 2007). En la figura 2 se muestra, por ejemplo, la formación de 10-hidroxi-18:0. En trabajos *in vivo* del grupo en el que se ha llevado a cabo esta tesis doctoral se ha relacionado la concentración de 10-oxo-18:0 en el contenido ruminal y la abundancia de unas bacterias grandes y ovaladas identificadas presumiblemente

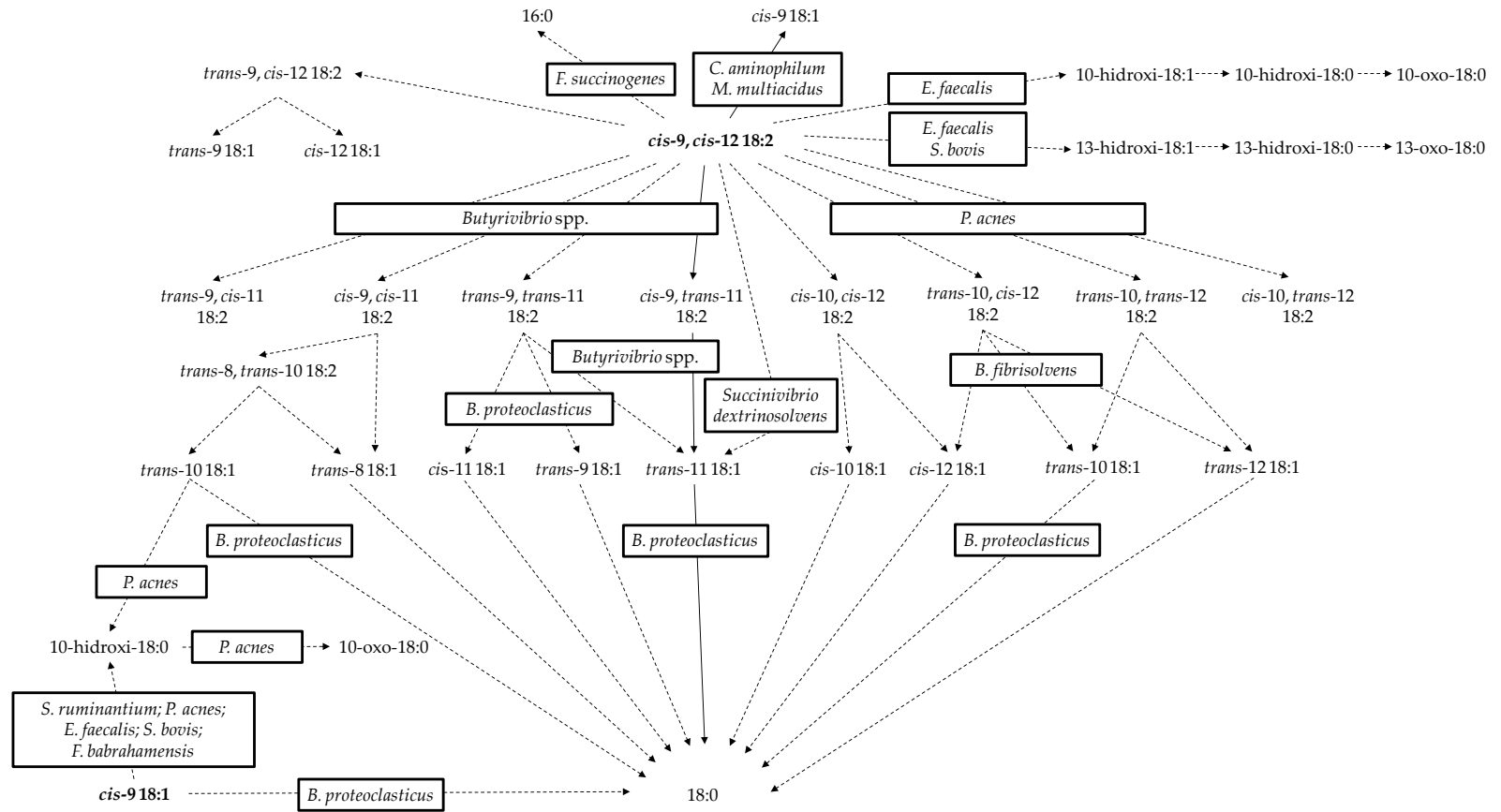


Figura 2. Principales rutas del metabolismo ruminal del *cis-9 18:1* y *18:2n-6*: bacterias cultivables capaces de llevar a cabo determinados pasos *in vitro* (datos extraídos de: Yokoyama y Davis, 1970; Kemp et al., 1975; Hudson et al., 1998; Ogawa et al., 2001; Maia et al., 2007; Shingfield y Wallace, 2014).

como *Quinella ovalis* (Belenguer et al., 2010; Toral et al., 2012). Sin embargo, la dificultad a la hora de conseguir un cultivo puro o enriquecido de *Q. ovalis* no ha permitido estudiar en detalle su implicación en el metabolismo ruminal de los AG insaturados (Castro-Carrera, 2015).

A modo de cierre, a partir de los resultados de estudios in vitro, se pensó que las bacterias del grupo *Butyrivibrio* serían las más relevantes en el proceso de BH ruminal (Wallace et al., 2006; Maia et al., 2007). No obstante, esto no se ha podido demostrar mediante estudios in vivo (e. g., Castro-Carrera et al., 2014). Así pues, parece muy probable que otras poblaciones aún no cultivadas, pertenecientes a varios grupos taxónomicos como *Clostridiales*, *Bacteroidales*, *Ruminococcaceae*, *Porphyromonadaceae*, *Lachnospiraceae*, *Prevotella* y *Anaerovorax* (Boeckert et al., 2008; Belenguer et al., 2010, Huws et al., 2011), y diferentes géneros como *Barnesiella*, *Fibrobacter*, *Prevotella*, *Anaerovorax* y *Paludibacter* (Huws et al., 2011; Zened et al., 2013; Castro-Carrera et al., 2014; Petri et al., 2014) estén implicadas in vivo en este proceso. Aun así, la dificultad para obtener cultivos puros que permitan realizar un análisis funcional de estos grupos sigue siendo un obstáculo para avanzar en la microbiología del metabolismo lipídico en el rumen (Lourenço et al., 2010; Shingfield y Wallace, 2014).

## 1.2. SÍNTESIS DE LÍPIDOS EN LA GLÁNDULA MAMARIA

La síntesis de lípidos de la leche en el tejido glandular mamario tiene lugar en unas estructuras saculares conocidas como alvéolos, que constituyen la unidad secretora funcional (Nickerson y Akers, 2011). Los alvéolos están formados por una única capa de células epiteliales secretoras, en contacto con la red de capilares, rodeadas a su vez por células mioepiteliales que al contraerse permiten la eyección de la leche hacia los conductos que desembocan en la cisterna mamaria (Figura 3; Turner, 1952; Akers, 2002).



Figura 3. Alvéolo mamario de una oveja en lactación, compuesto por un epitelio cúbico simple rodeado de células mioepiteliales; GG, Glóbulo de grasa en el lumen alveolar. Fotografía cedida por Marcos Royo González y Elena Gayo Rocas.

A la glándula mamaria llegan, transportados por el torrente sanguíneo, los AG de origen alimentario o derivados de su metabolismo lipídico en el rumen. Del mismo modo, el acetato y el  $\beta$ -hidroxibutirato, que provienen de la fermentación ruminal de los hidratos de carbono, alcanzan la célula secretora donde serán utilizados como la fuente principal de moléculas de carbono para la síntesis de AG de novo (Moore y Christie, 1981). Este proceso de lipogénesis implica la acción coordinada de varias enzimas (Figura 4), tal y como se detalla en los apartados siguientes.

### 1.2.1. Síntesis de ácidos grasos de novo

Las principales fuentes para la síntesis de AG en la glándula mamaria de ruminantes son el acetato, que proviene de la fermentación de los hidratos de carbono de la dieta, y en menor medida el  $\beta$ -hidroxibutirato, procedente de la transformación del ácido butírico en las paredes del rumen y el hígado (Vernon, 2005; Bauman et al., 2011b). Estas moléculas son captadas del torrente sanguíneo

gracias a la extensa red de capilares que están en contacto con la célula epitelial secretora mamaria. Como se muestra en la Figura 4, para poder iniciar la síntesis de novo se requiere la activación con coenzima-A del acetato o del  $\beta$ -hidroxibutirato, dando lugar a acetil-CoA o butiril-CoA, respectivamente (Moore y Christie, 1981). La enzima acil-CoA sintetasa citoplasmática (codificada por el gen *ACSS2*) parece ser la principal responsable de este proceso de activación (Bionaz y Loor, 2008b; Invernizzi et al., 2010).

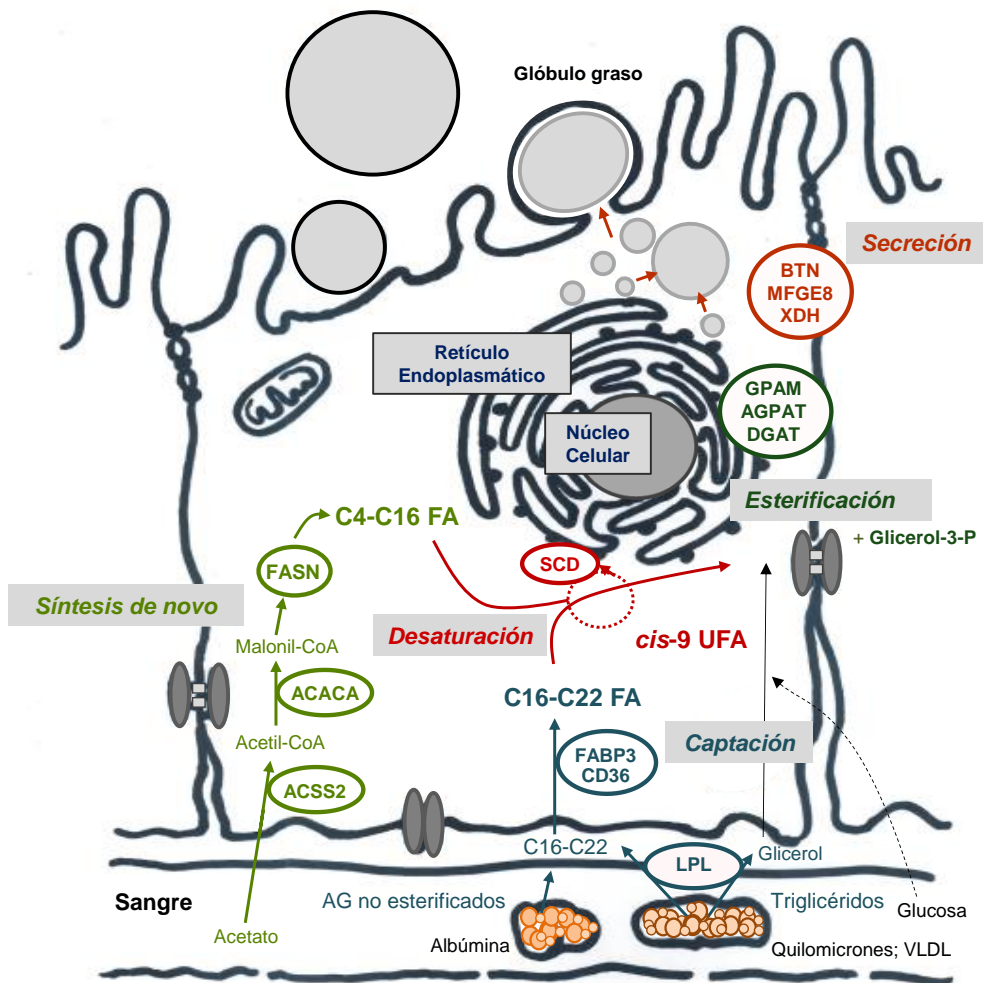


Figura 4. Principales enzimas implicadas en la lipogénesis en una célula epitelial del tejido secretor mamario de rumiantes. Figura adaptada de Bernard et al. (2008).



Una vez activado, el butiril-CoA puede ser usado como precursor de la síntesis de AG, pero no en su elongación, por lo que su utilización contribuye en menor medida a la síntesis de novo que el acetil-CoA (Bauman et al., 2011b). A continuación, en el citosol de la célula epitelial, las enzimas acetil-CoA carboxilasa alfa y la ácido graso sintasa (codificadas por los genes *ACACA* y *FASN*, respectivamente) llevan a cabo el proceso de síntesis de AG de cadena corta y media (Bernard et al., 2008; Bionaz y Loor, 2008b). En primer lugar, la *ACACA* cataliza la conversión de acetil-CoA a malonil-CoA, sobre el que la enzima *FASN* irá añadiendo consecutivamente más moléculas de acetil-CoA para elongar la cadena lipídica hasta un máximo de 16 átomos de carbono (Bauman y Davis, 1974). Esto explicaría por qué la mayor parte de los AG de la leche tienen una cadena par de carbonos. Aunque el origen de los AG de cadena impar de la leche es principalmente ruminal, se ha demostrado que la glándula mamaria es capaz de sintetizar de novo estos AG a partir del propionato, elongando después la cadena lipídica hasta un máximo de 17 átomos de carbono mediante la enzima propionil-CoA (Vlaeminck et al., 2006, 2015).

### **1.2.2. Captación de ácidos grasos circulantes en el torrente sanguíneo**

Continuando con la Figura 4, la utilización de los triglicéridos plasmáticos unidos a quilomicrones o VLDL requiere la acción de la enzima lipoproteinlipasa (codificada por el gen *LPL*), localizada en la superficie del endotelio capilar. Esta enzima rompe los enlaces éster y libera los AG de las lipoproteínas (Barber et al., 1997; Bionaz y Loor, 2008b) que, junto a los AG no esterificados presentes ya en la sangre, atravesarán la membrana plasmática gracias a la acción de proteínas transportadoras o, en menor medida, por difusión pasiva (Bauman et al., 2011b). La captación y el posterior transporte intracelular de AG es un proceso complejo y aún bastante desconocido en el que intervienen una serie de enzimas (Bernard et al., 2008). Entre ellas, cabe destacar el papel de la isoforma 3 de la proteína transportadora de AG (codificada por el gen *FABP3*) y la translocasa de AG (codificada por el gen *CD36*), que portarán los AG de cadena larga y muy larga,

desde su captación en la superficie luminal del endotelio hasta los orgánulos citoplasmáticos, donde serán procesados (Bionaz y Loor, 2008b).

### **1.2.3. Desaturación de los ácidos grasos**

Puesto que la mayor parte de los AG que abandonan el rumen son AG saturados, la glándula mamaria de los rumiantes es especialmente activa en el proceso de desaturación (Bernard et al., 2013), que consiste en introducir un doble enlace de configuración *cis* (Ntambi y Miyazaki, 2004). Este proceso permite reducir el punto de fusión de los triglicéridos presentes en la leche, lo cual resulta clave para el mantenimiento de la fluidez de la grasa láctea (e. g., 18:0, punto de fusión: 69°C frente a *cis*-9 18:1, punto de fusión: 14°C; Timmen y Patton, 1988; Bauman et al., 2011b).

La enzima encargada de este proceso en la posición  $\Delta 9$  es la esteroil-CoA desaturasa (SCD, también denominada  $\Delta$ -9 desaturasa), de la que se han descrito dos isoformas en rumiantes (codificadas por los genes *SCD1* y *SCD5*; Lengi y Corl, 2007) La isoforma SCD1 se expresa en mayor medida en la glándula mamaria y parece ser la principal encargada de la desaturación de AG (Bionaz y Loor, 2008b; Bernard et al., 2013), por ello su estudio ha recibido gran interés debido a su impacto positivo sobre la calidad nutricional de la grasa de la leche (Shingfield et al., 2008; Bichi et al., 2012, Bernard et al., 2013; Frutos et al., 2014). Dada su elevada afinidad por el 18:0, la SCD es la responsable de una gran parte del *cis*-9 18:1 que aparece en la leche (29-63% en ovino; Bichi et al., 2012; Frutos et al., 2014; Toral et al., 2015b). También sintetiza la mayoría del *cis*-9, *trans*-11 CLA secretado en la grasa láctea (51-94% en ovino; Bichi et al., 2012; Frutos et al., 2014; Toral et al., 2015b).

Además, en el tejido secretor mamario de los mamíferos se han identificado otras enzimas desaturadas (FADS), como por ejemplo la FADS1 y la FADS2, que añaden dobles enlaces en la posición  $\Delta 5$  y  $\Delta 6$  de los PUFA de cadena larga (Rodríguez-Cruz et al., 2006). Sin embargo, la abundancia del ARNm de los genes

que las codifican parece ser muy baja en rumiantes (Bionaz y Loor, 2008b; Toral et al., 2013a).

#### **1.2.4. Esterificación de los ácidos grasos**

Los AG son esterificados con glicerol-3-fosfato para la síntesis de triglicéridos (TG) en el retículo endoplasmático, siguiendo un patrón de distribución relativamente constante en los puntos de unión al glicerol que permite una adecuada fluidez del glóbulo graso a temperatura corporal (Taylor y MacGibbon, 2011). Generalmente, los AG de 18 átomos de carbono ocupan el primer carbono del glicerol (posición *sn-1*, Taylor y MacGibbon, 2011), proceso que es mediado por la enzima glicerol-3-fosfato aciltransferasa mitocondrial (codificada por el gen *GPAM*; Bernard et al., 2008). A continuación, los AG de 8 a 14 átomos de carbono se unen principalmente a la posición *sn-2* mediante la acción de la enzima 1-acilglicerol-3-fosfato O-aciltransferasa (codificada por *AGPAT*; Coleman y Lee, 2004; Bernard et al., 2008; Bionaz y Loor, 2008a,b), que convierte el ácido lisofosfatídico formado en la primera reacción en ácido fosfatídico. Este paso va seguido de la actuación de la enzima lipina (codificada por el gen *LPIN*; Donkor et al., 2007; Bionaz y Loor, 2008a,b) que retira el grupo fosfato del ácido fosfatídico para producir diacilglicerol (Coleman y Lee, 2004). Finalmente, los AG de cadena corta (e. g., 4:0 o 6:0) y el *cis-9* 18:1, se esterifican en la posición *sn-3* por acción de la diacilglicerol O-aciltransferasa (codificada por el gen *DGAT*; Coleman y Lee, 2004; Bernard et al., 2008; Taylor y MacGibbon, 2011), lo que reduce la densidad de empaquetamiento y con ello el punto de fusión del TG resultante (Taylor y MacGibbon, 2011).

#### **1.2.5. Síntesis y secreción del glóbulo graso**

Tras la síntesis de los TG, estos se agrupan próximos a la membrana del retículo endoplasmático, rodeados de una fina membrana constituida por proteínas y lípidos polares de dicho orgánulo, formándose así las gotas lipídicas. Algunas de

estas gotas se fusionan entre ellas mientras son transportadas hacia la membrana apical de la célula, dando lugar a una gota de mayor tamaño (Keenan y Mather, 2006). En su liberación al lumen alveolar, las gotas lipídicas se recubren de parte de la membrana plasmática de la célula epitelial, lo que forma una capa que previene tanto la coalescencia entre los glóbulos de grasa como su degradación enzimática (Dewettinck et al., 2008). Dicha capa, conocida como membrana del glóbulo graso, tiene una composición compleja e incluye algunas proteínas que podrían ser esenciales para la secreción de la grasa en la leche. Entre ellas, debe señalarse la butirofilina, subfamilia 1, miembro A1 (BTN1A1) y la xantina deshidrogenasa (XDH), que serían las más abundantes y cuya ausencia provoca la acumulación de gotas de grasa en el interior de las células secretoras (Ogg et al., 2004); la perilipina 2, que actúa como una capa protectora previniendo la acción de las lipasas y podría interactuar con las proteínas anteriores permitiendo la unión de las gotas lipídicas con la membrana apical (PLIN2; McManaman et al., 2007), y la anteriormente mencionada translocasa de AG (CD36), que podría ejercer en este caso cierto papel en la señalización intracelular (Keenan y Mather, 2006).

### ***1.2.6. Factores de transcripción implicados en la regulación nutricional de la lipogénesis mamaria.***

Los factores de transcripción son proteínas que se activan por señales citoplasmáticas y regulan la transcripción del ADN (Kadegowda et al., 2009; Ma y Corl, 2012). Sin participar directamente en un paso específico de una ruta metabólica, pueden activar o inhibir la expresión génica de otros genes que codifican algunas de las enzimas involucradas en la lipogénesis mamaria (Figura 5; Bernard et al., 2008; Bionaz y Loor, 2008b; Kadegowda et al., 2009). En relación con este proceso, posiblemente los dos más importantes sean el regulador de transcripción del factor 1 de unión a elementos reguladores del esterol (*SREBF1*) y el receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas (*PPARG*). Sin embargo, los trabajos más recientes apuntan a que la regulación transcripcional

podría estar mediada por la interacción de muchos más factores de los que no conocemos en detalle su grado de implicación (Bionaz et al., 2015; Osorio et al., 2016).

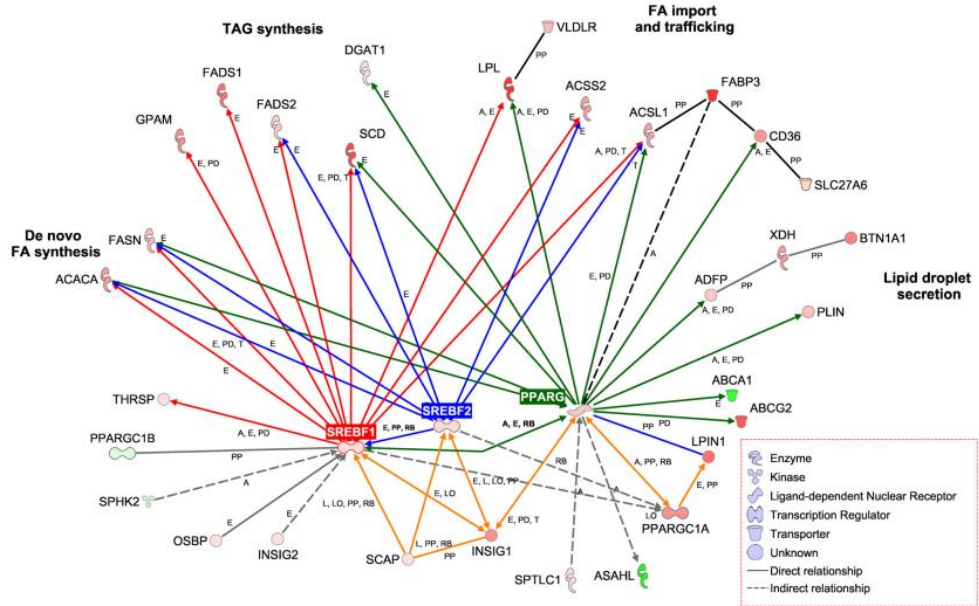


Figura 5. Potenciales redes de regulación de genes involucrados en la síntesis de grasa láctea en vacuno, según Bionaz y Loor (2008b). Las líneas rojas, azules y verdes señalan aquellos genes cuya expresión es regulada por SREBF1, SREBF2 y PPARG, respectivamente. El color naranja corresponde a la red que abarca PPARG, PPARGC1A, LPIN1, INSIG1 y SCAP, que controlaría la expresión o función de las proteínas dependientes de SREBF. Las letras que acompañan a las líneas especifican el tipo de acción: sobre la actividad (A), la expresión (E), la localización (LO), la proteólisis (L), la unión a ARN (RB), la unión proteína-ADN (PD) y la unión proteína-proteína (PP).

El primer factor de transcripción al que se atribuyó el papel clave en la regulación de la lipogénesis fue SREBP1 (codificado por el gen *SREBF1*; Ahnadi et al., 2002; Bauman et al., 2011a; Ma y Corl, 2012), presente en la membrana del retículo endoplasmático en forma de precursor inactivo y estrechamente asociado a la chaperona SREBP (SCAP), formando el complejo SREBP-SCAP (Bernard et al., 2008; Bauman et al., 2011a). Cuando los niveles de esteroides intracelulares son

bajos, el complejo SREBP-SCAP se desplaza al aparato de Golgi (Bernard et al., 2008) donde se activa mediante una serie de degradaciones proteolíticas antes de entrar en el núcleo celular (Goldstein et al., 2002). Una vez alcanzado el núcleo, la proteína SREBP1 madura se une al elemento regulador de esteroides (SRE) presente en las regiones promotoras de varios genes diana (e. g., *ACACA* y *FASN*), activando así su transcripción (Eberlé et al., 2004; Harvatine y Bauman, 2006; Bauman et al., 2011a). Del mismo modo, SREBP1 podría unirse al SRE presente en la región promotora de *SREBF1*, regulando así su propia expresión (Harvatine y Bauman, 2006). La mayor parte de los trabajos llevados a cabo en ganado vacuno otorgan a SREBP1 un papel predominante como regulador de la síntesis de grasa láctea, aunque hasta el momento no ha sido posible establecer el mecanismo directo por el que actúa (Bionaz et al., 2015; Osorio et al., 2016). Existe, en cambio, un estudio de Bionaz y Loor (2008b) en el que se señala que SREBP1 tendría menor peso como regulador de la lipogénesis mamaria, dado que el aumento de su expresión al comienzo de la lactación fue mínimo en comparación con la del gen 1 inducido por insulina (*INSIG1*). Por otra parte, la proteína *INSIG1* podría bloquear el complejo SREBP-SCAP en el retículo endoplasmático, impidiendo su movilidad hacia el aparato de Golgi y, por ende, su entrada al núcleo celular (Yang et al., 2002; Eberlé et al., 2004; Bernard et al., 2008). Esto explicaría que la actividad de SREBP1 pudiera estar parcialmente inhibida en la glándula mamaria en lactación (Bionaz y Loor, 2008b; Osorio et al., 2016).

Una cuarta proteína, la lipina 1 (codificada por el gen *LPIN1*), podría inhibir mediante fosforilación la actividad de la SREBP1 madura en el núcleo celular (Osorio et al., 2016). Es interesante destacar que la lipina 1 es también diana de otros importantes factores de transcripción, como los receptores activados por el proliferador de peroxisomas (PPAR; Bionaz et al., 2013), cuya activación podría afectar a la actividad de SREBP1 mediante la sobreexpresión de *LPIN1* (Osorio et al., 2016). Dentro de los diferentes PPAR (e. g.,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ), el receptor  $\gamma$ , conocido como PPAR $\gamma$  (Figura 5), es el que parece tener mayor importancia en la regulación de la síntesis de grasa en la glándula mamaria (Bionaz et al., 2013,

2015). Esta proteína receptora (codificada por el gen *PPARG*) se activa mediante la unión a diferentes ligandos, como los AG de cadena larga (Bionaz et al., 2013), lo que provoca cambios en su expresión y afecta a la lipogénesis (Desvergne et al., 2006; Osorio et al., 2016). El gen se expresa fundamentalmente en los adipocitos, aunque la abundancia de su ARNm en el tejido secretor mamario aumenta en la lactación (Bionaz y Loor, 2008b). Una vez activado, podría participar en la regulación de las principales enzimas que participan en el metabolismo lipídico, a diferentes niveles (e. g., captación y transporte de AG, síntesis de novo y formación de la gota lipídica; Bionaz y Loor, 2008b; Shi et al., 2014; Bionaz et al., 2015; Osorio et al., 2016), así como regulando la expresión de otros factores de transcripción (e. g., *SREBF1* e *INSIG1*; Kadegowda et al., 2009; Shi et al., 2013). No obstante, los resultados de estudios in vivo en rumiantes cuyas dietas están suplementadas con lípidos son a menudo aparentemente contradictorios (Invernizzi et al., 2010; Bichi et al., 2013b). Esto pone de manifiesto la complejidad de las redes de regulación génica de la lipogénesis mamaria (Figura 5) y plantea que probablemente existan otras proteínas, o factores de transcripción, también involucradas que de momento se desconocen (Bernard et al., 2008; Ibeagha-Awemu et al., 2016). En este sentido, se ha sugerido la implicación de otros factores de transcripción, como por ejemplo el elemento de respuesta a la hormona tiroidea (THRSP; Harvatine y Bauman, 2006; Bauman et al., 2011a) o el receptor hepático X alfa (codificado por el gen *NR1H3*; Lengqvist et al., 2004). Sin embargo, su participación en el proceso posiblemente no sea tan relevante como los anteriormente descritos (Harvatine y Bauman, 2006; Harvatine et al., 2014).

Para finalizar, tras confeccionar una parte de las redes de regulación de la síntesis de grasa en la glándula mamaria (Figura 5; Bionaz et al., 2015; Osorio et al., 2016), parece que entre los factores de transcripción destacan *SREBF1* y *PPARG*. Aunque ambos muestran un alto potencial en los estudios de genómica, su relevancia es aún controvertida y cuestionada en algunos trabajos recientes (Osorio et al., 2016, Suárez-Vega et al., 2015).

## 2. EFECTO DE LA ALIMENTACIÓN SOBRE LA COMPOSICIÓN DE LA GRASA DE LA LECHE

La grasa es el componente más variable de la leche de los rumiantes. Entre los factores que afectan a su contenido y composición (e. g., especie, raza, estado fisiológico; Tsiplakou et al., 2006, Bauman et al., 2011b), el más importante es la dieta (Chilliard et al., 2007; Shingfield et al., 2013). Numerosos trabajos han mostrado que el valor nutricional de la grasa de la leche puede mejorarse de forma natural y efectiva mediante cambios en la alimentación del ganado. Por ello, en los últimos años se ha prestado especial atención a la nutrición de rumiantes con el fin de obtener productos con un mayor contenido de AG con efectos potencialmente beneficiosos para la salud de los consumidores (e. g., *trans*-11 18:1, *cis*-9, *trans*-11 CLA o 18:3 n-3; Lock y Bauman, 2004; Hervás et al., 2008). El efecto de la alimentación sobre el contenido y la composición de la grasa de la leche viene determinado por una compleja interacción entre los nutrientes y el metabolismo ruminal y mamario (Bauman y Griinari, 2001). En primer lugar, debe considerarse la transferencia de los lípidos presentes en la dieta y de los productos intermedios derivados de su BH ruminal (Jenkins et al., 2008). En este sentido, se sabe por ejemplo que determinadas estrategias de alimentación permiten inhibir parte del proceso de BH ruminal del LA, consiguiéndose así aumentar el flujo de VA que escapa del rumen (Boeckeaert et al., 2008; Glasser et al., 2008) y llega a la glándula mamaria (Figura 6; Lock y Bauman, 2004; Toral et al., 2010a,b).

En segundo lugar, es fundamental el metabolismo en la propia glándula mamaria (Bauman et al., 2011a; Shingfield et al., 2013). Siguiendo con el mismo ejemplo, el VA que ha escapado del rumen sirve de sustrato a la enzima SCD para la formación de RA (Frutos et al., 2014; Toral et al., 2015b), uno de los principales isómeros del CLA con efectos potencialmente beneficiosos para la salud (Lock y Bauman, 2004). En este proceso podría haber una regulación nutricional relacionada con mecanismos transcripcionales (Harvatine y Bauman, 2006; Bauman et al., 2011a). De hecho, en el ganado vacuno se ha relacionado la



reducción de AG de cadena corta y media en la leche (sintetizados de novo en la glándula mamaria) con una represión de determinados genes implicados en la síntesis de novo (Piperova et al., 2000; Shingfield et al., 2013). No obstante, los mecanismos moleculares de este tipo de respuesta aún no han sido esclarecidos en rumiantes (Bauman et al., 2011a; Bichi et al., 2013b; Bionaz et al., 2015).

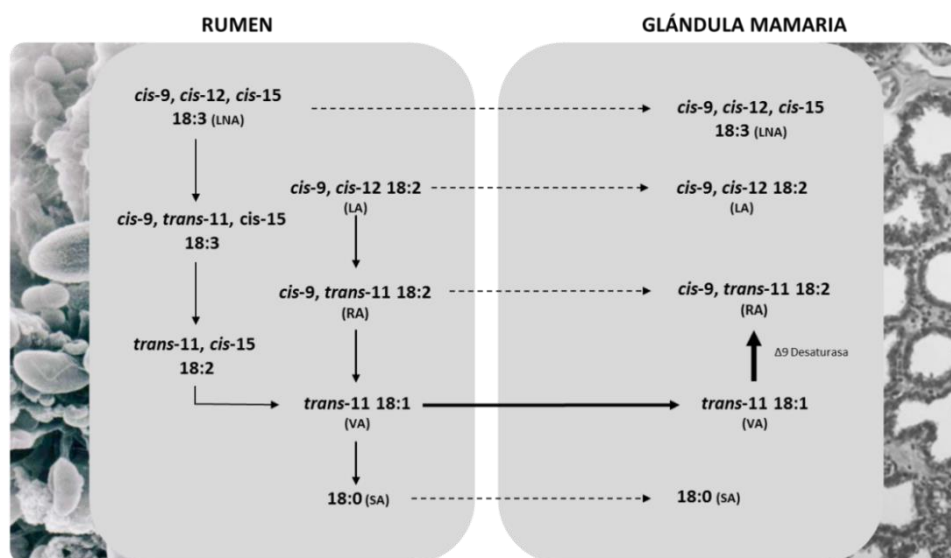


Figura 6. Incremento de la concentración de cis-9, trans-11 CLA en la grasa láctea mediante acumulación de trans-11 18:1 al inhibir el último paso de la biohidrogenación ruminal.

## 2.1. EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN DE LA DIETA CON TANINOS

Los taninos son un grupo amplio y heterogéneo de compuestos fenólicos presentes en numerosas especies vegetales que pueden ser consumidas por los rumiantes (Mole, 1993; Frutos et al., 2004; Mueller-Harvey, 2006). Tradicionalmente, aunque de un modo un poco simplista según diversos autores, los taninos se han clasificado en dos grupos: hidrolizables (TH) y condensados (TC; McLeod et al., 1974; McMahan et al., 1999). Los TH son polialcoholes constituidos por un carbohidrato en posición central, cuyos grupos hidroxilo se encuentran esterificados con grupos fenólicos (Khanbabaee y Van Ree, 2001). Por

su parte, los TC son oligómeros o polímeros no ramificados de flavonoides, unidos mediante enlaces carbono-carbono y carecen del núcleo glucídico que caracteriza a los TH (Khanbabaei y van Ree, 2001). Entre las propiedades químicas de los taninos, destacan su poder reductor derivado de su capacidad para absorber oxígeno, especialmente en soluciones alcalinas (Chyau et al., 2002) y su capacidad como agente quelante que les permite unirse con diversos iones metálicos (e. g.,  $Fe^{3+}$ ,  $Al^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$ ) y precipitar en soluciones acuosas (Santos-Buelga y Scalbert, 2000). Sin embargo, la propiedad más importante de los taninos radica en su capacidad para formar complejos estables, principalmente con las proteínas, pero también con otras moléculas, tales como polisacáridos, celulosa, hemicelulosa, pectina, alcaloides, ácidos nucleicos, minerales, etc. (Doce, 2010; Schofield et al., 2001). Centrándose en su efecto sobre la fermentación ruminal, existe cierta controversia ya que este puede variar considerablemente en función del tipo de tanino, su estructura y peso molecular, la cantidad consumida y la especie de rumiante que los consume (Barahona et al., 2003; Frutos et al., 2004). En líneas generales, la ingesta de taninos se ha relacionado con una menor degradación de la proteína en el rumen y de la producción de nitrógeno amoniacal (Bhatta et al., 2007; Frutos et al., 2004). Esta acción se ejerce a través de diversos mecanismos, como la formación de complejos tanino-proteína, o la inhibición del crecimiento y la actividad de enzimas microbianas (McMahon et al., 1999; McSweeney et al., 2001). De acuerdo con Salem et al. (2007), los taninos también podrían influir en la síntesis de proteína microbiana, al destinar una mayor proporción de los nutrientes disponibles a este proceso en detrimento de la producción de AG de cadena corta. Aunque su principal acción se ejerce sobre las proteínas, también se ha observado una reducción en la degradación de los hidratos de carbono, particularmente celulosa, hemicelulosa y almidón (Schofield et al., 2001), que pudieran deberse a una menor disponibilidad de los puntos de anclaje para las bacterias ruminales (Bento et al., 2005) o la formación de complejos con macromoléculas glucídicas (McSweeney et al., 2001). El efecto negativo sobre la fermentación ruminal puede verse reflejado tanto en la producción de AGV como

en sus proporciones molares (Frutos et al., 2004; Tiemann et al., 2008). No obstante, muchos investigadores no han registrado variaciones significativas en los AGV (e. g., Hervás et al., 2003; Osoro et al., 2007; Khiaosa-Ard et al., 2009).

Aunque históricamente se han considerado compuestos secundarios con efecto negativo sobre la alimentación de los rumiantes (McSweeney et al., 2001; Frutos et al., 2004), actualmente se sabe que estos efectos son enormemente variables y que pueden ejercer también una acción positiva, dependiendo de la dosis, del tipo de tanino y de su estructura y reactividad, la cual parece ligada al ratio de procianidinas/prodelfinidas, el grado de polimerización o el peso molecular (Mueller-Harvey, 2006).

Respecto a su capacidad como moduladores de la BH ruminal, diversos estudios han señalado que la adición de taninos a la dieta podría inhibir el paso de VA a SA, lo que favorecería el flujo post-ruminal de VA y, consecuentemente, la síntesis endógena de CLA en la glándula mamaria (Khiaosa-Ard et al., 2009; Vasta et al., 2009; Buccioni et al., 2011, 2015). Por el contrario, otros trabajos sugieren una inhibición general del proceso de BH, en lugar de un efecto específico sobre la conversión de VA a SA (e. g., Kronberg et al., 2007; Minieri et al., 2014). Como ya se ha apuntado, estas diferencias podrían deberse a la heterogeneidad de este grupo de compuestos, a la dosis consumida por el animal o al grado de interferencia con las poblaciones bacterianas implicadas en cada paso de la BH (Buccioni et al., 2015).

Los taninos se han presentado en los últimos años como una prometedora estrategia nutricional para modular el perfil lipídico de la leche, especialmente cuando se utilizan en combinación con aceites vegetales ricos en LA, lo que permite una mayor acumulación de VA en el rumen y posteriormente de CLA en la grasa láctea (Toral et al., 2013b; Buccioni et al., 2015). Sin embargo, dada la divergencia entre los trabajos publicados y las altas dosis empleadas en alguno de ellos, que serían inviables en la práctica ganadera, existen demasiadas incertidumbres sobre los efectos beneficiosos de su adición a la dieta de rumiantes (Buccioni et al., 2011, 2015; Toral et al., 2011, 2013b).

## 2.2. EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN DE LA DIETA CON ACEITES VEGETALES

Una de las estrategias más empleadas para mejorar el valor nutricional de la leche es la suplementación de la dieta de rumiantes con aceites vegetales, siendo la respuesta bastante diferente en vacuno, caprino y ovino (Lock y Bauman, 2004; Chilliard et al., 2007, Hervás et al., 2008).

Puesto que en el grupo de investigación en el que se ha desarrollado esta tesis ya se han publicado varios trabajos (e. g., Gómez-Cortés et al. 2008a,b; Hervás et al., 2008) y tesis (e. g., Toral, 2010; Castro-Carrera, 2015) sobre este tipo de suplementación en ovejas en lactación, en este apartado solo se mencionarán brevemente los principales efectos sobre el perfil lipídico de la leche. Cabe destacar que, si bien existe la idea generalizada de que los lípidos insaturados pueden afectar negativamente a la fermentación ruminal, la respuesta depende del tipo de aceite usado y especialmente de su nivel de inclusión en la dieta (Jenkins et al., 1993; Atkinson et al., 2006). Las dosis de aceites que generalmente se añaden para modificar el perfil de AG de los productos finales suelen ser bajas o moderadas ( $\leq 4\%$  MS) y no tienen por qué asociarse con efectos negativos sobre los procesos de digestión en el rumen (Atkinson et al., 2006; Toral et al., 2010a).

Los aceites más usados son ricos en PUFA de 18 carbonos, principalmente 18:2 n-6 (LA) y 18:3n-3 (LNA), lo que permite aumentar la concentración en la leche de AG con efectos potencialmente saludables, como *trans*-11 18:1 y *cis*-9, *trans*-11 CLA (RA; Hervás et al., 2008; Bernard et al., 2009; Castro-Carrera et al., 2015). Los aceites ricos en LA (como el de girasol o el de soja) podrían parecer más efectivos debido a que este AG favorece la síntesis de RA mediante dos vías: BH y desaturación del VA en la glándula mamaria, mientras que el LNA (encontrado por ejemplo en el aceite de linaza) únicamente contribuye a mejorar los niveles de RA mediante su síntesis endógena a partir del VA (Figura 6; Palmquist et al., 2005). Sin embargo, no todos los estudios coinciden con estos resultados y en general parece que los aumentos de RA en la leche son similares cuando se suplementa la dieta con aceites ricos en LA o LNA (Glasser et al., 2008). Esto es

debido a que el origen principal del RA en la leche es la síntesis endógena en los tejidos a partir de VA, y no de la captación del RA de origen ruminal (Griinari et al., 2000; Corl et al., 2001; Bernard et al., 2010; Bichi et al., 2012).

A pesar de estos efectos positivos, es preciso señalar que en algunos casos se ha observado que la suplementación con aceites vegetales también puede dar lugar a concentraciones relativamente altas de *trans*-10 18:1 en la leche (Gómez-Cortés et al., 2008a; Hervás et al., 2008), un isómero abundante en las grasas parcialmente hidrogenadas, que podría aumentar el riesgo de sufrir trastornos cardiovasculares (Shingfield et al., 2008). En cualquier caso, este tema es aún bastante controvertido y persiste la duda de si las grasas derivadas de los rumiantes tendrían el mismo comportamiento que las industriales, ya que la distribución de los isómeros *trans* es muy diferente (OMS, 2003; Recio et al., 2009).

### 2.3. EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN DE LA DIETA CON LÍPIDOS MARINOS

Al igual que se ha señalado previamente para la suplementación con lípidos vegetales, en el grupo de investigación en el que se enmarca esta tesis doctoral se han publicado varios trabajos (Toral et al., 2010a,b,c, 2015a; Bichi et al., 2013a) y tesis doctorales (Toral, 2010; Bichi, 2016) en los que se detalla no solo el perfil lipídico del contenido digestivo y de la leche en respuesta a la adición a la dieta de lípidos de origen marino sino también el efecto sobre el rendimiento productivo de los animales, con especial atención al síndrome de MFD. Por lo tanto, en este apartado solo se mencionarán algunos aspectos de este tipo de suplementación.

La leche y los derivados lácteos no contribuyen prácticamente al aporte diario de AG n-3 (conocidos comúnmente como omega-3) de cadena muy larga en la dieta de las personas (Simopoulos, 2009). Sin embargo, dado el efecto beneficioso de estos AG sobre la salud, se han estudiado varias estrategias para tratar de aumentar su contenido en la leche mediante la adición de aceites marinos a la dieta de los rumiantes (Lock y Bauman, 2004; Boeckeaert et al., 2008).

Los lípidos de origen marino (e. g., microalgas marinas o aceite de pescado) son ricos en PUFA de la serie n-3, tales como el ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6 n-3) o el eicosapentaenoico (EPA, 20:5 n-3), pero la eficiencia de su transferencia desde la dieta a la leche no es demasiado alta (Reynolds et al., 2006; Shingfield et al., 2006; Toral et al., 2010b). Esto vendría explicado no solo por el extenso metabolismo que sufren los AG de cadena larga en el rumen (Shingfield et al., 2003), sino también porque estos AG son transportados con mayor dificultad en las principales fracciones lipídicas captadas a nivel mamario (triglicéridos y AG no esterificados; Kitessa et al., 2001). Sin embargo, su uso como suplemento resulta muy eficaz para aumentar el contenido de RA en la grasa láctea, al actuar como potentes inhibidores del último paso de la BH e impedir la conversión del VA a SA (Griinari y Bauman, 1999). De este modo, tal y como se ha comentado previamente, se favorece un flujo post-ruminal rico en VA capaz de aumentar la síntesis endógena de RA (Figura 6; Whitlock et al., 2002; Lock y Bauman, 2004).

Ante un mismo nivel de inclusión en la ración, los aceites de origen marino parecen aumentar de forma más eficaz el contenido lácteo de RA que los aceites vegetales (Whitlock et al., 2002; Toral et al., 2010a,b). Por ello, una de las estrategias más prometedoras para aumentar la concentración de este AG en la leche pasa por suplementar la dieta de los rumiantes con una combinación de lípidos marinos y aceites vegetales ricos en LA. Así, se incrementa la concentración de VA que escapa del rumen gracias a la BH del LA y su conversión a SA se inhibe por los PUFA presentes en los lípidos marinos (AbuGhazaleh et al., 2004; Toral et al., 2010a,b; Bichi et al., 2013a).

No obstante, al igual que sucede con la suplementación con aceites vegetales, los resultados positivos van acompañados de aumentos considerables en algunos AG *trans*-18:1 en leche (de *trans*-4 a -15; Toral et al., 2010a,b; Bichi et al., 2013a), sobre los que, tal y como se menciona en el apartado anterior, existe aún controversia acerca de sus efectos sobre la salud del consumidor (OMS, 2003; Recio et al., 2009).

En general, se asume que los principales responsables del efecto de los lípidos marinos sobre la BH ruminal son el EPA y el DHA, pero no se ha estudiado la posible contribución de otros AG menos abundantes, como el ácido docosapentaenoico (DPA, 22:5 n-3), cuya tasa de transferencia aparente de los alimentos a la leche es superior a las de los anteriores (Offer et al., 1999; Toral et al., 2010a; Shingfield et al., 2012).

Por otra parte, también se ha planteado el posible efecto negativo de la adición de lípidos sobre la digestión ruminal (Palmquist y Jenkins, 1980) y, más concretamente, sobre la reducción de la degradabilidad de la fibra y la producción de AGV (Jenkins et al., 1993). No obstante, algunos trabajos han demostrado que las alteraciones observadas al suplementar la dieta con fuentes lipídicas dependen en gran medida del tipo y la cantidad de grasa utilizada, la composición de la dieta basal ofertada a los animales (Kucuk et al., 2004, Toral et al., 2010c) y los cambios en la microbiota ruminal (Boeckert et al., 2008; Kim et al., 2008). Ahora bien, tanto en el caso de estos lípidos como en el de los vegetales, cuando el objetivo final es la modificación del perfil de AG de la leche, la dosis utilizada suele ser demasiado baja para perturbar significativamente la fermentación ruminal (Toral et al., 2010c).

Por último, es importante destacar que la adición de lípidos marinos a la dieta puede dar lugar al denominado “síndrome de baja grasa en la leche” (Bauman y Griinari, 2001; Toral et al., 2010a,b; Chilliard et al., 2014), un problema comúnmente observado en rumiantes que anula su aplicación práctica por el efecto negativo sobre el rendimiento productivo.

### **3. SÍNDROME DE BAJA GRASA EN LA LECHE**

El principal inconveniente de la inclusión de lípidos de origen marino en la dieta de rumiantes sería la reducción que ocasionan sobre el contenido de grasa en la leche, sin verse afectados el resto de los componentes (e. g., lactosa, proteína) ni la producción total de leche, según la definición de Bauman y Griinari (2001) basada

en observaciones en vacas. Esta depresión, conocida también como síndrome de baja grasa en la leche (MFD, por las siglas en inglés de milk fat depression) ha sido investigada durante décadas y ampliamente descrita en el ganado vacuno lechero cuando se alimenta con una dieta rica en concentrado o suplementada con una fuente de AG insaturados (Bauman y Griinari, 2003; Harvatine y Bauman, 2006; Shingfield et al., 2010). En esta especie, la disminución del contenido de grasa puede alcanzar valores cercanos al 40%, con caídas en las tres fracciones en las que se clasifican los AG (<16 C, 16 C y >16 C) al verse afectada tanto la síntesis de novo como la captación de AG de la circulación sanguínea (Harvatine y Bauman, 2006).

En pequeños rumiantes, en cambio, la investigación sobre la MFD es relativamente reciente y escasa, pese a tratarse de un síndrome con importantes repercusiones económicas, ya que la mayor parte de la leche de estos animales se utiliza para la elaboración de queso (Pulina et al., 2006). El ganado caprino de leche parece ser menos sensible a padecer MFD (Bernard et al., 2009; Ollier et al., 2009). Aunque existen trabajos en los que se describe y caracteriza la MFD en cabras en respuesta a la administración de *trans*-10, *cis*-12 CLA (Lock et al., 2008) o a la suplementación con aceite de pescado (Chilliard et al., 2014; Toral et al., 2016a), la especie no muestra MFD cuando su dieta se suplementa con aceites vegetales (Bernard et al., 2009).

En ovino, la MFD aparece al suplementar la dieta con lípidos marinos (Bichi et al., 2013a,b) o tras la administración de *trans*-10, *cis*-12 CLA (Hussein et al., 2013, Ticiani et al., 2016; Toral et al., 2015a), mientras que, al igual que el caprino, el rendimiento productivo no se ve afectado cuando su dieta se suplementa con aceites vegetales o es rica en concentrado (Pulina et al., 2006; Gómez-Cortés et al., 2008b; Hervás et al., 2008).

En las ovejas, especie en la que se ha centrado esta tesis doctoral, la MFD se caracteriza por una disminución variable del contenido de grasa láctea (p.ej., alrededor del 17-31% en Capper et al., 2007; Toral et al., 2010a,b; Bichi et al., 2013a). Esta reducción puede ir acompañada de una pequeña caída en el contenido de proteína (aproximadamente del 5-7%; Toral et al., 2010a,b, 2016a),



aunque su síntesis estaría regulada por mecanismos independientes de la síntesis de grasa (Mele et al., 2006; Pulina et al., 2006).

En el perfil lipídico de la leche de vacuno con MFD, se observa una marcada caída en el contenido de SA, de ácido oleico (OA) y de AG de cadena corta <16C (Loor et al., 2005; Gama et al., 2008), frente al aumento de algunos AG con posibles efectos antilipogénicos (e. g., *trans*-10 18:1 y *trans*-10, *cis*-12 CLA; Shingfield et al., 2010). El aumento de este último AG no siempre se observa en el ganado ovino con MFD (Toral et al, 2010a,b), ni tampoco la reducción en los AG de cadena corta, aunque la producción molar de <16 C puede verse disminuida por un efecto dilución (Toral et al., 2015a).

El estudio de los mecanismos implicados en la MFD ha protagonizado una parte importante de la investigación científica en nutrición de rumiantes en las últimas décadas, habiéndose planteado diversas hipótesis. En la actualidad, la más ampliamente aceptada es la “Teoría de la biohidrogenación” y dataría de los años 70 (Davis y Brown, 1970; Pennington y Davis, 1975), pero cobró especial popularidad tras la revisión y propuesta de Bauman y Griinari (2001).

### 3.1. LA TEORÍA DE LA BIOHIDROGENACIÓN

Según la teoría de la biohidrogenación, en ciertas condiciones alimentarias, como cuando se usan dietas bajas en fibra o suplementadas con lípidos insaturados, se alteran algunas de las vías principales del proceso de BH ruminal, lo que conlleva a la formación de ciertos AG con propiedades antilipogénicas que podrían ser los causantes del desarrollo de la MFD (Bauman y Griinari, 2001).

Hasta el momento, el *trans*-10, *cis*-12 CLA es el único AG del que se ha demostrado un inequívoco efecto antilipogénico (Baumgard et al, 2002; Shingfield et al., 2010). Este isómero del CLA se formaría al alterarse las principales vías de BH del LA (Figura 2; Griinari y Bauman, 1999; Shingfield y Wallace, 2014). Son numerosos los trabajos en vacuno de aptitud lechera que han demostrado que la administración de *trans*-10, *cis*-12 CLA (en infusión abomasal o como suplemento protegido de isómeros del CLA) ocasiona una disminución en el contenido de

grasa de la leche (Baumgard et al., 2002; Peterson et al., 2002; de Veth et al., 2004). A pesar de su evidente implicación, es importante destacar también que la MFD se podría producir en ausencia de aumentos del contenido lácteo de este isómero del CLA, lo que deja la puerta abierta a la posible implicación de otros metabolitos de la BH (Loor et al., 2005; Perfield et al., 2007; Shingfield y Griinari, 2007).

En ovino se ha visto que la administración de *trans*-10, *cis*-12 CLA tendría un efecto similar al observado en vacuno (Sinclair et al., 2007; Weerasinghe et al., 2012; Toral et al., 2015a). Ahora bien, en esta especie, en la que los casos de MFD están ligados al consumo de lípidos marinos, la concentración en la leche de este AG no se ve generalmente afectada, de lo que se deduce que podría no jugar un papel tan relevante como en el vacuno (Toral et al., 2010a,b). Respecto al ganado caprino, existe cierta controversia, pues algunos autores señalaron que no afectaba a la producción de grasa láctea (de Andrade y Schmidely, 2006) pero otros apuntan que sí (e. g., Shingfield et al., 2009).

La implicación de otros isómeros *trans* de 18 C es todavía una incógnita. Aunque de algunos está demostrado que no ejercen un efecto inhibitor de la lipogénesis (e. g., *trans*-9 18:1, *trans*-11 18:1, *trans*-12 18:1; Rindsig y Schultz, 1974; Griinari et al., 2000), otros sí podrían estar relacionados con la depresión de la grasa láctea (Griinari, 1998, Piperova et al., 2000). Entre estos últimos, cabe destacar el papel controvertido del *trans*-10 18:1, que provendría principalmente de la BH del *trans*-10, *cis*-12 CLA (Griinari y Bauman, 1999). Aunque en el ganado vacuno se ha observado en numerosas ocasiones un paralelismo entre la reducción del contenido de grasa láctea y el aumento de la concentración de *trans*-10 18:1 en leche (Loor et al., 2005; Hinrichsen et al., 2006), esto podría indicar un cambio en el perfil de AG derivados de la BH, pero no una regulación de la síntesis de grasa (Lock et al., 2007; Shingfield y Griinari., 2007). En la especie ovina, diversos trabajos del grupo de investigación en el que se ha llevado a cabo esta tesis doctoral, han reportado niveles muy elevados de este AG en la leche tanto cuando no se produce MFD al suplementar con aceites vegetales (Gómez-Cortés et al., 2008a; Castro-Carrera et al., 2015) como en la MFD inducida por el consumo de

lípidos marinos (Toral et al., 2010a,b; Bichi et al., 2013a). Por lo tanto, aunque el *trans*-10 18:1 podría estar implicado, su intervención en la MFD de ovino es aún materia de estudio.

Respecto a otros AG con posible efecto antilipogénico, en el ganado vacuno se ha sugerido la implicación del *cis*-10, *trans*-12 18:2 (Saebo et al., 2005) y el *trans*-9, *cis*-11 18:2 en la MFD (Perfield et al., 2007). Sin embargo, en la MFD de ovejas, no se ha podido demostrar que ninguno de los dos sea realmente relevante (Toral et al., 2015a, 2016b).

### 3.2. REGULACIÓN DE LA FLUIDEZ DE LA GRASA LÁCTEA

Este apartado recoge de forma muy somera otro posible mecanismo que podría explicar la MFD: la regulación de la fluidez de la grasa de la leche. Para su secreción, la grasa debe encontrarse en forma líquida, por lo que su punto de fusión no puede superar la temperatura corporal (Timmen y Patton, 1988). La caída del ácido oleico, al disponer la glándula mamaria de menos sustrato (18:0) durante la MFD causada por lípidos de origen marino, podría incrementar el punto de fusión de la grasa láctea dificultando su secreción (Loor et al., 2005; Shingfield y Griinari, 2007, Gama et al., 2008). No obstante, los últimos trabajos al respecto en ovino indican que es improbable que este mecanismo pudiera explicar per se la MFD, dado que ni la inhibición de la  $\Delta^9$ -desaturasa implica necesariamente una disminución de la secreción de grasa (Frutos et al., 2014), ni un aporte extra de 18:0 en la dieta, como sustrato para la formación de ácido oleico, parece aliviar la depresión (Toral et al., 2016b).

Además, al suplementar la dieta con este tipo de lípidos aumenta el contenido lácteo de isómeros *trans* 18:1, que poseen un mayor punto de fusión que sus equivalentes isómeros *cis* lo que podría suponer un inconveniente para mantener la fluidez de la grasa láctea en la glándula mamaria (Timmen y Patton, 1988). Sin embargo, este incremento en los isómeros *trans* 18:1 podría ser contrarrestado por cambios en la concentración de otros AG (Toral et al., 2016b), sin afectar al punto de fusión de la grasa láctea o incluso disminuyéndolo (Toral et

al., 2013a, 2015a; Kairenius et al., 2015), lo que pondría de manifiesto la gran capacidad adaptativa de la glándula mamaria para mantener la fluidez de la grasa láctea a temperatura corporal (Taylor y MacGibbon, 2011; Toral et al., 2013a).

### 3.3. REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE LA LIPOGÉNESIS MAMARIA

Como se ha explicado en el apartado 1.2., numerosas enzimas están involucradas en la síntesis de grasa láctea. Alteraciones en la regulación de la expresión de los genes que codifican estas enzimas podrían ser otro de los mecanismos que explicasen la MFD (Piperova et al., 2000; Baumgard et al., 2002; Peterson et al., 2003; Hussein et al., 2013). En este sentido, en vacuno se ha observado una clara relación entre la depresión en la grasa láctea y la represión coordinada de ciertos genes responsables de la lipogénesis mamaria (e. g., *ACACA*, *LPL*, *GPAT*, *AGPAT* o *SCD*; Piperova et al., 2000; Shingfield et al., 2013). Esta inhibición de la expresión génica se observa tras la administración de *trans*-10, *cis*-12 CLA (Baumgard et al., 2002; Harvatine et al., 2009b) y por el consumo de dietas que provocan MFD en esta especie (Ahnadi et al., 2002; Peterson et al., 2003; Harvatine y Bauman, 2006). Esta represión coordinada de varios genes candidatos relacionados con la lipogénesis mamaria permitió sugerir que este tipo de respuesta podría estar dirigida por la actuación de determinados factores de transcripción (e. g., *SREBF*, *THRSP* y *PPARG*) que actúan como reguladores centrales de la síntesis de grasa al controlar la expresión de los genes anteriores (Harvatine et al., 2009a; Bauman et al., 2011a). Estos reguladores de la transcripción podrían ser sensibles al efecto inhibidor de ciertos AG con propiedades bioactivas (Harvatine et al., 2009b; Bauman et al., 2011b) y, en este sentido, se ha sugerido que *SREBF1* podría ser una de las dianas principales de los AG responsables de la MFD, ya que su expresión disminuye paralelamente y en la misma medida que la producción de grasa de la leche cuando ocurre la MFD (Bauman et al., 2011a). Además, su represión podría repercutir sobre la expresión de un amplio abanico de genes implicados en la captación, transporte, síntesis de novo o la desaturación de AG en la célula secretora mamaria (Desvergne et al., 2006; Harvatine y Bauman, 2006; Bionaz y

Loor, 2008b). Aunque muchos de los trabajos de nutrigenómica le otorgan un papel fundamental en la regulación transcripcional (Ahnadi et al., 2002; Bauman et al., 2011a; Ma y Corl, 2012), su mecanismo de acción no se conoce con certeza, pero se ha sugerido que su represión podría estar producida por la inhibición proteolítica de SREBP1, lo que impediría su llegada al núcleo celular (Peterson et al., 2004), tal y como se describe en el apartado 1.2. Aparte de *SREBF1*, se han sugerido otros factores de transcripción potencialmente sensibles al efecto inhibidor de AG involucrados en el desarrollo de la MFD, como por ejemplo, el *THRSP* (Harvatine y Bauman, 2006) y el *PPARG* (Bionaz y Loor, 2008b). No obstante, tampoco se han esclarecido completamente los mecanismos moleculares implicados en la represión de estos genes por parte del *trans-10, cis-12* CLA u otros AG con propiedades bioactivas, por lo que es necesaria más información para comprender el papel que desempeñan (Shingfield et al., 2010).

En pequeños rumiantes, la información acerca de este tipo de regulación es escasa y los resultados pueden incluso parecer a veces contradictorios. En cabras, la MFD inducida con aceite de pescado no se ha visto relacionada con cambios en los genes implicados en la lipogénesis mamaria (Bernard et al., 2017). En cambio, en ovejas, Hussein et al. (2013) observaron diferencias significativas en la abundancia relativa de ciertos genes (e. g. *ACACA*, *FASN*, *LPL*, *SCD1*) cuando suplementaron la dieta con un producto rico en *trans-10, cis-12* CLA. Estas variaciones se pudieron relacionar con un claro efecto negativo sobre la cantidad de ARNm de *SREBF1*. Sin embargo, en el trabajo de Bichi et al. (2013b), en el que suplementaron la dieta de ovejas lecheras con lípidos de origen marino para inducir MFD, no detectaron variaciones en la abundancia de ARNm de los genes candidatos de la síntesis de grasa ni de los factores de transcripción que analizaron. La divergencia entre resultados ha podido ser debida a la fase de la lactación, pues tal y como apuntan los autores de un reciente trabajo (Ticiani et al., 2016), en el que suplementaron la dieta de ovejas lecheras con *trans-10, cis-12* CLA, la represión en ciertos genes fue patente durante el inicio y mitad de la lactación (15 a 70 días en lactación) pero no se pudo detectar a los 120 días en lactación.

De todos modos, la información disponible al respecto es aún insuficiente para comprender al detalle la regulación transcripcional de la MFD en ovino debido también, en parte, a que otros genes diferentes a aquellos cuantificados podrían jugar un papel más relevante en la lipogénesis mamaria. En este sentido, el desarrollo de nuevas técnicas de secuenciación de ARN han permitido analizar ampliamente el transcriptoma mamario (Suárez-Vega et al., 2015). Recientemente, Suárez-Vega et al. (2017) han utilizado esta técnica para estudiar la MFD inducida por el consumo de lípidos marinos en ovejas lecheras. Los resultados de este estudio ponen de manifiesto la complejidad de los mecanismos transcripcionales involucrados en este síndrome y proponen la participación de varios genes expresados diferencialmente en las células somáticas de la leche de ovejas con MFD, que no habían sido diana de estudio hasta ahora. Por ejemplo, *APP*, *DUPS1* o *FGFR1*, que aparecían sobreexpresados y estarían implicados en la regulación de vías en las que participan proteínas SREBF, aunque la expresión de *SREBF1* no se viera afectada.

#### 4. REFERENCIAS

- Abecia, L., Toral, P. G., Martín-García, A. I., Martínez, G., Tomkins, N. W., Molina-Alcaide, E., Newbold, C. J., and Yáñez-Ruiz, D. R. 2012. Effect of bromochloromethane on methane emission, rumen fermentation pattern, milk yield, and fatty acid profile in lactating dairy goats. *J. Dairy Sci.* 95:2027-2036.
- AbuGhazaleh, A. A., and Jenkins, T. C. 2004. Docosahexaenoic acid promotes vaccenic acid accumulation in mixed ruminal cultures when incubated with linoleic acid. *J. Dairy Sci.* 87:1047-1050.
- Ahnadi, C. E., Beswick, N., Delbecchi, L., Kennelly, J. J., and Lacasse, P. 2002. Addition of fish oil to diets for dairy cows. II. Effects on milk fat and gene expression of mammary lipogenic enzymes. *J. Dairy Res.* 69:521-531.
- Akers, R. M. (ed.) 2002. Lactation and the mammary gland. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA.
- Aschenbach, J. R., Penner, G. B., Stumpff, F., and Gäbel, G. 2011. Ruminant Nutrition Symposium: Role of fermentation acid absorption in the regulation of ruminal pH. *J. Anim. Sci.* 89:1092-1107.
- Atkinson, R. L., Scholljegerdes, E. J., Lake, S. L., Nayigihugu, V., Hess B. W., and Rule, D. C. 2006. Site and extent of digestion, duodenal flow, and intestinal disappearance of total and esterified fatty acids in sheep fed a high-concentrate diet supplemented with high-linoleate safflower oil. *J. Anim. Sci.* 84:387-96.

- Barahona, R., Lascano, C. E., Narvaez, N., Owen, E., Morris, P., and Theodorou, M. K. 2003. In vitro degradability of mature and immature leaves of tropical forage legumes differing in condensed tannin and non-starch polysaccharide content and composition. *J. Sci. Food Agric.* 83:1256-1266.
- Barber, M. C., Clegg, R. A., Travers, M. T., and Vernon, R. G. 1997. Lipid metabolism in the lactating mammary gland. *Biochim. Biophys. Acta* 1347:101-126.
- Bauchart, D. 1993. Lipid absorption and transport in ruminants. *J. Dairy Sci.* 76:3864-3881.
- Bauman, D. E., and Davis, C. L. 1974. Biosynthesis of milk fat. In: *Lactation: a comprehensive treatise*. Larson, B. L., and Smith, V. R. (eds.). Academic Press, New York, USA, vol 2, pp: 31-75.
- Bauman, D. E., and Griinari, J. M., 2001. Regulation and nutritional manipulation of milk fat: low-fat milk syndrome. *Livest. Prod. Sci.* 70:15-29.
- Bauman, D. E., and Griinari, J. M. 2003. Nutritional regulation of milk fat synthesis. *Ann. Rev. Nutr.* 23:203-227.
- Bauman, D. E., Harvatine, K. J., and Lock, A. L. 2011a. Nutrigenomics, rumen-derived bioactive fatty acids, and the regulation of milk fat synthesis. *Annu. Rev. Nutr.* 31:299-319.
- Bauman, D. E., McGuire, M. A., and Harvatine, K. J. 2011b. Mammary gland, milk biosynthesis and secretion. In: *Encyclopedia of dairy sciences*. Fuquay, J. W., Fox, P. F., and McSweeney, P. L. H. (eds.). Elsevier, London, UK, pp: 352-358.
- Baumgard, L. H., Matitashvili, E., Corl, B. A., Dwyer, D. A., and Bauman, D. E. 2002. *Trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid decreases lipogenic rates and expression of genes involved in milk lipid synthesis in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 85:2155-2163.
- Belenguer, A., Toral, P. G., Frutos, P., and Hervás, G. 2010. Changes in the rumen bacterial community in response to sunflower oil and fish oil supplements in the diet of dairy sheep. *J. Dairy Sci.* 93:3275-3286.
- Bento, M. H. L., Acamovic, T., and Makkar, H. P. S. 2005. The influence of tannin, pectin and polyethylene glycol on attachment of <sup>15</sup>N-labelled rumen microorganisms to cellulose. *Anim. Feed Sci. Technol.* 122:41-57.
- Bergman, E. N. 1990. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiol. Rev.* 70:567-590.
- Bernard L., Mouriot, J., Rouel, J., Glasser, F., Capitan, P., Pujos-Guillot, E., Chardigny, J. M., and Chilliard, Y. 2010. Effects of fish oil and starch added to a diet containing sunflower-seed oil on dairy goat performance, milk fatty acid composition and in vivo  $\Delta^9$ -desaturation of [<sup>13</sup>C] vaccenic acid. *Br. J. Nutr.* 104:346-354.
- Bernard, L., Leroux, C., and Chilliard, Y. 2008. Expression and nutritional regulation of lipogenic genes in the ruminant lactating mammary gland. *Adv. Exp. Med. Biol.* 606:67-108.
- Bernard, L., Leroux, C., and Chilliard, Y. 2013. Expression and nutritional regulation of stearoyl-CoA desaturase genes in the ruminant mammary gland: relationship with milk fatty acid composition. In: *Stearoyl-CoA desaturase genes in lipid metabolism*. Ntambi JM, (ed.). iSpringer Science+Business Media, New York, USA, pp: 161-193.

- Bernard, L., Shingfield, K. J., Rouel, J., Ferlay, A., and Chilliard, Y. 2009. Effect of plant oils in the diet on performance and milk fatty acid composition in goats fed diets based on grass hay or maize silage. *Brit. J. Nutr.* 101:213-224.
- Bernard, L., Toral, P. G., and Chilliard, Y. 2017. Comparison of mammary lipid metabolism in dairy cows and goats fed diets supplemented with starch, plant oil, or fish oil. *J. Dairy Sci.* 100:9338-9351.
- Bhatta, R., Vaithyanathan, S., Singh, N. P., and Verma, D. L. 2007. Effect of feeding complete diets containing graded levels of *Prosopis cineraria* leaves on feed intake, nutrient utilization and rumen fermentation in lambs and kids. *Small Rumin. Res.* 67:75-83.
- Bichi, E. 2016. Síntesis endógena de ácidos grasos en la glándula mamaria y síndrome de baja grasa en la leche en ovejas. Tesis doctoral. Universidad de León, León, España.
- Bichi, E., Frutos, P., Toral, P. G., Keisler, D., Hervás, G., and Loor, J. J. 2013b. Dietary marine algae and its influence on tissue gene network expression during milk fat depression in dairy ewes. *Anim. Feed Sci. Technol.* 186:36-44.
- Bichi, E., Hervás, G., Toral, P. G., Loor, J. J., and Frutos, P. 2013a. Milk fat depression induced by dietary marine algae in dairy ewes: Persistency of milk fatty acid composition and animal performance responses. *J. Dairy Sci.* 96:524-532.
- Bichi, E., Toral, P. G., Hervás, G., Frutos, P., Gómez-Cortés, P., Juárez, M., and de la Fuente, M. A. 2012. Inhibition of delta-9 desaturase activity with sterculic acid: Effect on the endogenous synthesis of *cis*-9 18:1 and *cis*-9, *trans*-11 18:2 in dairy sheep. *J. Dairy Sci.* 95:5242-5252.
- Bionaz, M., Chen, S., Khan, M. J., and Loor, J. J. 2013. Functional role of PPARs in ruminants: potential targets for fine-tuning metabolism during growth and lactation. *PPAR Res.* 2013:684159.
- Bionaz, M., and Loor, J. J. 2008a. *ACSL1*, *AGPAT6*, *FABP3*, *LPIN1*, and *SLC27A6* are the most abundant isoforms in bovine mammary tissue and their expression is affected by stage of lactation. *J. Nutr.* 138:1019-1024.
- Bionaz, M., and Loor, J. J. 2008b. Gene networks driving bovine milk fat synthesis during the lactation cycle. *BMC Genomics* 9:366. doi: 10.1186/1471-2164-9-366 .
- Bionaz, M., Osorio, J., and Loor, J. J. 2015. Nutrigenomics in dairy cows: Nutrients, transcription factors, and techniques. *J. Anim. Sci.* 93:5531-5553.
- Boeckeaert C., Fievez V., Van Hecke D., Verstraete W., Boon N. 2007. Changes in rumen biohydrogenation intermediates and ciliate protozoa diversity after algae supplementation to dairy cattle. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 109:767-777.
- Boeckeaert, C., Vlaeminck, B., Fievez, V., Maignien, L., Dijkstra, J., and Boon, N. 2008. Accumulation of *trans* C-18:1 fatty acids in the rumen after dietary algal supplementation is associated with changes in the *Butyrivibrio* community. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:6923-6930.
- Buccioni, A., Minieri, S., Rapaccini, S., Antongiovanni, M., and Mele, M., 2011. Effect of chestnut and quebracho tannins on fatty acid profile in rumen liquid- and solid-associated bacteria: an in vitro study. *Animal* 5:1521-1530.



- Buccioni, A., Pauselli, M., Viti, C., Minieri, S., Pallara, G., Roscini, V., Rapaccini, S., Marinucci, M. T., Lupi, P., Conte, G., and Mele, M. 2015. Milk fatty acid composition, rumen microbial population, and animal performances in response to diets rich in linoleic acid supplemented with chestnut or quebracho tannins in dairy ewes. *J. Dairy Sci.* 98:1145–1156.
- Capper, J. L., Wilkinson, R. G., Mackenzie, A. M., and Sinclair, L. A. 2007. The effect of fish oil supplementation of pregnant and lactating ewes on milk production and lamb performance. *Animal* 1:889-898.
- Castro-Carrera, T. 2015. Efecto de la adición de lípidos a la dieta de ovejas lecheras sobre los microorganismos implicados en el metabolismo ruminal de los ácidos grasos y la regulación nutricional de la lipogénesis mamaria. Tesis doctoral. Universidad de León, León, España.
- Castro-Carrera, T., Frutos, P., Leroux, C., Chilliard, Y., Hervás, G., Belenguer, A., Bernard, L., and Toral, P. G. 2015. Dietary sunflower oil modulates milk fatty acid composition without major changes in adipose and mammary tissue fatty acid profile or related gene mRNA abundance in sheep. *Animal* 9:582-591.
- Castro-Carrera, T., Toral, P. G., Frutos, P., McEwan, N. R., Hervás, G., Abecia, L., Pinloche, E., Girdwood, S. E., and Belenguer, A. 2014. Rumen bacterial community evaluated by 454 pyrosequencing and terminal restriction fragment length polymorphism analyses in dairy sheep fed marine algae. *J. Dairy Sci.* 97:1661-1669.
- Chaban, B., Ng, S. Y. M., and Jarrell, K. F. 2006. Archaeal habitats - from the extreme to the ordinary. *Can. J. Microbiol.* 52:73-116.
- Chilliard, Y., Glasser, F., Ferlay, A., Bernard, L., Rouel, J., and Doreau, M. 2007. Diet, rumen biohydrogenation and nutritional quality of cow and goat milk fat. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 109:828-855.
- Chilliard, Y., Toral, P. G., Shingfield, K. J., Rouel, J., Leroux, C., and Bernard, L. 2014. Effects of diet and physiological factors on milk fat synthesis, milk fat composition and lipolysis in the goat: A short review. *Small Rumin. Res.* 122:31-37.
- Chyau, C. C., Tsai, S. Y., Ko, P. T., and Mau, J. L. 2002. Antioxidant properties of solvent extracts from *Terminalia catappa* leaves. *J. Dairy Sci.* 78:483-488.
- Coleman, R. A., and Lee, D. P. 2004. Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation. *Prog. Lipid Res.* 43:134–76.
- Corl, B. A., Baumgard, L. H., Dwyer, D. A., Griinari, J. M., Phillips, B. S., and Bauman, D. E. 2001. The role of  $\Delta 9$ -desaturase in the production of *cis-9*, *trans-11* CLA. *J. Nutr. Biochem.* 122:622–630.
- Cronjé, P. B. 2000. Ruminant physiology. Digestion, metabolism, growth and reproduction. Department of Animal and Wildlife Sciences (eds.). University of Pretoria, South Africa.
- Cuvelier, C., Cabaraux, J. F., Dufresne, I., Istasse, L., and Hornick, J. L. 2005. Production, digestion et absorption des acides gras chez le ruminant. *Ann. Méd. Vét.* 149:49-59.
- Davis, C. L., and Brown, R. E. 1970. Low-fat milk syndrome. In: Physiology of digestion and metabolism in the ruminant. Phillipson, A. T. (ed.). Oriel Press, Newcastle upon Tyne, UK, pp: 545-565.

- De Andrade, P. V. D., and Schmidely, P. 2006. Effect of duodenal infusion of *trans*-10, *cis*-12 CLA on milk performance and milk fatty acid profile in dairy goats fed high or low concentrate diet in combination with rolled canola seed. *Reprod. Nutr. Dev.* 46:31-48.
- De Veth, M. J., Griinari, J. M., Pfeiffer, A. M., and Bauman, D. E. 2004. Effect of CLA on milk fat synthesis in dairy cows: comparison of inhibition by methyl esters and free fatty acids, and relationships among studies. *Lipids* 39:365-372.
- Dehority, B. A. 1993. Laboratory manual for classification and morphology of rumen ciliate protozoa. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, USA.
- Dehority, B. A. 2003. Rumen Microbiology. In: Nottingham University Press. Nottingham, UK.
- Desvergne, B., Michalik, L., and Wahli, W. 2006. Transcriptional regulation of metabolism. *Physiol. Rev.* 86:465-514.
- Devillard, E., McIntosh, F. M., Newbold, C. J., and Wallace, R. J. 2006. Rumen ciliate protozoa contain high concentrations of conjugated linoleic acids and vaccenic acid, yet do not hydrogenate linoleic acid or desaturate stearic acid. *Brit. J. Nutr.* 96:697-704.
- Dewettinck, K., Rombaut, R., Thienpont, N., Le, T. T., Messens, K., and Van Camp, J. 2008. Review: Nutritional and technological aspects of milk fat globule membrane material. *Int. Dairy J.* 18:436-457.
- Doce, R. R. 2010. Consumo de hojas jóvenes de roble (*Quercus pyrenaica*) por el ganado vacuno: aspectos nutricionales e intoxicación. Tesis Doctoral. Universidad de León, León, España.
- Donkor, J., Sariahmetoglu, M., Dewald, J., Brindley, D. N., Reue, K. 2007. Three mammalian lipins act as phosphatidate phosphatases with distinct tissue expression patterns. *J. Biol. Chem.* 282:3450-3457.
- Eberlé, D., Hegarty, B., Bossard, P., Ferre, P., and Fouchère, F. 2004. *SREBP* transcription factors: Master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie* 86:839-848.
- Edwards, H. D., Anderson, R. C., Taylor, T. M., Miller, R. K., Hardin, M. D., Nisbet, D. J., Krueger, N. A., and Smith, S. B. 2013. Interactions between oil substrates and glucose on pure cultures of ruminal lipase-producing bacteria. *Lipids* 48:749-755.
- Edwards, J. E., McEwan, N. R., Travis, A. J., and Wallace, R. J. 2004. 16S rDNA library-based analysis of ruminal bacterial diversity. *Anton. Leeuw. Int. J. G.* 86:263-281.
- Faruque, A. J. M. O., Jarvis, B. D. W., and Hawke, J. C. 1974. Studies on Rumen Metabolism . IX. Contribution of plant lipases to release of free fatty-acids in rumen. *J. Sci. Food Agric.* 25:1313-1328.
- Fievez, V., Dohme, F., Danneels, M., Raes, K., and Demeyer, D. 2003. Fish oils as potent rumen methane inhibitors and associated effects on rumen fermentation in vitro and in vivo. *Anim. Feed Sci. Technol.* 104:41-58.
- Fouts, D. E., Szpakowski, S., Purushe, J., Torralba, M., Waterman, R. C., MacNeil, M. D., Alexander, L. J., and Nelson, K. E. 2012. Next generation sequencing to define prokaryotic and fungal diversity in the bovine rumen. *PLoS One* 7:e48289.
- Frutos, P. Toral, P. G., Ramos-Morales, E., Shingfield, K. J., Belenguer, A., and Hervás, G. 2014. Oral administration of cobalt acetate alters milk fatty acid composition, consistent with an inhibition of stearyl-coenzyme A desaturase in lactating ewes. *J. Dairy Sci.*

97:1036-1046.

- Frutos, P., Hervás, G., Giráldez, F. J., and Mantecón, A. R. 2004. Review. Tannins and ruminant nutrition. *Span. J. Agric. Res.* 2:191-202.
- Fuentes, M. C., Calsamiglia, S., Cardozo, P., and Vlaeminck, B. 2009. Effect of pH and level of concentrate in the diet on the production of biohydrogenation intermediates in a dual-flow continuous culture. *J. Dairy Sci.* 92:4456-4466.
- Fuentes, M. C., Calsamiglia, S., Fievez, V., Blanch, M., and Mercadal, D. 2011. Effect of pH on ruminal fermentation and biohydrogenation of diets rich in omega-3 or omega-6 fatty acids in continuous culture of ruminal fluid. *Anim. Feed Sci. Technol.* 169:35-45.
- Gama, M. A. S., Garnsworthy, P. C., Griinari, J. M., Leme, P. R., Rodrigues, P. H. M., Souza, L. W. O., and Lanna, D. P. D. 2008. Diet induced milk fat depression: association with changes in milk fatty acid composition and fluidity of milk fat. *Livest. Sci.* 115:319-331.
- Garton, G. A. 1977. Fatty acid metabolism in ruminants. In: *Biochemistry of Lipids II. International review of biochemistry.* Goodwin, T. W. (ed.). University Park Press, Baltimore, USA, pp: 337-370.
- Givens, D. I., Kliem, K. E., Gibbs, R. A. 2006. The role of meat as a source of n-3 polyunsaturated fatty acids in the human diet. *Meat Sci.* 74:209-218.
- Glasser, F., Ferlay, A., Doreau, M., Schmidely, P., Sauvant, D., and Chilliard, Y. 2008. Long-chain fatty acid metabolism in dairy cows: A meta-analysis of milk fatty acid yield in relation to duodenal flows and de novo synthesis. *J. Dairy Sci.* 91:2771-2785.
- Goldstein, J. L., Rawson, R. B., Brown, M. S. 2002. Mutant mammalian cells as tools to delineate the sterol regulatory element-binding protein pathway for feedback regulation of lipid synthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* 397:139-48.
- Gómez-Cortés, P., Frutos, P., Mantecón, A. R., Juárez, M., de la Fuente, M. A., and Hervás, G., 2008a. Milk production, conjugated linoleic acid content, and in vitro ruminal fermentation in response to high levels of soybean oil in dairy ewe diet. *J. Dairy Sci.* 91:1560-1569.
- Gómez-Cortés, P., Frutos, P., Mantecón, A. R., Juárez, M., de la Fuente, M. A., and Hervás, G. 2008b. Addition of olive oil to dairy ewe diets: effect on milk fatty acid profile and animal performance. *J. Dairy Sci.* 91:3119-3127.
- Griinari, J. M., Corl, B. A., Lacy, S. H., Chouinard, P. Y., Nurmela, K. V., and Bauman, D.E. 2000. Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by  $\Delta 9$ -desaturase. *J. Nutr.* 130:2285-2291.
- Griinari, J. M., and Bauman, D. E. 1999. Biosynthesis of conjugated linoleic acid and its incorporation into meat and milk in ruminants. In: *Advances in conjugated linoleic acid research.* Yurawecz, M. P., Mossoba, M. M., Kramer, J. K. G., Pariza, M. W., and Nelson, G. J. (eds.). AOCS Press, Champaign, Illinois, USA, pp: 180-200.
- Griinari, J. M., Dwyer, D. A., McGuire, M. A., Bauman, D. E., Palmquist, D. L., and Nurmela, K. V. V. 1998. *Trans*-octadecenoic acids and milk fat depression in lactating cows. *J. Dairy Sci.* 81:1251-1261.
- Halmemies-Beauchet-Filleau, A., Kairenius, K., Ahvenjärvi, S., Crosley, L. K., Muetzel, S., Huhtanen, P., Vanhatalo, A., Toivonen, V., Wallace, R. J., and Shingfield, K. J. 2013.

- Effect of forage conservation method on ruminal lipid metabolism and microbial ecology in lactating cows fed diets containing a 60:40 forage-to-concentrate ratio. *J. Dairy Sci.* 96:2428-2447.
- Harfoot, C. G. 1981. Lipid metabolism in the rumen. In: *Lipid Metabolism in Ruminant Animal*. Christie, W. W. (ed.). Pergamon Press. Oxford, UK, pp: 21-55.
- Harfoot, C. G., and Hazlewood, G. P. 1997. Lipid metabolism in the rumen. In: *The rumen microbial ecosystem*. Hobson, P. N., and Stewart, C. S. (eds.). Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, pp: 382-426.
- Harvatine, K. J., and Bauman, D. E. 2006. SREBP1 and thyroid hormone responsive to spot 14 (S14) are involved in the regulation of bovine mammary lipid synthesis during diet-induced milk fat depression and treatment with CLA. *J. Nutr.* 136:2468-2474.
- Harvatine, K. J., Boisclair, Y. R., and Bauman, D. E. 2009b. Recent advances in the regulation of milk fat synthesis. *Animal* 3:40:54.
- Harvatine, K. J., Boisclair, Y. R., and Bauman, D. E. 2014. Liver x receptors stimulate lipogenesis in bovine mammary epithelial cell culture but do not appear to be involved in diet-induced milk fat depression in cows. *Physiol. Rep.* 2:e00266.
- Harvatine, K.J., Perfield II, J.W., Bauman, D.E., 2009a. Expression of enzymes and key regulators of lipid synthesis is upregulated in adipose tissue during CLA-induced milk fat depression in dairy cows. *J. Nutr.* 139, 849–854.
- Hazlewood, G. P., and Dawson, R. M. C. 1979. Characteristics of a lipolytic and fatty acid-requiring *Butyrivibrio* spp. isolated from the ovine rumen. *J. Gen. Microbiol.* 112:15-27.
- Hazlewood, G. P., Kemp, P., Lander, D., and Dawson, R. M. C. 1976. C18-unsaturated fatty acid hydrogenation patterns of some rumen bacteria and their ability to hydrolyse exogenous phospholipid. *Brit. J. Nutr.* 35:293-297.
- Henderson, C. 1973. The effects of fatty acids on pure cultures of rumen bacteria. *J. Agric. Sci. Camb.* 81:107-112.
- Hervás, G., Frutos, P., Giráldez, F. J., Mantecón, A. R., and Álvarez del Pino, M. C. 2003. Effect of different doses of quebracho tannins extract on rumen fermentation in ewes. *Anim. Feed Sci. Technol.* 109:65-78.
- Hervás, G., Luna, P., Mantecón, A. R., Castañares, N., de la Fuente, M. A., Juárez, M., and Frutos, P. 2008. Effect of diet supplementation with sunflower oil on milk production, fatty acid profile and ruminal fermentation in lactating dairy ewes. *J. Dairy Res.* 75:399-405.
- Hinrichsen, T., A. L. Lock, and D. E. Bauman. 2006. The relationship between *trans*-10 18:1 and milk fat yield in cows fed high oleic acid or high linoleic acid plant oil supplements. Euro-Fed Lipid Congress, October 2006, Madrid, Spain.
- Hobson, P. N., and Stewart, C. S. 1997. *The rumen microbial ecosystem*. Hobson, P.N., and Stewart, C. S. (eds.). Chapman & Hall, London, UK.
- Hocquette, J. F., and Bauchart, D. 1999. Intestinal absorption, bloodtransport and hepatic and muscle metabolism of fatty acids in preruminant and ruminant animals. *Reprod. Nutr. Dev.* 39:27-48.
- Honkanen, A. M., Griinari, J. M., Vanhatalo, A., Ahvenjärvi, S., Toivonen, V., and Shingfield, K. J. 2012. Characterization of the disappearance and formation of

- biohydrogenation intermediates during incubations of linoleic acid with rumen fluid in vitro. *J. Dairy Sci.* 95:1376-1394.
- Hudson, J. A., Morvan, B., and Joblin, K. N. 1998. Hydration of linoleic acid by bacteria isolated from ruminants. *FEMS Microbiol. Lett.* 169:277-282.
- Hussein, M., Harvatine, K. H., Weerasinghe, W. M. P. B., Sinclair, L. A., and Bauman, D. E. 2013. Conjugated linoleic acid-induced milk fat depression in lactating ewes is accompanied by reduced expression of mammary genes involved in lipid synthesis. *J. Dairy Sci.* 96:3825-3834.
- Huws, S. A., Kim, E. J., Lee, M. R. F., Scott, M. B., Tweed, J. K. S., Pinloche, E., Wallace, R. J., and Scollan, N. D. 2011. As yet uncultured bacteria phylogenetically classified as *Prevotella*, *Lachnospiraceae* incertae sedis and unclassified *Bacteroidales*, *Clostridiales* and *Ruminococcaceae* may play a predominant role in ruminal biohydrogenation. *Environ. Microbiol.* 13:1500-1512.
- Huws, S. A., Kim, E. J., Kingston-Smith, A. H., Lee, M. R. F., Muetzel, S. M., Cookson, A. R., Newbold, C. J., Wallace, R. J., and Scollan, N. D. 2009. Rumen protozoa are rich in polyunsaturated fatty acids due to the ingestion of chloroplasts. *FEMS Microbiol. Ecol.* 69:461-471.
- Ibeagha-Awemu, E. M., Lil, R., Ammah, A. A., Dudemaine, P., Bissonnette, N., Benchaar, C., and Zhao, X. 2016. Transcriptome adaptation of the bovine mammary gland to diets rich in unsaturated fatty acids shows greater impact of linseed oil over safflower oil on gene expression and metabolic pathways. *BMC Genomics.* 17:104.
- Invernizzi, G., Thering, B. J., McGuire, M. A., Savoini, G., and Loor, J. J. 2010. Sustained upregulation of stearoyl-CoA desaturase in bovine mammary tissue with contrasting changes in milk fat synthesis and lipogenic gene networks caused by lipid supplements. *Funct. Integr. Genomics* 10:561-575.
- Jami, E., and Mizrahi, I. 2012. Composition and similarity of bovine rumen microbiota across individual animals. *PLoS One* 7:e33306.
- Jarvis, G. N., and Moore, E. R. B. 2010. Lipid metabolism and the rumen microbial ecosystem. In: *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology*. Timmis, K. N., McGenity, T. J., Meer, J. R., and de Lorenzo, V. (eds.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York, USA, pp: 2245-2257.
- Jenkins T. C. 1993. Lipid-metabolism in the rumen. *J. Dairy Sci.* 76:3851-3863.
- Jenkins, T. C., Wallace, R. J., Moate, P. J., and Mosley, E. E. 2008. Board-invited review: Recent advances in biohydrogenation of unsaturated fatty acids within the rumen microbial ecosystem. *J. Anim. Sci.* 86:397-412.
- Jensen, R. G. 2002. The composition of bovine milk lipids: January 1995 to December 2000. *J. Dairy Sci.* 85:295-350.
- Jensen, R. G., and Newburg, D. S. 1995. Bovine milk lipids. In: *The handbook of milk composition*. Jensen, R. G. (ed.). Academic Press, San Diego, California, USA, pp: 543-575.
- Kadegowda, A. K. G., Bionaz, M., Piperova, L. S., Erdman, R. A., Loor, J. J. 2009. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation and long-chain fatty acids alter lipogenic gene networks in bovine mammary epithelial cells to various extents. *J. Dairy Sci.* 92:4276-4289.

- Kairenius, P., Ärölä, A., Leskinen, H., Toivonen, V., Ahvenjärvi, S., Vanhatalo, A., Huhtanen, P., Hurme, T., Griinari, J. M., and Shingfield, K. J. 2015. Dietary fish oil supplements depress milk fat yield and alter milk fatty acid composition in lactating cows fed grass silage based diets. *J. Dairy Sci.* 98:5653-5671.
- Kamra, D.N. 2005. Rumen microbial ecosystem. In: *Current Science.* 89:126.
- Keenan, T. W., and Mather, I. H. 2006. Intracellular origin of milk fat globules and the nature of the milk fat globule membrane. In: *Advanced dairy chemistry Vol. 2: Lipids.* Fox, P. F., and McSweeney, P. L. H. (eds.). Springer, New York, USA, pp: 137-171.
- Kemp, P., White, R., and Lander, D. 1975. The hydrogenation of unsaturated fatty acids by five bacterial isolates from the sheep rumen, including a new species. *J. Gen. Microbiol.* 90:100-114.
- Khanbabaee, K., and Van Ree, T. 2001. Tannins: classification and definition. *Nat. Prod. Rep.* 18:641-649.
- Khiaosa-Ard, R., Bryner, S. F., Scheeder, M. R. L., Wettstein, H. R., Leiber, F., Kreuzer, M., Soliva, C. R. 2009. Evidence for the inhibition of the terminal step of ruminal alpha-linolenic acid biohydrogenation by condensed tannins. *J. Dairy Sci.* 92:177-188.
- Kim, E. J., Huws, S. A., Lee, M. R. F., Wood, J. D., Muetzel, S. M., Wallace, R. J., and Scollan, N. D. 2008. Fish oil increases the duodenal flow of long chain polyunsaturated fatty acids and *trans*-11 18:1 and decreases 18:0 in steers via changes in the rumen bacterial community. *J. Nutr.* 138:889-896.
- Kim, Y. J., Liu, R. H., Rychlik, J. L., and Russell, J. B. 2002. The enrichment of a ruminal bacterium (*Megasphaera elsdenii* YJ-4) that produces the *trans*-10, *cis*-12 isomer of conjugated linoleic acid. *J. Appl. Microbiol.* 5:976-82.
- Kitessa, S. M., Gulati, S. K., Ashes, J. R., Fleck, E., Scott, T. W., and Nicholds, P. D. 2001. Utilisation of fish oil in ruminants – I. Fish oil metabolism in sheep. *Anim. Feed Sci. Technol.* 89:189-199.
- Koenig, K. M., Newbold, C. J., McIntosh, F. M., and Rode, L. M. 2000. Effects of protozoa on bacterial nitrogen recycling in the rumen. *J. Anim. Sci.* 78:2431-2445.
- Kong, Y., Teather, R., and Forster, R. 2010. Composition, spatial distribution, and diversity of the bacterial communities in the rumen of cows fed different forages. *FEMS Microbiol. Ecol.* 74:612-622.
- Krause, D. O., Nagaraja, T. G., Wright, A. D. G., and Callaway, T. R. 2013. Board-invited review: Rumen microbiology: Leading the way in microbial ecology. *J. Anim. Sci.* 91:331-341.
- Kronberg, S., Scholljegerdes, E., Barcelo-Coblijn, G., and Murphy, E. 2007. Flaxseed treatments to reduce biohydrogenation of alpha-linolenic acid by rumen microbes in cattle. *Lipids* 42:1105-1111.
- Kucuk, O., Hess, B. W., and Rule, D. C. 2004. Soybean oil supplementation of a high-concentrate diet does not affect site and extent of organic matter, starch, neutral detergent fiber, or nitrogen digestion, but influences both ruminal metabolism and intestinal flow of fatty acids in limit-fed lambs. *J. Anim. Sci.* 82:2985-2994.
- Leahy, S. C., Kelly, W. J., Ronimus, R. S., Wedlock, N., Altermann, E., and Attwood, G. T. 2013. Genome sequencing of rumen bacteria and archaea and its application to

- methane mitigation strategies. *Animal* 7:235-243.
- Lee, H. J., Jung, J. Y., Oh, Y. K., Lee, S. S., Madsen, E. L., and Jeon, C. O. 2012. Comparative survey of rumen microbial communities and metabolites across one caprine and three bovine groups, using bar-coded pyrosequencing and <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 78:5983-5993.
- Lengi, A. J., and Corl, B. A. 2007. Identification and characterization of a novel bovine stearoyl-CoA desaturase isoform with homology to human SCD5. *Lipids* 42:499-508.
- Lengqvist, J., Mata de Urquiza, A., Bergman, A. C., Willson, T. M., Sjovall, J., and Perlmann, T. 2004. Polyunsaturated fatty acids including docosahexaenoic and arachidonic acid bind to the retinoid X receptor alpha ligand-binding domain. *Mol. Cell. Proteomics* 3:692-703.
- Lock, A. L., Rovai, M., Gipson, T. A., de Veth, M. J., and Bauman, D. E. 2008. A conjugated linoleic acid supplement containing *trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid reduces milk fat synthesis in lactating goats. *J. Dairy Sci.* 91:3291-3299.
- Lock, A. L., Tyburczy, C., Dwyer, D. A., Harvatine, K. J., Destailats, F., Mouloungui, Z., Candy, L., and Bauman, D. E. 2007. *Trans*-10 octadecenoic acid does not reduce milk fat synthesis in dairy cows. *J. Nutr.* 137:71-76.
- Lock, A. L., and Bauman, D. E. 2004. Modifying milk fat composition of dairy cows to enhance fatty acids beneficial to human health. *Lipids* 39:1197-1206.
- Loor, J. J., Doreau, M., Chardigny, J. M., Ollier, A., Sebedio, J. L., and Chilliard, Y. 2005. Effects of ruminal or duodenal supply of fish oil on milk fat secretion and profiles of *trans*-fatty acids and conjugated linoleic acid isomers in dairy cows fed maize silage. *Anim. Feed Sci. Technol.* 119:227-246.
- Lourenço, M., Ramos-Morales, E., and Wallace, R. J. 2010. The role of microbes in rumen lipolysis and biohydrogenation and their manipulation. *Animal* 4:1024-1036.
- Ma, L., and Corl, B. A. 2012. Transcriptional regulation of lipid synthesis in bovine mammary epithelial cells by sterol regulatory element binding protein-1. *J. Dairy Sci.* 95:3743-3755.
- Mackie, R. I., McSweeney, C. S., and Klieve, A. V. 2002. Microbial ecology of the ovine rumen. In: *Sheep nutrition*. Freer, M., and Dove, H. (eds.). Oxon, New York, USA, pp: 71-94.
- Maia, M. R. G., Chaudhary, L. C., Bestwick, C. S., Richardson, A. J., McKain, N., Larson, T. R., Graham, I. A., and Wallace, R. J. 2010. Toxicity of unsaturated fatty acids to the biohydrogenating ruminal bacterium, *Butyrivibrio fibrisolvens*. *BMC Microbiol.* 10:52-61.
- Maia, M. R. G., Chaudhary, L. C., Figueres, L., and Wallace, R. J. 2007. Metabolism of polyunsaturated fatty acids and their toxicity to the microflora of the rumen. *Anton. Leeuw. Int. J. G.* 91:303-314.
- McCann, J. C., Wiley, L. M., Forbes, T. D., Rouquette, F. M. Jr., and Tedeschi, L. O. 2014. Relationship between the rumen microbiome and residual feed intake-efficiency of Brahman bulls stocked on bermudagrass pastures. *PLoS One* 9:e91864.
- McKain, N., Shingfield, K. J., and Wallace, R. J. 2010. Metabolism of conjugated linoleic acids and 18:1 fatty acids by ruminal bacteria: products and mechanisms. *Microbiol-SGM.* 156:579-588.

- McLeod, M. N. 1974. Plants tannins. Their role in forage quality. *Nutrition abstracts and Reviews*. 44:803-815.
- McMahon, L. R., Majak, W., McAllister, T. A., Hall, J. W., Jones, G. A., Popp, J. D., and Cheng, K. J. 1999. Effect of sainfoin on in vitro digestion of fresh alfalfa and bloat in steers. *Can. J. Anim. Sci.* 79:203-212.
- McManaman, J. L., Russell, T. D., Schaack, J., Orlicky, D. J., and Robenek, H. 2007. Molecular determinants of milk lipid secretion. *J. Mammary Gland. Biol. Neoplasia* 12:259-268.
- McSweeney, C., and Mackie, R. 2012. Microorganisms and ruminant digestion: State of knowledge, trends and future prospects. Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture. Background study paper No. 61. Food and Agriculture Organisation, United Nations, Rome, Italy.
- McSweeney, C. S., Palmer, B., McNeill, D. M., and Krause, D. O. 2001. Microbial interactions with tannins: nutritional consequences for ruminants. *Anim. Feed Sci. Technol.* 91:83-93.
- Mele, M., Buccioni, A., Petacchi, F., Serra, A., Banni, S., Antongiovanni, M., and Secchiari, P. 2006. Effect of forage/concentrate ratio and soybean oil supplementation on milk yield, and composition from Sarda ewes. *Anim. Res.* 55:273-285.
- Miller, M. E., Yeoman, C. J., Chia, N., Tringe, S. G., Angly, F. E., Edwards, R. A., Flint, H. J., Lamed, R., Bayer, E. A., and White, B. A. 2012. Phage-bacteria relationships and CRISPR elements revealed by metagenomic survey of the rumen microbiome. *Environ. Microbiol.* 14:207-227.
- Minieri, S., Buccioni, A., Rapaccini, S., Pezzati, A., Benvenuti, D., Serra, A., and Mele, M. 2014. Effect of quebracho tannin extract on soybean and linseed oil biohydrogenation by solid associated bacteria: an in vitro study. *Ital. J. Anim. Sci.* 13:604-608.
- Mole, S. 1993. The systematic distribution of tannins in the leaves of angiosperms: a tool for ecological studies. *Biochem. Syst. Ecol.* 21:833-846.
- Moon, C., Pacheco, D., Kelly, W., Leahy, S., Li, D., and Kopečný, J. 2008. Reclassification of *Clostridium proteoclasticum* as *Butyrivibrio proteoclasticus* comb. nov., a butyrate producing ruminal bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58:2041-2045.
- Moore, J. H., and Christie, W. W. 1981. Lipid metabolism in the mammary gland of ruminant animals. In: *Lipid metabolism in ruminant animals*. Christie, W. W. (ed.). Pergamon Press Ltd, Oxford, UK, pp: 227-278.
- Mueller-Harvey, I., 2006. Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. *J. Sci. Food Agric.* 86:2010-2037.
- Newbold, C. J., de la Fuente, G., Belanche, A., Ramos-Morales, E., and McEwan, N. R. 2015. The Role of Ciliate Protozoa in the Rumen. *Front. Microbiol.* 6:1313
- Newbold, C. J., Ushida, K., Morvan, B., Fonty, G., and Jouany, J. P. 1996. The role of ciliate protozoa in the lysis of methanogenic archaea in rumen fluid. *Lett. Appl. Microbiol.* 23:421-425.
- Nickerson, S. C., and Akers, R. M. 2011. Mammary gland anatomy. In: *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Fuquay, J. W., Fox, P. F., and McSweeney, P. L.H. (eds.). Academic Press, San Diego, California, USA, pp: 328-337.



- Noble, R. C. 1978. Digestion, absorption and transport of lipids. *Prog. Lipid Res.* 17:55-91.
- Ntambi, J. M., and Miyazaki, M. 2004. Regulation of stearoyl-CoA desaturases and role in metabolism. *Prog. Lipid Res.* 43:91-104.
- Offer, N. W., Marsden, M., Dixon, J., Speake, B. K., and Thacker, F. E. 1999. Effect of dietary fat supplements on levels of n-3 poly-unsaturated fatty acids, *trans* acids and conjugated linoleic acid in bovine milk. *Anim. Sci.* 69:613-625.
- Ogawa, J., Matsumura, K., Kishino, S., Omura, Y., and Shimizu, S. 2001. Conjugated linoleic acid accumulation via 10-hydroxy-12 octadecaenoic acid during microaerobic transformation of linoleic acid by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microb.* 67:1246-1252.
- Ogg, S. L., Weldon, A. K., Dobbie, L., Smith, A. J. H., and Mather, I. H. 2004. Expression of butyrophilin (*Btn1a1*) in lactating mammary gland is essential for the regulated secretion of milk-lipid droplets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:10084-10089.
- Ollier, S., Leroux, C., de la Foye, A., Bernard, L., Rouel, J., and Chilliard, Y. 2009. Whole intact rapeseeds or sunflower oil in high-forage or high-concentrate diets affects milk yield, milk composition, and mammary gene expression profile in goats. *J. Dairy Sci.* 92:5544-5560.
- Olubobokun, J. A., Craig, W. M., and Nipper, W. A. 1988. Characteristics of protozoal and bacterial fractions from microorganisms associated with ruminal fluid or particles. *J. Anim. Sci.* 66:2701-2710.
- OMS, 2003. Diet, Nutrition and the Prevention of Chronic Diseases. Report of a Joint WHO/FAO Expert Consultation, World Health Organization Technical Reports Series 916. Organización Mundial de la Salud, Ginebra, Suiza.
- Orpin, C. G., and Joblin, K. N. 1997. The rumen anaerobic fungi. In: The rumen microbial ecosystem. Hobson, P. N., and Stewart, C. S. (eds.). Blackie Academic & Professional, London, UK, pp: 140-195.
- Osorio, J. S., Lohakare, J., and Bionaz, M. 2016. Biosynthesis of milk fat, protein, and lactose: roles of transcriptional and post-transcriptional regulation. *Physiol. Genomics* 48:231-56.
- Osoro, K., Mateos-Sanz, A., Frutos, P., García, U., Ortega-Mora, L. M., Ferreira, L. M. M., Celaya, R., and Ferre, I. 2007. Anthelmintic and nutritional effects of heather supplementation on Cashmere goats grazing perennial ryegrass-white clover pastures. *J. Anim. Sci.* 85:861-870.
- Palmquist, D. L. 2006. Milk fat: origin of fatty acids and influence of nutritional factors thereon. In: Advanced dairy chemistry: Lipids. Fox, P. F., and McSweeney, P. L. (eds.). Springer, New York, USA, pp: 43-92.
- Palmquist, D. L., and Jenkins, T. C. 1980. Fat in Lactation Rations: Review. *J. Dairy Sci.* 63:1-14.
- Palmquist, D. L., Lock, A. L., Shingfield, K. J., and Bauman, D. E. 2005. Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants and humans. In: Advances in Food and Nutrition Research. Taylor, S. L. (ed.). Elsevier Academic Press, San Diego, CA, USA, pp: 179-217.
- Paul, K., Nonoh, J. O., Mikulski, L., and Brune, A. 2012. *Methanoplasmatales*, *Thermoplasmatales*-related archaea in termite guts and other environments, are the

- seventh order of methanogens. *Appl. Environ. Microbiol.* 78:8245-8253.
- Pennington, J. A., and Davis, C. L. 1975. Effects of intraruminal and intra-abomasal additions of codliver oil on milk fat production in the cow. *J. Dairy Sci.* 58:49-55.
- Perfield, J. W., Lock, A. L., Griinari, J. M., Saebo, A., Delmonte, P., Dwyer, D. A., and Bauman, D. E. 2007. *Trans*-9, *cis*-11 conjugated linoleic acid reduces milk fat synthesis in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90:2211-2218.
- Peterson, D. G., Baumgard, L. H., and Bauman, D. E. 2002. Milk fat response to low doses of *trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid (CLA). *J. Dairy Sci.* 85:1764-1766.
- Peterson, D. G., Matitashvili, E. A., and Bauman, D. E. 2003. Diet-induced milk fat depression in dairy cows results in increased *trans*-10, *cis*-12 CLA in milk fat and coordinate suppression of mRNA abundance for mammary enzymes involved in milk fat synthesis. *J. Nutr.* 133:3098-3102.
- Peterson, D.G., Matitashvili, E. A., and Bauman, D. E. 2004. The inhibitory effect of *trans*-10, *cis*-12 CLA on lipid synthesis in bovine mammary epithelial cells involves reduced proteolytic activation of the transcription factor SREBP-1. *J. Nutr.* 134:2523-2527.
- Petri, R. M., Mapiye, C., Dugan, M. E. R., and McAllister, T. A. 2014. Subcutaneous adipose fatty acid profiles and related rumen bacterial populations of steers fed red clover or grass hay diets containing flax or sunflower-seed. *PLoS One* 9:e104167.
- Piperova, L. S, Teter, B. B, Bruckental, I., Sampugna, J., Mills, S. E., Yurawecz, M. P., Fritsche, J., Ku, K., and Erdman, R. A. 2000. Mammary lipogenic enzyme activity, *trans* fatty acids and conjugated linoleic acids are altered in lactating dairy cows fed a milk fat-depressing diet. *J. Nutr.* 130:2568-2574.
- Privé, F., Kaderbhai, N. N., Girdwood, S., Worgan, H. J., Pinloche, E., Scollan, N. D., Huws, S. A., and Newbold, C. J. 2013. Identification and characterization of three novel lipases belonging to families II and V from *Anaerovibrio lipolyticus* 5ST. *PLoS One* 8:e69076.
- Pulina, G., Nudda, A., Battaccone, G., and Cannas, A. 2006. Effects of nutrition on the contents of fat, protein, somatic cells, aromatic compounds, and undesirable substances in sheep milk. *Anim. Feed Sci. Technol.* 131:255-291.
- Recio, I., De la Fuente, M.A., Juárez, M., and Ramos, M. 2009. Bioactive components in sheep milk. In: *Bioactive components in milk and dairy products*. Park, Y. W. (ed.). Wiley-Blackwell, Ames, IA, USA, pp: 83-104.
- Reynolds, C. K., Cannon, V. L., and Loerch, S. C. 2006. Effects of forage source and supplementation with soybean and marine algal oil on milk fatty acid composition of ewes. *Anim. Feed Sci. Technol.* 131:333-357
- Rindsig, R. B., and Schultz, L. H. 1974. Effects of abomasal infusions Abomasal infusion of safflower oil or elaidic acid on blood lipids and milk fat in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 57:1459-1466.
- Rodriguez-Cruz, M., Tovar, A. R., Palacios-González B., del Prado, M., and Torres, N. 2006. Synthesis of long-chain polyunsaturated fatty acids in lactating mammary gland: role of  $\Delta 5$  and  $\Delta 6$  desaturases, SREBP-1, PPAR $\alpha$ , and PGC-1. *J. Lipid Res.* 47:553-560.
- Rohwer, F., and Thurber, R. V. 2009. Viruses manipulate the marine environment. *Nature.* 459:207-212.

- Russell, J. B., and J.L. Rychlik. 2001. Factors that alter rumen microbial ecology. *Science* 292:1119–1122.
- Sæbo, A., Sæbo, P. C., Griinari, J. M., and Shingfield, K. J. 2005. Effect of abomasal infusions of geometric isomers of 10,12 conjugated linoleic acid on milk fat synthesis in dairy cows. *Lipids* 40:823-832.
- Salem, A. Z. M., Robinson, P. H., El-Adawy, M. M., and Hassan, A. A. 2007. In vitro fermentation and microbial protein synthesis of some browse tree leaves with or without addition of polyethylene glycol. *Anim. Feed Sci. Technol.* 138:318-330.
- Santos-Buelga, C., and Scalbert, A. 2000. Proanthocyanidins and Tannin-Like Compounds—Nature, Occurrence, Dietary Intake and Effects on Nutrition and Health. *J. Sci. Food Agric.* 80:1094-1117.
- Schofield, P., Mbugua, D. M., and Pell, A. N. 2001. Analysis of Condensed Tannins: A Review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 91:21-40.
- Shi, H., Luo, J., Zhu, J., Li, J., Sun, Y., Lin, X., Zhang, L., Yao, D., and Shi, H. 2013. PPAR $\gamma$  regulates genes involved in triacylglycerol synthesis and secretion in mammary gland epithelial cells of dairy goats. *PPAR Res.* 2013: 310948.
- Shi, H. B., Zhao, W. S., Luo, J., Yao, D. W., Sun, Y. T., Li, J., Shi, H. P. and Looor, J. J. 2014. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ 1 and  $\gamma$ 2 isoforms alter lipogenic gene networks in goat mammary epithelial cells to different extents. *J. Dairy Sci.* 97:5437-5447.
- Shingfield, K., S. Ahvenjärvi, V. Toivonen, A. Äröla, K. Nurmela, P. Huhtanen, and J. Griinari. 2003. Effect of dietary fish oil on bio-hydrogenation of fatty acids and milk fatty acid content in cows. *Anim. Sci.* 77:165–179.
- Shingfield, K. J., Bernard, L., Leroux, C., and Chilliard, Y. 2010. Role of *trans* fatty acids in the nutritional regulation of mammary lipogenesis in ruminants. *Animal* 4:1140-1166.
- Shingfield, K. J., Bonnet, M., and Scollan, N. D. 2013. Recent developments in altering the fatty acid composition of ruminant-derived foods. *Animal* 7:132-162.
- Shingfield, K. J., Chilliard, Y., Toivonen, V., Kairenius, P., and Givens, D. I. 2008. *Trans* fatty acids and bioactive lipids in ruminant milk. *Adv. Exp. Med. Biol.* 606:3-65.
- Shingfield, K. J., and Griinari, J. M. 2007. Role of biohydrogenation intermediates in milk fat depression. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 109:799-816.
- Shingfield, K. J., Kairenius, P., Äröla, A., Paillard, D., Muetzel, S., Ahvenjärvi, S., Vanhatalo, A., Huhtanen, P., Toivonen, V., Griinari, J. M., and Wallace, R. J. 2012. Dietary fish oil supplements modify ruminal biohydrogenation, alter the flow of fatty acids at the omasum, and induce changes in the ruminal *Butyrivibrio* population in lactating cows. *J. Nutr.* 142:1437-1448.
- Shingfield, K. J., Reynolds, C. K., Hervás, G., Griinari, J. M., Grandison, A. S., and Beever, D. E. 2006. Examination of the persistency of milk fatty acid composition responses to fish oil and sunflower oil in the diet of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 89:714-732.
- Shingfield, K. J., Sæbø, A., Sæbø, P.-C., Toivonen, V., and Griinari, J. M. 2009. Effect of abomasal infusions of a mixture of octadecenoic acids on milk fat synthesis in lactating cows. *J. Dairy Sci.* 92:4317-4329.

- Shingfield, K. J., and Wallace, R. J. 2014. Synthesis of conjugated linoleic acid in ruminants and humans. In: Conjugated linoleic acids and conjugated vegetable oils. Sels, B., and Philippaerts, A. (eds.). The Royal Society of Chemistry, Oxford, UK, pp: 1-65.
- Simopoulos, A. P. 2009. Omega-6/omega-3 essential fatty acids: biological effects. *World Rev. Nutr. Diet.* 99:1-16.
- Sinclair, L. A., Lock, A. L., Early, R., and Bauman, D. E. 2007. Effects of *trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid on ovine milk fat synthesis and cheese properties. *J. Dairy Sci.* 90:3326-3335.
- Stewart, C. S., Flint, H. J., and Bryant, M. P. 1997. The rumen bacteria. In: The rumen microbial ecosystem. Hobson, P. S., and Stewart, C. S. (eds.). Blackie Academic & Professional, London, UK, pp: 10-72.
- Suárez-Vega, A., Gutiérrez-Gil, B., Klopp, C., Robert-Granie, C., Tosser-Klopp, G., and Arranz, J. J. 2015. Characterization and comparative analysis of the milk transcriptome in two dairy sheep breeds using RNA sequencing. *Sci. Rep.* 5:18399
- Suárez-Vega, A., Toral, P. G., Gutiérrez-Gil, B., Hervás, G., Arranz, J. J., and Frutos, P. 2017. Elucidating fish oil-induced milk fat depression in dairy sheep: Milk somatic cell transcriptome analysis. *Sci. Rep.* 7:45905.
- Tajima, K., Aminov, R. I., Nagamine, T., Ogata, K., Nakamura, M., Matsui, H., and Benno, Y. 1999. Rumen bacterial diversity as determined by sequence analysis of 16S rDNA libraries. *FEMS Microbiol. Ecol.* 29:159-169.
- Taylor, M. W., and MacGibbon, A. K. H. 2011. Triacylglycerols. In: Encyclopedia of dairy sciences. Fuquay, F. W. (ed.). Academic Press, San Diego, California, USA, pp: 665-669.
- Tiemann, T. T., Avila, P., Ramírez, G., Lascano, C., Kreuzer, M., and Hess, H. D. 2008. In vitro ruminal fermentation of tanniferous tropical plants: Plant-specific tannin effects and counteracting efficiency of PEG. *Anim. Feed Sci. Technol.* 146:222-241.
- Ticiani, E., Urio, M., Ferreira, R., Harvatine, K. J., and de Oliveira, D. E. 2016. Transcriptional regulation of acetyl-CoA carboxylase  $\alpha$  isoforms in dairy ewes during conjugated linoleic acid induced milk fat depression. *Animal* 10:1677-1683.
- Timmen, H., and Patton, S. 1988. Milk fat globules: fatty-acid composition, size and in vivo regulation of fat liquidity. *Lipids* 23:685-689.
- Toral, P. G. 2010. Supplementation of the diet of dairy sheep with sunflower oil and marine lipids to modulate milk fat composition. Effect on animal performance, rumen microbiota and fermentation characteristics, and milk and digesta fatty acid profiles. Tesis doctoral. Universidad de León, León, España.
- Toral, P. G., Belenguer, A., Shingfield, K. J., Hervás, G., Toivonen, V., and Frutos, P. 2012. Fatty acid composition and bacterial community changes in the rumen fluid of lactating sheep fed sunflower oil plus incremental levels of marine algae. *J. Dairy Sci.* 95:794-806.
- Toral, P. G., Bernard, L., Belenguer, A., Rouel, J., Hervás, G., Chilliard, Y., and Frutos, P. 2016a. Comparison of ruminal lipid metabolism in dairy cows and goats fed diets supplemented with starch, plant oil, or fish oil. *J. Dairy Sci.* 99:301-316.
- Toral, P. G., Bernard, L., Delavaud, C., Gruffat, D., Leroux, C., and Chilliard, Y. 2013a. Effects of fish oil and additional starch on tissue fatty acid profile and lipogenic gene

- mRNA abundance in lactating goats fed a diet containing sunflower-seed oil. *Animal* 7:948-956.
- Toral, P. G., Frutos, P., Hervás, G., Gómez-Cortés, P., Juárez, M., and de la Fuente, M. A. 2010a. Changes in milk fatty acid profile and animal performance in response to fish oil supplementation, alone or in combination with sunflower oil, in dairy ewes. *J. Dairy Sci.* 93:1604-1615.
- Toral, P. G., Hervás, G., Belenguer, A., Bichi, E., and Frutos, P. 2013b. Effect of the inclusion of quebracho tannins in a diet rich in linoleic acid on milk fatty acid composition in dairy ewes. *J. Dairy Sci.* 96:431-439.
- Toral, P.G., Hervás, G., Bichi, E., Belenguer, A., and Frutos, P., 2011. Tannins as feed additives to modulate ruminal biohydrogenation: effects on animal performance, milk fatty acid composition and ruminal fermentation in dairy ewes fed a diet containing sunflower oil. *Anim. Feed Sci. Technol.* 164:199-206.
- Toral, P. G., Hervás, G., Carreño, D., Belenguer, A., and Frutos, P. 2015a. Comparison of milk fatty acid responses during fish oil- and *trans*-10 *cis*-12 18:2-induced milk fat depression in dairy ewes. *Anim. Feed Sci. Technol.* 210:66-73.
- Toral, P. G., Hervás, G., Carreño, G., and Frutos, P. 2016b. Does supplemental 18:0 alleviate fish oil-induced milk fat depression in dairy ewes? *J. Dairy Sci.* 99:1133-1144.
- Toral, P. G., Hervás, G., and Frutos, P. 2015b. Reductions in milk  $\Delta$ 9-desaturation ratios to oral dosing of cobalt-acetate are accompanied by the downregulation of SCD1 in lactating ewes. *J. Dairy Sci.* 98:1961-1971.
- Toral, P. G., Hervás, G., Gómez-Cortés, P., Frutos, P., Juárez, M., and de la Fuente, M. A. 2010b. Milk fatty acid profile and dairy sheep performance in response to diet supplementation with sunflower oil plus incremental levels of marine algae. *J. Dairy Sci.* 93:1655-1667.
- Toral, P. G., Shingfield, K. J., Hervás, G., Toivonen, V., and Frutos, P. 2010c. Effect of fish oil and sunflower oil on rumen fermentation characteristics and fatty acid composition of digesta in ewes fed a high concentrate diet. *J. Dairy Sci.* 93:4804-4817.
- Tsiplakou, E., Mountzouris, K. C., and Zervas, G. 2006. The effect of breed, stage of lactation and parity on sheep milk fat CLA content under the same feeding practices. *Livest. Sci.* 105:162-167.
- Turner, C. W. (ed.) 1952. The anatomy of the udder of sheep. In: The anatomy of the udder of cattle and domestic animals. Lucas Brothers Publishers, Columbia, Missouri, USA, pp: 315-331.
- Van Soest, P. J. (ed.) 1994. Nutritional ecology of the ruminants. Cornell University Press, Ithaca, New York, USA.
- Vasta, V., Makkar, H. P. S., Mele, M., and Priolo, A. 2009. Ruminal biohydrogenation as affected by tannins in vitro. *Br. J. Nutr.* 102:82-92.
- Vernon, R.G. 2005. Lipid metabolism during lactation: A review of adipose tissue-liver interactions and the development of fatty liver. *J. Dairy Res.* 72:460-469.
- Vlaeminck, B., Gervais, R., Rahman, M., Gadeyne, F., Gorniak, M., Doreau, M., and Fievez, V. 2015. Postruminal synthesis modifies the odd- and branched-chain fatty acid profile from the duodenum to milk. *J. Dairy Sci.* 98:1-12.

- Vlaeminck, B., Fievez, V., Cabrita, A. R. J., Fonseca, A. J. M., and Dewhurst, R. J. 2006. Factors affecting odd- and branched-chain fatty acids in milk: A review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 131:389-417.
- Wallace, R. J., Chaudhary, L. C., McKain, N., McEwan, N. R., Richardson, A. J., Vercoe, P. E., Walker, N. D., and Paillard, D. 2006. *Clostridium proteoclasticum*: a ruminal bacterium that forms stearic acid from linoleic acid. *FEMS Microbiol. Lett.* 265:195-201.
- Weerasinghe, W. M. P. B., Wilkinson, R. G., Lock, A. L., de Veth, M. J., Bauman, D. E., and Sinclair, L. A. 2012. Effect of a supplement containing *trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid on the performance of dairy ewes fed 2 levels of metabolizable protein and at a restricted energy intake. *J. Dairy Sci.* 95:109-116.
- Whitlock, L. A., Schingoethe, D. J., Hippen, A. R., Kalscheur, K. F., Baer, R. J., Ramaswamy, N., and Kasperon, K. M. 2002. Fish oil and extruded soybeans fed in combination increase conjugated linoleic acids in milk of dairy cows more than when fed separately. *J. Dairy Sci.* 85:234-243.
- Williams, A. G., and Coleman, G. S. 1992. Structure of Entodiniomorphid Protozoa and its relationship to function. In: *The Rumen Protozoa*. Brock, T. D. (ed). Springer: New York, USA, pp: 236-255.
- Williams, A. G., and Coleman, G. S. 1997. The rumen protozoa. In: *The rumen microbial ecosystem*. Hobson, P. N., and Stewart, C. S. (eds.) Blackie Academic & Professional, London. UK, pp: 73-139.
- Woese, C. R., Kandler, O., and Wheelis, M. L. 1990. Towards a natural system of organism. Propossal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87:4576-4579.
- Wright, A. D. G., and Klieve, A. V. 2011. Does the complexity of the rumen microbial ecology prelude methane mitigation? *Anim. Feed Sci. Technol.* 166:248-253.
- Wu, S., Baldwin, R., Li, W., Li, C., Connor, E., and Li, R. 2012. The bacterial community composition of the bovine rumen detected using pyrosequencing of 16S rRNA genes. *Metagenomics* 1:235571.
- Yang, T., Espenshade, P. J., Wright, M. E., Yabe, D., Gong, Y., Aebersold, R., Goldstein, J. L., and Brown, M. S. 2002. Crucial step in cholesterol homeostasis: Sterols promote binding of SCAP to INSIG-1, a membrane protein that facilitates retention of SREBPs in ER. *Cell* 110:489-500.
- Yáñez-Ruiz, D. R., Scollan, N. D., Merry, R. J., and Newbold, C. J. 2006. Contribution of rumen protozoa to duodenal flow of nitrogen, conjugated linoleic acid and vaccenic acid in steers fed silages differing in their water-soluble carbohydrate content. *Brit. J. Nutr.* 96:861-869.
- Yokoyama, M. T., and Davis, C. L. 1970. Hydrogenation of linoleic acid by *Borrelia* B25 and *Succinivibrio dextrinosolvens*. *Fed. Proc.* 29:A691.
- Yokoyama, M. T., and Davis, C. L. 1971. Hydrogenation of unsaturated fatty acids by *Treponema* (*Borrelia*) strain B25, a rumen spirochete. *J. Bacteriol.* 107:519-527.
- Zened, A., Combes, S., Cauquil, L., Mariette, J., Klopp, C., Bouchez, O., Troegeler-Meynadier, A., and Enjalbert, F. 2013. Microbial ecology of the rumen evaluated by 454 GS FLX pyrosequencing is affected by starch and oil supplementation of diets. *FEMS Microbiol. Ecol.* 83:504-514.

## PRUEBA I

### ABILITY OF DIFFERENT TYPES AND DOSES OF TANNIN EXTRACTS TO MODULATE *IN VITRO* RUMINAL BIOHYDROGENATION IN SHEEP

D. Carreño, G. Hervás, P.G. Toral, A. Belenguer, P. Frutos

*Instituto de Ganadería de Montaña, CSIC – Universidad de León,*

*Finca Marzanas s/n, 24346 Grulleros, León, Spain*

*Animal Feed Science and Technology* 202 (2015) 42-51

doi: 10.1016/j.anifeedsci.2015.02.003

Presentado en parte en el *1st Joint ISNH/ISRP International Conference. Harnessing the Ecology and Physiology of Herbivores*. 8–12 de septiembre de 2014, Canberra, Australia

y en parte en *FAO-CIHEAM Network on Sheep and Goats. Seminar of the Sub-Network on Production Systems and Sub-Network on Nutrition*, 16–18 de junio de 2015, Montpellier, Francia





**ABILITY OF DIFFERENT TYPES AND DOSES OF TANNIN  
EXTRACTS TO MODULATE *IN VITRO* RUMINAL  
BIOHYDROGENATION IN SHEEP**

D. Carreño, G. Hervás, P.G. Toral, A. Belenguer, P. Frutos

---

**Abstract.** The ability of tannins to interfere with ruminal biohydrogenation (BH) and modulate the fatty acid (FA) profile of ruminant-derived products is highly controversial, which is probably related to the type of tannin and the dosage rate. Therefore, this *in vitro* study was conducted to analyse the effect of four commercial extracts of tannins (from chestnut, oak, quebracho and grape) at four doses (20, 40, 60 and 80 g/kg diet DM) with the aim of selecting an effective treatment to modulate the BH of unsaturated FA. Two *in vitro* assays with batch cultures of rumen microorganisms, using cannulated ewes as donors of rumen inocula, were performed. The incubated substrate (a total mixed ration similar to that fed to the animals) was supplemented with 20 g of sunflower oil/kg DM. The first experiment followed a 4 × 4 + 1 design (*i.e.*, 4 types of tannins × 4 doses of each one, and a control), and treatment effects on the FA composition of the ruminal digesta were examined by gas chromatography. On the basis of these results, the second experiment was conducted to make sure that the selected dose and type of tannin would not impair rumen fermentation. To this end, gas production kinetic parameters, extent of degradation, *in vitro* true substrate digestibility, pH, and ammonia and VFA concentrations, as well as the bacterial community (by T-RFLP) were examined. All tannin extracts were able to modulate the *in vitro* BH of unsaturated FA. However, the high dose required in many cases suggests that their efficacy would be rather limited in terms of animal feeding. On the other hand, the oak tannin extract, at a dose of 20 g/kg diet DM, increased total PUFA, 18:3n-3, 18:2n-6 and *trans*-11 18:1, and decreased *trans*-10 18:1 and 18:0 rumen concentrations without eliciting any negative response in ruminal fermentation. Although this treatment had no discernible effects on the bacterial community

structure and diversity, a few fragments compatible with uncultured *Lachnospiraceae* species were affected.

*Keywords:* ewe, fatty acid, condensed tannin, hydrolysable tannin, rumen microbiota, ruminal fermentation.

*Abbreviations:* A, cumulative gas production; ADF, acid detergent fibre; AFR, average fermentation rate; aNDF, neutral detergent fibre; BCFA, branched-chain fatty acids; BH, biohydrogenation; c, fractional fermentation rate; CHE, chestnut; CLA, conjugated linoleic acid; CP, crude protein; DM, dry matter; DMD, dry matter disappearance; ED, extent of degradation in the rumen; FA, fatty acid; FAME, fatty acid methyl esters; GRA, grape; *iv*TSD, *in vitro* true substrate digestibility; OBCFA, odd- and branched-chain fatty acids; OM, organic matter; PUFA, polyunsaturated fatty acids; QUE, quebracho; TMR, total mixed ration; T-RFLP, terminal restriction fragment length polymorphism; VFA, volatile fatty acid.

---

## 1. INTRODUCTION

Due to consumers' concerns about food of animal origin and demands for healthier food, considerable effort is being made by ruminant nutrition researchers to develop products that are safe and potentially health promoting. Such properties have been assigned to unsaturated fatty acids (FA) and particularly to conjugated linoleic acids (CLA) formed in the rumen by microbial biohydrogenation (BH) of certain polyunsaturated FA (PUFA; Lock and Bauman, 2004; Shingfield et al., 2008).

Increased levels of desirable FA in ruminant derived products can be achieved through feeding strategies reducing the extent of BH or facilitating a higher rumen output of *cis*-9 *trans*-11 CLA, the main health-promoting CLA isomer, and especially *trans*-11 18:1, which will act as a precursor of the former in the animal's own tissues (Lock and Bauman, 2004; Shingfield et al., 2008).

Tannins are plant secondary compounds with antibacterial and rumen modulating properties that are able to interfere with BH (McSweeney et al., 2001; Mueller-Harvey, 2006; Vasta et al., 2009a). Some *in vitro* studies have suggested that diet supplementation with these phenolic compounds may be an efficient tool to favourably modify the BH of dietary PUFA and enhance the accumulation of *trans*-11 18:1 due to an inhibition of the last step of BH (Khiaosa-Ard et al., 2009; Buccioni et al., 2011). However, some others have reported a general inhibition of BH rather than a specific inhibition of the conversion of *trans*-11 18:1 to 18:0 (Kronberg et al., 2007; Minieri et al., 2014). In any case, this beneficial effect has rarely been validated *in vivo* (Vasta et al., 2009b; Khiaosa-Ard et al., 2011) and many experiments seem to point to a different direction (*e.g.*, Benchaar and Chouinard, 2009; Cabiddu et al., 2009).

Results from our studies with lactating ewes fed diets supplemented with a combination of tannin extracts of quebracho and chestnut (10 g/kg diet DM; Toral et al., 2011) or just quebracho (20 g/kg diet DM; Toral et al., 2013) showed that tannin addition was not able to modify milk FA composition towards a potentially healthier profile, especially in the long-term. Recently, Buccioni et al. (2015), using the same tannin extracts (*i.e.*, quebracho and chestnut) but at higher levels (53 g/kg diet DM), observed a slight increase in the milk concentration of linoleic, vaccenic and rumenic acids and a decrease in stearic and saturated FA.

Given the great variation in the structural features and reactivity of different tannins (Álvarez del Pino et al., 2005; Mueller-Harvey, 2006), all these inconsistent results may be attributable to the type and/or concentration of tannins. Thus, there is a void of knowledge about which of the many types of tannins might be potentially more useful for a particular purpose, and also a need for further studies.

Therefore, this *in vitro* study was conducted to analyse the effect of different types and doses of tannins with the aim of selecting an effective treatment to modulate the ruminal BH of unsaturated FA. Once a type of tannin at a practical dose (in terms of cost and avoidance of toxicity; Makkar, 2003) was chosen, a

secondary aim, before recommending its test *in vivo*, was to make sure that it would not impair ruminal fermentation.

## 2. MATERIALS AND METHODS

An *in vitro* trial (Experiment 1) was conducted in batch cultures to assess the effects of different concentrations of a range of tannins on rumen BH. On the basis of the results obtained in this assay, a new *in vitro* trial (Experiment 2) was conducted to test the effect of a selected type and dose of tannin on rumen fermentation and bacterial community. All experimental procedures were approved and completed in accordance with the Spanish Royal Decree 53/2013 for the protection of animals used for experimental purposes.

### 2.1. Animals, diets and tannins

*In vitro* incubations were conducted as outlined previously (Frutos et al., 2004) with rumen fluid collected from five ruminally cannulated (40 mm internal diameter) Merino sheep (body weight =  $63.6 \pm 6.42$ ). All the animals were offered a total mixed ration (TMR, forage:concentrate ratio 50:50), based on alfalfa hay (particle size >4 cm) and concentrates, in two meals (60% at 9:00 h and 40% at 17:00 h) at approximately 0.8 times the voluntary feed intake previously determined ad libitum (37 g DM/kg metabolic weight and day). Formulation and chemical composition of the diet is shown in Table 1. Animals had continuous access to clean drinking water.

Four types of commercial oenological tannin extracts (Agrovin S.A., Alcázar de San Juan, Spain) were tested: two condensed [quebracho (QUE; *Schinopsis lorentzii* – Tanicol MOX) and grape (GRA; *Vitis vinifera* – Tanicol VMax)] and two hydrolysable [chestnut (CHE; *Castanea sativa* – Vinitanon) and oak (OAK; *Quercus robur* and *Q. petraea* – Robletan FST)] tannins.

## 2.2. *In vitro* experiments

In each experiment, and after an adaptation period of 15 days, rumen fluid inocula (collected in three different days) were obtained via the cannula before the morning feeding. The inocula were immediately taken in thermal flasks to the laboratory where they were strained through a nylon membrane (400 µm; Fisher Scientific S.L., Madrid, Spain) while bubbled with CO<sub>2</sub>.

Table 1. *Formulation and chemical composition of the experimental diet.*

	TMR <sup>A</sup>	SEM <sup>B</sup>
Ingredients, g/kg of fresh matter		
Dehydrated alfalfa hay	500	-
Whole corn grain	140	-
Whole barley grain	100	-
Soybean meal solvent 440 g/kg CP	150	-
Sugar beet pulp, pellets	50.0	-
Molasses, liquid	40.0	-
Mineral supplement <sup>C</sup>	18.0	-
Vitamin supplement <sup>D</sup>	2.00	-
Chemical composition, g/kg DM		
Organic matter	900	3.15
Crude protein	187	6.08
Neutral detergent fibre	311	24.3
Acid detergent fibre	218	21.1
Ether extract	23.5	1.80

<sup>A</sup> n = 6. Contained (g/100 g of total FA): 16:0 (25.2), 18:0 (5.38), *cis*-9 18:1 (13.9), 18:2n-6 (34.6) and 18:3n-3 (11.9).

<sup>B</sup> SEM, standard error of the mean.

<sup>C</sup> Contained (g/kg): CaCO<sub>3</sub> (556), Ca<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (222), and NaCl (222).

<sup>D</sup> VITAFAC Ovino 0.2% AC (DSM Nutritional Products S.A., Madrid, Spain). Declared as containing: vitamin A (4,000,000 IU/kg), vitamin D3 (1,000,000 IU/kg), vitamin E (5 g/kg), iron (17.5 g/kg), manganese (20 g/kg), cobalt (50 mg/kg), iodine (250 mg/kg), zinc (15 g/kg), selenium (100 mg/kg), sepiolite (100 g/kg), calcium (26.2 g/kg), and magnesium (6.15 g/kg).

### 2.2.1. Experiment 1

This trial was conducted using batch cultures of rumen microorganisms (in 16 mL Hungate tubes), following a 4 × 4 + 1 (control) design. Treatments were: 4 types of

tannins (quebracho, grape, chestnut and oak) × 4 doses of each one (20, 40, 60 and 80 g/kg DM), and a control.

The incubated substrate was a TMR, similar to that used to feed the animals, supplemented with 20 g of sunflower oil/kg diet DM [Carrefour S.A., Madrid, Spain; containing (g/kg total FA): 16:0 (54.8), 18:0 (44.2), *cis*-9 18:1 (364) and 18:2n-6 (503)]. Both the oil and the tannins were dissolved, respectively, in ethanol 96% and in water at about 30°C, and added into the tubes just before the incubation started.

Each Hungate tube contained 78 mg DM of the substrate (ground using a hammer-mill fitted with a 0.5 mm screen) that were incubated with 12 mL of a mix (1:2) of strained rumen fluid and phosphate-bicarbonate buffer (Goering and Van Soest, 1970). The pH was adjusted to 6.8 with orthophosphoric acid in order to better simulate ruminal conditions in animals fed a 50:50 forage:concentrate diet.

Tubes were incubated under anaerobic conditions for 12 h (when, according to previous preliminary assays, effects were better detected) in an incubator set at 39.5°C, and were individually agitated every 6 h. The reaction was stopped by placing the tubes into ice-water for approximately 5-10 min. They were then stored at -80°C until FA analysis.

### 2.2.2. Experiment 2

Once the oak tannin extract at a dose of 20 g/kg DM was selected, a new *in vitro* trial was conducted in 125 mL sealed serum flasks to test the effect of this treatment on rumen fermentation and bacterial community.

For each of the three runs, two samples of each treatment (*i.e.*, control and OAK20; 325 mg DM milled to pass a 1 mm screen) and two blanks (*i.e.*, buffered rumen fluid without substrate) were incubated at 39.5°C with 50mL of a mix (1:2) of strained rumen fluid and phosphate-bicarbonate buffer. The pH of the buffer solution was adjusted to 6.8 as in the Experiment 1.

The rate and extent of gas production were determined by measuring head-space gas pressure at 2, 4, 6, 9, 12, 16, 20, 24, 30, 36, 48, 60 and 72 h post-

inoculation. Pressure values, corrected for the quantity of organic matter (OM) incubated and gas released from blanks, were used to generate gas volume estimates using a predictive equation, as reported in Frutos et al. (2004). Dry matter disappearance (DMD; g/kg) after 72 h incubation was estimated by filtering residues using pre-weighed sintered glass crucibles (100–160  $\mu\text{m}$ ; Pyrex, Stone, UK).

In addition, three more flasks per treatment and run were incubated for 24h. Once the reaction was stopped, the pH was measured in two flasks and centrifuged samples (at 976 x g for 10min) were collected for ammonia and volatile fatty acid (VFA) analysis. Values of DMD and *in vitro* true substrate digestibility (*iv*TSD) were estimated by filtering the residues using pre-weighed sintered glass crucibles (100–160  $\mu\text{m}$ ; Pyrex, Stone, UK) and determining the neutral detergent fibre content, as reported in Frutos et al. (2004). The third flask was immediately frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  for subsequent microbial DNA extraction and terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis.

### 2.3. Chemical analysis

Feed samples were prepared (ISO 6498:2012) and analysed for DM (ISO 6496:1999), ash (ISO 5984:2002), and crude protein (ISO 5983-2:2009). Neutral and acid detergent fibres (aNDF and ADF) were determined using an Ankom<sup>2000</sup> fibre analyser (AnkomTechnology Methods 13 and 12, respectively; Ankom Technology Corp., Macedon, NY, USA, <https://ankom.com/procedures.aspx>); the former was assayed with sodium sulphite and  $\alpha$ -amylase, and both were expressed with residual ash. The content of ether extract in the diets was determined by the Ankom Filter Bag Technology (AnkomTechnology Method 2; Ankom Technology Corp.). Fatty acid methyl esters (FAME) of lipid in freeze-dried samples of TMR and in the sunflower oil were prepared in a one-step extraction-transesterification procedure, as outlined previously by Shingfield et al. (2003).

Rumen samples for FA composition were freeze-dried directly in the Hungate tubes. The lipids were then extracted using a mixture of hexane and

isopropanol (3:2, vol/vol) and converted to FAME by sequential base–acid catalysed transesterification (Toral et al., 2010). Methyl esters were separated and quantified using a gas chromatograph (Agilent 7890A GC System, Santa Clara, CA, USA) equipped with a flame-ionisation detector and a 100-m fused silica capillary column (0.25 mm i.d., 0.2- $\mu$ m film thickness; CP-SIL 88, CP7489, Varian Ibérica S.A., Madrid, Spain) and hydrogen as the carrier gas. Total FAME profile in a 2  $\mu$ L sample volume at a split ratio of 1:50 was determined using a temperature gradient programme (Shingfield et al., 2003). Isomers of 18:1 were further resolved in a separate analysis under isothermal conditions at 170°C (Shingfield et al., 2003). Peaks were identified based on retention time comparisons with commercially available authentic standards (Nu-Chek Prep., Elysian, MN, USA; Sigma–Aldrich, Madrid, Spain; and Larodan Fine Chemicals AB, Solna, Sweden; Toral et al., 2010), cross referencing with chromatograms reported in the literature (Shingfield et al., 2003; Toral et al., 2010) and comparison with reference samples for which the FA composition was determined based on gas chromatography analysis of FAME and gas chromatography–mass spectrometry analysis of corresponding 4,4-dimethyloxazoline derivatives (Toral et al., 2010).

The ammonia concentration was determined by colorimetry, and VFA by gas chromatography, using crotonic acid as the internal standard, both in centrifuged samples (Frutos et al., 2004).

#### ***2.4. DNA extraction and T-RFLP analysis***

Frozen samples were freeze-dried and thoroughly mixed before DNA extraction, which was conducted in duplicate using the QiagenQIAmp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Inc., Valencia, CA, USA), with the modification of a greater temperature (95°C) to improve cell lysis. Duplicate samples were combined and used as templates for T-RFLP analysis of bacterial 16S rRNA genes, which were performed as described previously (Castro-Carrera et al., 2014), using three restriction enzymes (*HhaI*, *MspI* and *HaeIII*). Determination of the sizes of the terminal



restriction fragments (T-RF) was completed with the size standard ET 900-R (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, UK) and the GeneMarker Analysis software (SoftGenetics, State College, PA, USA). In order to infer the bacterial composition of the samples, *in silico* restriction for the major rumen bacteria with the primers and the enzymes used were obtained from the Ribosomal Database Project II website (<http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>; Cole et al., 2014).

### 2.5. Calculations and statistical analysis

Gas production data were fitted to an exponential model using SAS software package (version 9.3, SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA) to provide parameters describing gas release in terms of cumulative gas production ( $A$ , mL of gas/g of OM incubated) and fractional fermentation rate ( $c$ , /h). Average fermentation rate (AFR, mL of gas/h) and extent of degradation in the rumen (ED, g/kg of DM) were estimated assuming a rumen particulate outflow ( $kp$ , /h) of 0.042, according to the following equations:  $ED = (c \times DMD)/(c + kp)$ , and  $AFR = (A \times c)/(2 \times \ln 2)$ , where DMD = *in vitro* DM disappearance after 72 h of incubation.

Data from T-RFLP (size, bp, and peak area for each T-RF) were analysed for peak filtering and binning as outlined by Abdo et al. (2006), and used to determine the relative abundance of each fragment over the total peak area, as well as the diversity indices (number of T-RF or richness, and Shannon index; Hill et al., 2003). Multivariate analysis of variance (MANOVA) of the relative abundance data of each T-RF was conducted, using the R-project software ([www.r-project.org](http://www.r-project.org), version 3.1.1), to assess the effect of experimental treatment on the whole bacterial structure.

FA composition of ruminal digesta from the Experiment 1 was analysed by a one-way ANOVA using the MIXED procedure of SAS with a model that included the fixed effect of experimental treatment. Run nested within treatment was designated as the random effect. Orthogonal polynomial contrasts were used to evaluate linear (L), quadratic (Q) and cubic (C) components of the response to incremental amounts of each tannin extract. Rumen fermentation data from the

Experiment 2 were analysed using the MIXED procedure of SAS with a model that included the fixed effect of experimental treatment and the random effect of run nested within the treatment. Relative abundances of each T-RF were analysed similarly, although some data did not satisfy the assumptions of normality and were transformed to  $\log_{10}(n + c)$  ("c" being a constant of the same order of magnitude as the variable). Differences were declared significant at  $P < 0.05$  and considered a trend towards significance at  $P < 0.10$ . Means were separated through the "pdiff" option of the "lsmeans" statement of the MIXED procedure, and least square means are reported.

### 3. RESULTS

#### 3.1. FA composition of ruminal digesta (Experiment 1)

As shown in Table 2 and Fig. 1, all tannins and doses, with the exception of QUE80, proved to be able to slightly reduce the concentration of 18:0 ( $P < 0.001$ ) after 12 h incubations. Low and moderate doses increased concentrations of 18:2n-6 and 18:3n-3 (up to 90 and 86%, respectively;  $P < 0.01$ ). However, only some doses of 60 and 80 g/kg tended to augment *cis*-9 18:1. Likewise, concentrations of *cis*-9 *trans*-11 18:2 were only favoured by 60 g/kg of QUE and CHE, and 80 of GRA and OAK ( $P < 0.001$ ), the highest value representing an increase of 128% compared to the control. No significant effect of the tannin treatment was observed on the digesta concentration of *trans*-9 *cis*-12 18:2.

A tendency to a greater accumulation of *trans*-11 18:1 was only detected with 60 and 80 g/kg of GRA and CHE, and 20 of OAK (up to 16%;  $P < 0.10$ ). The concentration of *trans*-10 18:1 showed an irregular behaviour: although QUE60 increased it, most other treatments (e.g., QUE, CHE and OAK at 20 g/kg) decreased it ( $P < 0.001$ ). These variations were accompanied by a number of changes in several odd and branched-chain FA and also in some oxo-FA concentrations (see Table 3 and Fig. 1). Thus, the proportion of 14:0 *iso* was increased by QUE and CHE at 20, 40 and 60 g/kg and by OAK at 20 and 40 g/kg ( $P < 0.01$ ).

Figure 1. Effect of incremental levels of different tannin extracts (quebracho, grape, chestnut and oak) on the percentage of variation with respect to the control (i.e., without tannins) of 17:0 (SEM=0.801), 18:0 (SEM=0.317), *cis*-9 18:1 (SEM=1.45), *trans*-10 18:1 (SEM=1.82), *trans*-11 18:1 (SEM=0.987), *cis*-9 *trans*-11 18:2 (SEM=10.5), 18:2*n*-6 (SEM=5.32), and 18:3*n*-3 (SEM=6.09) content after 12-h *in vitro* incubation with rumen inoculum from sheep. Differences (\*:  $P < 0.05$ ; t:  $P < 0.10$ ) compared with the control. SEM, standard error of the mean.

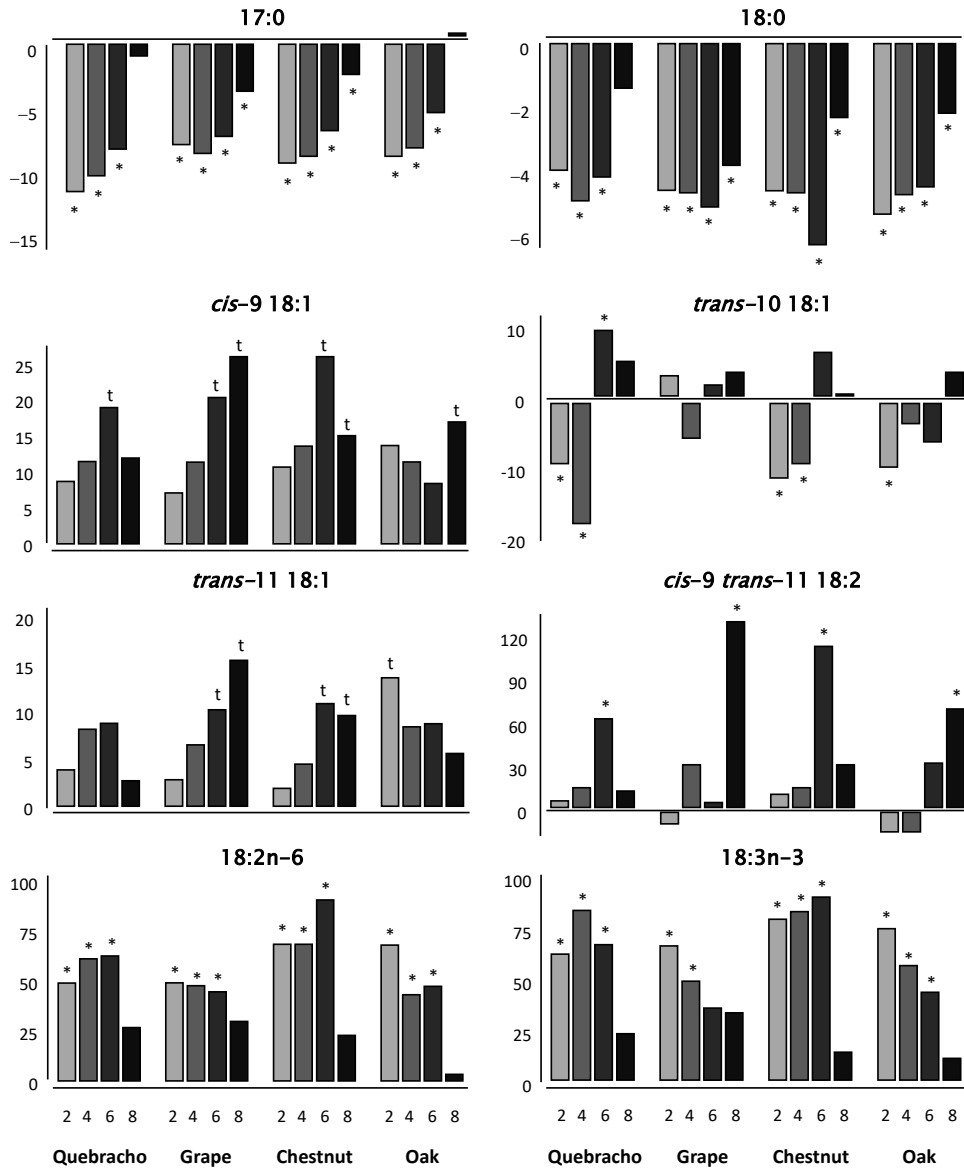


Table 2. Effect of incremental levels of different tannin extracts (quebracho, QUE; grape, GRA; chestnut, CHE; oak, OAK) on 18:0 and unsaturated fatty acid concentration (g/100 g of total fatty acids) after 12-h *in vitro* incubation with rumen inoculum from sheep<sup>A</sup>.

	18:0	<i>cis</i> -9 18:1	<i>trans</i> -10 18:1	<i>trans</i> -11 18:1	<i>cis</i> -9 <i>trans</i> -11 18:2 <sup>B</sup>	<i>trans</i> -9 <i>cis</i> -12 18:2	18:2n-6	18:3n-3	PUFA <sup>C</sup>
Control	61.2 <sup>a</sup>	2.06 <sup>c</sup>	0.387 <sup>b-e</sup>	5.15 <sup>d</sup>	0.088 <sup>d-f</sup>	0.033	0.877 <sup>f</sup>	0.175 <sup>f</sup>	1.38 <sup>e</sup>
QUE20	58.8 <sup>c-e</sup>	2.24 <sup>bc</sup>	0.354 <sup>f-h</sup>	5.35 <sup>cd</sup>	0.092 <sup>d-f</sup>	0.035	1.31 <sup>b-d</sup>	0.278 <sup>a-d</sup>	2.07 <sup>b-d</sup>
QUE40	58.2 <sup>ef</sup>	2.30 <sup>bc</sup>	0.321 <sup>h</sup>	5.57 <sup>a-d</sup>	0.100 <sup>d-f</sup>	0.034	1.41 <sup>a-d</sup>	0.314 <sup>ab</sup>	2.21 <sup>ab</sup>
QUE60	58.7 <sup>de</sup>	2.45 <sup>ab</sup>	0.423 <sup>a</sup>	5.61 <sup>a-d</sup>	0.142 <sup>c</sup>	0.036	1.42 <sup>a-d</sup>	0.286 <sup>a-c</sup>	2.21 <sup>ab</sup>
QUE80	60.4 <sup>ab</sup>	2.31 <sup>bc</sup>	0.406 <sup>a-c</sup>	5.29 <sup>cd</sup>	0.098 <sup>d-f</sup>	0.038	1.11 <sup>c-f</sup>	0.213 <sup>d-f</sup>	1.77 <sup>de</sup>
GRA20	58.4 <sup>ef</sup>	2.21 <sup>bc</sup>	0.398 <sup>a-d</sup>	5.30 <sup>cd</sup>	0.081 <sup>d-f</sup>	0.038	1.31 <sup>b-d</sup>	0.285 <sup>a-c</sup>	2.07 <sup>b-d</sup>
GRA40	58.4 <sup>ef</sup>	2.29 <sup>bc</sup>	0.368 <sup>d-g</sup>	5.49 <sup>a-d</sup>	0.114 <sup>c-e</sup>	0.033	1.29 <sup>b-d</sup>	0.256 <sup>a-e</sup>	2.13 <sup>b</sup>
GRA60	58.1 <sup>ef</sup>	2.48 <sup>ab</sup>	0.393 <sup>a-e</sup>	5.68 <sup>a-c</sup>	0.091 <sup>d-f</sup>	0.042	1.27 <sup>b-e</sup>	0.234 <sup>c-f</sup>	2.21 <sup>ab</sup>
GRA80	58.9 <sup>c-e</sup>	2.60 <sup>a</sup>	0.400 <sup>a-d</sup>	5.95 <sup>a</sup>	0.201 <sup>a</sup>	0.037	1.14 <sup>b-f</sup>	0.230 <sup>c-f</sup>	1.86 <sup>b-d</sup>
CHE20	58.4 <sup>ef</sup>	2.28 <sup>bc</sup>	0.346 <sup>gh</sup>	5.25 <sup>cd</sup>	0.096 <sup>d-f</sup>	0.030	1.47 <sup>ab</sup>	0.307 <sup>ab</sup>	2.25 <sup>ab</sup>
CHE40	58.4 <sup>ef</sup>	2.34 <sup>a-c</sup>	0.354 <sup>f-h</sup>	5.38 <sup>b-d</sup>	0.100 <sup>d-f</sup>	0.033	1.47 <sup>ab</sup>	0.313 <sup>ab</sup>	2.27 <sup>ab</sup>
CHE60	57.4 <sup>f</sup>	2.60 <sup>a</sup>	0.411 <sup>ab</sup>	5.71 <sup>a-c</sup>	0.186 <sup>ab</sup>	0.042	1.67 <sup>a</sup>	0.325 <sup>a</sup>	2.56 <sup>a</sup>
CHE80	59.8 <sup>b-d</sup>	2.37 <sup>ab</sup>	0.386 <sup>b-f</sup>	5.65 <sup>a-c</sup>	0.114 <sup>c-e</sup>	0.043	1.08 <sup>d-f</sup>	0.198 <sup>ef</sup>	1.74 <sup>c-e</sup>
OAK20	58.0 <sup>ef</sup>	2.34 <sup>abc</sup>	0.352 <sup>gh</sup>	5.86 <sup>ab</sup>	0.076 <sup>ef</sup>	0.037	1.47 <sup>a-c</sup>	0.299 <sup>a-c</sup>	2.27 <sup>ab</sup>
OAK40	58.3 <sup>ef</sup>	2.30 <sup>bc</sup>	0.376 <sup>c-g</sup>	5.59 <sup>a-d</sup>	0.076 <sup>f</sup>	0.038	1.25 <sup>b-e</sup>	0.269 <sup>a-d</sup>	2.06 <sup>b-d</sup>
OAK60	58.5 <sup>ef</sup>	2.23 <sup>bc</sup>	0.366 <sup>e-g</sup>	5.60 <sup>a-d</sup>	0.115 <sup>cd</sup>	0.032	1.29 <sup>b-d</sup>	0.247 <sup>b-e</sup>	2.11 <sup>bc</sup>
OAK80	59.9 <sup>bc</sup>	2.41 <sup>ab</sup>	0.400 <sup>a-c</sup>	5.44 <sup>b-d</sup>	0.148 <sup>bc</sup>	0.039	0.906 <sup>ef</sup>	0.193 <sup>ef</sup>	1.56 <sup>de</sup>
SED <sup>D</sup>	0.692	0.155	0.160	0.233	0.0210	0.0047	0.203	0.0349	0.278
P-value	<0.001	0.053	<0.001	0.099	<0.001	0.288	0.006	<0.001	<0.001

(continued)

Table 2. (continued)

	18:0	<i>cis</i> -9 18:1	<i>trans</i> -10 18:1	<i>trans</i> -11 18:1	<i>cis</i> -9 <i>trans</i> -11 18:2 <sup>2</sup>	<i>trans</i> -9 <i>cis</i> -12 18:2	18:2n-6	18:3n-3	PUFA <sup>3</sup>
Contrasts <sup>E</sup>									
QUE	LQ	(L)	Q	(L)	L		L	L	L
GRA	LQ	(L)		(L)			L	Q	LQ
CHE	LQ	(L)	Q		LQ		L	LQ	L
OAK	LQC				Q		LQC	Q	LQC

<sup>a-b</sup>Within a column, different superscripts indicate significant differences.

<sup>A</sup> The incubated substrate was a TMR (forage:concentrate ratio 50:50) supplemented with 20 g of sunflower oil/kg diet DM.

<sup>B</sup> Coelutes with *trans*-7 *cis*-9 18:2 and *trans*-8 *cis*-10 18:2.

<sup>C</sup> PUFA, polyunsaturated fatty acids.

<sup>D</sup> SED, standard error of the difference.

<sup>E</sup> For each tannin, significance ( $P < 0.05$ ) of linear (L), quadratic (Q) and cubic (C) responses to tannin addition. Trends towards significance ( $P < 0.10$ ) are reported in parentheses.

Table 3. Effect of incremental levels of different tannin extracts (quebracho, QUE; grape, GRA; chestnut, CHE; oak, OAK) on odd- and branched-chain and oxo- fatty acid concentration (g/100 g of total fatty acids) after 12-h *in vitro* incubation with rumen inoculum from sheep<sup>A</sup>.

	14:0 <i>iso</i>	15:0 <i>iso</i>	15:0 <i>anteiso</i>	15:0	17:0	BCFA <sup>B</sup>	OBCFA <sup>C</sup>	10-oxo-18:0	13-oxo-18:0
Control	0.068 <sup>e</sup>	0.261	0.431 <sup>f</sup>	1.06 <sup>c-e</sup>	0.955 <sup>a</sup>	2.34 <sup>ef</sup>	4.84 <sup>de</sup>	0.143 <sup>b-d</sup>	0.190 <sup>d-f</sup>
QUE20	0.085 <sup>a-d</sup>	0.305	0.489 <sup>b-f</sup>	1.13 <sup>a-c</sup>	0.851 <sup>i</sup>	2.63 <sup>b-d</sup>	5.13 <sup>b-d</sup>	0.101 <sup>de</sup>	0.164 <sup>fg</sup>
QUE40	0.093 <sup>a-c</sup>	0.320	0.519 <sup>a-d</sup>	1.18 <sup>a</sup>	0.862 <sup>hi</sup>	2.71 <sup>ab</sup>	5.24 <sup>a-c</sup>	0.103 <sup>de</sup>	0.166 <sup>e-g</sup>
QUE60	0.084 <sup>a-d</sup>	0.273	0.491 <sup>b-f</sup>	1.07 <sup>c-e</sup>	0.881 <sup>fg</sup>	2.59 <sup>b-f</sup>	5.06 <sup>b-e</sup>	0.096 <sup>e</sup>	0.134 <sup>g</sup>
QUE80	0.071 <sup>de</sup>	0.251	0.436 <sup>ef</sup>	1.04 <sup>e</sup>	0.947 <sup>ab</sup>	2.32 <sup>f</sup>	4.79 <sup>e</sup>	0.112 <sup>de</sup>	0.188 <sup>d-f</sup>
GRA20	0.077 <sup>de</sup>	0.309	0.535 <sup>a-c</sup>	1.09 <sup>b-e</sup>	0.884 <sup>fg</sup>	2.73 <sup>ab</sup>	5.28 <sup>ab</sup>	0.143 <sup>b-d</sup>	0.203 <sup>c-e</sup>
GRA40	0.075 <sup>de</sup>	0.287	0.502 <sup>a-f</sup>	1.07 <sup>c-e</sup>	0.878 <sup>f-h</sup>	2.61 <sup>b-e</sup>	5.09 <sup>b-e</sup>	0.194 <sup>a</sup>	0.222 <sup>cd</sup>
GRA60	0.075 <sup>de</sup>	0.289	0.528 <sup>a-d</sup>	1.07 <sup>c-e</sup>	0.890 <sup>ef</sup>	2.62 <sup>b-e</sup>	5.12 <sup>b-d</sup>	0.189 <sup>a</sup>	0.231 <sup>bc</sup>
GRA80	0.079 <sup>c-e</sup>	0.289	0.540 <sup>a-c</sup>	1.09 <sup>b-e</sup>	0.922 <sup>cd</sup>	2.64 <sup>bc</sup>	5.16 <sup>b-d</sup>	0.175 <sup>ab</sup>	0.231 <sup>bc</sup>
CHE20	0.095 <sup>ab</sup>	0.316	0.521 <sup>a-d</sup>	1.17 <sup>a</sup>	0.871 <sup>gh</sup>	2.68 <sup>bc</sup>	5.21 <sup>a-c</sup>	0.134 <sup>b-e</sup>	0.221 <sup>cd</sup>
CHE40	0.096 <sup>ab</sup>	0.318	0.513 <sup>a-e</sup>	1.16 <sup>ab</sup>	0.876 <sup>f-h</sup>	2.64 <sup>bc</sup>	5.19 <sup>a-c</sup>	0.123 <sup>c-e</sup>	0.262 <sup>ab</sup>
CHE60	0.098 <sup>ab</sup>	0.312	0.550 <sup>ab</sup>	1.11 <sup>a-e</sup>	0.894 <sup>ef</sup>	2.77 <sup>ab</sup>	5.29 <sup>ab</sup>	0.104 <sup>de</sup>	0.147 <sup>g</sup>
CHE80	0.074 <sup>de</sup>	0.255	0.455 <sup>d-f</sup>	1.06 <sup>de</sup>	0.934 <sup>bc</sup>	2.36 <sup>d-f</sup>	4.84 <sup>de</sup>	0.137 <sup>b-e</sup>	0.200 <sup>c-f</sup>
OAK20	0.099 <sup>a</sup>	0.352	0.578 <sup>a</sup>	1.13 <sup>a-d</sup>	0.876 <sup>f-h</sup>	2.96 <sup>a</sup>	5.49 <sup>a</sup>	0.172 <sup>a-c</sup>	0.294 <sup>a</sup>
OAK40	0.084 <sup>b-d</sup>	0.310	0.505 <sup>a-f</sup>	1.07 <sup>c-e</sup>	0.882 <sup>fg</sup>	2.69 <sup>a-c</sup>	5.21 <sup>a-c</sup>	0.178 <sup>ab</sup>	0.272 <sup>a</sup>
OAK60	0.077 <sup>de</sup>	0.304	0.519 <sup>a-d</sup>	1.05 <sup>c-e</sup>	0.907 <sup>de</sup>	2.67 <sup>bc</sup>	5.19 <sup>a-c</sup>	0.160 <sup>a-c</sup>	0.199 <sup>c-f</sup>
OAK80	0.074 <sup>de</sup>	0.264	0.470 <sup>c-f</sup>	1.09 <sup>c-e</sup>	0.957 <sup>a</sup>	2.41 <sup>c-f</sup>	4.94 <sup>c-e</sup>	0.144 <sup>b-d</sup>	0.200 <sup>c-f</sup>
SED <sup>D</sup>	0.0073	0.0336	0.0379	0.0372	0.0091	0.1365	0.1593	0.0243	0.0158
P-value	0.004	0.232	0.027	0.007	<0.001	0.003	0.010	<0.001	<0.001

(continued)

Table 3. (continued)

	14:0 <i>iso</i>	15:0 <i>iso</i>	15:0 <i>anteiso</i>	15:0	17:0	BCFA <sup>2</sup>	OBCFA <sup>3</sup>	10-oxo-18:0	13-oxo-18:0
Contrasts <sup>E</sup>									
QUE	LQ			Q	LQC			L	L
GRA					LQ	Q			
CHE	LQ		L	Q	LQC	L	L	L	QC
OAK	LQ		QC		LQ	QC	Q		Q

<sup>a-i</sup>Within a column, different superscripts indicate significant differences.

<sup>A</sup> The incubated substrate was a TMR (forage:concentrate ratio 50:50) supplemented with 20 g of sunflower oil/kg diet DM.

<sup>B</sup> BCFA, branched-chain fatty acids.

<sup>C</sup> OBCFA, odd- and branched-chain fatty acids.

<sup>D</sup> SED, standard error of the difference.

<sup>E</sup> For each tannin, significance of linear (L), quadratic (Q) and cubic (C) responses to tannin addition.

No differences were found in 15:0 *iso* ( $P > 0.10$ ) while many treatments increased 15:0 *anteiso*, and 15:0 was higher in QUE40 and CHE20 and 40 ( $P < 0.05$ ). All tannins decreased 17:0 when added at doses of 20, 40 and 60 g/kg, and GRA and CHE also at 80 g/kg. Overall, despite the erratic pattern, all tannin extracts led to general increases in both branched-chain (BCFA) and odd- and branched-chain (OBCFA) fatty acids ( $P < 0.01$ ).

### 3.2. Rumen fermentation and bacterial community (Experiment 2)

As shown in Table 4, addition of OAK20 had no effect on any of the rumen fermentation characteristics that were analysed (*e.g.*, gas production kinetic parameters, extent of degradation, pH, ammonia and VFA concentrations, molar proportions of VFA, etc.;  $P > 0.10$ ).

Table 4. Effect of the addition of an oak tannin extract (20 g/kg diet DM) on rumen fermentation parameters after *in vitro* incubation with rumen inoculum from sheep<sup>A</sup>.

Item <sup>B</sup>	Control	OAK20	SED <sup>C</sup>	P-value
DMD <sub>72</sub> (g/g)	0.703	0.679	0.0301	0.464
A (mL/g OM)	381	381	10.7	0.979
<i>c</i> (/h)	0.068	0.071	0.0016	0.176
AFR	18.7	19.5	0.355	0.115
ED (g/g)	0.435	0.426	0.0209	0.690
<i>iv</i> TSD (g/g)	0.809	0.802	0.0195	0.752
pH	6.44	6.46	0.0240	0.526
Ammonia (mg/L)	709	654	101	0.618
Total VFA (mmol/L)	79.2	71.5	4.72	0.176
Molar proportions (mol/mol)				
Acetate	0.613	0.602	0.0225	0.641
Propionate	0.177	0.182	0.0117	0.664
Butyrate	0.157	0.162	0.0095	0.665
Others <sup>D</sup>	0.053	0.054	0.0029	0.671
Acetate:propionate ratio	3.52	3.35	0.338	0.635

<sup>A</sup> The incubated substrate was a TMR (forage:concentrate ratio 50:50) supplemented with 20 g of sunflower oil/kg diet DM.

<sup>B</sup> A = cumulative gas production; AFR = average fermentation rate; *c* = fractional fermentation rate; DMD<sub>72</sub> = DM disappearance after 72 h of incubation; ED = extent of degradation in the rumen; *iv*TSD = *in vitro* true substrate digestibility; VFA = volatile fatty acids.

<sup>C</sup> SED, standard error of the difference.

<sup>D</sup> Calculated as the sum of isobutyrate, isovalerate and valerate.



Regarding the microbiota, MANOVA revealed that OAK20 had no discernible effects on the bacterial community structure ( $P > 0.10$ ). Neither did the diversity indices (richness and Shannon) differ between treatments in data derived from the enzymes *HhaI*, *MspI* and *HaeIII* ( $P > 0.10$ ; Table 5). However, the OAK20 induced variations in the relative abundances of a few T-RF (Table 5), such as an increase in some fragments that may correspond to uncultured bacteria of the class *Clostridia* (750 bp with *HhaI*;  $P < 0.10$ ) or the family *Lachnospiraceae* (65 bp with *HhaI*, 293 bp with *MspI*, and 277 bp with *HaeIII*;  $P < 0.05$ ).

Table 5. Effect of the addition of an oak tannin extract (20 g/kg diet DM) on the diversity indices of the bacterial community, and on the relative frequencies [expressed as  $\log_{10}(n + c)$  of the percentage over the total peak area, with original values in parentheses] of some terminal restriction fragments (T-RF) after 24-h *in vitro* incubation with rumen inoculum from sheep<sup>A</sup>.

		Control	OAK20	SED <sup>B</sup>	P-value
Diversity indices					
<i>HhaI</i>	Richness	64.33	63.00	2.667	0.643
	Shannon index	3.58	3.59	0.066	0.933
<i>MspI</i>	Richness	95.00	95.33	4.702	0.947
	Shannon index	4.11	4.15	0.051	0.472
<i>HaeIII</i>	Richness	56.00	57.33	3.667	0.735
	Shannon index	3.61	3.62	0.072	0.940
T-RF frequencies					
<i>Clostridia</i> <sup>C</sup>	750 bp ( <i>HhaI</i> )	-0.064 (0.86)	0.099 (1.28)	0.0611	0.056
	95 bp ( <i>MspI</i> )	0.836 (7.06)	0.836 (7.42)	0.0908	0.783
<i>Lachnospiraceae</i> <sup>C</sup>	65 bp ( <i>HhaI</i> )	0.895 (7.87)	0.946 (8.82)	0.0138	0.022
	293 bp ( <i>MspI</i> )	0.077 (1.20)	0.176 (1.50)	0.0247	0.016
	277 bp ( <i>HaeIII</i> )	-0.056 (0.23)	0.291 (1.28)	0.1092	0.034

<sup>A</sup> The incubated substrate was a TMR (forage:concentrate ratio 50:50) supplemented with 20 g of sunflower oil/kg diet DM.

<sup>B</sup> SED, standard error of the difference.

<sup>C</sup> Putative taxonomic identification.

#### 4. DISCUSSION

Due to its major influence on the FA composition of ruminant meat and milk, a great deal of effort has been directed towards modulation of lipid metabolism in the rumen (Lock and Bauman, 2004; Shingfield et al., 2008). The ability of tannins to contribute to this goal is highly controversial, which is most probably related to their type and dosage rate, and highlights the need to further investigate on this issue. As shown in Fig.1, although most FA concentrations follow a similar pattern of response to tannin extracts (*e.g.*, decreases in 17:0 and 18:0 or increases in 18:2 n-6 and 18:3 n-3), there were also many exceptions in their effects (*e.g.*, on *trans*-10 and *trans*-11 18:1 or on *cis*-9 *trans*-11 18:2) due to both the type of tannin and the dose.

Starting from the type, there are some studies on the use of commercial extracts of quebracho, and also of chestnut tannins (*e.g.*, Vasta et al., 2009a; Toral et al., 2011; Buccioni et al., 2015), although their results are rather inconsistent. Nevertheless, and despite some works have been conducted with grape seeds (*e.g.*, Correddu et al., 2015), reports are very limited for marketable extracts of grape or oak tannins.

Tannins comprise a very wide and heterogeneous group of phenolic compounds with different chemical and structural features (Mueller-Harvey, 2006). Hence, dissimilarities in procyanidin/prodelphinidin ratios, degree of galloylation, molecular weights, etc. would account for major variations in their ability to bind to other molecules or to affect microorganisms, and consequently in their effects, in this case on ruminal BH. In line with this, for example, the inclusion of an extract of condensed tannins from *Acacia mearnsii* (79 g/kg DM) inhibited the *in vitro* conversion of *trans*-11 18:1 to 18:0, while the same amount of tannins from *Onobrychis viciifolia* decreased the hydrogenation of linoleic and linolenic acids but had no effect on the last step of BH (Khiaosa-ard et al., 2009).

Regarding the key issue of the dosage rate, we chose four doses to have a wide range that allow us to detect effects that may help to understand the underlying mechanisms of tannins. However, only the low (20 g/kg) and perhaps

the moderate (40 g/kg) concentrations might be of interest in terms of animal feeding. Even if the 60 and 80 g/kg doses had shown promising effects on the BH process, they could be not only detrimental to animal performance but also impractical under farm conditions due to their cost. This occurs, for instance, in some *in vitro* assays that found a beneficial impact of tannins on BH but at very high levels (up to 160 g/kg DM; Vasta et al., 2009a). The difficulty in selecting dosage rates of plant secondary compounds to positively affect a particular parameter without conferring a negative response in others has been previously reported in several occasions (*e.g.*, Benchaar et al., 2008; Toral et al., 2013).

In any case, regardless of the practicality, our results do not clearly point to a greater ability of a particular dose to modulate the BH process towards a potentially healthier FA profile, suggesting interactions between types of tannins, doses and specific steps of the BH pathways. Thus, for example, only doses of 60 and 80 g/kg were able to promote the accumulation of *cis-9 trans-11* CLA, while those of 20, 40 and 60 g/kg increased the concentration of total PUFA, linoleic and linolenic acids, and QUE80 was the only treatment unable to decrease the proportion of 18:0. In agreement with this, Buccioni et al. (2011) observed that the effect of tannins on the BH process was, in many cases, stronger with a lower dose (49 *vs.* 82 g/kg DM).

Overall, our results are consistent with those of other *in vitro* studies (*e.g.*, Kronberg et al., 2007; Minieri et al., 2014) and suggest a general inhibition of the BH rather than the specific negative effect on the conversion of *trans-11* 18:1 to 18:0 that had been detected in some *in vitro* assays (Khiaosa-ard et al., 2009, Vasta et al., 2009a, Buccioni et al., 2011). However, as mentioned in the introduction, they are in disagreement with the slight but positive effects reported by Buccioni et al. (2015) in ewes fed quebracho and chestnut tannin extracts at a dose of 53 g/kg diet DM. Although differences between *in vitro* and *in vivo* results cannot be ruled out, after a comprehensive comparison of these studies, the reason for the discrepancy is still uncertain. It is noteworthy, however, that in this latter work, tannin extracts replaced bentonite from the diet, which might partly explain some differences

with the control diet, due to the potential effects of this clay on BH (Jeronimo et al., 2010).

Despite all tannin extracts tended to favour a slight accumulation of *trans*-11 18:1 (with a  $P < 0.10$  only with doses of 60 and 80 g/kg of grape and chestnut, and 20 of oak), their effect on the concentration of *trans*-10 18:1, a FA with an uncertain involvement in consumers' health and animals' performance (Shingfield et al., 2008), was highly variable. This is in line with inconsistent results found in the literature (e.g., Cabiddu et al., 2009, Abbeddou et al., 2011; Toral et al., 2011). Nevertheless, the formation of *trans*-10 18:1 was not promoted at the expense of *trans*-11 18:1, which may be related to the basal diet (Vasta et al., 2009b) and would indicate only small deviations from major ruminal BH pathways.

In this regard, concentrations of *trans*-9 *cis*-12 18:2 were investigated to test the hypothesis that tannins would benefit microbial populations able to metabolise *cis*-9 *cis*-12 18:2 via mechanisms other than isomerisation of the *cis*-12 double bond. However, this minor BH pathway (Honkanen et al., 2012), observed in sheep fed quebracho tannins (Toral et al., 2013), was not evident in our current assay.

Different effects of the extracts on the BH of different unsaturated FA would suggest a distinct sensitivity to tannins of the microorganism involved in each step of the process (Buccioni et al., 2011) because all changes are supposed to be mediated by the impact of tannins on the microbiota. This was supported by the variations observed in odd and branched-chain FA, which are known to be largely derived from bacteria (Fievez et al., 2012). The quoted review by Fievez et al. (2012) related an increased proportion of cellulolytic bacteria with a high *iso* FA content, while increased amylolytic populations would facilitate a higher content of *anteiso* and linear odd-chain FA. Yet, the erratic pattern observed in our incubations does not allow us to attribute differences to specific alterations in these two kinds of bacteria. Changes in odd- and branched-chain FA reflecting shifts in rumen microorganisms are also supported by variations in some keto-FA

(e.g., 10-oxo- and 13-oxo-18:0), which suggest alteration of the ruminal BH pathways (Toral et al., 2010, 2012).

To recapitulate, the treatment showing a more promising behaviour at a practical dose was OAK20, which increased total PUFA, 18:3n-3, 18:2n-6 and *trans*-11 18:1, and decreased *trans*-10 18:1 and 18:0 concentrations. Therefore, the second experiment was conducted to ensure that this oenological extract of hydrolysable tannins would not elicit a negative response in ruminal fermentation.

Although the attribution of more toxic and less efficient results to hydrolysable than to condensed tannins has proved simplistic and erroneous, some generalisations still persist (Mueller-Harvey, 2006). However, the OAK20 modulated BH but did not detrimentally affect any of the rumen fermentation characteristics that were analysed, most likely due to the small amount added to the diet. A number of studies have demonstrated this dose-dependent effect of tannins (e.g., Hervás et al., 2003, Makkar, 2003), which is even applicable to their capacity to reduce rumen ammonia concentration due to their strong inhibitory effect on proteolysis (Makkar, 2003; Frutos et al., 2004; Mueller-Harvey, 2006).

Finally, regarding the microbial analyses, the low dose of tannins precluded major changes and therefore discernible effects were observed neither in the bacterial community structure nor in the diversity indices. Furthermore, the issue of the shifts in specific bacteria involved in BH is rather complicated because recent studies question previous reports indicating that BH is achieved only by a small group of bacteria and suggest that yet uncultivated species would play a relevant role (Huws et al., 2011; Toral et al., 2012, Castro-Carrera et al., 2014).

In this assay, some T-RF affected by the addition of OAK20 are compatible with uncultured species belonging to the family *Lachnospiraceae*, which include bacterial strains that have been related to lipid metabolism, both *in vitro* (Paillard et al., 2007; Boeckert et al., 2009) and *in vivo* (Huws et al., 2011; Toral et al., 2012). Concerning the tolerance of the microbes of this diverse group to the presence of tannins, reports in the literature are once again inconsistent. For example, it has been reported that sainfoin (*O. viciifolia*) tannins inhibit the growth of a strain of

*Butyrivibrio fibrisolvens in vitro* (Jones et al., 1994) but tannin-resistant bacteria of this genus have been identified in the rumen (Odenyo et al., 2001). Indeed, Vasta et al. (2010) observed in lambs that the addition of quebracho tannins to the diet increased its abundance.

## 5. CONCLUSIONS

The four oenological tannin extracts (quebracho, grape, chestnut and oak) that were examined in this study seem to be able to modulate the *in vitro* BH of unsaturated FA. However, the high dose required in many cases suggests that their efficacy would be rather limited in terms of animal feeding. On the other hand, the oak tannin extract, at a practical dose of 20 g/kg diet DM, increases total PUFA, 18:3n-3, 18:2n-6 and *trans*-11 18:1, and decreases *trans*-10 18:1 and 18:0 rumen concentrations without eliciting any negative response in ruminal fermentation. Further studies would be now necessary to examine if these positive effects are extended to *in vivo* conditions.

## 6. REFERENCES

- Abbeddou, S., Rischkowsky, B., Richter, E. K., Hess, H. D., and Kreuzer, M. 2011. Modification of milk fatty acid composition by feeding forages and agro-industrial byproducts from dry areas to Awassi sheep. *J. Dairy Sci.* 94:4657-4668.
- Abdo, Z., Schüette, U. M. E., Bent, S. J., Williams, C. J., Forney, L. J., and Joyce, P. 2006. Statistical methods for characterizing diversity of microbial communities by analysis of terminal restriction fragment length polymorphisms of 16S rRNA genes. *Environ. Microbiol.* 8:929-938.
- Álvarez del Pino, M. C., Hervás, G., Mantecón, A. R., Giráldez, F. J., and Frutos, P., 2005. Comparison of biological and chemical methods, and internal and external standards, for assaying tannins in Spanish shrub species. *J. Sci. Food Agric.* 85:583-590.
- Benchaar, C., and Chouinard, P. Y. 2009. Assessment of the potential of cinnamaldehyde, condensed tannins, and saponins to modify milk fatty acid composition of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 92:3392-3396.
- Benchaar, C., McAllister, T. A., and Chouinard, P. Y. 2008. Digestion, ruminal fermentation, ciliate protozoal populations, and milk production from dairy cows fed cinnamaldehyde, quebracho condensed tannin, or *Yucca schidigera* saponin extracts. *J. Dairy Sci.* 91:4765-4777.

- Boeckaert, C., Morgavi, D. P., Jouany, J. P., Maignien, L., Boon, N., and Fievez, V. 2009. Role of the protozoan *Isotricha prostoma*, liquid-, and solid-associated bacteria in rumen biohydrogenation of linoleic acid. *Animal* 3:961-971.
- Buccioni, A., Minieri, S., Rapaccini, S., Antongiovanni, M., and Mele, M. 2011. Effect of chestnut and quebracho tannins on fatty acid profile in rumen liquid- and solid-associated bacteria: an *in vitro* study. *Animal* 5:1521-1530.
- Buccioni, A., Pauselli, M., Viti, C., Minieri, S., Pallara, G., Roscini, V., Rapaccini, S., Marinucci, M. T., Lupi, P., Conte, G., and Mele, M. 2015. Milk fatty acid composition, rumen microbial population, and animal performances in response to diets rich in linoleic acid supplemented with chestnut or quebracho tannins in dairy ewes. *J. Dairy Sci.* 98:1145-1156.
- Cabiddu, A., Molle, G., Decandia, M., Spada, S., Fiori, M., Piredda, G., and Addis, M. 2009. Responses to condensed tannins of flowering sulla (*Hedysarum coronarium L.*) grazed by dairy sheep. Part 2: Effects on milk fatty acid profile. *Livest. Sci.* 123:230-240.
- Castro-Carrera, T., Toral, P. G., Frutos, P., McEwan, N. R., Hervás, G., Abecia, L., Pinloche, E., Girdwood, S. E., and Belenguer, A. 2014. Rumen bacterial community evaluated by 454 pyrosequencing and terminal restriction fragment length polymorphism analyses in dairy sheep fed marine algae. *J. Dairy Sci.* 97:1661-1669.
- Cole, J. R., Wang, Q., Fish, J., Chai, B., McGarrell, D. M., Sun, Y., Titus Brown, C., Porrás-Alfaro, A., Kuske, C. A., and Tiedje, J. M. 2014. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.* 42:633-642.
- Correddu, F., Nudda, A., Battacone, G., Boe, R., Francesconi, A. H. D., and Pulina, G. 2015. Effects of grape seed supplementation, alone or associated with linseed, on ruminal metabolism in Sarda dairy sheep. *Anim. Feed Sci. Technol.* 199:61-72.
- Fievez, V., Colman, E., Castro-Montoya, J. M., Stefanov, I., and Vlaeminck, B. 2012. Milk odd- and branched-chain fatty acids as biomarkers of rumen function – An update. *Anim. Feed Sci. Technol.* 172:51-65.
- Frutos, P., Hervás, G., Giráldez, F. J., and Mantecón, A. R. 2004. An *in vitro* study on the ability of polyethylene glycol to inhibit the effect of quebracho tannins and tannic acid on rumen fermentation in sheep, goats, cows, and deer. *Aust. J. Agric. Res.* 55:1125-1132.
- Goering, M. K., and Van Soest, P. J. 1970. Forage Fiber Analysis (Apparatus, Reagents, Procedures and some Applications. Agriculture Handbook, No 379. Agricultural Research Service, USDA, Washington, USA.
- Hervás, G., Frutos, P., Giráldez, F. J., Mantecón, A. R., and Álvarez del Pino, M. C. 2003. Effect of different doses of quebracho tannins extract on rumen fermentation in ewes. *Anim. Feed Sci. Technol.* 109:65-78.
- Hill, T. C. J., Walsh, K. A., Harris, J. A., and Moffett, B. F. 2003. Using ecological diversity measures with bacterial communities. *FEMS Microbiol. Ecol.* 43:1-11.
- Honkanen, A. M., Griinari, J. M., Vanhatalo, A., Ahvenjärvi, S., Toivonen, V., and Shingfield, K. J. 2012. Characterization of the disappearance and formation of biohydrogenation intermediates during incubations of linoleic acid with rumen fluid *in vitro*. *J. Dairy Sci.* 95:1376-1394.

- Huws, S. A., Kim, E. J., Lee, M. R. F., Scott, M. B., Tweed, J. K. S., Pinloche, E., Wallace, R. J., and Scollan, N. D. 2011. As yet uncultured bacteria phylogenetically classified as *Prevotella*, *Lachnospiraceae incertae sedis* and unclassified *Bacteroidales*, *Clostridiales* and *Ruminococcaceae* may play a predominant role in ruminal biohydrogenation. *Environ. Microbiol.* 13:1500-1512.
- Jeronimo, E., Alves, S., Martins, S., Prates, J., Bessa, R., and Santos-Silva, J. 2010. Effect of sodium bentonite and vegetable oil blend supplementation on growth, carcass quality and intramuscular fatty acid composition of lambs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 158:136-145.
- Jones, G., McAllister, T., Muir, A., and Cheng, K. 1994. Effects of sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop) condensed tannins on growth and proteolysis by 4 strains of ruminal bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:1374-1378.
- Khiaosa-ard, R., Bryner, S. F., Scheeder, M. R. L., Wettstein, H. R., Leiber, F., Kreuzer, M., and Soliva, C. R. 2009. Evidence for the inhibition of the terminal step of ruminal alpha-linolenic acid biohydrogenation by condensed tannins. *J. Dairy Sci.* 92:177-188.
- Khiaosa-ard, R., Soliva, C. R., Kreuzer, M., and Leiber, F. 2011. Influence of alpine forage either employed as donor cow's feed or as incubation substrate on *in vitro* ruminal fatty acid biohydrogenation. *Livest. Sci.* 140:80-87.
- Kronberg, S., Scholljegerdes, E., Barcelo-Coblijn, G., and Murphy, E. 2007. Flaxseed treatments to reduce biohydrogenation of alpha-linolenic acid by rumen microbes in cattle. *Lipids* 42:1105-1111.
- Lock, A. L., and Bauman, D. E. 2004. Modifying milk fat composition of dairy cows to enhance fatty acids beneficial to human health. *Lipids* 39:1197-1206.
- Makkar, H. P. S. 2003. Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. *Small Rumin. Res.* 49:241-256.
- McSweeney, C. S., Palmer, B., McNeill, D. M., and Krause, D. O. 2001. Microbial interactions with tannins: nutritional consequences for ruminants. *Anim. Feed Sci. Technol.* 91:83-93.
- Minieri, S., Buccioni, A., Rapaccini, S., Pezzati, A., Benvenuti, D., Serra, A., and Mele, M. 2014. Effect of quebracho tannin extract on soybean and linseed oil biohydrogenation by solid associated bacteria: an *in vitro* study. *Ital. J. Anim. Sci.* 13:604-608.
- Mueller-Harvey, I. 2006. Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. *J. Sci. Food Agric.* 86:2010-2037.
- Odenyo, A. A., Bishop, R., Asefa, G., Jamnadass, R., Odongo, D., and Osuji, P. 2001. Characterization of tannin-tolerant bacterial isolates from East African ruminants. *Anaerobe* 7:5-15.
- Paillard, D., McKain, N., Chaudhary, L. C., Walker, N. D., Pizette, F., Koppova, I., McEwan, N. R., Kopečný, J., Vercoe, P. E., Louis, P., and Wallace, R. J. 2007. Relation between phylogenetic position, lipid metabolism and butyrate production by different *Butyrivibrio*-like bacteria from the rumen. *Anton. Leeuw. Int. J. G.* 91:417-422.
- Shingfield, K. J., Ahvenjärvi, S., Toivonen, V., Äröla, A., Nurmela, K. V. V., Huhtanen, P., and Griinari, J. M. 2003. Effect of dietary fish oil on biohydrogenation of fatty acids and milk fatty acid content in cows. *Anim. Sci.* 77:165-179.



- Shingfield, K. J., Chilliard, Y., Toivonen, V., Kairenius, P., and Givens, D. I. 2008. *Trans* fatty acids and bioactive lipids in ruminant milk. *Adv. Exp. Med. Biol.* 606:3-65.
- Toral, P. G., Belenguer, A., Shingfield, K. J., Hervás, G., Toivonen, V., and Frutos, P. 2012. Fatty acid composition and bacterial community changes in the rumen fluid of lactating sheep fed sunflower oil plus incremental levels of marine algae. *J. Dairy Sci.* 95:794-806.
- Toral, P. G., Hervás, G., Belenguer, A., Bichi, E., and Frutos, P. 2013. Effect of the inclusion of quebracho tannins in a diet rich in linoleic acid on milk fatty acid composition in dairy ewes. *J. Dairy Sci.* 96:431-439.
- Toral, P. G., Hervás, G., Bichi, E., Belenguer, A., and Frutos, P. 2011. Tannins as feed additives to modulate ruminal biohydrogenation: Effects on animal performance, milk fatty acid composition and ruminal fermentation in dairy ewes fed a diet containing sunflower oil. *Anim. Feed Sci. Technol.* 164:199-206.
- Toral, P. G., Shingfield, K. J., Hervás, G., Toivonen, V., and Frutos, P. 2010. Effect of fish oil and sunflower oil on rumen fermentation characteristics and fatty acid composition of digesta in ewes fed a high concentrate diet. *J. Dairy Sci.* 93:4804-4817.
- Vasta, V., Makkar, H. P. S., Mele, M., and Priolo, A. 2009a. Ruminal biohydrogenation as affected by tannins *in vitro*. *Br. J. Nutr.* 102:82-92.
- Vasta, V., Mele, M., Serra, A., Scerra, M., Luciano, G., Lanza, M., and Priolo, A. 2009b. Metabolic fate of fatty acids involved in ruminal biohydrogenation in sheep fed concentrate or herbage with or without tannins. *J. Anim. Sci.* 87:2674-2684.
- Vasta, V., Yañez-Ruiz, D. R., Mele, M., Serra, A., Luciano, G., Lanza, M., Biondi, L., and Priolo, A. 2010. Bacterial and protozoal communities and fatty acid profile in the rumen of sheep fed a diet containing added tannins. *Appl. Environ. Microbiol.* 76:2549-2555.



## **PRUEBA II**

**EFFECTO DE LA ADICIÓN DE EPA, DPA Y DHA A LA DIETA SOBRE  
EL MICROBIOMA BACTERIANO RUMINAL DE VACAS Y OVEJAS.  
COMPARACIÓN IN VITRO**

*EFFECT OF EPA, DPA AND DHA DIETARY ADDITION ON RUMEN  
BACTERIAL MICROBIOME OF COWS AND EWES.  
IN VITRO COMPARISON*

*Instituto de Ganadería de Montaña, CSIC – Universidad de León  
Finca Marzanas s/n, 24346 Grulleros, León, España*

*Institute of Biological, Environmental and Rural Sciences, Universidad de Aberystwyth,  
SY23 3DA, Aberystwyth, Reino Unido*



**EFFECTO DE LA ADICIÓN DE EPA, DPA Y DHA A LA DIETA SOBRE  
EL MICROBIOMA BACTERIANO RUMINAL DE VACAS Y OVEJAS.  
COMPARACIÓN IN VITRO**

*EFFECT OF EPA, DPA AND DHA DIETARY ADDITION ON RUMEN  
BACTERIAL MICROBIOME OF COWS AND EWES.  
IN VITRO COMPARISON*

---

**Abstract.** Addition of marine lipids to the diet of dairy ruminants has proven to be an effective strategy to enhance the milk content of some bioactive unsaturated fatty acids (FA) due to the inhibition of the last microbial biohydrogenation (BH) step in the rumen. However, the effect of individual n-3 PUFA on rumen microbiota has rarely been studied and it is still uncertain which rumen bacteria are involved in the BH of unsaturated FA. Therefore, to study the impact of the addition of 20:5 n-3 (eicosapentaenoic acid; EPA), 22:5 n-3 (docosapentaenoic acid; DPA), and 22:6 n-3 (docosahexaenoic acid; DHA), at 2% incubated dry matter, on the rumen bacterial community, an *in vitro* trial was conducted using batch cultures of rumen microorganisms. In addition, since there could be differences regarding lipid metabolism between ruminant species, a second objective was to compare the response to n-3 PUFA after 24 h of *in vitro* incubation with inocula collected from cannulated cows and sheep. Treatment effects on bacterial microbiome were analysed, after 24 hours of incubation, using Ion Torrent Next Generation Sequencing (NGS). Dendrogram based on Bray-curtis distances and Principal Coordinate Analysis (PCoA) showed a clear separation between ruminant species and responses to n-3 PUFA treatments. Bacterial community structure in the rumen of sheep and cows was clearly affected by supplementing the diet with EPA and DHA. In contrast, DPA did not modify it in sheep and showed a lower effect compared to EPA and DHA in cattle, suggesting a low contribution of this FA to the action of marine lipids. Regarding the bacterial community composition, relevant alterations due to PUFA addition were

observed within the major ruminal phyla, families and genera, namely *Anaerovorax*, *Barnesiella*, *Butyrivibrio*, *Prevotella*, *Ruminobacter*, *Ruminococcus* and *Succinivibrio*, which might be related to a potential role in different pathways of rumen FA metabolism. Although most changes due to the added PUFA were comparable in bovine and ovine, there were also variations exclusive to each ruminant species. For example, the relative abundance of *Hallella*, *Megasphaera*, *Phocaeicola*, *Ruminococcus*, *Ruminobacter* and *Tannerella* only changed in cows, while *Oscillibacter* and *Paraprevotella* were only affected in sheep. These results underline the complexity of the rumen ecosystem response to dietary lipid supplementation. In any event, further research is needed to understand which rumen bacteria are truly involved in the BH in cows and sheep.

---

## 1. INTRODUCCIÓN

La suplementación de la dieta de ovejas con lípidos de origen marino permite aumentar el contenido en la leche de ciertos AG con potenciales efectos beneficiosos para la salud del consumidor (e. g., *cis*-9, *trans*-11 CLA; Lock y Bauman, 2004; Shingfield et al., 2008). Esto es debido a la capacidad inhibidora de la BH de algunos PUFA de cadena muy larga, presentes en los lípidos marinos (Toral et al., 2017). La BH combina reacciones de isomerización e hidrogenación de dobles enlaces reduciendo la acción bactericida y bacteriostática de los PUFA (Jenkins et al., 2008) y es llevado a cabo, principalmente, por las bacterias ruminales (Lourenço et al., 2010).

Los lípidos de origen marino son ricos en PUFA n-3 y, dentro de ellos, el ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6 n-3) y el ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5 n-3) son los más abundantes y considerados los principales responsables de su acción sobre la comunidad bacteriana del rumen. El DHA parece inhibir de forma más potente el último paso de la BH de los AG insaturados de la dieta que el EPA (AbuGhazaleh y Jenkins, 2004). Sin embargo, se ha sugerido que este último

podría ser más tóxico que el DHA para las poblaciones bacterianas del rumen (Maia et al., 2007). Además de EPA y DHA, en los lípidos marinos existen otros PUFA n-3 menos abundantes, como el ácido docosapentaenoico (DPA, 22:5 n-3), que podrían también contribuir a tal acción. Del DPA se ha sugerido un menor impacto sobre la BH ruminal de los AG de 18 átomos de carbono que el del EPA y DHA (Toral et al., 2017), pero se desconoce aún si esto se corresponde con un menor efecto tóxico sobre la microbiota que el de los otros PUFA n-3 de cadena muy larga.

El número de trabajos publicados en relación al efecto de los lípidos marinos sobre la comunidad bacteriana del rumen es aún escaso (e. g., Huws et al., 2011; Castro-Carrera et al., 2014; Tsiplakou et al., 2017). Algunos estudios han analizado la respuesta a EPA y DHA en cultivos puros de bacterias conocidas por su posible implicación en la BH en ensayos in vitro (Maia et al., 2007; Jeyanathan et al., 2016), siendo hasta el momento *Butyrivibrio proteoclasticus* P-18 la única cepa capaz de metabolizar el DHA (Jeyanathan et al., 2016). Conocer qué microorganismos ruminales son los principales responsables del metabolismo de estos PUFA de cadena muy larga es esencial para entender su implicación en el metabolismo lipídico.

Aunque las técnicas moleculares de huella genética han sido ampliamente utilizadas en el estudio de la microbiota del rumen (e. g., Huws et al., 2011; Toral et al., 2012), el reciente desarrollo de secuenciadores de última generación, como la plataforma *Ion Torrent*, ofrece una mayor cobertura de la comunidad bacteriana (e. g., De la Fuente et al., 2014; Belanche et al., 2016a), especialmente útil para comparar la estructura y diversidad de los ecosistemas ruminales y permitir detectar posibles grupos bacterianos que podrían jugar un papel predominante en la BH. Ahora bien, estos secuenciadores apenas han sido utilizados para estudiar la implicación microbiana en el metabolismo lipídico del rumen (Zened et al., 2013; Castro-Carrera et al., 2014; Petri et al., 2014) por lo que la información al respecto es escasa y en ocasiones contradictoria. Por otra parte, la mayoría de los trabajos acerca de la influencia de los lípidos marinos sobre la comunidad

bacteriana han sido llevados a cabo en vacuno (Huws et al., 2011, 2015; Petri et al., 2014) y tan solo unos pocos se centran en el ovino (Toral et al., 2012; Castro-Carrera et al., 2014). Es muy probable, no obstante, que las diferencias existentes en la composición bacteriana del rumen de vacuno y ovino (Ferreira et al., 2017; Henderson et al., 2015) se vean reflejadas en distintas poblaciones responsables del metabolismo lipídico y, por ende, en variaciones en el perfil de AG del contenido ruminal (Toral et al., 2017). A pesar de ello, no hemos encontrado ningún trabajo en el que se compare de modo directo la respuesta de la microbiota ruminal de ambas especies a la adición de PUFA n-3 de cadena muy larga.

Basándose en todo lo expuesto anteriormente y mediante el uso de una técnica de secuenciación masiva de última generación (*Ion Torrent*), se realizó un ensayo in vitro con el objetivo principal de estudiar el efecto de EPA, DPA y DHA sobre el microbioma bacteriano del rumen. Además, se comparó la respuesta en las dos especies de rumiantes domésticos mencionadas: vacuno y ovino.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

Este experimento se llevó a cabo in vitro siguiendo un modelo factorial 4 x 2: 4 tratamientos (EPA, DPA, DHA y control) en 2 especies de rumiantes (ovino y vacuno). Fue realizado en paralelo al trabajo de Toral et al. (2017) en el que se estudió el efecto de estos PUFA n-3 de cadena muy larga sobre la fermentación ruminal y la BH de los AG de 18C.

Todos los procedimientos experimentales fueron realizados de acuerdo con el Real Decreto 53/2013 para la protección de animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.

### 2.1. *Animales y dietas*

Se utilizaron como donantes de fluido ruminal 2 ovejas merinas ( $76 \pm 8,5$  kg PV) y 2 vacas frisonas ( $727 \pm 77,5$  kg PV), canuladas en el rumen (cánulas de 4 y 10 cm de diámetro interno, respectivamente) y alojadas en jaulas individuales. Los animales recibieron, durante dos semanas de adaptación y en el periodo de recogida de



fluido ruminal, una ración completa mezclada (TMR) basada en heno de alfalfa (tamaño medio de partícula >4cm) y concentrado (relación forraje:concentrado 50:50). Esta se ofertó en dos tomas diarias (60% a las 9:00 h y 40% a las 17:00 h) y de forma restringida (37 y 46 g MS/kg PV<sup>0,75</sup> y día, en ovino y vacuno respectivamente), para cubrir las necesidades energéticas de mantenimiento de acuerdo con las estimaciones del INRA (2007) y trabajar en condiciones similares en ambas especies. La composición de la TMR se muestra en la Tabla 1. Los animales tuvieron continuamente acceso a agua limpia y fresca, excepto durante los 90 min anteriores a la recogida del inóculo ruminal.

Tabla 1. *Formulación y composición química de la ración completa mezclada (TMR).*

	TMR <sup>1</sup>	eem <sup>2</sup>
Ingredientes, g/kg de materia fresca		
Heno de alfalfa deshidratado	500	-
Grano de maíz	140	-
Grano de cebada	100	-
Torta de soja (440 g de proteína bruta/kg)	150	-
Pulpa de remolacha, pellets	50	-
Melaza, líquida	40	-
Suplemento mineral <sup>3</sup>	18	-
Suplemento vitamínico <sup>4</sup>	2	-
Composición química, g/kg MS <sup>5</sup>		
Materia orgánica	900	3,15
Proteína bruta	187	6,08
FND <sup>5</sup>	311	24,3
FAD <sup>5</sup>	218	21,1
Extracto etéreo	23,5	1,80

<sup>1</sup> Contiene (g/100 g del total AG): 16:0 (23,9), 18:0 (5,27), *cis*-9 18:1 (13,0), 18:2 n-6 (35,3) y 18:3 n-3 (13,5).

<sup>2</sup> Error estándar de la media.

<sup>3</sup> Contiene (g/kg): CaCO<sub>3</sub> (556), Ca<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (222), and NaCl (222).

<sup>4</sup> VITAFAC *Ovino 0,2% AC* (DSM Nutritional Products S.A., Madrid, España). Contiene: Vitamina A (4.000.000 IU/kg), Vitamina D3 (1.000.000 IU/kg), Vitamina E (5 g/kg), Hierro (17,5 g/kg), Manganeso (20 g/kg), Cobalto (50 mg/kg), Yodo (250 mg/kg), Zinc (15 g/kg), Selenio (100 mg/kg), Sepiolita (100 g/kg), Calcio (26,2 g/kg), y Magnesio (6,15 g/kg).

<sup>5</sup> MS, materia seca; FND, fibra neutro detergente; FAD, fibra ácido detergente.

## 2.2. *Cultivos no renovados de microorganismos ruminales*

Las incubaciones in vitro se realizaron, durante 3 días consecutivos (tandas), con inóculo ruminal recogido a través de la cánula antes de la oferta de la mañana. Una vez recolectado, se transportó inmediatamente al laboratorio en termos, se filtró a través de una membrana de nailon (400 µm; Fisher Scientific S.L., Madrid, España) mientras se gaseó con CO<sub>2</sub> para conservar, en lo posible, las condiciones de anaerobiosis. Los inóculos de las 2 ovejas se mezclaron y se diluyeron (1:4, v/v) con un medio de cultivo (Goering y Van Soest, 1970) que contenía soluciones tampón, reductora, de macrominerales, de microminerales y resazurina, gaseado continuamente con CO<sub>2</sub>. Del mismo modo se procesaron los inóculos de las 2 vacas.

La TMR ofertada a los animales se utilizó también como sustrato para la incubación. Se pesó una cantidad de 10 mg (molida a 0,5 mm) por cada mL de inóculo+medio de cultivo en tubos Hungate de 16 mL.

Justo antes de dosificar el inóculo+medio (12 mL), se administró el PUFA n-3 correspondiente [10-2005-9 (EPA), 10-2205-9 (DPA) o 10-2206-9 (DHA); Larodan, Solna, Suecia] a una concentración del 2% MS del sustrato o lo que es lo mismo, 1 mg AG/mL líquido ruminal. Para ello, se resuspendió el PUFA n-3 correspondiente en etanol al 96%, siendo la concentración final de este último 5 µL/mL de inóculo+medio, y se agitó mediante un sonicador (UP200H, Hielscher Ultrasonics GmbH, Teltow, Alemania). Según Morgavi et al. (2004), no cabría esperar que dicha cantidad de etanol afectase a la fermentación. A los tubos del tratamiento control (sustrato sin suplementación lipídica) también se les dosificó el mismo volumen de etanol. Finalmente, los recipientes se cerraron herméticamente y se introdujeron en un incubador (Mettmert UFP 500, Alemania) a 39,5 °C durante 24 h.

La mezcla de inóculo de cada especie se muestreó a las 0 h, enfriándose rápidamente en agua con hielo picado durante 5-10 min para asegurar que no se produjesen cambios en las poblaciones microbianas y congelándose después a

-80°C. Del mismo modo, trascurridas 24 horas de incubación, se detuvo la fermentación y se congelaron los tubos a -80°C. Posteriormente, todas las muestras se liofilizaron (FTS Lyostar, EEUU) y el residuo resultante se homogeneizó minuciosamente y se conservó de nuevo a -80°C hasta la extracción del ADN microbiano.

### **2.3. Secuenciación masiva mediante la plataforma Ion Torrent**

El análisis de la comunidad bacteriana del rumen fue realizado en colaboración con la Universidad de Aberysthwyth (Reino Unido) mediante una estancia predoctoral.

#### **2.3.1. Extracción de ADN y cuantificación**

La extracción de ADN se realizó por duplicado a partir de aproximadamente 80 mg de muestra liofilizada, mediante el kit de purificación de ADN de QIAamp ADN Stool Mini Kit (Quiagen Inc., Valencia, CA, EEUU) modificando la temperatura a 95°C para mejorar la lisis celular. Los duplicados se mezclaron y la concentración y pureza del DNA se determinó mediante espectrofotometría (NanoDrop ND-100 espectrofotómetro; NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, EEUU).

#### **2.3.2. Amplificación por PCR y purificación**

La amplificación de las regiones hipervariables V1-V2 del gen del ARNr 16S bacteriano se llevó a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando un par de primers específicos para bacterias (27F, AGAGTTTGATCMTGGCTCAG; 357R, CTGCTGCCTYCCGTA; Spear et al., 2008), provisto de los adaptadores para la secuenciación en *Ion Torrent* en el extremo 5' (27F, CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG; 357R, CCTCTCTATGGGCA GTCGGTGAT). Además, para permitir la identificación de las muestras, una vez constituida la librería de ADN, se marcó el cebador directo (forward primer; 27F) con 10 nucleótidos diferentes para cada muestra. La PCR se realizó por duplicado en un volumen de 25 µL que contenía: 1 µL de ADN molde a una concentración

aproximada de 20 ng/ $\mu$ L, 0,2  $\mu$ L de cebador reverso (reverse primer), 1  $\mu$ L de cebador directo, 5  $\mu$ L de tampón (incluidos los oligonucleótidos; PCR Biosystems Ltd., Londres, Reino Unido), 0,25  $\mu$ L bio HiFi polimerasa (PCR Biosystems Ltd.) y 17,55  $\mu$ L de agua estéril deionizada ( $H_2O_{ad}$ ). El programa de amplificación consistió en un paso inicial de desnaturalización a 95 °C durante 1 min, seguido de 22 ciclos a 95 °C durante 15 s, 55 °C durante 15 s y 72 °C durante 30 s, finalizando el último ciclo con 7 min de extensión a 72 °C. Los amplicones resultantes se visualizaron en un gel de agarosa al 1% con TAE (disolución tampón de Tris-acetato-EDTA) para comprobar que la amplificación tuvo lugar en todas las muestras y confirmar la presencia de la banda de aproximadamente 330 pares de bases (pb). Los productos de PCR duplicados se mezclaron y a continuación fueron purificados utilizando Agencout AMPure XP beads (Beckman Coulter Inc., Fullerton, EEUU) a la concentración recomendada por el fabricante para eliminar los fragmentos no deseados.

### *2.3.3. Preparación de la librería de ADN y secuenciación en Ion Torrent*

La concentración del ADN purificado en cada muestra se cuantificó con un espectrofotómetro Epoch Microplate (BioTek UK, Potton, Reino Unido), permitiendo así elaborar una librería de ADN con concentraciones equi-molares de cada muestra identificada con su correspondiente marcador. A continuación, la librería se purificó en un E-Gel System (Life Technologies Ltd., Paisley, Reino Unido), mediante un gel de agarosa al 2% en el que se seleccionó la banda del tamaño determinado (aprox. 330 pb). Finalmente, se determinó la concentración y la calidad de la librería de ADN purificado en un chip de ADN de alta sensibilidad (Agilent Technologies UK Ltd., Stockport, Reino Unido) en el Agilent 2100 Bioanalyzer.

La emulsión de PCR se realizó con el sistema Ion Chef™ (Thermo Fisher Scientific; Leicestershire, Reino Unido), utilizando el kit Ion PGM™ IC 200 (Thermo Fisher Scientific) en un chip Ion PGM Sequencing 316™. Una vez preparado el chip, se secuenció en la plataforma de secuenciadores de nueva

generación (NGS) *Ion Torrent Personal Genome Machine*<sup>TM</sup> (PGM; Thermo Fisher Scientific).

A continuación, las secuencias generadas fueron procesadas siguiendo el método descrito por De la Fuente et al. (2014). Brevemente, las secuencias se transformaron a formato FASTA y se asignaron los números de identificación de cada muestra utilizando el software MOTHUR (<https://www.mothur.org/>). El procesado de datos se inició eliminando la secuencias de baja calidad (parámetros de calidad: máximo 10 homo-polímeros; valor de calidad media 15, Q15, con un intervalo de longitud para el control de calidad de 30pb, aproximadamente el 10% de la longitud media de las secuencias; identificación del marcador en cada muestra; comprobación de quimeras por Uchime, tanto de las originadas de novo como de las detectadas mediante la base de datos). A continuación, las secuencias fueron agrupadas en unidades taxonómicas operacionales (OTU), asignadas al 97% de similitud, utilizando la plataforma CD-HIT-OTU (disponible en <http://weizhongli-lab.org/cd-hit-otu/>). Los datos obtenidos se normalizaron de acuerdo a la muestra con menor número de secuencias disponibles, mediante la plataforma Daisychopper (<http://www.genomics.ceh.ac.uk/GeneSwyatch/>).

La información taxonómica se obtuvo por comparación con la base de datos The Ribosomal Database Project-II (RDP-II), un método ampliamente empleado que permite una rápida clasificación desde dominio a género bacteriano. La alineación de secuencias se detuvo en el último nivel correctamente clasificado, dejando de este modo el resto como no clasificados.

#### **2.4. Análisis estadístico**

A partir de las unidades taxonómicas operacionales (OTUs), se realizó el análisis de agrupamiento jerárquico para construir el dendrograma con los datos transformados en  $\log_{10}$ . Se utilizó el método de la distancia máxima o similitud mínima (complete-linkage) basándose en las distancias Bray-Curtis, en R-project (<https://www.r-project.org>, versión 3.2.2). Del mismo modo, se llevó a cabo el análisis de las coordenadas principales (PCoA) de cada especie por separado. Para

determinar el efecto de la especie, el tratamiento y su interacción sobre la estructura de la comunidad bacteriana, se realizó un análisis multivariante de la varianza (MANOVA) y, para establecer la comparación de tratamientos 2 a 2, se realizó un análisis Pairwise en R. En el mismo programa, se calcularon el número de especies observadas (S. Obs) y los índices de diversidad de Chao1, Shannon y Simpson (Hill et al., 2003) a partir de los datos normalizados tal y como describen De la Fuente et al. (2014).

Mediante el test Shapiro-Wilk se examinó la normalidad de los datos de abundancia relativa sobre el total de secuencias en la clasificación taxonómica, que tuvieron que transformarse en  $\log_{10}(n + c)$  para obtener una distribución normal. El análisis estadístico de estos datos, junto a los parámetros de diversidad, se llevó a cabo con el procedimiento MIXED del programa estadístico SAS (versión 9.4; SAS Inst. Inc., Estados Unidos) incluyendo en el modelo el efecto fijo de la especie (Sp; vacuno y ovino), el tratamiento (Tto; control, EPA, DPA y DHA) y la interacción (Sp x Tto). Además, la tanda y el inóculo anidado a la especie se consideraron como efectos aleatorios. Las medias fueron separadas mediante la opción "pdiff" del "lsmeans" en el procedimiento MIXED, ajustando con la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples. Se admitieron como diferencias significativas aquellas con un nivel de significación inferior al 5% ( $P < 0,05$ ), considerándose  $P < 0,10$  una tendencia a la significación.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La secuenciación de un fragmento del gen del ARNr 16S bacteriano generó una media de 56.505 secuencias por muestra, que tras el control de la calidad y la normalización resultó en  $38.319 \pm 78$  secuencias por muestra, que permitieron identificar hasta 2199 OTUs. El elevado número de secuencias fue similar al de trabajos anteriores en los que se estudió la comunidad bacteriana en el rumen con la misma técnica (De la Fuente et al., 2014; Belanche et al., 2016a), que ofrece mayor información y más detallada que las técnicas de huella genética, como la T-RFLP (Castro-Carrera et al., 2014; De la Fuente et al., 2014), al permitir identificar y

detectar cambios en poblaciones bacterianas minoritarias. Esto podría ser de gran ayuda para descubrir qué bacterias ruminales se ven afectadas por cambios en la alimentación (Kittelman et al., 2013). Dentro del ecosistema ruminal, las bacterias son el grupo predominante y responsable de los principales procesos metabólicos, incluido el metabolismo lipídico (Jenkins et al., 2008). Ahora bien, aunque la utilización de cultivos puros ha contribuido al conocimiento de algunos microorganismos ruminales implicados en la BH (Maia et al., 2007; Jeyanathan et al., 2016), las técnicas de secuenciación masiva ofrecen información valiosa sobre la estructura y composición de la comunidad bacteriana, incluyendo aquellas especies bacterianas que no han sido cultivadas. Entre ellas, la secuenciación *Ion Torrent* permite analizar un alto número de secuencias en un periodo corto de tiempo (De la Fuente et al., 2014). Sin embargo, existen muy pocos trabajos aún en los que se haya utilizado para el estudio de los ecosistemas ruminales (De la Fuente et al., 2014; Indugu et al., 2016) y, al menos hasta ahora, parece que no ha sido empleada en trabajos de microbiología del metabolismo lipídico en el rumen.

El análisis de agrupamiento jerárquico (Figura 1) mostró, como era de esperar, una evidente separación entre especies animales en cuanto a la estructura de la comunidad bacteriana, lo que fue confirmado por el MANOVA ( $P < 0,01$ ) y coincide con trabajos anteriores en rumiantes domésticos (Ferreira et al., 2016; Toral et al., 2016). Los resultados del MANOVA reflejaron también un efecto significativo del tratamiento ( $P < 0,05$ ). Aunque la interacción no alcanzó la significación exigida, la separación entre los tratamientos DHA y EPA respecto al Control y DPA fue aparentemente más clara en el caso del ovino (Figura 1).

Debido a la marcada separación entre especies de rumiantes, el análisis de coordenadas principales (PCoA) permitió visualizar con claridad el efecto de cada tratamiento dentro de cada una de ellas (Figura 2). Los resultados obtenidos con el análisis Pairwise separaron los tratamientos EPA y DHA del Control en ambas especies (Vacuno: EPA vs Control,  $P = 0,02$ ; DHA vs Control,  $P = 0,01$ ; Ovino: EPA vs Control,  $P = 0,02$ ; DHA vs Control,  $P = 0,01$ ), sin detectar diferencias entre sí (Vacuno: EPA vs DHA,  $P = 0,33$ ; Ovino: EPA vs DHA,  $P = 0,37$ ).

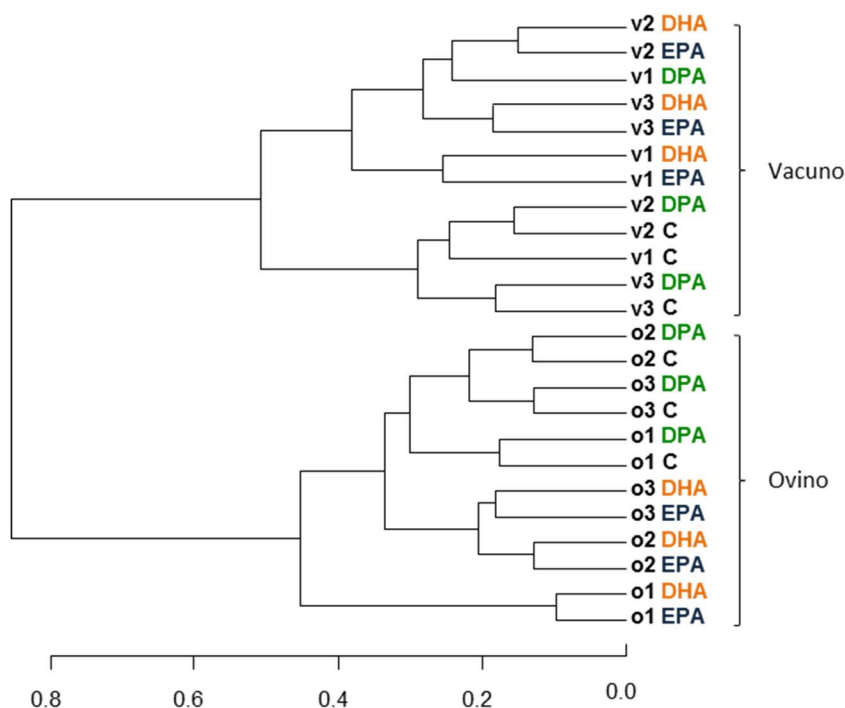


Figura 1. Análisis de agrupamiento jerárquico basado en el método de distancia máxima o similitud mínima (*complete-linkage*) y las distancias Bray-Curtis, de los perfiles bacterianos en el contenido ruminal de vacuno (v) y ovino (o) tras 24 horas de incubación *in vitro* con la adición o no (Control, C) de DPA, EPA y DHA. La numeración 1, 2 y 3 hace referencia al número de tanda.

En lo que respecta al efecto del DPA, en el análisis Pairwise para vacuno se observaron diferencias significativas tanto con el Control ( $P=0,03$ ) como con EPA y DHA ( $P=0,01$  y  $0,02$ , respectivamente), lo que coincide con el PCoA de la figura 2. En esta especie, los resultados sugieren que el tratamiento DPA fue capaz de modificar la estructura de la comunidad bacteriana respecto al control, aunque dicho efecto fue menos marcado que con EPA y DHA.

Por el contrario, en el ovino no se observaron diferencias significativas entre el DPA y el Control ( $P=0,23$ ), mientras sí las hubo cuando se comparó DPA con el EPA y DHA ( $P=0,048$  y  $P=0,01$ , respectivamente).

A partir de la figura 2 podría especularse que la respuesta en cuanto a sensibilidad de cada especie a la adición de los tres PUFA n-3 es diferente. Así, la



mayor distancia observada, respecto al control, en el caso del vacuno podría implicar que la estructura de la comunidad bacteriana se viese más afectada por la adición de PUFA n-3 en esta especie que en el ovino. Aunque no parecen existir trabajos previos disponibles en los que se compare directamente la respuesta de la microbiota a estos PUFA de cadena muy larga en ambas especies, sí se han descrito diferencias en la comunidad bacteriana de distintas especies de rumiantes que consumen la misma dieta (Torral et al., 2016), que podrían ser debidas, al menos en parte, a las diferencias anatómicas en el aparato gastrointestinal y su adaptación evolutiva (Hoffman, 1989; Henderson et al., 2015).

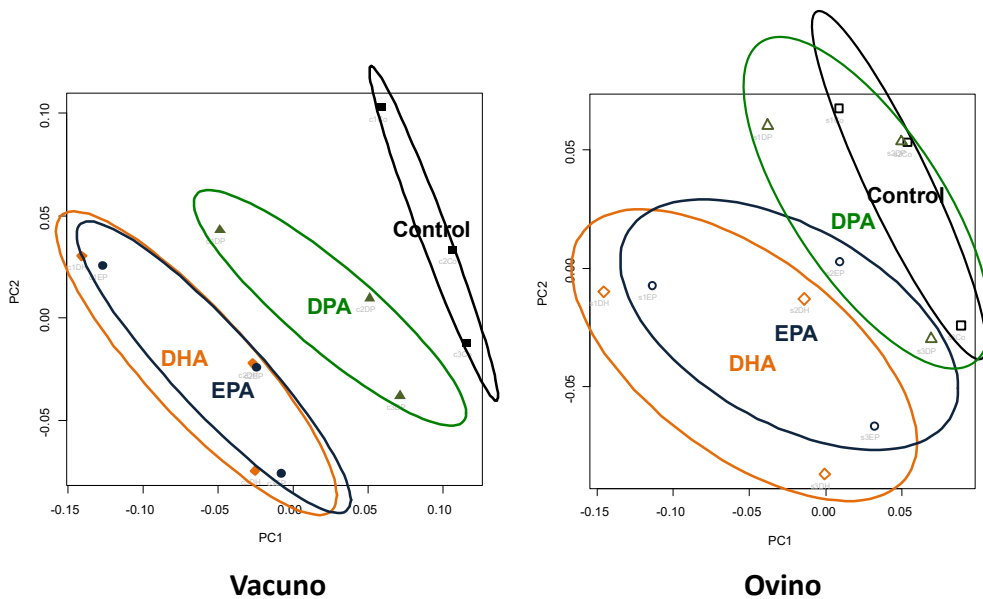


Figura 2. Análisis de las Coordenadas Principales (PCoA) de los perfiles bacterianos en el contenido ruminal de vacuno u ovino tras 24 horas de incubación *in vitro* con la adición o no (Control, cuadrados) de DPA (triángulos), EPA (círculos) y DHA (rombos).

Las diferencias entre vacuno y ovino en relación al efecto de EPA, DPA y DHA sobre la estructura de la comunidad bacteriana (Figura 2), podrían estar relacionadas con los resultados observados en el estudio concomitante de Toral et al. (2017) sobre el perfil de AG del contenido ruminal. En dicho trabajo, aunque el impacto de los PUFA n-3 sobre la BH de los AG de 18 átomos de carbono fue, en

líneas generales, similar en el vacuno y el ovino, se detectaron algunas diferencias interespecíficas relevantes. Por ejemplo, la inhibición más marcada del último paso de la BH se dio en el vacuno, con una reducción en el contenido de 18:0 de hasta el 37%, similar con los tres PUFA, frente al 27% observado en el ovino, donde además, el efecto del DHA fue mayor que el de DPA.

En relación a la diversidad bacteriana (Tabla 2), el número de especies observadas (S. Obs) fue mayor en el ovino que en el vacuno ( $P < 0,05$ ), sin verse afectado por el tratamiento ( $P > 0,05$ ). Los resultados fueron similares para el índice de Chao1, aunque en este caso el efecto de la especie mostró solo una tendencia a la significación ( $P < 0,10$ ). En cambio, el índice Shannon presentó diferencias debido al tratamiento ( $P < 0,05$ ): el DHA afectó a la diversidad más que el DPA. Además, el índice Simpson mostró una interacción Sp x Tto significativa ( $P < 0,01$ ), siendo este descenso más marcado en el tratamiento DHA en ovino. Al igual que sobre la estructura de la comunidad bacteriana (Figuras 1 y 2), el DPA parece ejercer una acción más débil sobre los índices de diversidad ya que, pese a que no se encontraron apenas diferencias significativas respecto al control, numéricamente los valores fueron, por lo general, más bajos con EPA y DHA (Tabla 2).

El mayor número de S. Obs y el índice Chao1 en ovino podría, junto a los resultados del PCoA (Figura 2) y la falta de efecto del tratamiento DPA, sugerir una mayor estabilidad de este ecosistema ruminal. No obstante, se desconoce aún si existe una relación entre estabilidad y diversidad de los ecosistemas microbianos (Hairston et al., 1968) y no conocemos ningún trabajo respecto a la posible mayor estabilidad microbiana del ovino respecto al vacuno en respuesta a la ingestión de este tipo de PUFA. Ahora bien, en el estudio concomitante (Toral et al., 2017), aunque no hubo diferencias notables entre especies en cuanto al impacto sobre la BH, las variaciones observadas en la concentración de 18:0 y el aumento de *trans*-11 18:1 con los tres PUFA n-3 en vacuno y solo con DHA en ovino, sugieren que consumiendo la misma dieta basal y dosis de lípidos, la microbiota ruminal de vacuno sería más sensible que la del ovino al efecto de los PUFA n-3 (Toral et al., 2017).

Tabla 2. Índices de diversidad y abundancia relativa [transformada en  $\log_{10}(n + c)$ ] de los filos, familias y géneros más relevantes, sobre el total de secuencias en el contenido ruminal de vacuno y ovino tras 24 horas de incubación *in vitro* con la adición o no (Control) de DPA, EPA y DHA. Entre paréntesis se muestran los valores originales del porcentaje del total de secuencias.

	Especie		Tratamiento				Probabilidad			
	Vacuno	Ovino	Control	DPA	EPA	DHA	eed <sup>1</sup>	Sp <sup>2</sup>	Tto <sup>2</sup>	Sp x Tto <sup>2</sup>
<i>Índices de diversidad</i>										
S. Obs <sup>3</sup>	1220,3	1471,3	1377,2	1365,5	1332,2	1308,2	62,35	<0,001	0,413	0,728
Chao1	1619,5	1844,2	1731,8	1836,8	1737,3	1621,5	249,7	0,091	0,690	0,628
Shannon	5,23	5,20	5,30 <sup>ab</sup>	5,32 <sup>a</sup>	5,20 <sup>ab</sup>	5,03 <sup>b</sup>	0,133	0,590	0,030	0,083
Simpson	0,983	0,961	0,978	0,980	0,972	0,958	0,008	<0,001	0,009	0,009
<i>Bacteroidetes</i>										
No clasificados	2,03 (52,3)	2,05 (56,7)	2,04 (55,6)	2,04 (55,8)	2,02 (51,2)	2,04 (55,6)	0,006	<0,001	0,001	<0,001
<i>Porphyromonadaceae</i>	1,85 (35,0)	1,87 (37,8)	1,86 (35,2)	1,87 (37,2)	1,85 (33,9)	1,88 (39,4)	0,013	0,017	<0,001	<0,001
No clasificados	0,75 (2,06)	0,95 (5,22)	0,79 (2,78)	0,82 (3,13)	0,89 (4,24)	0,90 (4,42)	0,014	<0,001	<0,001	0,047
<i>Tannerella</i>	0,45 (0,34)	0,85 (4,58)	0,62 (2,08)	0,63 (2,18)	0,67 (2,76)	0,67 (2,81)	0,015	<0,001	<0,001	0,048
<i>Barnesiella</i>	-1,09 (0,03)	-0,89 (0,08)	-0,89 (0,08)	-0,99 (0,05)	-1,03 (0,05)	-1,05 (0,04)	0,064	0,0598	0,001	0,007
<i>Prevotellaceae</i>	0,44 (1,69)	0,23 (0,57)	0,24 (0,63)	0,30 (0,89)	0,38 (1,43)	0,41 (1,57)	0,001	<0,001	<0,001	<0,001
No clasificados	1,44 (14,2)	1,42 (13,1)	1,48 <sup>a</sup> (16,9)	1,45 <sup>ab</sup> (14,7)	1,41 <sup>bc</sup> (12,2)	1,39 <sup>c</sup> (10,8)	0,022	0,236	<0,001	0,102
<i>Prevotella</i>	1,00 (5,28)	0,96 (4,31)	1,00 (5,13)	0,99 (5,10)	0,97 (4,65)	0,95 (4,21)	0,019	<0,001	0,008	0,013
<i>Paraprevotella</i>	1,14 (7,02)	1,13 (6,85)	1,24 <sup>a</sup> (10,29)	1,16 <sup>b</sup> (7,66)	1,09 <sup>c</sup> (5,32)	1,06 <sup>c</sup> (4,48)	0,033	0,674	<0,001	0,184
<i>Hallella</i>	0,17 (0,40)	0,45 (1,77)	0,03 (0,94)	0,31 (1,05)	0,32 (1,17)	0,33 (1,19)	0,028	<0,001	0,061	0,005
<i>Hallella</i>	0,36 (1,50)	-0,03 (0,13)	0,10 (0,52)	0,16 (0,78)	0,21 (1,05)	0,19 (0,90)	0,034	<0,001	0,002	0,017
<i>Bacteroidales inc. sed.</i>	0,16 (0,89)	-0,07 (0,27)	-0,01 (0,42)	0,03 (0,53)	0,06 (0,64)	0,09 (0,73)	0,042	0,003	0,002	0,008
<i>Phocaeicola</i>	0,16 (0,89)	-0,07 (0,27)	-0,01 (0,42)	0,03 (0,53)	0,06 (0,64)	0,09 (0,73)	0,042	0,003	0,002	0,008
<i>Firmicutes</i>										
No clasificados	1,58 (19,9)	1,54 (16,4)	1,56 (17,9)	1,55 (17,7)	1,57 (18,9)	1,56 (18,1)	0,012	0,012	0,130	0,613
No clasificados	1,19 (7,73)	1,20 (8,03)	1,18 <sup>c</sup> (7,34)	1,19 <sup>bc</sup> (7,69)	1,21 <sup>a</sup> (8,35)	1,21 <sup>ab</sup> (8,15)	0,013	0,494	<0,001	0,959

(Continúa)

Tabla 2. (Continuación)

	Especie		Tratamiento				Probabilidad			
	Vacuno	Ovino	Control	DPA	EPA	DHA	eed <sup>1</sup>	Sp <sup>2</sup>	Tto <sup>2</sup>	Sp x Tto <sup>2</sup>
<i>Lachnospiraceae</i>	0,81 (3,64)	0,68 (2,01)	0,78 (3,19)	0,74 (2,69)	0,74 (2,79)	0,73 (2,62)	0,024	<0,001	0,063	0,749
No clasificados	0,51 (1,73)	0,46 (1,33)	0,05 (1,55)	0,49 (1,54)	0,49 (1,57)	0,47 (1,46)	0,029	0,037	0,827	0,052
<i>Pseudobutyrvibrio</i>	-0,17 (0,36)	-0,20 (0,30)	-0,14 (0,40)	-0,21 (0,30)	0,19 (0,32)	-0,21 (0,30)	0,052	0,471	0,066	0,544
<i>Butyrvibrio</i>	0,32 (1,32)	0,04 (0,30)	0,24 <sup>a</sup> (1,07)	0,16 <sup>b</sup> (0,71)	0,17 <sup>b</sup> (0,74)	0,16 <sup>b</sup> (0,71)	0,036	<0,001	0,010	0,614
<i>Roseburia</i>	-1,34 (0,03)	-1,62 (0,01)	-1,55 (0,01)	-1,51 (0,01)	-1,41 (0,03)	-1,47 (0,02)	0,062	0,030	0,008	0,006
<i>Ruminococcaceae</i>	1,08 (6,72)	0,98 (4,18)	1,05 <sup>a</sup> (5,84)	1,03 <sup>ab</sup> (5,38)	1,04 <sup>ab</sup> (5,49)	1,02 <sup>b</sup> (5,09)	0,025	0,013	0,004	0,129
No clasificados	1,05 (6,24)	0,93 (3,54)	1,00 <sup>a</sup> (5,32)	0,98 <sup>ab</sup> (4,84)	0,99 <sup>ab</sup> (4,88)	0,97 <sup>b</sup> (4,53)	0,028	0,012	0,004	0,069
<i>Ruminococcus</i>	-0,49 (0,19)	-0,63 (0,09)	-0,60 (0,11)	-0,60 (0,11)	-0,50 (0,19)	-0,54 (0,16)	0,056	0,117	<0,001	0,004
<i>Oscillibacter</i>	-0,64 (0,04)	-0,29 (0,33)	-0,45 (0,20)	-0,46 (0,20)	0,47 (0,18)	-0,49 (0,16)	0,034	0,008	0,030	0,001
<i>Veillonellaceae</i>	-0,11 (0,35)	-0,01 (0,54)	-0,11 (0,35)	-0,06 (0,45)	-0,02 (0,53)	-0,06 (0,44)	0,287	0,040	<0,001	<0,001
No clasificados	-0,48 (0,05)	-0,11 (0,51)	-0,32 (0,25)	-0,27 (0,33)	-0,28 (0,30)	-0,30 (0,25)	0,040	0,010	0,010	0,014
<i>Megasphaera</i>	-0,86 (0,11)	-1,26 (0,00)	-1,17 (0,01)	-1,12 (0,03)	-0,94 (0,11)	-1,01 (0,07)	0,115	0,051	0,005	0,005
<i>Selenomonas</i>	-1,11 (0,05)	-1,43 (0,01)	-1,30 (0,02)	-1,28 (0,03)	-1,23 (0,04)	-1,26 (0,03)	0,056	0,001	0,237	0,237
<i>Anaerovibrio</i>	-0,89 (0,08)	-1,19 (0,02)	-1,08 (0,04)	-1,04 (0,05)	-1,00 (0,06)	-1,03 (0,05)	0,031	0,004	0,017	0,045
<i>Acidaminococcaceae</i>	0,08 (0,57)	0,14 (0,72)	0,06 (0,50)	0,10 (0,61)	0,13 (0,72)	0,15 (0,76)	0,014	<0,001	<0,001	0,004
<i>Succiniclasticum</i>	0,08 (0,57)	0,14 (0,72)	0,06 (0,49)	0,10 (0,61)	0,13 (0,72)	0,15 (0,76)	0,014	<0,001	<0,001	0,005
<i>Clostridiales inc. sed.</i>	0,06 (0,64)	-0,03 (0,41)	-0,04 <sup>c</sup> (0,39)	0,00 <sup>bc</sup> (0,48)	0,06 <sup>a</sup> (0,64)	0,04 <sup>ab</sup> (0,59)	0,026	<0,001	<0,001	0,121
XIII										
<i>Anaerovorax</i>	-0,09 (0,46)	-0,20 (0,27)	-0,19 <sup>c</sup> (0,29)	-0,16 <sup>bc</sup> (0,32)	-0,10 <sup>a</sup> (0,44)	-0,12 <sup>ab</sup> (0,41)	0,029	0,004	0,003	0,901
<i>Proteobacteria</i>	1,24 (10,4)	1,06 (4,27)	1,11 (5,66)	1,11 (5,82)	1,12 (10,2)	1,16 (7,56)	0,233	0,005	<0,001	<0,001
No clasificados	0,93 (5,17)	0,71 (1,68)	0,81 (3,04)	0,81 (3,15)	0,84 (4,06)	0,81 (3,45)	0,031	0,015	0,075	<0,001

(Continúa)

Tabla 2. (Continuación)

	Especie		Tratamiento				Probabilidad			
	Vacuno	Ovino	Control	DPA	EPA	DHA	eed <sup>1</sup>	Sp <sup>2</sup>	Tto <sup>2</sup>	Sp x Tto <sup>2</sup>
<i>Succinivibrionaceae</i>	0,88 (4,77)	0,75 (2,31)	0,74 (2,20)	0,75 (2,14)	0,93 (5,94)	0,85 (3,89)	0,043	0,049	<0,001	0,011
<i>Ruminobacter</i>	0,82 (4,29)	0,67 (1,82)	0,67 (1,85)	0,69 (1,73)	0,86 (5,28)	0,78 (3,36)	0,050	0,052	<0,001	0,018
<i>Succinivibrio</i>	-0,25 (0,37)	-0,62 (0,04)	-0,51 (0,12)	-0,47 (0,16)	-0,35 (0,32)	-0,41 (0,23)	0,663	0,002	0,003	0,040
<i>Tenericutes</i> <sup>4</sup>	0,97 (4,56)	1,00 (5,43)	1,10 <sup>a</sup> (7,81)	1,00 <sup>ab</sup> (5,31)	0,96 <sup>bc</sup> (4,46)	0,86 <sup>c</sup> (2,38)	0,058	0,547	<0,001	0,380
<i>Anaeroplasmata</i>	0,97 (4,55)	0,99 (5,39)	1,10 <sup>a</sup> (7,78)	1,00 <sup>ab</sup> (5,28)	0,96 <sup>bc</sup> (4,44)	0,86 <sup>c</sup> (2,36)	0,058	0,566	<0,001	0,378
<i>Spirochaetes</i>	0,61 (2,00)	0,64 (2,18)	0,59 (1,78)	0,61 (2,02)	0,63 (2,19)	0,65 (2,38)	0,037	0,531	0,041	0,015
<i>Spirochaetaceae</i>	0,59 (1,96)	0,60 (2,04)	0,56 (1,67)	0,59 (1,92)	0,61 (2,10)	0,63 (2,32)	0,041	0,784	0,027	0,016
<i>Sphaerochaeta</i>	0,43 (1,30)	0,47 (1,55)	0,39 (1,07)	0,44 (1,35)	0,47 (1,54)	0,49 (1,74)	0,047	0,308	0,007	0,003
<i>Synergistetes</i> <sup>5</sup>	0,16 (0,82)	0,14 (0,67)	0,04 (0,35)	0,12 (0,60)	0,21 (0,94)	0,24 (1,09)	0,045	0,492	<0,001	0,035
<i>Jonquetella</i>	0,15 (0,80)	0,13 (0,63)	0,02 (0,34)	0,10 (0,58)	0,20 (0,91)	0,23 (1,04)	0,048	0,519	<0,001	0,031
<i>Fibrobacteres</i> <sup>6</sup>	0,60 (2,03)	0,63 (2,24)	0,51 <sup>c</sup> (1,15)	0,59 <sup>b</sup> (1,79)	0,67 <sup>a</sup> (2,63)	0,70 <sup>a</sup> (2,97)	0,045	0,546	<0,001	0,541
Otros <sup>7</sup>	0,71(3,04)	0,53 (1,24)	0,64 <sup>a</sup> (2,36)	0,63 <sup>ab</sup> (2,21)	0,59 <sup>b</sup> (1,84)	0,62 <sup>ab</sup> (2,15)	0,033	0,002	0,008	0,059

<sup>1</sup> Error estándar de la diferencia para la interacción Sp x Tto.

<sup>2</sup> Sp, especie; Tto, tratamiento; Sp x Tto, interacción especie y tratamiento. En cada fila, los diferentes superíndices (a, b y c) indican diferencias significativas para el tratamiento.

<sup>3</sup> Especies observadas.

<sup>4</sup> Prácticamente todas las secuencias clasificadas del filo *Tenericutes* corresponden a la familia *Anaeroplasmataceae* (>99%, datos no mostrados en la tabla).

<sup>5</sup> Prácticamente todas las secuencias clasificadas del filo *Synergistetes* corresponden a la familia *Synergistaceae* (>99%, datos no mostrados en la tabla).

<sup>6</sup> Prácticamente todas las secuencias clasificadas del filo *Fibrobacteres* corresponden al género *Fibrobacter* (>99%, datos no mostrados en la tabla).

Aunque la dosis de los PUFA n-3 utilizada en este trabajo (2% MS) fue superior a la utilizada en la dieta de rumiantes en algunos ensayos in vivo (e. g., AbuGhazaleh et al., 2004; Belenguer et al., 2010; Shingfield et al., 2012), los índices no se vieron notablemente afectados. Sin embargo, aunque cabría extrapolar que la inclusión de los PUFA n-3 no afectaría de forma acusada a la diversidad bacteriana en el rumen, el hecho de que los tratamientos EPA y DHA mostraran diferencias numéricas (con valores más bajos) obliga a considerar la posibilidad de que quizás con un número mayor de réplicas sí se hubieran podido detectar diferencias significativas. No obstante, los resultados sobre los índices de diversidad siguen la misma línea que los publicados en trabajos anteriores in vitro (Vargas et al., 2017) e in vivo (Belenguer et al., 2010; Toral et al., 2012; Castro-Carrera et al., 2014) en los que se suplementó la dieta de ovejas con lípidos marinos y los índices de diversidad apenas se vieron afectados. Ahora bien, tal y como apuntan Toral et al. (2012) en un estudio con dosis crecientes de microalgas marinas, el efecto negativo sobre los parámetros de diversidad bacteriana en el rumen podría estar determinado por la dosis de inclusión de los lípidos marinos en la dieta.

En cuanto a la composición de la comunidad bacteriana (Figura 3), esta presentó un patrón de distribución que coincide con el habitual (e. g., De la Fuente et al., 2014; Zhao et al., 2015; Belanche et al., 2016a), siendo el filo mayoritario *Bacteroidetes* (47-60%), seguido de *Firmicutes* (16-21%) y *Proteobacteria* (4-16%).

El filo *Tenericutes*, que normalmente aparece por debajo del 2% del total de bacterias (Castro-Carrera et al., 2014; Belanche et al., 2016a), presentó una abundancia mayor (2-8%). Esto podría sugerir que las condiciones de la técnica in vitro favorecieron su crecimiento, dado que en el inóculo (hora 0) su abundancia relativa se encontraba por debajo del 1,5% (datos no mostrados).

El resto de filos detectados en el contenido digestivo del rumen (*Spirochaetes*, *Fibrobacteres*, *SR1*, *Elusimicrobia*, *Synergistetes*, *Lentisphaerae*, *Actinobacteria*, *Chloroflexi*, *Candidatus Saccharibacteria*, *Fusobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Armatimonadetes*, *Cyanobacteria/Chloroplast*) presentaron abundancias por debajo

del 3% coincidiendo, como filos minoritarios, con trabajos anteriores en los que se estudió la composición de la comunidad bacteriana en el rumen mediante secuenciación masiva (Castro-Carrera et al., 2014; Zhao et al., 2015). El porcentaje de secuencias no clasificadas fue similar al de estudios previos en los que se utilizó secuenciación *Ion Torrent* (De la Fuente et al., 2014; Nathani et al., 2015; Belanche et al., 2016a).

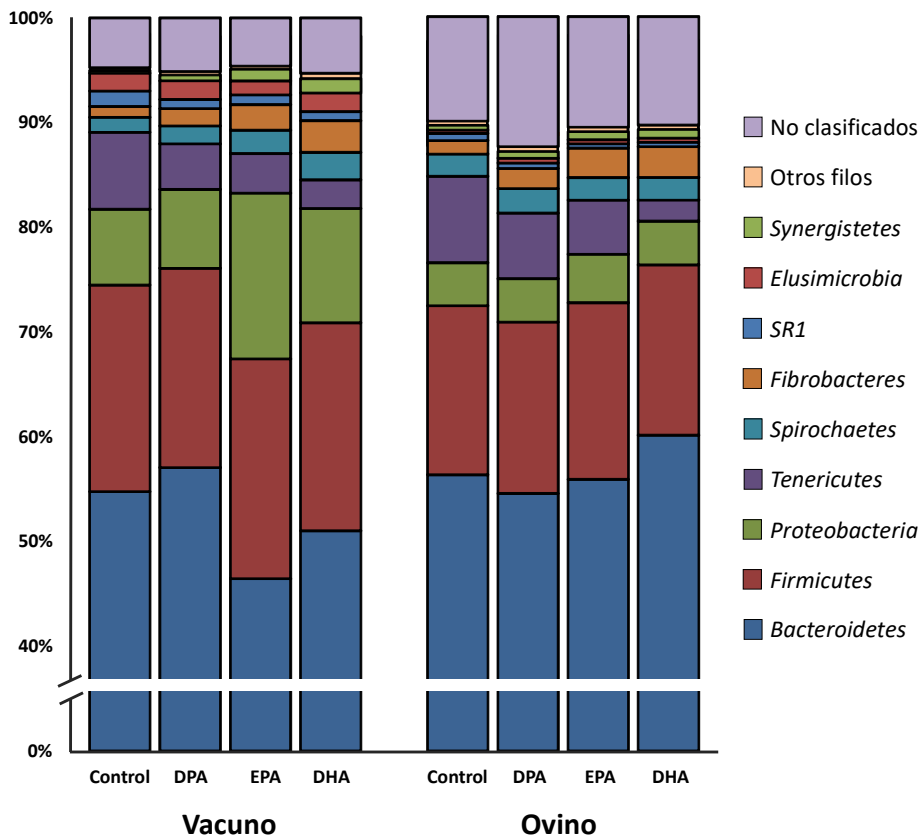


Figura 3. Abundancia relativa (% del total de secuencias) de los filos identificados en el contenido ruminal de vacuno y ovino tras 24 horas de incubación in vitro con la adición o no (Control) de DPA, EPA y DHA. El grupo "Otros filos" incluye *Lentisphaerae*, *Candidatus Saccharibacteria*, *Chloroflexi*, *Actinobacteria*, *Cyanobacteria/Chloroplast*, *Verrucomicrobia*, *Armatimonadetes* y *Fusobacteria*.

A nivel de filo, la abundancia de no clasificados fue mayor en el ovino (promedio 11%) que en el vacuno (promedio 5%), lo que podría quizás ser debido a que la composición de la comunidad bacteriana ruminal del vacuno ha sido más ampliamente estudiada y existe, por tanto, más información en las bases de datos.

Dentro del filo *Bacteroidetes* (Tabla 2), un porcentaje elevado de secuencias no pudieron ser clasificadas a un nivel taxonómico menor (66,6% de media). La familia detectada con mayor abundancia fue *Prevotellaceae* (10-17% sobre el total de bacterias), que se vio afectada negativamente por los tratamientos EPA y DHA respecto al control ( $P < 0,01$ ) en ambas especies de rumiantes. *Prevotellaceae* es generalmente la familia más abundante en el contenido digestivo de rumiantes (e. g., Castro-Carrera et al., 2014; Belanche et al., 2016b). La abundancia de *Prevotella*, el género clasificado con mayor proporción (4-11%), disminuyó con los tres PUFA n-3 ( $P < 0,01$ ), viéndose reducida hasta aproximadamente la mitad con DHA. Estos resultados contrastan con la resistencia reportada en el ensayo in vitro de Maia et al. (2007) de algunas cepas cultivables de *Prevotella* frente a EPA y DHA, así como con la falta de efecto observada in vivo en ovejas que recibieron una dieta con microalgas (Castro-Carrera et al., 2014) o en vacuno al suplementar con aceite de pescado (Huws et al., 2010). Es importante destacar que la dosis de PUFA de cadena muy larga utilizada en el presente trabajo fue superior, lo que podría explicar la dimensión de las variaciones encontradas. De todos modos, *Prevotella* está compuesto por un grupo muy heterogéneo de bacterias (Bekele et al., 2010) y, aunque su función más conocida es la degradación de hidratos de carbono (Stewart et al., 1997), hay autores que apuntan que algunas de las especies de este género podrían jugar también un papel relevante en la BH ruminal, por ejemplo en la formación de 18:0 (Huws et al., 2011). En este sentido, la respuesta de *Prevotella* a los PUFA n-3 siguió un patrón muy similar a la reducción en el contenido de 18:0 observado en el trabajo concomitante (Toral et al., 2017). Dentro de esta familia, se observaron incrementos significativos y paralelos en la abundancia de *Hallella* en vacuno y *Paraprevotella* en ovino, en respuesta a la adición de EPA y DHA (interacción Sp x Tto significativa;  $P < 0,05$ ; Figura 4). Este



paralelismo en la respuesta, podría indicar que quizás ambos géneros ocupen un nicho ecológico similar (es decir, realizando funciones metabólicas similares) dentro de cada especie de rumiante, como se ha observado en otros géneros bacterianos (Stewart et al., 1997). Además, como ya han sugerido otros autores (Maia et al., 2007; Huws et al., 2010; Castro-Carrera et al., 2014), los cambios descritos dentro de la familia *Prevotellaceae*, junto a la respuesta observada en los no clasificados de esta familia ( $P < 0,05$ ), apuntarían a una posible relación con la BH.

Dentro del filo *Bacteroidetes*, la familia *Porphyromonadaceae* se vio favorecida por la inclusión de EPA y DHA. Esta respuesta fue más marcada en vacuno (interacción Sp x Tto significativa;  $P < 0,05$ ), lo que pudo ser debido, al menos en parte, al aumento del género *Barnesiella* (Figura 4), cuya abundancia en el vacuno fue mayor e incrementó con los tres PUFA, pero principalmente con EPA y DHA (interacción Sp x Tto significativa;  $P < 0,001$ ). Aunque este género ha sido identificado en los últimos años (Kim et al., 2011), ya se ha sugerido que podría verse estimulado por la inclusión en la dieta de algunos PUFA (Petri et al., 2014). Además, la respuesta observada fue muy similar al aumento en el contenido ruminal del total de *trans* 18:1, con cada uno de los tres PUFA, reportado en el trabajo paralelo (Torral et al., 2017). Por ello, el aumento en su abundancia podría estar relacionado con la participación en el proceso de BH ruminal. El género *Tannerella* (Figura 4), que se encuentra mayoritariamente en la fracción líquida del contenido ruminal (Fouts et al., 2012), fue el único detectado dentro de *Porphyromonadaceae* que se vio afectado negativamente por la inclusión de EPA o DHA y solo en el contenido digestivo del vacuno (interacción Sp x Tto significativa;  $P < 0,05$ ). También únicamente en esta especie se observó un aumento del género *Phocaeicola* (Figura 4, interacción Sp x Tto significativa;  $P < 0,01$ ), perteneciente a la familia *Bacteroidales inc. sed.*, con EPA y DHA.

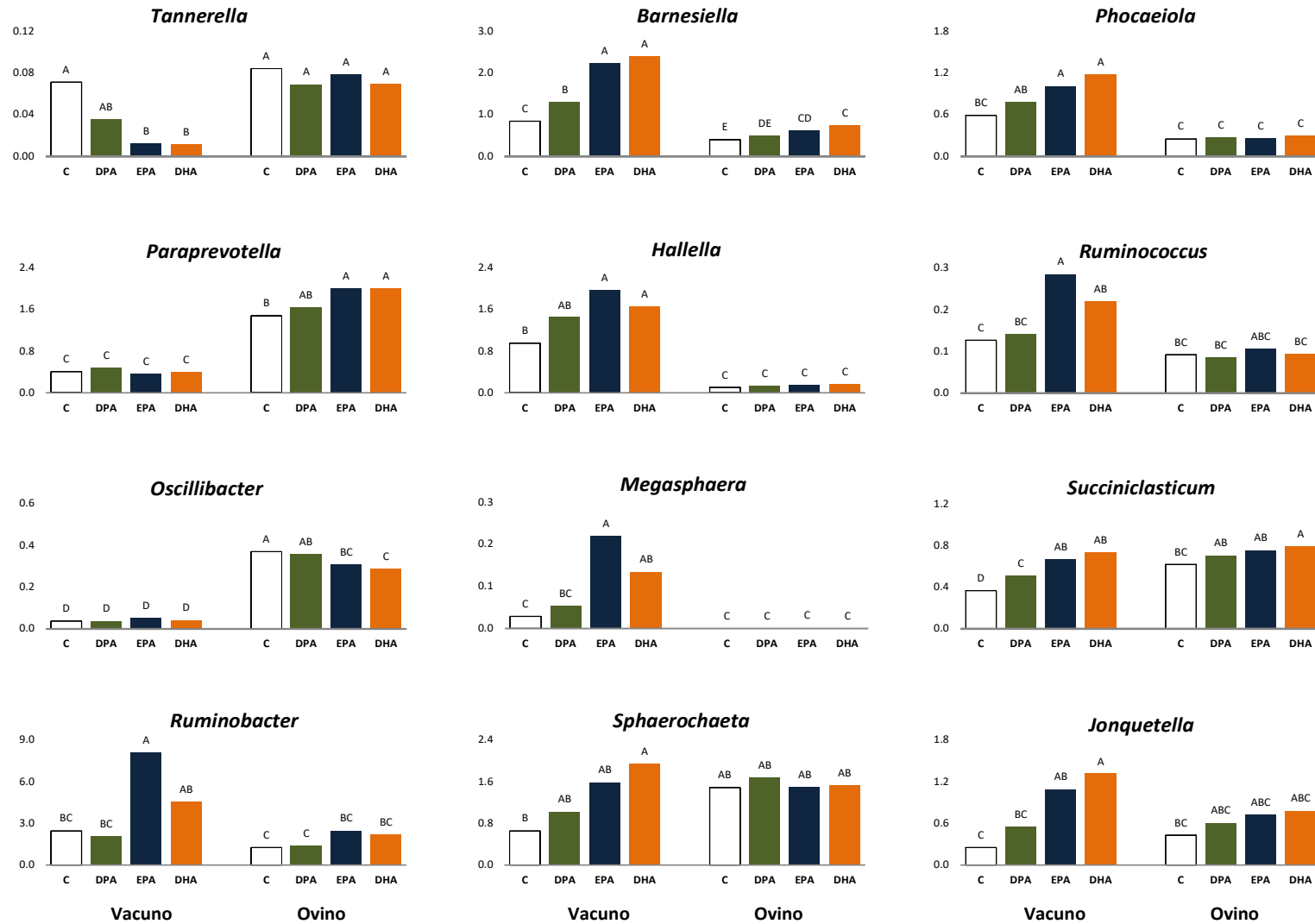


Figura 4. Abundancia relativa (% del total de secuencias) de algunos grupos bacterianos relevantes con diferencias significativas para la interacción  $Sp \times Tto$ , en el contenido ruminal de vacuno y ovino tras 24 horas de incubación *in vitro* con la adición o no (Control, C) de DPA, EPA y DHA. En cada gráfica, los diferentes superíndices (A, B y C) indican diferencias significativas para la interacción  $Sp \times Tto$ .

En relación al filo *Firmicutes*, el porcentaje de secuencias clasificadas a nivel de familia superó el 50% (Tabla 2). *Ruminococcaceae* fue la familia detectada con mayor abundancia (4-7%), especialmente en el vacuno ( $P < 0,05$ ) y mostró sensibilidad al tratamiento DHA ( $P < 0,05$ ). Dentro de esta familia, gran parte de las secuencias (aproximadamente 90%) no pudieron ser clasificadas a un nivel inferior. El género *Ruminococcus* (Figura 4), a pesar de ser bastante minoritario, alcanzó incrementos del 73% y 124% con los tratamientos DHA y EPA, respectivamente, en el vacuno y no presentó cambios significativos en el ovino (interacción Sp x Tto significativa;  $P < 0,01$ ). Este género es conocido por formar parte de las bacterias celulolíticas (Koike et al., 2001), aunque también parece ser altamente sensible a la inclusión de PUFA de cadena muy larga in vitro (Maia et al., 2007; Gudla et al., 2012). Miembros de esta misma familia, incluidos algunos del género *Ruminococcus*, han sido potencialmente relacionados con la BH ruminal en ovejas (Castro-Carrera et al., 2014) y novillos (Huws et al., 2011) que recibieron una dieta suplementada con lípidos marinos. Por otro lado, el género *Oscillibacter* (Figura 4), cuya abundancia en ovino es considerablemente superior al vacuno, se vio afectado negativamente por los tratamientos EPA y DHA únicamente en la primera especie (interacción Sp x Tto significativa;  $P < 0,01$ ).

En la familia *Lachnospiraceae* (Tabla 2) se encuentran los principales géneros con capacidad demostrada para biohidrogenar in vitro AG insaturados (*Butyrivibrio* y *Pseudobutyrvibrio*; Kopecny et al., 2003; Paillard et al., 2007) y, más concretamente, *Butyrivibrio proteoclasticus* P-18, que es, hasta el momento, la única cepa con capacidad demostrada de metabolizar in vitro DHA (Jeyanathan et al., 2016). Aunque la adición de AG insaturados afecta gravemente al crecimiento de este grupo de bacterias cuando se cultivan (Maia et al., 2010), en otros experimentos tanto in vitro (Vargas et al., 2017) como in vivo (Boeckert et al., 2008; Castro-Carrera et al., 2014) apenas se observan cambios en su abundancia al suplementar la dieta con lípidos marinos, y cuando los hay, estos afectan solo a un subgrupo de estos microorganismos (Shingfield et al., 2012; Vargas et al., 2017). Según Shingfield et al. (2012), la suplementación de la dieta de vacas lecheras con

PUFA afectó negativamente a la abundancia relativa de la suma de *B. fibrisolvens* y *Pseudobutyrvibrio*, sin verse afectada la suma de *Butyrvibrio* y *Pseudobutyrvibrio*, ni las poblaciones de *B. proteoclasticus*. En cambio, en el trabajo de Vargas et al. (2017) reportaron reducciones en la abundancia de especies de *Butyrvibrio* formadoras de 18:0, mientras que el conjunto de especies de *Butyrvibrio* no mostró cambios debidos a la suplementación.

En el presente trabajo, *Butyrvibrio* mostró una mayor abundancia en vacuno (1,32 vs 0,30%;  $P < 0,001$ ; Tabla 2) y se redujo alrededor del 30-37% debido a los tratamientos ( $P = 0,01$ ) en ambas especies donantes de inóculo. Por su parte, *Pseudobutyrvibrio* (<0,5%) mostró una respuesta similar a los tratamientos, aunque solo con una tendencia a la significación ( $P < 0,10$ ). Las reducciones en ambos grupos podrían ayudar a explicar, al menos parcialmente, algunos de los cambios observados sobre el perfil lipídico del contenido digestivo en el trabajo concomitante (Toral et al., 2017), como por ejemplo el aumento en la concentración de algunos isómeros *trans* 18:1 y la reducción del contenido de 18:0 con EPA, DPA y DHA en ambas especies de rumiantes. Sin embargo, la abundancia de *Butyrvibrio* en el contenido ruminal es relativamente baja, sobre todo en ovino, y según lo sugerido en trabajos anteriores, podría no jugar un papel dominante en la BH ruminal in vivo (Belenguer et al., 2010; Toral et al., 2012; Shingfield et al., 2012; Castro-Carrera et al., 2014). De hecho, en el caso concreto de *B. proteoclasticus*, cuando se ha cuantificado su abundancia, no se ha podido establecer una relación in vivo con la cantidad de 18:0 en el contenido ruminal (Belenguer et al., 2010; Huws et al., 2011). Por otro lado, es importante mencionar que la actividad funcional de estas bacterias podría no ser proporcional a la abundancia del gen ARNr 16S, tal y como se ha observado para otros grupos microbianos en los que varía su actividad metabólica sin verse reducida su abundancia en el rumen (Popova et al., 2011).

Otras familias minoritarias (<1% abundancia) del mismo filo (Tabla 2), como *Veillonellaceae* (0,3-0,6%) o *Acidaminococcaceae* (0,5-0,8%), presentaron cambios significativos en vacuno, aumentando su abundancia con los PUFA n-3

(interacción Sp x Tto significativa:  $P < 0,01$ ), debido, principalmente, al efecto de EPA y DHA sobre los géneros *Megasphaera* y *Succiniclasticum* (Figura 4;  $P < 0,01$ ). *Megasphaera elsdenii* ha sido propuesta como una de las posibles especies formadoras de *trans*-10 *cis*-12 18:2 in vitro (Kim et al., 2002), aunque esta capacidad no se ha podido confirmar (Wallace et al., 2007; Mckain et al., 2010). En el trabajo concomitante, el contenido de este AG en el rumen no se vio afectado por la adición de PUFA n-3 (Toral et al., 2017), por lo que no se puede relacionar esta respuesta con la abundancia relativa de este género en los tratamientos EPA y DHA en vacuno (interacción significativa Sp x Tto;  $P < 0,01$ ).

Otros miembros de la familia *Veillonellaceae* se han relacionado además con el proceso de hidratación de AG en el rumen de ovejas (Belenguer et al., 2010; Toral et al., 2012). Por ejemplo, la abundancia de *Quinella ovalis* pareció aumentar de forma similar al contenido de 10-oxo-18:0 en el rumen de cabras que recibieron una dieta suplementada con aceite de pescado (Toral et al., 2016). En el presente trabajo, las bases de datos no permiten identificar si las secuencias no clasificadas de *Veillonellaceae* pertenecían al género *Quinella* o a otras bacterias implicadas en la hidratación. Ahora bien, las variaciones en la abundancia de no clasificados de *Veillonellaceae* en vacuno sí coincidieron con los cambios en el contenido de 10-oxo-18:0 reportados en el trabajo paralelo (Toral et al., 2017), por lo que podrían formar parte de este grupo de bacterias capaces de hidratar AG en el rumen.

Respecto a *Succiniclasticum*, aumentó su abundancia con los tres PUFA en vacuno y solamente con DHA en ovino, lo que contrasta con los resultados obtenidos en vacuno por Patra y Yu (2015), en los que el uso in vitro de aceites esenciales redujo la abundancia de este género. El aumento de la proporción molar de ácido propiónico observado en el trabajo de Toral et al. (2017) podría estar relacionado con los cambios observados en este género, dado que es capaz de convertir el ácido succínico en propiónico (Stewart et al., 1997). Del mismo modo, otros grupos como *Paraprevotella*, *Fibrobacter* y *Barnesiella*, formadores de succínico (Stewart et al., 1997; Sakamoto, 2014) podrían haber contribuido al aumento de este ácido graso volátil en el contenido ruminal. Dentro del mismo filo, los

*Clostridiales inc. sed. XIII* (Tabla 2) y, en especial, el género *Anaerovorax*, aumentaron al incluir EPA y DHA ( $P < 0,01$ ) en vacuno y ovino. Aunque, según Huws et al. (2011), este último podría estar implicado en el proceso de BH, es interesante señalar que la dificultad para obtener cultivos puros que permitan realizar un estudio funcional de este u otros grupos, sigue siendo un enorme obstáculo para avanzar en la microbiología del metabolismo lipídico en el rumen (Lourenço et al., 2010).

El filo *Proteobacteria* (Tabla 2) fue más abundante en vacuno (10,4% vs 4,3%) y su presencia solo se vio afectada por los tratamientos en esta especie (interacción Sp x Tto significativa;  $P < 0,001$ ). Dentro de este filo, el género *Ruminobacter* (Figura 4) aumentó significativamente con EPA en vacuno (interacción Sp x Tto significativa;  $P < 0,05$ ). Un efecto similar fue detectado en *Succinivibrio*, aunque su abundancia fue considerablemente menor ( $< 0,4\%$ ). Yokoyama y Davis (1970) sugirieron una posible actividad biohidrogenadora de *Succinivibrio dextrinosolvens* y recientemente se ha especulado sobre la implicación en la BH de *Ruminobacter* (Pallara et al., 2014), miembros de *Succinivibrionaceae* (Castro-Carrera et al., 2014; Toral et al., 2016) o *Proteobacteria* (Li et al., 2012), pero el papel de estos microorganismos es aún incierto.

El género *Anaeroplasma* (2-8%), que representó la mayor parte de las secuencias pertenecientes al filo *Tenericutes* (Tabla 2), se vio afectado por la inclusión de los PUFA n-3, mostrando una reducción significativa con EPA y especialmente con DHA respecto al control ( $P < 0,001$ ). No obstante, hasta el momento, no parece existir ninguna evidencia de que este grupo esté relacionado con el metabolismo lipídico en el rumen.

En último lugar, *Fibrobacteres* (1-3%), *Spirochaetes* (1,8-2,4%) y *Synergistetes* (0,4-1,1%) aumentaron por el efecto de los tratamientos ( $P < 0,01$ ; Tabla 2). El primero incrementó su abundancia en ambas especies de rumiantes tras la inclusión de los tres PUFA, especialmente con EPA y DHA ( $P < 0,001$ ; Tabla 2). Esto contrasta con la ausencia de cambios en la abundancia de la especie *Fibrobacter succinogenes* observada por Tsiplakou et al. (2017) al suplementar la dieta de cabras

con microalgas como fuente de EPA, aunque la dosis utilizada en su caso (0,12 g de EPA/kg MS) estaba muy por debajo de la del presente trabajo. Por otro lado, *Spirochaetes* y *Synergistetes* únicamente variaron en el ganado vacuno (interacción Sp x Tto significativa;  $P > 0,05$ ; Tabla 2). Dentro de estos últimos filos, las diferencias encontradas se deberían, al menos en parte, al comportamiento de *Sphaerochaeta* y *Jonquetella*, que respondieron positivamente a la adición de EPA y DHA (Figura 4). Hasta el momento, no se conoce una relación entre estos grupos de bacterias y el metabolismo lipídico, por lo que serían necesarios más estudios que permitiesen profundizar en su actividad metabólica.

De todos modos, es necesario tener en cuenta que el incremento en la abundancia de estos u otros grupos podría deberse a la dependencia o competitividad con otras especies que sean altamente sensibles al efecto tóxico de los PUFA n-3 de cadena muy larga (Czerkawski, 1986; Dehority, 2003).

#### 4. CONCLUSIONES

La estructura y composición de la comunidad bacteriana del rumen de ovejas y vacas se ve claramente afectada al suplementar la dieta con un 2% de EPA y DHA. En cambio, la adición de la misma dosis de DPA no origina una respuesta relevante en el ovino y su efecto es menor que el de EPA y DHA en el vacuno, lo que sugiere una menor contribución de este PUFA n-3 al efecto global de los lípidos marinos. El microbioma bacteriano ruminal procedente de las vacas es menos estable que el del ovino frente a la adición de EPA, DPA y DHA.

La suplementación de la dieta con PUFA n-3 de cadena muy larga afecta a la abundancia relativa de diversos filos, familias y géneros de bacterias, como *Anaerovorax*, *Barnesiella*, *Butyrivibrio*, *Prevotella*, *Ruminobacter*, *Ruminococcus* y *Succinivibrio*, que podrían estar implicados en el metabolismo de los AG en el rumen. En cualquier caso, es necesario profundizar en el estudio de su actividad metabólica para conocer su participación real en el proceso de BH. Aunque la mayoría de los cambios debidos a la adición de los tres PUFA n-3 son comparables en vacuno y en ovino, existen algunas variaciones entre ambas especies de

rumiantes. Por ejemplo, la abundancia relativa de *Hallella*, *Megasphaera*, *Phocaeicola*, *Ruminococcus*, *Ruminobacter* y *Tannerella* únicamente cambia en vacuno, mientras *Oscillibacter* y *Paraprevotella* solo se ven afectados en ovino.

## 5. REFERENCIAS

- AbuGhazaleh, A. A., and Jenkins, T. C. 2004. Disappearance of docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids from cultures of mixed ruminal microorganisms. *J. Dairy Sci.* 87:645-651.
- Bekele, A. Z., Koike, S., and Kobayashi, Y. 2010. Genetic diversity and diet specificity of ruminal *Prevotella* revealed by 16S rRNA gene-based analysis. *FEMS Microbiol. Lett.* 305:49-57.
- Belanche A., Kingston-Smith, A. H., and Newbold, C. J. 2016b. An integrated Multi-Omics approach reveals the effects of supplementing grass or grass hay with vitamin E on the rumen microbiome and its function. *Front. Microbiol.* 7:905.
- Belanche, A., Pinloche, E., Preskett, D., and Newbold, C. J. 2016a. Effects and mode of action of chitosan and ivy fruit saponins on the microbiome, fermentation and methanogenesis in the rumen simulation technique. *FEMS Microbiol. Ecol.* 92:1 fiv160.
- Belenguer, A., Toral, P. G., Frutos, P., and Hervás, G. 2010. Changes in the rumen bacterial community in response to sunflower oil and fish oil supplements in the diet of dairy sheep. *J. Dairy Sci.* 93:3275-3286.
- Boeckaert, C., Vlaeminck, B., Fievez, V., Maignien, L., Dijkstra, J., and Boon, N. 2008. Accumulation of *trans* C18:1 fatty acids in the rumen after dietary algal supplementation is associated with changes in the *Butyrivibrio* community. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:6923-6930.
- Castro-Carrera, T., Toral, P. G., Frutos, P., McEwan, N. R., Hervás, G., Abecia, L., Pinloche, E., Girdwood, S. E., and Belenguer, A. 2014. Rumen bacterial community evaluated by 454 pyrosequencing and terminal restriction fragment length polymorphism analyses in dairy sheep fed marine algae. *J. Dairy Sci.* 97:1661-1669.
- Czerkawski, J.W. 1986. An introduction to rumen studies. Pergamon Press, Oxford, UK.
- De la Fuente, G., Belanche, A., Girwood, S. E., Pinloche, E., Wilkinson, T., and Newbold, C. J. 2014. Pros and cons of ion-torrent next generation sequencing versus terminal restriction fragment length polymorphism T-RFLP for studying the rumen bacterial community. *PLoS One.* 9:e101435.
- Dehority, B. A. 2003. Rumen Microbiology. Nottingham University Press. Nottingham, UK.
- Ferreira, L. M. M., Hervás, G., Belenguer, A., Celaya, R., Rodrigues, M. A. M., García, U., Frutos, P., and Osoro, K. 2017. Comparison of feed intake, digestion and rumen function among domestic ruminant species grazing in upland vegetation communities. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 101:846-856.
- Fouts, D. E., Szpakowski, S., Purushe, J., Torralba, M., Waterman, R. C., MacNeil, M. D., Alexander, L. J., and Nelson, K. E. 2012. Next Generation Sequencing to define



- prokaryotic and fungal diversity in the bovine rumen. PLoS One 7:e48289.
- Goering, M. K., and Van Soest, P. J. 1970. Forage Fiber Analysis (Apparatus, Reagents, Procedures and Some Applications). Agriculture Handbook, No. 379. Agricultural Research Service, USDA, Washington, USA.
- Gudla, P., AbuGhazaleh, A. A., Ishlak, A., and Jones, K. 2012. The effect of level of forage and oil supplement on biohydrogenation intermediates and bacteria in continuous cultures. Anim. Feed Sci. Technol. 171:108-116.
- Hairston, N. G., Allan, J. D., Colwell, R. K., Futuyma, D. J., Howell, J., Lubin, M. D., Mathias, J., and Vandermeer, J. H. 1968. The relationship between species diversity and stability: An experimental approach with protozoa and bacteria. Ecology 49:1091-1101.
- Henderson, G., Cox, F., Ganesh, S., Jonker, A., Young, W., Global Rumen Census Collaborators, GRC., and Janssen, P. 2015. Rumen microbial community composition varies with diet and host, but a core microbiome is found across a wide geographical range. Sci. Rep. 5:14567
- Hill, T. C., Walsh, K. A., Harris, J. A., and Moffett, B. F. 2003. Using ecological diversity measures with bacterial communities. FEMS Microbiol. Ecol. 43:1-11.
- Hofmann, R. R. 1989. Evolutionary steps of ecopathological adaptation and diversification of ruminants: a comparative view of their digestive system. Oecologia 78:443-457.
- Huws, S. A., Kim, E. J., Cameron, S. J. S., Girdwood, S. E., Davies, L., Tweed, J., Vallin, H., and Scollan, N. D. 2015. Characterization of the rumen lipidome and microbiome of steers fed a diet supplemented with flax and echium oil. Microb. Biotechnol. 8:331-341.
- Huws, S. A., Kim, E. J., Lee, M. R. F., Scott, M. B., Tweed, J. K. S., Pinloche, E., Wallace, R. J., and Scollan, N. D. 2011. As yet uncultured bacteria phylogenetically classified as *Prevotella*, *Lachnospiraceae incertae sedis* and unclassified *Bacteroidales*, *Clostridiales* and *Ruminococcaceae* may play a predominant role in ruminal biohydrogenation. Environ. Microbiol. 13:1500-1512.
- Huws, S. A., Lee, M. R. F., Muetzel, S. M., Scott, T. W., Wallace, R. J., and Scollan, N. D. 2010. Forage type and fish oil cause shifts in rumen bacterial diversity. FEMS Microbiol. Ecol. 73:396-407.
- Indugu, N., Bittinger, K., Kumar, S., Vecchiarelli, B., and Pitta, D. 2016. A comparison of rumen microbial profiles in dairy cows as retrieved by 454 Roche and Ion Torrent (PGM) sequencing platforms. PeerJ 4:e1599.
- INRA. 2007. Alimentation des bovins, ovins et caprins. Besoins des Animaux: Valeur des aliments. Tables INRA 2007. INRA, Versailles, France.
- Jeyanathan, J., Escobar, M., Wallace, R. J., Fievez, V., and Vlaeminck, B. 2016. Biohydrogenation of 22:6n-3 by *Butyrivibrio proteoclasticus* P18. BMC Microbiol. 16:104.
- Jenkins, T. C., Wallace, R. J., Moate, P. J., and Mosley, E. E. 2008. Recent advances in biohydrogenation of unsaturated fatty acids within the rumen microbial ecosystem. J. Anim. Sci. 86:397-412.
- Kim, Y. J., Liu, R. H., Rychlik, J. L., and Russell, J. B. 2002. The enrichment of a ruminal bacterium (*Megasphaera elsdenii* YJ-4) that produces the *trans*-10, *cis*-12 isomer of conjugated linoleic acid. J. Appl. Microbiol. 92:976-82.

- Kim, M., Morrison, M., and Yu, Z. 2011. Status of the phylogenetic diversity census of ruminal microbiomes. *FEMS Microbiol. Ecol.* 76:49-63.
- Kittlmann, S., Seedorf, H., Walters, W. A., Clemente, J. C., Knight, R., Gordon, J. I., and Janssen, P. H. 2013. Simultaneous amplicon sequencing to explore co-occurrence patterns of bacterial, archaeal and eukaryotic microorganisms in rumen microbial communities. *PLoS One* 8:e47879.
- Koike, S., and Kobayashi, Y. 2001. Development and use of competitive PCR assays for the rumen cellulolytic bacteria: *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* and *Ruminococcus flavefaciens*. *FEMS Microbiol. Lett.* 204:361-366.
- Kopečný, J., Zorec, M., Mrazek, J., Kobayashi, Y., and Marinsek-Logar, R. 2003. *Butyrivibrio hungatei* sp. nov. and *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* sp. nov., butyrate-producing bacteria from the rumen. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53:201-209.
- Li, D., Wang, J., and Bu, D. 2012. Ruminal microbe of biohydrogenation of trans-vaccenic acid to stearic acid in vitro. *BMC Res. Notes* 5:97.
- Lock, A. L., and Bauman, D. E. 2004. Modifying milk fat composition of dairy cows to enhance fatty acids beneficial to human health. *Lipids* 39:1197-1206.
- Lourenço, M., Ramos-Morales, E., and Wallace, R. J. 2010. The role of microbes in rumen lipolysis and biohydrogenation and their manipulation. *Animal* 4:1024-1036.
- Nathani, N. M., Patel, A. K., Chandra Shekar, M., Reddy, B., Shah, S. V., Lunagaria, P. M., Kothari, R. K., and Joshi, C. G. 2015. Effect of roughage on rumen microbiota composition in the efficient feed converter and sturdy Indian Jaffrabadi buffalo (*Bubalus bubalis*). *BMC Genomics* 16:1116.
- Maia, M. R. G., Chaudhary, L. C., Bestwick, C. S., Richardson, A. J., McKain, N., Larson, T. R., Graham, I. A., and Wallace, R. J. 2010. Toxicity of unsaturated fatty acids to the biohydrogenating ruminal bacterium, *Butyrivibrio fibrisolvens*. *BMC Microbiol.* 10:52-61.
- Maia, M. R. G., Chaudhary, L. C., Figueres, L., and Wallace, R. J. 2007. Metabolism of polyunsaturated fatty acids and their toxicity to the microflora of the rumen. *Anton. Leeuw. Int. J. G.* 91:303-314.
- McKain, N., Shingfield, K. J., and Wallace, R. J. 2010. Metabolism of conjugated linoleic acids and 18:1 fatty acids by ruminal bacteria: products and mechanisms. *Microbiol.* 156:579-588.
- Morgavi, D. P., Boudra, H., Jouany, J. P., and Michalet-Doreau, B. 2004. Effect and stability of gliotoxin, an *Aspergillus fumigatus* toxin, on in vitro rumen fermentation. *Food Addit. Contam.* 21:871-878.
- Paillard, D., McKain, N., Chaudhary, L. C., Walker, N. D., Pizette, F., Koppova, I., McEwan, N. R., Kopečný, J., Vercoe, P. E., Louis, P., and Wallace, R. J. 2007. Relation between phylogenetic position, lipid metabolism and butyrate production by different *Butyrivibrio*-like bacteria from the rumen. *Anton. Leeuw. Int. J. G.* 91:417-422.
- Pallara, G., Buccioni, A., Pastorelli, R., Minieri, S., Mele, M., Rapaccini, S., Messini, A., Pauselli, M., Servili, M., Giovannetti, L., and Viti, C. 2014. Effect of stoned olive pomace on rumen microbial communities and polyunsaturated fatty acid biohydrogenation: an in vitro study. *BMC Vet. Res.* 10:271.

- Patra, A. K., and Yu, Z. 2015. Essential oils affect populations of some rumen bacteria in vitro revealed by microarray (RumenBactArray) analysis. *Front. Microbiol.* 6:297.
- Petri, R. M., Mapiye, C., Dugan, M. E. R., and McAllister, T. A. 2014. Subcutaneous adipose fatty acid profiles and related rumen bacterial populations of steers fed red clover or grass hay diets containing flax or sunflower-seed. *PLoS One* 9:e104167.
- Popova, M., Martin, C., Eugène, M., Mialon, M. M., Doreau, M., and Morgavi, D. P. 2011. Effect of fibre- and starch-rich finishing diets on methanogenic Archaea diversity and activity in the rumen of feedlot bulls. *Anim. Feed Sci. Technol.* 167:113-121.
- Sakamoto, M. 2014. The family *Porphyromonadaceae*. In: *The Prokaryotes – Other Major Lineages of Bacteria and The Archaea*, Eugene Rosenberg, Edward F. DeLong, Stephen Lory, Erko Stackebrandt, Fabiano Thompson, Heidelberg-Berlin, Alemania, pp: 811-825.
- Shingfield, K. J., Chilliard, Y., Toivonen, V., Kairenius, P., and Givens, D. I. 2008. *Trans* fatty acids and bioactive lipids in ruminant milk. *Adv. Exp. Med. Biol.* 606:3-65.
- Shingfield, K. J., Kairenius, P., Arölä, A., Paillard, D., Muetzel, S., Ahvenjärvi, S., Vanhatalo, A., Huhtanen, P., Toivonen, V., Griinari, J. M., and Wallace, R. J. 2012. Dietary fish oil supplements modify ruminal biohydrogenation, alter the flow of fatty acids at the omasum, and induce changes in the ruminal *Butyrivibrio* population in lactating cows. *J. Nutr.* 142:1437-1448.
- Spear, G. T., Sikaroodi, M., Zariffard, M. R., Landay, A. L., French, A. L., and Gillevet, P. M. 2008. Comparison of the diversity of the vaginal microbiota in HIV-infected and HIV-uninfected women with or without bacterial vaginosis. *J. Infect. Dis.* 198:1131-1140.
- Stewart, C. S., Flint, H. J., and Bryant, M. P. 1997. The rumen bacteria. In: *The rumen microbial ecosystem*. 2nd ed. Hobson PS and Stewart CS, eds. Blackie Academic & Professional, London, UK, pp. 10-72.
- Toral, P. G., Belenguer, A., Shingfield, K. J., Hervás, G., Toivonen, V., and Frutos, P. 2012. Fatty acid composition and bacterial community changes in the rumen fluid of lactating sheep fed sunflower oil plus incremental levels of marine algae. *J. Dairy Sci.* 95:794-806.
- Toral, P. G., Bernard, L., Belenguer, A., Rouel, J., Hervás, G., Chilliard, Y., and Frutos, P. 2016. Comparison of ruminal lipid metabolism in dairy cows and goats fed diets supplemented with starch, plant oil, or fish oil. *J. Dairy Sci.* 99:301-316.
- Toral, P. G., Hervás, G., Carreño, D., Leskinen, H., Belenguer, A., Shingfield, K. J., and Frutos, P. 2017. In vitro response to EPA, DPA, and DHA: Comparison of effects on ruminal fermentation and biohydrogenation of 18-carbon fatty acids in cows and ewes. *J. Dairy Sci.* 100:6187-6198.
- Tsiplakou, E., Abdullah, M. A. M., Skliros, D., Chatzikonstantinou, M., Fliemetakis, E., Labrou, N., and Zervas, G. 2017. The effect of dietary *Chlorella vulgaris* supplementation on micro-organism community, enzyme activities and fatty acid profile in the rumen liquid of goats. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 101:275-283.
- Vargas, J. E., Andrés, S., Snelling, T. J., López-Ferreras, L., Yáñez-Ruíz, D. R., García-Estrada, C., and López, S. 2017. Effect of sunflower and marine oils on ruminal microbiota, in vitro fermentation and digesta fatty acid profile. *Front. Microbiol.* 8,1124.

- Wallace, R. J., McKain, N., Shingfield, K. J. and Devillard, E. 2007. Isomers of conjugated linoleic acids are synthesized via different mechanisms in ruminal digesta and bacteria. *J. Lipid Res.* 48:2247-2254.
- Yokoyama, M. T., and Davis, C. L. 1970. Hydrogenation of linoleic acid by *Borrelia* B25 and *Succinivibrio dextrinosolvens*. *Fed. Proc.* 29:A691.
- Zened, A., Combes, S., Cauquil, L., Mariette, J., Klopp, C., Bouchez, O., Troegeler-Meynadier, A., and Enjalbert, F. 2013. Microbial ecology of the rumen evaluated by 454 GS FLX pyrosequencing is affected by starch and oil supplementation of diets. *FEMS Microbiol. Ecol.* 83:504-514.
- Zhao, L., Meng, Q., Ren, L., Liu, W., Zhang, X., Huo, Y., and Zhou, Z. 2015. Effects of nitrate addition on rumen fermentation, bacterial biodiversity and abundance. *Asian Austr J Anim Sci.* 28:1433-1441.

## PRUEBA III

# FISH OIL-INDUCED MILK FAT DEPRESSION AND ASSOCIATED DOWNREGULATION OF MAMMARY LIPOGENIC GENES IN DAIRY EWES

D. Carreño, G. Hervás, P. G. Toral, T. Castro-Carrera, and P. Frutos

*Instituto de Ganadería de Montaña, CSIC – Universidad de León*

*Finca Marzanas s/n, 24346 Grulleros, León, España*

*Journal of Dairy Science* 99 (2016) 7971-7981

doi: 10.3168/jds.2016-11019

Presentado en parte en el *66th Annual Meeting of the European Federation of Animal Science (EAAP)*. 31 de Agosto – 4 de septiembre de 2015. Varsovia, Polonia

y en parte en las *XVI Jornadas sobre Producción Animal AIDA*.  
19–20 de mayo de 2015, Zaragoza, España



# FISH OIL-INDUCED MILK FAT DEPRESSION AND ASSOCIATED DOWNREGULATION OF MAMMARY LIPOGENIC GENES IN DAIRY EWES

D. Carreño, G. Hervás, P. G. Toral, T. Castro-Carrera, and P. Frutos

---

**Abstract.** Several studies in dairy cows have shown a relationship between milk fat depression (MFD) and alterations caused in lipogenic gene expression by dietary nutrients. However, information on small ruminants is not only scarce but also inconsistent. Therefore, this experiment was conducted in dairy ewes to study the effect of a diet known to induce MFD on milk fatty acid (FA) composition and mRNA abundance of key candidate genes involved in mammary lipogenesis. Twelve lactating Assaf ewes (on average 63 d in milk) were randomly assigned to 2 treatments consisting of a total mixed ration based on alfalfa hay and concentrates (50:50), supplemented with 0 (control) or 17 g of fish oil/kg of diet DM (FO). Profiles of milk FA and mRNA abundance of candidate genes in biopsied mammary tissue were examined before starting the treatments and after 1 and 4.5 weeks on the diets. As expected, FO induced MFD and modified milk FA composition. Compared with the control, reductions in milk fat concentration and yield were not detected on d 7, but reached up to 25 and 22%, respectively, on d 30. However, increases in confirmed or putative antilipogenic FA (*trans*-10 *cis*-12 and *trans*-9 *cis*-11 18:2, *cis*-9 16:1, *cis*-11 18:1 and oxo-FA) were already established on the early stage of the treatment and lasted until the end of the feeding period. These changes were accompanied by decreases in the mRNA abundance of genes encoding lipogenic enzymes. The coordinated nature of the downregulation, which tended to affect most studied metabolic pathways, including FA activation (*ACSS1*), *de novo* synthesis (*ACACA* and *FASN*), uptake and transport (*LPL* and *FABP3*), desaturation (*SCD1*) and esterification (*AGPAT6*), supports the involvement of a central regulator of milk fat synthesis. In this regard, without ruling out the potential contribution of *PPARG*, our results suggest that *SREBF1*

would have a relevant role in the MFD syndrome in sheep fed FO. Among the other studied transcription factors, the tendency to a downregulation of *INSIG1* was associated with that of *SREBF1*, whereas no variation was detected for *SCAP* or *THRSP*. Fish oil had no significant effects on the transcript abundance of *CD36*, *GPAM*, *DGAT1*, *LPIN1* and *XDH*. Overall, changes in potential antilipogenic FA and mRNA abundance of candidate lipogenic genes support a relationship between them and suggest that FO-induced MFD in dairy ewes would be mediated by transcriptional mechanisms.

*Key words:* fatty acid, gene expression, marine lipid, nutrigenomics, sheep

---

## 1. INTRODUCTION

Without ruling out the potential involvement of other causative factors, it is widely accepted that the low-milk fat syndrome is mediated by alterations of ruminal fermentation resulting in the formation of specific bioactive fatty acids (FA) that will exert antilipogenic effects in the mammary gland (Bauman and Griinari, 2001; Shingfield et al., 2010). However, the molecular mechanisms by which these FA are able to decrease mammary synthesis of fat remain uncertain (Bauman et al., 2011). Based on studies in dairy cows, the low-milk fat syndrome, commonly referred to as milk fat depression (MFD), has been hypothesized to be caused by alterations in lipogenic gene expression by dietary nutrients (Harvatine and Bauman, 2006; Angulo et al., 2012; Bionaz et al., 2015). The downregulation of the mRNA abundance of key genes involved in milk fat synthesis by *trans*-10 *cis*-12 CLA is likely the best-known example of nutrigenomics in this area (Shingfield et al., 2010; Bauman et al., 2011; Hussein et al., 2013).

Nevertheless, information about nutrigenomics and lipid metabolism in small ruminants is not only scarce but also inconsistent (Shingfield et al., 2013). For example, Hussein et al. (2013) reported that *trans*-10 *cis*-12 CLA-induced MFD in lactating ewes involves the *SREBF* family and a coordinated downregulation of genes related to mammary lipid synthesis (*e.g.*, *ACACA*, *FASN*, *SCD1*, *AGPAT6*,



*SREBF1* or *INSIG1*). In contrast, several studies in dairy sheep (Dervishi et al., 2012; Bichi et al., 2013a; Castro-Carrera et al., 2015) or dairy goats (Bernard et al., 2008; Tsiplakou et al., 2009; Toral et al., 2013) observed a weak relationship between changes in milk FA production and mammary mRNA abundance of key candidate genes and transcription factors involved in lipid metabolism. Yet, Bichi et al. (2013a), who studied that relationship after 54 d on marine lipids, suggested that transcriptional regulation in dairy ewes might have been established earlier during the feeding period. This speculation was based on the findings of Invernizzi et al. (2010) in mammary tissue from dairy cows fed saturated lipids or soybean oil and fish oil, who observed that transcriptional control mechanisms altering the expression of several lipogenic genes (e.g., *PPARG*, *LPIN1*, *SREBF1*, *ACSS1*, *ACACA*, *FASN* or *LPL*) were affected by d 7 post-feeding, but variations between diets had disappeared on d 21.

This experiment was therefore conducted in dairy ewes to study the effect of dietary supplementation with marine lipids, which is known to induce MFD in this species (Capper et al., 2007; Bichi et al., 2013b; Toral et al., 2016b), on milk fat composition and mRNA abundance of key candidate genes involved in mammary lipogenesis. Based on previous reports (Invernizzi et al., 2010; Toral et al., 2010; Bichi et al., 2013a), we hypothesized that changes in FA composition and gene expression would be detected early during the feeding period whereas the milk fat decrease would only be observed latter on. To test this hypothesis, transcript and FA profiles were examined before starting the assay and after 1 and 4.5 weeks on a control or a fish oil supplemented diet.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. Animals, experimental diets and management

All experimental procedures were approved and completed in accordance with the Spanish Royal Decree 53/2013 for the protection of animals used for experimental purposes.

Twelve lactating Assaf ewes (BW = 77.8 kg, SD = 7.81; DIM = 63, SD = 7.8; milk production = 2.5 kg/d, SD = 0.35) were housed in individual tie stalls and randomly allocated to one of 2 groups (n = 6). They were used to test the effects of 2 dietary treatments consisting of a TMR, based on alfalfa hay (particle size > 4 cm) and concentrates (50:50), without lipid supplementation (control) or supplemented with 17 g of fish oil (Afampes 121 DHA; Afamsa, Mos, Spain)/kg of diet DM (FO). The ingredients and chemical composition of the experimental diets, which were prepared weekly and included molasses to reduce selection of components, are presented in Table 1. All ewes were fed the control diet during 4 weeks of adaptation before the start of the study. The TMR were offered twice daily, at 0930 and 1830 h, to ensure ad libitum intakes. Ewes had continuous access to clean drinking water and were milked at approximately 0900 and 1800 h in a dedicated 1 × 10 stall-milking parlor (DeLaval, Madrid, Spain).

## ***2.2. Measurements and sampling procedures***

### *2.2.1. Diets*

Representative samples of the experimental diets, collected weekly, and the fish oil were stored at -30°C until analysis. Feed intake was measured on d 0 (pre-treatment), 7 and 30, by weighing the amount of DM offered and refused by each ewe.

### *2.2.2. Milk*

Milk yield was recorded on d 0 (pre-treatment), 7 and 30, and individual milk samples were collected and composited according to morning and evening milk yield. One aliquot of composite milk was stored at -30°C until milk FA composition analysis, whereas another aliquot was preserved with bronopol (D & F Control Systems Inc., San Ramon, CA, USA) and stored at 4°C until analyzed for fat and CP.

Table 1. Formulation and chemical composition of the TMR without lipid supplementation (control) or supplemented with 17 g of fish oil/kg DM (FO).

	TMR	
	Control	FO
Ingredients, g/kg of fresh matter		
Dehydrated alfalfa hay	500	493
Whole corn grain	140	138
Whole barley grain	100	99
Soybean meal solvent 440 g CP/kg	150	148
Sugar beet pulp, pellets	50	49
Molasses, liquid	40	39
Fish oil <sup>1</sup>	0	15
Mineral supplement <sup>2</sup>	18	18
Vitamin supplement <sup>3</sup>	2	2
Chemical composition, g/kg DM		
OM	904	902
CP	187	181
NDF	251	240
ADF	155	145
14:0	0.60	1.16
16:0	5.49	8.78
<i>cis</i> -9 16:1	0.00	0.77
18:0	1.07	2.04
<i>cis</i> -9 18:1	4.17	7.22
<i>cis</i> -11 18:1	0.31	0.89
18:2n-6	12.53	12.74
18:3n-3	3.15	3.26
20:5n-3	0.00	1.08
22:5n-3	0.00	0.27
22:6n-3	0.00	3.86
Total FA	28.1	43.7

<sup>1</sup>Semirefined tuna and sardine oil (Afampes 121 DHA; Afamsa, Mos, Spain); contained (g/100 g total FA): 14:0 (3.1), 16:0 (18.6), *cis*-9 16:1 (4.2), 17:0 (0.8), 18:0 (5.4), *cis*-9 18:1 (17.2), *cis*-11 18:1 (3.2), 18:2n-6 (2.3), 18:3n-3 (0.9), *cis*-11 20:1 (1.8), 20:5n-3 (5.9), 22:5n-3 (1.5) and 22:6n-3 (21.2).

<sup>2</sup>Declared as containing (g/kg): CaCO<sub>3</sub> (556), Ca<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (222) and NaCl (222).

<sup>3</sup>VITAFAC *Ovino* 0.2% AC (DSM Nutritional Products S.A., Madrid, Spain). Declared as containing: vitamin A (4,000,000 IU/kg), vitamin D3 (1,000,000 IU/kg), vitamin E (5 g/kg), iron (17.5 g/kg), manganese (20 g/kg), cobalt (50 mg/kg), iodine (250 mg/kg), zinc (15 g/kg), selenium (100 mg/kg), sepiolite (100 g/kg), calcium (26.2 g/kg) and magnesium (6.15 g/kg).

### 2.2.3. Biopsies

Two weeks before starting the experiment (*i.e.*, the administration of the two experimental diets; pre-treatment) and on d 8 and 31 on the treatments, mammary tissue samples were biopsied from each ewe. Biopsies were performed with local

anesthesia of the area by subcutaneous injection of lidocaine (Anesvet, Laboratorios Ovejero S.A., León, Spain). A 4-cm incision was made at the midpoint section of a half-udder, through the skin and underlying fascia until the mammary capsule was clearly visible. Tissue samples ( $\approx 25$  mg) were then collected using disposable needles (12 gauge x 10 cm, MN1210, Bard Magnum, Bard Biopsy Systems, Tempe, AZ, USA) for Magnum reusable core biopsy instrument (MG1522, Bard Biopsy Systems), immediately frozen in liquid N<sub>2</sub> and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until RNA extraction. Briefly (see Toral et al., 2015b for details), the wound was treated with adrenaline, and the incision was closed with suture clips and sprayed with topical antibiotic (oxytetracycline) and a wound-healing product (micronized aluminium powder). Ewes also received injections of antibiotic (amoxicillin and colistin), anti-inflammatory (ketoprofen) and systemic hemostatic drugs (ethamsylate). No incidences of mastitis were detected for any ewe in the study.

### **2.3. Laboratory analysis**

#### *2.3.1. Diets*

Samples were analyzed for DM (ISO, 1999a), ash (ISO, 2002), and CP (ISO, 2009). The NDF and ADF were determined using an Ankom<sup>2000</sup> fiber analyzer (Ankom Technology Methods 13 and 12, respectively; Ankom Technology Corp., Macedon, NY, USA); the former was assayed with sodium sulfite and  $\alpha$ -amylase, and both were expressed with residual ash. Fatty acid methyl esters (FAME) of lipid in freeze-dried samples of TMR were prepared in a 1-step extraction-transesterification procedure using chloroform (Sukhija and Palmquist, 1988) and 2% (vol/vol) sulfuric acid in methanol (Shingfield et al., 2003), and *cis*-12 tridecenoate (Larodan, Solna, Sweden) as an internal standard. Methyl esters were separated and quantified using a gas chromatograph (Agilent 7890A GC System, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA) equipped with a flame-ionization detector and a 100-m fused silica capillary column (0.25 mm i.d., 0.2  $\mu\text{m}$  film thickness; CP-SIL 88, CP7489, Varian Ibérica S.A., Madrid, Spain) and

hydrogen as the carrier gas (207 kPa, 2.1 mL/min). The total FAME profile in a 2  $\mu$ L sample volume at a split ratio of 1:50 was determined using a temperature gradient program (Shingfield et al., 2003). Peaks were identified based on retention time comparisons with commercially available standard FAME mixtures (Nu-Chek Prep., Elysian, MN, USA; and Sigma-Aldrich, Madrid, Spain).

### 2.3.2. Milk

Fat and CP concentrations were determined by infrared spectrophotometry (ISO, 1999b) using a MilkoScan FT6000 (Foss, Hillerød, Denmark). Lipid in 1 mL of milk was extracted using diethylether and hexane (5:4, vol/vol) and transesterified to FAME using freshly prepared methanolic sodium methoxide as a catalyst (Shingfield et al., 2003). The total FAME profile was determined by gas chromatography using the same chromatograph and temperature gradient program applied for the analysis of feeds, but isomers of 18:1 were further resolved in a separate analysis under isothermal conditions at 170°C (Shingfield et al., 2003). Peaks were identified based on retention time comparisons with the same FAME mixtures used for the analysis of feeds, other commercially available standards (Nu-Chek Prep.; Sigma-Aldrich; and Larodan), cross referencing with chromatograms reported in the literature (Shingfield et al., 2003; Halmemies-Beauchet-Filleau et al., 2011) and comparison with reference samples for which the FA composition was determined based on gas chromatography analysis of FAME and GC-MS analysis of corresponding 4,4-dimethyloxazoline derivatives (Bichi et al., 2013b).

### 2.3.3. Mammary tissue. RNA Isolation and Quantitative PCR

Total RNA from the mammary secretory tissue was isolated and purified (PureLink RNA Mini kit, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) as described in Bonnet et al. (2013), with the exception that the tissue was homogenized using a bead beater (Mini-bead Beater-8, BioSpec Products, Bartlesville, OK, USA). The concentration and purity of RNA was determined by spectrophotometry using a Nano-Drop

ND-1000 spectrophotometer (Nano-Drop Technologies, Wilmington, DE, USA), and the RNA integrity by capillary electrophoresis (Agilent 2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies Inc.). The average RNA integrity number (RIN) of the samples was  $8.1 \pm 0.46$ . For quantitative PCR (qPCR) analysis, cDNA was synthesized using the High Capacity RNA-to-cDNA kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and the lack of DNA contamination was verified by a PCR amplification using *ACTB* primers flanking an intron (Supplementary Table S1). The qPCR was carried out (Bonnet et al., 2013) using a 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) and specific primers for the main candidate genes and transcription factors involved in mammary lipogenesis. These genes are described in Table 2 and were selected on the basis of previous works on lipid metabolism in ruminants (*e.g.*, Bernard et al., 2008; Bauman et al., 2011; Ma and Corl, 2012). To account for variations in RNA integrity and quantification and cDNA synthesis, mRNA abundance was normalized using the geometric mean of 3 reference genes (Table 2), which have been identified as suitable internal controls (Bionaz and Looor, 2007; Bonnet et al., 2013) and were confirmed as the most stable genes among those quantified using the geNorm procedure (Vandesompele et al., 2002). The primer sequences and qPCR performance are shown in Supplementary Tables S1 and S2, respectively. The abundance of gene transcripts was expressed as the  $\log_2$  value of mRNA copy number relative to the geometric mean of the 3 reference genes.

#### **2.4. Statistical analysis**

All statistical analyses were performed using the SAS software package (version 9.4, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). After the second biopsies, 2 animals from each group were removed from the assay because they showed a slow recovery. Animal performance, milk FA composition, and mammary mRNA abundances of candidate genes ( $\log_2$ -transformed values) were analyzed for repeated measures using PROC MIXED.

Table 2. *Candidate genes studied in the mammary tissue of experimental ewes.*

Metabolic pathway	Gene symbol	Gene name
Fatty acid activation	<i>ACSS1</i>	Acyl-CoA synthetase short-chain family member 1
<i>De novo</i> fatty acid synthesis	<i>ACACA</i> <i>FASN</i>	Acetyl-CoA carboxylase alpha Fatty acid synthase
Uptake and intracellular transport of fatty acids	<i>LPL</i> <i>CD36</i> <i>FABP3</i>	Lipoprotein lipase CD36 molecule Fatty acid-binding protein 3
$\Delta^9$ -desaturation of fatty acids	<i>SCD1</i>	Stearoyl-CoA desaturase (delta-9-desaturase)
Esterification of fatty acids to glycerol	<i>GPAM</i> <i>DGAT1</i> <i>AGPAT6</i> <i>LPIN1</i>	Glycerol-3-phosphate acyltransferase, mitochondrial Diacylglycerol O-acyltransferase 1 1-Acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 6 Lipin 1
Lipid droplet formation	<i>XDH</i>	Xanthine dehydrogenase
Regulation of transcription	<i>SREBF1</i> <i>INSIG1</i> <i>SCAP</i> <i>THRSP</i> <i>PPARG</i>	Sterol regulatory element binding transcription factor 1 Insulin induced gene 1 SREBF chaperone Thyroid hormone responsive Peroxisome proliferator activated receptor gamma
Reference genes	<i>PPIA</i> <i>UXT</i> <i>EIF3K</i>	Peptidylprolyl isomerase A Ubiquitously expressed prefoldin like chaperone Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit K

For each variable, the covariance structure (*e.g.*, compound symmetric, first-order autoregressive, heterogeneous first-order autoregressive, first-order antedependence, or unstructured) was selected on the basis of Schwarz's Bayesian information model fit criterion. The statistical model included the fixed effects of diet, sampling time, their interaction, and the pretreatment record (*i.e.*, d 0 for animal performance and milk FA composition and d -13 for gene mRNA abundances) as a covariate. When the P-value for the interaction of diet x sampling time was <0.10, a previously defined orthogonal contrast (FO-d30 *vs.* Control-d7 + Control-d30 + FO-d7 for animal performance and milk FA composition data, and FO-d31 *vs.* Control-d8 + Control-d31 + FO-d8 for mammary mRNA abundance data) was used to test that the effect of FO supplementation was not detected early (d 7–8) but late (d 30–31) during the feeding period. Differences were declared significant at  $P < 0.05$  and considered a trend toward significance at  $P < 0.10$ , and least squares means (adjusted for the covariance) are reported throughout.

### 3. RESULTS

#### 3.1. Animal Performance and Milk Composition

Fish oil supplementation had no effect on DMI and milk yield, but significantly modified milk composition (Table 3). Compared with the control, reductions in milk fat concentration and yield were not detected on d 7, but reached up to 25 and 22%, respectively, on d 30. The milk protein content also tended to be decreased by FO, but to a lower extent (-6%) and on both sampling days. Time exerted a negative effect on milk yield.

#### 3.2. Milk FA Composition

Addition of fish oil to the diet had a marked influence on milk FA composition (Table 4 and Supplementary Table S3). Variations in relative proportions of FA derived from mammary uptake were generally more relevant than those observed



Table 3. Intake, and milk yield and composition in lactating ewes fed a TMR without lipid supplementation (control) or supplemented with 17 g of fish oil/kg DM (FO).

	Pre-treatment <sup>1</sup>		Day 7		Day 30		SED <sup>2</sup>	P <sup>3</sup>			Contrast <sup>4</sup>
	Control	FO	Control	FO	Control	FO		D	T	D × T	
DMI, g/d	3,375	3,465	3,390	3,281	3,308	3,107	198.3	0.221	0.313	0.710	
Milk, g/d	2,535	2,552	2,564	2,701	2,089	2,172	199.2	0.362	0.002	0.834	
Fat, %	5.92	5.77	5.89	5.90	5.98	4.51	0.054	0.062	0.065	0.043	0.005
g/d	150.5	146.9	151.0	159.0	125.4	97.5	11.33	0.156	0.002	0.041	<0.001
Protein, %	5.26	5.21	5.26	5.00	5.39	5.08	0.158	0.065	0.110	0.614	
g/d	133.7	132.4	135.2	135.4	112.3	108.4	20.92	0.879	0.067	0.865	

<sup>1</sup>Data collected on d 0.

<sup>2</sup>SED = standard error of the difference.

<sup>3</sup>Probability of significant effects due to diet (D), time (T), and their interaction (D × T).

<sup>4</sup>Probability of the orthogonal contrast: FO-d30 vs. Control-d7 + Control-d30 + FO-d7.

Table 4. Milk FA composition in lactating ewes fed a TMR without lipid supplementation (control) or supplemented with 17 g of fish oil/kg DM (FO) (data on additional FA are reported in Supplementary Table S3).

FA (g/100 g of total FA)	Pre-treatment <sup>1</sup>		Day 7		Day 30		SED <sup>2</sup>	P <sup>3</sup>			Contrast <sup>4</sup>
	Control	FO	Control	FO	Control	FO		D	T	D × T	
4:0	3.00	2.90	2.80	2.50	2.85	2.72	0.111	0.034	0.046	0.175	
6:0	2.73	2.68	2.65	2.81	2.69	2.95	0.130	0.138	0.011	0.080	0.022
8:0	2.97	3.00	3.02	3.54	3.03	3.48	0.214	0.039	0.626	0.536	
10:0	10.58	11.22	10.96	12.37	10.89	11.56	0.601	0.108	0.010	0.020	0.714
<i>cis</i> -9 10:1	0.28	0.25	0.29	0.27	0.32	0.32	0.019	0.558	0.004	0.666	
12:0	6.65	7.25	7.21	7.34	6.84	6.72	0.400	0.996	0.002	0.247	
<i>cis</i> -9 12:1	0.11	0.11	0.13	0.11	0.14	0.10	0.012	0.039	0.677	0.638	
14:0	12.69	12.95	13.01	11.72	13.01	11.77	0.411	0.001	0.936	0.927	
<i>cis</i> -9 14:1	0.21	0.20	0.22	0.17	0.24	0.20	0.025	0.019	0.132	0.707	
16:0	27.09	25.72	26.72	24.66	25.78	25.16	1.274	0.182	0.760	0.338	
<i>cis</i> -9 16:1	0.70	0.61	0.74	0.90	0.79	1.06	0.097	0.028	0.056	0.233	
<i>trans</i> -9 16:1	0.08	0.07	0.08	0.37	0.08	0.26	0.082	0.005	0.298	0.247	
18:0	6.43	6.93	6.00	2.12	6.05	1.65	0.327	<0.001	0.443	0.242	
<i>cis</i> -9 18:1 <sup>5</sup>	12.32	11.54	11.18	7.39	12.07	6.32	0.677	<0.001	0.839	0.058	<0.001
<i>cis</i> -11 18:1	0.79	0.76	0.73	0.98	0.78	1.06	0.085	0.001	0.265	0.745	
<i>trans</i> -10 18:1	0.19	0.24	0.36	0.62	0.38	2.78	0.675	0.031	0.004	0.005	<0.001
<i>trans</i> -11 18:1	1.08	0.97	1.13	5.65	1.19	4.40	0.510	<0.001	0.053	0.037	<0.001
10- + 13-oxo-18:0	<0.01	<0.01	<0.01	0.23	<0.01	0.37	0.505	<0.001	0.057	0.073	<0.001
<i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12 18:2	2.46	2.50	2.39	2.02	2.41	1.92	0.137	0.004	0.512	0.340	
<i>cis</i> -9 <i>trans</i> -12 18:2	0.07	0.06	0.07	0.08	0.07	0.09	0.009	0.079	0.308	0.073	0.026
<i>cis</i> -9 <i>trans</i> -13 18:2	0.17	0.17	0.17	0.24	0.18	0.26	0.025	0.002	0.348	0.768	
<i>cis</i> -9 <i>trans</i> -14 18:2	0.07	0.08	0.07	0.05	0.07	0.04	0.008	0.010	0.232	0.663	

(continued)

Table 4. (continued)

FA (g/100 g of total FA)	Pre-treatment <sup>1</sup>		Day 7		Day 30		SED <sup>2</sup>	P <sup>3</sup>			Contrast <sup>4</sup>
	Control	FO	Control	FO	Control	FO		D	T	D × T	
<i>trans</i> -9 <i>cis</i> -12 18:2	0.02	0.02	0.03	0.07	0.03	0.08	0.009	<0.001	0.418	0.304	
<i>trans</i> -11 <i>cis</i> -15 18:2	0.07	0.07	0.08	0.36	0.07	0.38	0.054	<0.001	0.731	0.615	
<i>cis</i> -9 <i>trans</i> -11 CLA <sup>6</sup>	0.54	0.44	0.51	2.28	0.53	2.28	0.307	<0.001	0.938	0.920	
<i>trans</i> -9 <i>cis</i> -11 CLA	0.03	0.03	0.03	0.12	0.04	0.16	0.021	0.001	0.008	0.033	<0.001
<i>trans</i> -10 <i>cis</i> -12 CLA	<0.01	<0.01	<0.01	0.02	<0.01	0.02	0.004	<0.001	0.688	0.647	
<i>trans</i> -11 <i>cis</i> -13 CLA	0.01	0.02	0.01	0.04	0.01	0.03	0.007	0.001	0.347	0.266	
other <i>trans,trans</i> CLA <sup>7</sup>	0.03	0.03	0.03	0.04	0.03	0.04	0.007	0.013	0.803	0.719	
18:3n-3	0.62	0.64	0.60	0.53	0.58	0.46	0.047	0.056	0.027	0.238	
20:5n-3	0.06	0.05	0.07	0.28	0.07	0.35	0.041	<0.001	0.203	0.239	
Σ unsaturated C20	0.33	0.34	0.33	0.97	0.40	0.99	0.099	<0.001	0.562	0.729	
22:5n-3	0.10	0.10	0.10	0.35	0.10	0.35	0.041	<0.001	0.863	0.956	
22:6n-3	0.05	0.05	0.04	0.78	0.03	0.99	0.107	<0.001	0.213	0.188	
Σ unsaturated C22	0.21	0.21	0.18	1.39	0.21	1.60	0.165	<0.001	0.320	0.478	

<sup>1</sup> Data collected on d 0.

<sup>2</sup>SED = standard error of the difference.

<sup>3</sup>Probability of significant effects due to diet (D), time (T), and their interaction (D × T).

<sup>4</sup>Probability of the orthogonal contrast: FO-d30 *vs.* Control-d7 + Control-d30 + FO-d7.

<sup>5</sup>Contains *trans*-13, -14 and -15 18:1 and *cis*-10 18:1 as minor components.

<sup>6</sup>Contains *trans*-8 *cis*-10 and *trans*-7 *cis*-9 CLA as minor components.

<sup>7</sup>Sum of *trans*-8 *trans*-10, *trans*-9 *trans*-11, *trans*-10 *trans*-12 and *trans*-11 *trans*-13 CLA.

in *de novo* synthesized FA, and most changes were already detected on d 7 and comparable on both sampling days. For example, concentrations of the antilipogenic *trans*-10 *cis*-12 CLA and other *trans* 18:2 intermediate metabolites, such as *trans*-9 *cis*-12 and *trans*-11 *cis*-15 18:2, or *cis*-9 *trans*-11, *trans*-11 *cis*-13 and *trans,trans* CLA, were increased several times compared with the control. These increases were similar on d 7 and 30. On the contrary, the large increment in *trans*-9 *cis*-11 CLA was greater at the end of the trial, in coincidence with a rise in *trans*-10 18:1 and a less pronounced increase in *trans*-11 18:1.

Notable variations in milk long-chain FA also included reductions in the major C18 FA, namely 18:0 and *cis*-9 18:1, which averaged 69 and 41%, respectively, as well as an increase in oxo-FA, which tended to be greater on d 30, and in *cis*-11 18:1. Similarly, the proportions of very long-chain n-3 PUFA (*i.e.*, 20:5n-3, 22:5n-3 and 22:6n-3) were augmented with this treatment, whereas the milk concentration of major PUFA in the control (namely, 18:2n-6 and 18:3n-3) was negatively affected by oil supplementation. The percentage of some short- and medium-chain FA in milk was also modified by the FO diet, with decreases in 4:0, *cis*-9 12:1, 14:0 and *cis*-9 14:1, and increases in 8:0, *cis*-9 16:1 and *trans*-9 16:1 that were comparable in both sampling days. However, the concentration of milk 10:0 was increased in the early stage of the treatment (d 7), and that of 6:0 tended to be higher at the end point (d 30). On a molar basis, FA with less than 16 carbons accounted for 43% of the reduction in milk fat yield with FO on d 30, and those with 18 or more carbon atoms for 27%, whereas the other 30% was explained by C16 FA (data not shown in Tables).

### 3.3. mRNA abundance of candidate genes

As shown in Table 5, the mRNA abundance of most candidate genes was affected by either diet or time. The lipogenic genes *ACACA*, *ACSS1* and *AGPAT6*, and the transcription factor *SREBF1* were downregulated in the mammary tissue of ewes fed FO. Also the abundance of *FABP3*, *LPL*, *SCD1* and *INSIG1* transcripts tended to be reduced by marine lipid supplementation. All these changes in gene

expression were already identified on d 8 and remained stable afterwards, whereas those of *FASN* were only detected on d 31. With regard to the effect of time on candidate gene expression, greater mRNA abundances of *PPARG1* and *THRSP* were found on d 31 compared with d 8, and the opposite behavior was observed for *ACSS1*, *DGAT1*, *GPAM*, *LPIN1*, *SCAP* and *SREBF1*.

#### 4. DISCUSSION

Dietary supplementation of dairy ewes with marine lipids is known to modulate milk FA composition towards a potentially healthier profile for consumers (Capper et al., 2007; Bichi et al., 2013b; Toral et al., 2016b). However, it induces MFD, which has a negative effect on ovine cheese making and hampers the implementation of this feeding strategy. Because the causative factors and mechanisms involved in this syndrome are still uncertain, like in dairy cows, MFD remains an active area of research (Hussein et al., 2013; Bionaz et al., 2015; Toral et al., 2015a).

In the present study, fish oil was used as a mean of experimentally decreasing milk fat concentration and yield in sheep, based on earlier reports indicating that this species is not prone to develop MFD with plant oils (Mele et al., 2006; Pulina et al., 2006; Castro-Carrera et al., 2015). This is probably the first but not the only difference when comparing this syndrome in ovine and bovine. As expected, feeding FO caused MFD, with a reduction in milk fat content (25% on d 30) that was within the range observed in lactating sheep consuming marine lipids (17-31%; Capper et al., 2007; Toral et al., 2010; Bichi et al., 2013b).

Table 5. mRNA relative abundance ( $\log_2$  transformed data) of candidate genes in mammary tissue of lactating ewes fed a TMR without lipid supplementation (control) or supplemented with 17 g of fish oil/kg DM (FO).

	Pre-treatment <sup>1</sup>		Day 8		Day 31		SED <sup>2</sup>	P <sup>3</sup>			Contrast <sup>4</sup>
	Control	FO	Control	FO	Control	FO		D	T	D × T	
Lipogenic genes											
ACACA	7.09	7.22	7.26	6.61	6.95	6.25	0.385	0.030	0.175	0.910	
ACSS1	7.72	7.80	7.77	7.30	7.61	6.54	0.228	0.015	0.031	0.101	
AGPAT6	6.91	7.52	7.50	6.96	7.53	6.54	0.266	0.004	0.274	0.211	
CD36	7.41	7.45	7.19	7.34	7.13	7.55	0.289	0.171	0.712	0.471	
DGAT1	6.91	6.82	6.81	6.82	6.56	6.34	0.198	0.502	0.011	0.293	
FABP3	6.88	7.38	6.67	6.45	7.10	5.88	0.729	0.066	0.885	0.295	
FASN	7.93	8.34	8.58	8.26	9.32	7.83	0.442	0.060	0.230	0.004	0.002
GPAM	6.88	7.08	6.64	6.87	6.18	6.50	0.310	0.106	0.068	0.829	
LPIN1	6.11	7.05	7.32	6.56	6.73	6.13	0.588	0.178	0.095	0.776	
LPL	6.92	7.10	7.31	6.81	7.08	6.51	0.304	0.054	0.116	0.803	
SCD1	7.17	7.02	7.40	6.97	7.53	6.69	0.326	0.054	0.549	0.138	
XDH	7.42	7.36	7.14	7.20	6.99	7.48	0.310	0.254	0.718	0.257	
Transcription factors											
INSIG1	7.10	7.35	7.40	6.43	6.86	6.19	0.488	0.057	0.158	0.556	
PPARG	6.91	7.07	6.39	6.46	6.82	6.78	0.204	0.927	0.015	0.663	
SCAP	6.93	7.10	6.85	6.92	6.41	6.53	0.246	0.540	0.026	0.877	
SREBF1	6.68	7.47	7.20	6.10	6.76	5.63	0.367	0.004	0.069	0.941	
THRSP	5.28	5.50	5.71	5.58	7.10	6.96	0.831	0.793	0.030	0.991	

<sup>1</sup>Data collected on d -13.

<sup>2</sup>SED = standard error of the difference.

<sup>3</sup>Probability of significant effect due to diet (D), time (T), and their interaction (D × T).

<sup>4</sup>Probability of the orthogonal contrast: FO-d31 vs. Control-d8 + Control-d31 + FO-d8.

The MFD syndrome has been defined in dairy cows as a reduction in milk fat synthesis with no change in the yield of milk and other components (Bauman et al., 2011). In dairy ewes, however, MFD is often accompanied by small decreases in milk protein concentration (approx. 5-7%; Toral et al., 2010, 2016b), which is consistent with our results. Mechanisms involved in milk protein depression might be speculated to be independent from those underlying the inhibition in lipogenesis, because reductions in protein content also occur in the absence of changes in milk fat synthesis when sheep receive lipid supplements (*e.g.*, Mele et al., 2006; Pulina et al., 2006). This is in agreement with our observations on d 7, when MFD had not been detected yet.

Another difference between dairy cows and sheep is that several nutritional assays in cows have shown a relationship between marine lipid-induced MFD and changes in mammary gene expression (*e.g.*, Ahnadi et al., 2002; Harvatine and Bauman, 2006; Angulo et al., 2012), whereas this link is not so clear in ewes. For instance, Bichi et al. (2013a) could not detect any significant relationship between the MFD observed in dairy sheep after 54 d of diet supplementation with microalgae and the mRNA abundance of the studied lipogenic genes. However, concurring with our results and based on findings by Invernizzi et al. (2010), the authors suggested that transcriptional regulation mechanisms could be established early during the feeding period.

In line with this, we observed higher contents of *trans*-10 *cis*-12 and *trans*-9 *cis*-11 18:2, two CLA isomers with confirmed or putative, respectively, antilipogenic properties after only 7 d on FO. Yet, these increments were lower than those reported to affect milk fat synthesis when administered separately (Perfield et al., 2007; Shingfield et al., 2010; Hussein et al., 2013). This contributes to its actual involvement in FO-induced MFD remaining uncertain and supports that other less well-known inhibitor FA might play a relevant role in the low-milk fat syndrome. In this regard, our results agree with recent reports that suggest a potential influence of *cis*-9 16:1, *cis*-11 18:1, and oxo-FA (Kairenius et al., 2015; Toral et al., 2015a, 2016b). Another FA being putatively involved in MFD (Alves and Bessa,

2014; Kairenius et al., 2015) is *trans*-10 *cis*-15 18:2. Under our chromatographic conditions, this intermediate probably coelutes with *trans*-11 *cis*-15 18:2 (Kairenius et al., 2015); the unresolved peak showing noticeable increases with FO.

Increments in these potentially antilipogenic FA were observed on d 7 and lasted until the end of the experiment. However, the higher concentration of *trans*-10 18:1 (an intermediate FA with yet-equivocal effects on lipogenesis; Kadegowda et al., 2009; Shingfield et al., 2010) only on d 30 is an exception to the general trend in the temporal pattern of milk FA responses. All these changes were inversely related with variations in the mRNA abundance of genes encoding key lipogenic enzymes, which supports a relationship between them (Gervais et al., 2009; Kadegowda et al., 2009; Hussein et al., 2013) and suggests that FO-induced MFD in dairy ewes would be mediated by downregulation of lipogenic genes. This mechanism, previously observed in other dairy ruminants (Shingfield et al., 2010; Bauman et al., 2011; Bionaz et al., 2015), would have tended to affect most studied metabolic pathways, including FA activation (*ACSS1*), *de novo* synthesis (*ACACA* and *FASN*), uptake and transport (*LPL* and *FABP3*), desaturation (*SCD1*) and esterification (*AGPAT6*).

The enzyme encoded by *ACACA* has been traditionally considered as responsible for the rate-limiting step in *de novo* lipogenesis (Bauman and Davis, 1974), but simultaneous decreases in the transcript abundance of this gene and *FASN* are common features of MFD (e.g., Ahnadi et al., 2002; Peterson et al., 2003; Hussein et al., 2013). Despite both genes would share common regulatory mechanisms (Bernard et al., 2008), reductions in *FASN* mRNA abundance were not observed on the early stage of the treatment.

*De novo* FA synthesis might have also been limited by the lower mRNA abundance of *ACSS1*, indirectly involved in this metabolic pathway through acetate activation. Although the available information on this gene in lactating ruminants is scant and inconsistent (Mach et al., 2011; Hussein et al., 2013), our results suggest its implication in fish oil-induced MFD in dairy ewes.



Among the candidate genes codifying for enzymes responsible for FA uptake, *LPL* has received a great deal of attention. Available data suggest that, under feeding conditions increasing milk long-chain FA yield (e.g., the addition of plant oils to the diet of small ruminants; Bernard et al., 2008; Castro-Carrera et al., 2015), *LPL* transcript abundance would not be limiting. However, downregulation of this lipogenic gene has been consistently associated with decreases in milk fat synthesis (Harvatine and Bauman, 2006; Angulo et al., 2012; Hussein et al., 2013), which agrees with our results and supports a role in ovine MFD.

Little and erratic information exists about other genes potentially involved in mammary FA uptake and transport in ruminants, such as *CD36* or *FABP3*. The stability of *CD36* transcript abundance observed in the FO treatment as well as in a variety of other feeding conditions (Invernizzi et al., 2010; Hussein et al., 2013; Castro-Carrera et al., 2015) might reflect a low relevance in the transcriptional mechanisms mediating diet-induced changes in lipogenesis. On the other hand, and despite the co-expression of *CD36* and *FABP3* in the bovine mammary gland (Spitsberg et al., 1995), we detected a tendency to a lower mRNA abundance of *FABP3* with FO, which may indicate a possible involvement in marine lipid-induced MFD in ewes. This contrasts with the increase reported by Invernizzi et al. (2010) in cows suffering MFD caused by the consumption of FO and soybean oil, and also with the lack of variation in ovine CLA-induced MFD (Hussein et al., 2013).

Following the pathways of milk fat synthesis in the mammary epithelial cell, prior to the synthesis of milk triacylglycerols, some FA can be subjected to the action of  $\Delta^9$ -desaturase, an enzyme that deserves particular attention due to its key role in milk fat composition (Bernard et al., 2013; Toral et al., 2015b). The nutritional regulation of *SCD1* gene expression involves complex interactions between dietary factors and regulatory events that have not been well characterized yet (Bernard et al., 2013). Still, consistent with our results, a number of studies have shown a downregulation of *SCD1* during MFD induced by marine and plant lipid supplementation (Ahnadi et al., 2002; Peterson et al., 2003; Angulo

et al., 2012) or CLA administration (Baumgard et al., 2002; Gervais et al., 2009), the latter not only in cows but also in dairy ewes (Hussein et al., 2013). Increases in 20:5n-3 and *trans*-10 *cis*-12 CLA, which were observed from the early stage of FO treatment, might have been involved in this inhibition (Kadegowda et al., 2009; Bernard et al., 2013).

Due to the diet-induced differences in the availability of *cis*-9-containing FA and substrates for mammary  $\Delta^9$ -desaturation, it was not possible to associate the tendency to a downregulation of *SCD1* with systematic reductions in its product milk concentrations. However, the inhibition might have contributed to a further decline in the already low *cis*-9 18:1 milk content derived from the shortage of 18:0 of ruminal origin (Shingfield et al., 2003; Toral et al., 2016b). Decreases in these FA have been linked to altered milk fat fluidity and tentatively to the negative impact of marine lipids on mammary lipogenesis (Gama et al., 2008; Shingfield et al., 2010; Bichi et al., 2013b), although some recent results in dairy ewes (Toral et al., 2016b) question its relevance. In any event, it is probably worth mentioning that Bionaz and Looor (2008) speculated that *FABP3* would provide 18:0 to the SCD, which would worsen the situation in our study.

The last steps of milk fat synthesis include esterification of FA to glycerol and secretion of milk fat globules. Among the studied candidate genes (*i.e.*, *GPAM*, *AGPAT6*, *DGAT1*, *LPIN1* and *XDH*), the lack of variation in *DGAT1* transcript abundance during MFD (Invernizzi et al., 2010; Bichi et al., 2013a; Hussein et al., 2013) agrees with our findings and is probably explained by its known post-transcriptional regulation (Bernard et al., 2008). Conversely, the reduction in *AGPAT6* mRNA abundance with FO, in line with previous reports (Baumgard et al., 2002; Peterson et al., 2003; Hussein et al., 2013), would suggest a greater relevance of transcriptional regulating mechanisms. Based on our results and on inconsistent changes detected in response to diet-induced MFD (Peterson et al., 2003; Invernizzi et al., 2010; Hussein et al., 2013), this link appears less clear for *GPAM*, *LPIN1* and *XDH*. Reasons for the specific downregulation of *AGPAT6* in ewes fed FO are not clear but its greater affinity for short- and medium-chain

saturated FA (Bernard et al., 2008) leaves room for speculation about a relationship with the inhibition of *de novo* lipogenesis.

Overall, the coordinated nature in all these lipogenic gene changes support the involvement of a central regulator of milk fat synthesis (Bernard et al., 2008; Shingfield et al., 2010; Bauman et al., 2011). The *SREBF1* and *PPARG* transcription factors seem to play a prominent nutrigenomic role through different mechanisms (Bionaz et al., 2015). Thus, *PPARG*-mediated effects in gene expression does not necessarily involve variations in its mRNA abundance (Kadegowda et al., 2009; Shi et al., 2013), whereas downregulation of *SREBF1* is frequently detected during MFD induced by CLA (Gervais et al., 2009; Hussein et al., 2013) or marine lipid supplementation (Harvatine and Bauman, 2006; Invernizzi et al., 2010; Angulo et al., 2012), as observed in our study. Furthermore, there may be complex interactions between them: *PPARG* could partly control the expression of *SREBF1*, which in turn could affect the activity of *PPARG* by increasing the production of its natural agonists (Bionaz et al., 2015).

Other transcription factors, such as *INSIG1* and *SCAP*, are known to be involved in *SREBF1* activation to its mature form (the nuclear SREBP1; Sakai et al., 1998; Yang et al., 2002). So far, no clear association between lipid supplementation and changes in *SCAP* transcript abundance has been demonstrated, in contrast to diet-induced changes in both *INSIG* and *SREBF1* mRNA abundances during MFD (Harvatine and Bauman, 2006; Mach et al., 2011; Hussein et al., 2013), which concurs with our observations. Reduced *SREBF1* transcript abundance in ewes fed FO may be indicative of an inhibition of SREBP1 signaling pathway and of its target genes (Bernard et al., 2008; Ma and Corl, 2012), which could contribute to explain the negative effects of FO on the expression of a large number of our candidate genes, including *ACACA*, *FASN*, *LPL*, *FABP3* and *SCD1*.

Concerning *THRSP*, although there is evidence indicating that this gene acts as a relevant transcriptional regulator in the mammary responses to antilipogenic FA in bovine (Bauman et al., 2011), neither our results nor the little available information in dairy ewes (Bichi et al., 2013a; Hussein et al., 2013) allow to confirm

a similar role in this species. Further research is necessary to elucidate whether observed differences are attributable to interspecies features in the transcriptional regulation of mammary lipogenic genes or in the ruminal metabolism of PUFA (Shingfield et al., 2010; Toral et al., 2016a).

Finally, it is probably worth mentioning that our results do not allow to conclude a causative relationship between downregulation and lower milk fat synthesis. In fact, some of the enzymes encoded by the candidate genes that we studied might be no longer necessary during MFD, or not as much, and therefore their inhibition might be a consequence of rather than a cause for the low-milk fat syndrome. This would also merit further investigation.

## 5. CONCLUSIONS

Reductions in milk fat concentration and yield in dairy ewes consuming 1.7% DM of fish oil were not detected on d 7 but reached up to 25 and 22%, respectively, after 30 d on the diet. However, increases in potentially antilipogenic FA in milk already appeared on the early stage of treatment and lasted until the end of the feeding period. These increments were accompanied by decreases in the mRNA abundance of candidate genes encoding key lipogenic enzymes, which supports a relationship between them and suggests that FO-induced milk fat depression in dairy ewes would be mediated by transcriptional mechanisms. The coordinated nature of the downregulation, which tended to affect most studied metabolic pathways, including FA activation (*ACSS1*), *de novo* synthesis (*ACACA* and *FASN*), uptake and transport (*LPL* and *FABP3*), desaturation (*SCD1*) and esterification (*AGPAT6*), suggests the involvement of a central regulator of milk fat synthesis. Without ruling out the potential contribution of *PPARG*, our results suggest that the *SREBF1* transcription factor might play a relevant role in the MFD syndrome in lactating sheep fed FO.

## 6. REFERENCES

- Ahnadi, C. E., Beswick, N., Delbecchi, L., Kennelly, J. J., and Lacasse, P. 2002. Addition of fish oil to diets for dairy cows. II. Effects on milk fat and gene expression of mammary lipogenic enzymes. *J. Dairy Res.* 69:521-531.
- Alves, S. P., and Bessa, R. J. B. 2014. The *trans*-10,*cis*-15 18:2: a missing intermediate of *trans*-10 shifted rumen biohydrogenation pathway? *Lipids* 49:527-541.
- Angulo, J., Mahecha, L., Nuernberg, K., Nuernberg, G., Dannenberger, D., Olivera, M., Boutinaud, M., Leroux, C., Albrecht, E., and Bernard, L. 2012. Effects of polyunsaturated fatty acids from plant oils and algae on milk fat yield and composition are associated with mammary lipogenic and *SREBF1* gene expression. *Animal* 6:1961-1972.
- Bauman, D. E., and Davis, C. L. 1974. Biosynthesis of milk fat. In: *Lactation: A Comprehensive Treatise*. Vol. 2. B. L. Larson and V. R. Smith, ed. Academic Press, New York, NY, USA, pp: 31-75.
- Bauman, D. E., and Griinari, J. M. 2001. Regulation and nutritional manipulation of milk fat: low-fat milk syndrome. *Livest. Prod. Sci.* 70:15-29.
- Bauman, D. E., Harvatine, K. J., and Lock, A. L. 2011. Nutrigenomics, rumen-derived bioactive fatty acids, and the regulation of milk fat synthesis. *Ann. Rev. Nutr.* 31:299-319.
- Baumgard, L. H., Matitashvili, E., Corl, B. A., Dwyer, D. A., and Bauman, D. E. 2002. *Trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid decreases lipogenic rates and expression of genes involved in milk lipid synthesis in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 85:2155-2163.
- Bernard, L., Leroux, C., and Chilliard, Y. 2008. Expression and nutritional regulation of lipogenic genes in the ruminant lactating mammary gland. *Adv. Exp. Med. Biol.* 606:67-108.
- Bernard, L., Leroux, C., and Chilliard, Y. 2013. Expression and nutritional regulation of stearoyl-CoA desaturase genes in the ruminant mammary gland: Relationship with milk fatty acid composition. In: *Stearoyl-CoA Desaturase Genes in Lipid Metabolism*. Ntambi, J. M. (ed.) Springer Science+Business Media, New York, NY, USA, pp: 161-193.
- Bichi, E., Frutos, P., Toral, P. G., Keisler, D., Hervás, G., and Loor, J. J. 2013a. Dietary marine algae and its influence on tissue gene network expression during milk fat depression in dairy ewes. *Anim. Feed Sci. Technol.* 186:36-44.
- Bichi, E., Hervás, G., Toral, P. G., Loor, J. J., and Frutos, P. 2013b. Milk fat depression induced by dietary marine algae in dairy ewes: Persistency of milk fatty acid composition and animal performance responses. *J. Dairy Sci.* 96:524-532.
- Bionaz, M., and Loor, J. J. 2007. Identification of reference genes for quantitative real-time PCR in the bovine mammary gland during the lactation cycle. *Physiol. Genomics* 29:312-319.
- Bionaz, M., and Loor, J. J. 2008. Gene networks driving bovine milk fat synthesis during the lactation cycle. *BMC Genomics* 9:366.
- Bionaz, M., Osorio, J., and Loor, J. J. 2015. Nutrigenomics in dairy cows: Nutrients, transcription factors, and techniques. *J. Anim. Sci.* 93:5531-5553.

- Bonnet, M., Bernard, L., Bes, S., and Leroux, C. 2013. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR normalisation in adipose tissue, muscle, liver and mammary gland from ruminants. *Animal* 7:1344-1353.
- Capper, J. L., Wilkinson, R. G., Mackenzie, A. M., and Sinclair, L. A. 2007. The effect of fish oil supplementation of pregnant and lactating ewes on milk production and lamb performance. *Animal* 1:889-898.
- Castro-Carrera, T., Frutos, P., Leroux, C., Chilliard, Y., Hervás, G., Belenguer, A., Bernard, L., and Toral, P. G. 2015. Dietary sunflower oil modulates milk fatty acid composition without major changes in adipose and mammary tissue fatty acid profile or related gene mRNA abundance in sheep. *Animal* 9:582-591.
- Dervishi, E., Joy, M., Sanz, A., Álvarez-Rodríguez, J., Molino, F., and Calvo, J. H. 2012. Forage preservation (grazing vs. hay) fed to ewes affects the fatty acid profile of milk and *CPT1B* gene expression in the sheep mammary gland. *BMC Vet. Res.* 8:106.
- Gama, M. A. S., Garnsworthy, P. C., Griinari, J. M., Leme, P. R., Rodrigues, P. H. M., Souza, L. W. O., and Lanna, D. P. D. 2008. Diet-induced milk fat depression: Association with changes in milk fatty acid composition and fluidity of milk fat. *Livest. Sci.* 115:319-331.
- Gervais, R., McFadden, J. W., Lengi, A. J., Corl, B. A., and Chouinard, P. Y. 2009. Effects of intravenous infusion of *trans*-10, *cis*-12 18:2 on mammary lipid metabolism in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 92:5167-5177.
- Halmemies-Beauchet-Filleau, A., Kokkonen, T., Lampi, A. M., Toivonen, V., Shingfield, K. J., and Vanhatalo, A. 2011. Effect of plant oils and camelina expeller on milk fatty acid composition in lactating cows fed diets based on red clover silage. *J. Dairy Sci.* 94:4413-4430.
- Harvatine, K. J., and 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. *J. Nutr.* 136:2468-2474.
- Hussein, M., Harvatine, K. H., Weerasinghe, W. M. P. B., Sinclair, L. A., and Bauman, D. E. 2013. Conjugated linoleic acid-induced milk fat depression in lactating ewes is accompanied by reduced expression of mammary genes involved in lipid synthesis. *J. Dairy Sci.* 96:3825-3834.
- Invernizzi, G., Thering, B. J., McGuire, M. A., Savoini, G., and Loor, J. J. 2010. Sustained upregulation of stearoyl-CoA desaturase in bovine mammary tissue with contrasting changes in milk fat synthesis and lipogenic gene networks caused by lipid supplements. *Funct. Integr. Genomics* 10:561-575.
- ISO. 1999a. Animal feeding stuffs - Determination of moisture and other volatile matter content. Standard 6496:1999. International Organisation for Standardisation (ISO), Geneva, Switzerland.
- ISO. 1999b. Whole milk - Determination of milkfat, protein and lactose content - Guidance on the operation of mid-infrared instruments. Standard 9622:1999. International Organisation for Standardisation (ISO), Geneva, Switzerland.
- ISO. 2002. Animal feeding stuffs - Determination of crude ash. Standard 5984:2002. International Organisation for Standardisation (ISO), Geneva, Switzerland.
- ISO. 2009. Animal feeding stuffs - Determination of nitrogen content and calculation of crude protein content - Part 2: Block digestion and steam distillation method. Standard

- 5983-2:2009. International Organisation for Standardisation (ISO), Geneva, Switzerland.
- Kadegowda, A. K. G., Bionaz, M., Piperova, L. S., Erdman, R. A., and Loor, J. J. 2009. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation and long-chain fatty acids alter lipogenic gene networks in bovine mammary epithelial cells to various extents. *J. Dairy Sci.* 92:4276-4289.
- Kairenius, P., Ärölä, A., Leskinen, H., Toivonen, V., Ahvenjärvi, S., Vanhatalo, A., Huhtanen, P., Hurme, T., Griinari, J. M., and Shingfield, K. J. 2015. Dietary fish oil supplements depress milk fat yield and alter milk fatty acid composition in lactating cows fed grass silage based diets. *J. Dairy Sci.* 98:5653-5672.
- Ma, L., and Corl, B. A. 2012. Transcriptional regulation of lipid synthesis in bovine mammary epithelial cells by sterol regulatory element binding protein-1. *J. Dairy Sci.* 95:3743-3755.
- Mach, N., Jacobs, A. A. A., Kruijt, L., van Baal, J., and Smits, M. A. 2011. Alteration of gene expression in mammary gland tissue of dairy cows in response to dietary unsaturated fatty acids. *Animal* 5:1217-1230.
- Mele, M., Buccioni, A., Petacchi, F., Serra, A., Banni, S., Antongiovanni, M., and Secchiari, P. 2006. Effect of forage/concentrate ratio and soybean oil supplementation on milk yield, and composition from Sarda ewes. *Anim. Res.* 55:273-285.
- Perfield, J. W., Lock, A. L., Griinari, J. M., Saebo, A., Delmonte, P., Dwyer, D. A., and Bauman, D. E. 2007. *Trans*-9, *cis*-11 conjugated linoleic acid reduces milk fat synthesis in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90:2211-2218.
- Peterson, D. G., Matitashvili, E. A., and Bauman, D. E. 2003. Diet-induced milk fat depression in dairy cows results in increased *trans*-10, *cis*-12 CLA in milk fat and coordinate suppression of mRNA abundance for mammary enzymes involved in milk fat synthesis. *J. Nutr.* 133:3098-3102.
- Pulina, G., Nudda, A., Battacone, G., and Cannas, A. 2006. Effects of nutrition on the contents of fat, protein, somatic cells, aromatic compounds, and undesirable substances in sheep milk. *Anim. Feed Sci. Technol.* 131:255-291.
- Sakai, J., Nohturfft, A., Goldstein, J. L., and Brown, M. S. 1998. Cleavage of sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs) at site-1 requires interaction with SREBP cleavage-activating protein. Evidence from *in vivo* competition studies. *J. Biol. Chem.* 273:5785-5793.
- Shi, H. B., Luo, J., Yao, D. W., Zhu, J. J., Xu, H. F., Shi, H. P., and Loor, J. J. 2013. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma stimulates the synthesis of monounsaturated fatty acids in dairy goat mammary epithelial cells via the control of stearyl-coenzyme A desaturase. *J. Dairy Sci.* 96:7844-7853.
- Shingfield, K. J., Ahvenjärvi, S., Toivonen, V., Ärölä, A., Nurmela, K. V. V., Huhtanen, P., and Griinari, J. M. 2003. Effect of dietary fish oil on biohydrogenation of fatty acids and milk fatty acid content in cows. *Anim. Sci.* 77:165-179.
- Shingfield, K. J., Bernard, L., Leroux, C., and Chilliard, Y. 2010. Role of *trans* fatty acids in the nutritional regulation of mammary lipogenesis in ruminants. *Animal* 4:1140-1166
- Shingfield, K. J., Bonnet, M., and Scollan, N. D. 2013. Recent developments in altering the fatty acid composition of ruminant-derived foods. *Animal* 7S1:132-162.

- Spitsberg, V. L., Matitashvili, E., and Gorewit, R. C. 1995. Association and coexpression of fatty-acid-binding protein and glycoprotein CD36 in the bovine mammary-gland. *Eur. J. Biochem.* 230:872-878.
- Sukhija, P. S., and Palmquist, D. L. 1988. Rapid method for determination of total fatty-acid content and composition of feedstuffs and feces. *J. Agric. Food Chem.* 36:1202-1206.
- Toral, P. G., Bernard, L., Belenguer, A., Rouel, J., Hervás, G., Chilliard, Y., and Frutos, P. 2016a. Comparison of ruminal lipid metabolism in dairy cows and goats fed diets supplemented with starch, plant oil, or fish oil. *J. Dairy Sci.* 99:301-316.
- Toral, P. G., Bernard, L., Delavaud, C., Gruffat, D., Leroux, C., and Chilliard, Y. 2013. Effects of fish oil and additional starch on tissue fatty acid profile and lipogenic gene mRNA abundance in lactating goats fed a diet containing sunflower-seed oil. *Animal* 7:948-956.
- Toral, P. G., Hervás, G., Carreño, D., Belenguer, A., and Frutos, P. 2015a. Comparison of milk fatty acid responses during fish oil- and *trans*-10 *cis*-12 18:2-induced milk fat depression in dairy ewes. *Anim. Feed Sci. Technol.* 210:66-73.
- Toral, P. G., Hervás, G., Carreño, D., and Frutos, P. 2016b. Does supplemental 18:0 alleviate fish oil-induced milk fat depression in dairy ewes? *J. Dairy Sci.* 99:1133-1144.
- Toral, P. G., Hervás, G., and Frutos, P. 2015b. Reductions in milk  $\Delta$ 9-desaturation ratios to oral dosing of cobalt-acetate are accompanied by the downregulation of *SCD1* in lactating ewes. *J. Dairy Sci.* 98:1961-1971.
- Toral, P. G., Frutos, P., Hervás, G., Gómez-Cortés, P., Juárez, M., and de la Fuente, M. A. 2010. Changes in milk fatty acid profile and animal performance in response to fish oil supplementation, alone or in combination with sunflower oil, in dairy ewes. *J. Dairy Sci.* 93:1604-1615.
- Tsiplakou, E., Flemetakis, E., Kalloniati, C., Papadomichelakis, G., Katinakis, P., and Zervas, G. 2009. Sheep and goats differences in CLA and fatty acids milk fat content in relation with mRNA stearoyl-CoA desaturase and lipogenic genes expression in their mammary gland. *J. Dairy Res.* 76:392-401.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., and Speleman, F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* 3:RESEARCH0034.
- Yang, T., Espenshade, P. J., Wright, M. E., Yabe, D., Gong, Y., Aebersold, R., Goldstein, J. L., and Brown, M. S. 2002. Crucial step in cholesterol homeostasis: sterols promote binding of SCAP to INSIG-1, a membrane protein that facilitates retention of SREBPs in ER. *Cell* 110:489-500.



## 7. SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary Table S1. *Primer sequences used for qPCR analysis.*

Gene	Accession#	Primers <sup>1</sup>	Nucleotide sequence (5' → 3')	Source
<i>ACACA</i>	NM_001009256.1	F.2201 R.2319	ACCATGCTGGGAGTTGTCTGT AGAAGTGTATGAGCAGAGAGGACTTG	Bichi et al., 2013
<i>ACSS1</i>	DQ272257.1	F.197 R.303	CGAAGCCATAAAGATCTGTCCAT CCATCTCCTGCTCAAGAGAAACA	Bichi et al., 2013
<i>AGPAT6</i>	XM_004021798.1	F.1156 R.1256	ACTTCCATTACATCAGCCTGAGGC CGTGAAAGCGAGAGCTATCCTG	Adapted from Hussein et al., 2013
<i>CD36</i>	XM_005205326.1	F.1914 R.2099	ACAGATGTGGCTTGAGCGTG ACTGGGTCTGTGTTTTGCAGG	Bernard et al., 2012
<i>DGAT1</i>	NM_001110164.1	F.178 R.299	CACTGGGACCTGAGGTGTCA AACCGTGCCTGCTTAAGATC	Hussein et al., 2013
<i>FABP3</i>	AY157617.1	F.1954 R.2054	AGGGCAAGAACCCCAATTTAA CTCATTCCCATTCTCTAGTTTTTG	Bichi et al., 2013
<i>FASN</i>	CR552737	F.6383 R.6474	ACCTCGTGAAGGCTGTGACTCA TGAGTCGAGGCCAAGGTCTGAA	Kadegowda et al., 2009
<i>GPAM</i>	NM_001012282	F.2161 R.2330	ACCAGCAGTTCATCACCTTC GTACACGGCAACCCTCCTCT	Faulconnier et al., 2011
<i>LPIN1</i>	NM_001280700.1	F.2041 R.2141	TGGCCACCAGAATAAAGCATG GCTGACGCTGGACAACAGG	Bionaz and Loor, 2008
<i>LPL</i>	NM_001009394	F.942 R.1041	TGGAGATGTGGACCAGCTAGTG CCGGTAGGCCTTACTTGGATT	Bichi et al., 2013

(continued)

Supplementary Table S1. (continued)

Gene	Accession#	Primers <sup>1</sup>	Nucleotide sequence (5' → 3')	Source
<i>SCD1</i>	FJ513370	F.1100 R.1200	GATGACATCTATGACCCAACTTACCA CCCAAGTGTAACAGACCCATGA	Bichi et al., 2013
<i>XDH</i>	EF529448.1	F.631 R.730	GCTCGAGCTCAGCACACAGA TGAACCTTGCCACACAGGCATT	Bichi et al., 2013
<i>INSIG1</i>	XM_004008186.1	F.370 R.466	GTCATCGCCACCATCTTCTC GACTGTCGATGCAGGGTA	Hussein et al., 2013
<i>PPARG</i>	FJ200441.1	F.64 R.163	CCGTGCAGGAGATCACAGAGT ATCTCGTGCACGCCGATTT	Bichi et al., 2013
<i>SCAP</i>	XM_004019431.1	F.735 R.842	CCATGTGCACTTCAAGGAGGA ATGTGATCTTGCGTGTGGAG	Hussein et al., 2013
<i>SREBF1</i>	GU206528	F.152 R.267	GGGACAAGGTTTGTCTACATG GGCAGCTTGTCAGTGTCCACTA	Bichi et al., 2013
<i>THRSP</i>	XM_004019431.1	F.633 R.783	CTGCCTTCTCTGAGCACCAGTTC TAGCACACTAACCAGGTGACAGAC	Adapted from Harvatine and Bauman, 2006
<i>PPIA</i>	JX534530.1	F.176 R.295	GGATTTATGTGTCCAGGGTGGTGA CAAGATGCCAGGACCTGTATG	Bonnet et al., 2000
<i>UXT</i>	NM_001037471.2	F.300 R.400	TGTGGCCCTTGGATATGGTT GGTTGTCGCTGAGCTCTGTG	Bionaz and Loor, 2007
<i>EIF3K</i>	NM_001034489	F.344 R.468	CCAGGCCACCAAGAAGAA TTATACCTTCCAGGAGGTCCATGT	Kadegowda et al., 2009
<i>ACTB</i>	NM_173979	F.651 R.961	GACTACCTCATGAAGATCCTC CGGATGTCGACGTCACTTC	Bonnet et al., 2013

<sup>1</sup>Primer direction (F – forward; R – reverse) and hybridization position on the sequence. The PCR annealing temperature was 60°C, except for CD36 and GPAM that was 58°C.

Supplementary Table S2. Quantitative PCR performance of candidate genes and internal controls.

Gene	Cq <sup>1</sup>	Slope <sup>2</sup>	(R <sup>2</sup> ) <sup>3</sup>	Efficiency <sup>4</sup>
ACACA	19.6 ± 0.12	-3.313	0.990	2.00
ACSS1	24.8 ± 0.10	-3.975	0.999	1.78
AGPAT6	22.7 ± 0.12	-3.861	0.994	1.82
CD36	18.0 ± 0.12	-3.988	0.999	1.78
DGAT1	26.0 ± 0.10	-3.618	0.994	1.89
FABP3	25.8 ± 0.23	-3.545	0.996	1.91
FASN	24.1 ± 0.13	-3.532	0.996	1.92
GPAM	17.8 ± 0.27	-3.340	0.994	1.99
LPIN1	25.2 ± 0.18	-3.742	0.996	1.85
LPL	20.5 ± 0.12	-3.347	0.999	1.99
SCD1	19.7 ± 0.12	-3.296	0.994	2.01
XDH	16.0 ± 0.10	-3.605	0.997	1.89
INSIG1	23.4 ± 0.14	-3.764	0.994	1.84
PPARG	27.6 ± 0.16	-3.387	0.998	1.97
SCAP	26.1 ± 0.12	-3.592	0.991	1.90
SREBF1	23.7 ± 0.13	-3.278	0.996	2.02
THRSP	27.5 ± 0.29	-4.114	0.993	1.75
PPIA	16.6 ± 0.08	-3.478	0.999	1.94
UXT	21.5 ± 0.08	-3.476	0.991	1.94
EIF3K	21.5 ± 0.08	-3.348	0.991	1.99
ACTB	19.6 ± 0.12	-3.313	0.990	2.00

<sup>1</sup>Quantification cycle.

<sup>2</sup>Slope of the standard curve.

<sup>3</sup>Coefficient of determination of the standard curve.

<sup>4</sup>Calculated as  $[10^{(-1/\text{slope})}]$ .

Supplementary Table S3. Other FA in milk from lactating ewes fed a TMR without lipid supplementation (control) or supplemented with 17 g of fish oil/kg DM (FO).

FA (g/100g of total FA)	Pre-treatment <sup>1</sup>		Day 7		Day 30		SED <sup>2</sup>	P <sup>3</sup>			Contrast <sup>4</sup>
	Control	FO	Control	FO	Control	FO		D	T	D × T	
5:0	0.019	0.021	0.021	0.017	0.019	0.019	0.0015	0.038	0.886	0.029	0.934
7:0	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.004	0.367	0.578	0.172	
9:0	0.08	0.09	0.09	0.09	0.08	0.08	0.008	0.780	0.240	0.615	0.979
11:0	0.13	0.16	0.16	0.14	0.14	0.13	0.017	0.239	0.212	0.709	
<i>trans</i> -9 12:1	0.05	0.05	0.06	0.04	0.06	0.05	0.006	0.006	0.245	0.914	0.979
13:0 <i>iso</i>	0.02	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02	0.003	0.180	0.172	0.371	
13:0 <i>anteiso</i>	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.001	0.362	0.272	0.304	0.979
14:0 <i>iso</i>	0.11	0.12	0.12	0.08	0.12	0.09	0.016	0.021	0.887	0.532	
<i>cis</i> -7 14:1	0.024	0.026	0.028	0.023	0.024	0.025	0.0029	0.410	0.564	0.085	0.979
<i>cis</i> -12 14:1	0.10	0.11	0.13	0.10	0.14	0.10	0.013	0.006	0.241	0.514	
<i>trans</i> -5 14:1	0.02	0.03	0.02	0.02	0.02	0.02	0.002	0.560	0.555	0.683	0.979
<i>trans</i> -6 14:1	0.02	0.02	0.02	0.02	0.01	0.03	0.003	0.001	0.555	0.239	
15:0	1.00	1.10	1.09	0.94	1.02	0.95	0.078	0.144	0.351	0.234	0.979
15:0 <i>iso</i> <sup>5</sup>	0.22	0.19	0.23	0.19	0.22	0.20	0.022	0.177	0.875	0.245	
15:0 <i>anteiso</i>	0.42	0.48	0.44	0.40	0.44	0.40	0.041	0.335	0.913	0.949	0.979
<i>trans</i> -5 15:1	0.14	0.14	0.14	0.16	0.15	0.19	0.016	0.021	0.237	0.298	
<i>trans</i> -6 15:1	0.03	0.03	0.03	0.05	0.03	0.05	0.004	<0.001	0.294	0.446	0.979
16:0 <i>iso</i>	0.32	0.35	0.34	0.28	0.36	0.23	0.053	0.039	0.614	0.159	
<i>cis</i> -7 16:1	0.06	0.06	0.06	0.07	0.06	0.08	0.004	<0.001	0.144	0.146	0.979
<i>cis</i> -11 16:1	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.002	0.555	0.384	0.297	
<i>trans</i> -5 16:1	0.03	0.02	0.03	0.05	0.03	0.05	0.013	0.129	0.418	0.806	0.979
<i>trans</i> -6 16:1	0.04	0.06	0.04	0.09	0.04	0.10	0.009	<0.001	0.424	0.366	
<i>trans</i> -8 16:1	0.04	0.03	0.04	0.12	0.04	0.21	0.076	0.059	0.397	0.356	0.979
17:0	0.61	0.63	0.58	0.75	0.53	0.76	0.038	<0.001	0.457	0.332	

(continued)

Supplementary Table S3. (continued).

FA (g/100g of total FA)	Pre-treatment <sup>1</sup>		Day 7		Day 30		SED <sup>2</sup>	P <sup>3</sup>			Contrast <sup>4</sup>
	Control	FO	Control	FO	Control	FO		D	T	D × T	
17:0 <i>iso</i>	0.55	0.50	0.55	0.64	0.56	0.64	0.039	0.013	0.890	0.801	
17:0 <i>anteiso</i>	0.56	0.61	0.55	0.52	0.55	0.51	0.039	0.257	0.746	0.799	
<i>cis</i> -9 17:1	0.23	0.21	0.22	0.19	0.22	0.20	0.020	0.181	0.603	0.775	
<i>trans</i> -10 17:1	0.003	0.003	0.003	0.014	0.003	0.015	0.0018	<0.001	0.490	0.789	
18:0 <i>iso</i>	0.04	0.04	0.03	0.05	0.03	0.05	0.005	0.001	0.872	0.858	
<i>cis</i> -12 18:1	0.34	0.36	0.33	0.24	0.33	0.28	0.042	0.020	0.542	0.413	
<i>cis</i> -13 18:1	0.09	0.10	0.10	0.13	0.10	0.20	0.032	0.008	0.145	0.139	
<i>trans</i> -4 18:1	0.039	0.045	0.039	0.031	0.047	0.035	0.0019	<0.001	0.001	0.074	0.010
<i>trans</i> -5 18:1	0.01	0.01	0.01	0.02	0.01	0.02	0.002	0.002	0.115	0.393	
<i>trans</i> -6+7+8 18:1	0.13	0.14	0.15	0.17	0.15	0.12	0.016	0.905	0.017	0.016	0.009
<i>trans</i> -9 18:1	0.16	0.16	0.16	0.36	0.17	0.32	0.034	<0.001	0.323	0.163	
<i>trans</i> -12 18:1	0.29	0.31	0.34	0.89	0.33	0.87	0.064	<0.001	0.738	0.796	
<i>trans</i> -16 18:1 <sup>6</sup>	0.27	0.30	0.28	0.23	0.28	0.22	0.034	0.077	0.673	0.558	
Δ <sup>9,15</sup> 18:2	0.12	0.12	0.13	0.14	0.14	0.14	0.012	0.985	0.413	0.628	
18:3n-6	0.06	0.06	0.06	0.02	0.06	0.01	0.005	<0.001	0.961	0.130	
20:0	0.17	0.17	0.19	0.15	0.20	0.15	0.009	<0.001	0.221	0.228	
<i>cis</i> -9 20:1	0.03	0.03	0.04	0.07	0.05	0.08	0.010	<0.001	0.302	0.767	
<i>cis</i> -11 20:1	0.06	0.06	0.07	0.30	0.07	0.33	0.032	<0.001	0.368	0.411	
<i>cis</i> -12 20:1	0.02	0.03	0.02	0.03	0.03	0.05	0.007	0.003	0.007	0.232	
20:2n-6	0.02	0.03	0.03	0.07	0.04	0.08	0.014	<0.001	0.229	0.910	
20:3n-6	0.02	0.03	0.03	0.06	0.03	0.04	0.005	<0.001	0.006	0.010	0.406
20:3n-3	0.01	0.01	0.01	0.05	0.02	0.04	0.010	0.001	0.904	0.535	
20:4n-6	0.19	0.19	0.18	0.40	0.21	0.36	0.031	<0.001	0.949	0.115	
20:4n-3	<0.01	<0.01	0.01	0.08	0.01	0.06	0.015	<0.001	0.327	0.334	
21:0	0.09	0.10	0.09	0.08	0.10	0.08	0.009	0.013	0.881	0.262	

(continued)

Supplementary Table S3. (continued).

FA (g/100g of total FA)	Pre-treatment <sup>1</sup>		Day 7		Day 30		SED <sup>2</sup>	P <sup>3</sup>			Contrast <sup>4</sup>
	Control	FO	Control	FO	Control	FO		D	T	D × T	
22:0	0.08	0.09	0.10	0.10	0.09	0.09	0.008	0.987	0.138	0.770	
<i>cis</i> -13 22:1	0.02	0.03	0.03	0.08	0.05	0.08	0.008	<0.001	0.093	0.077	<0.001
<i>trans</i> -13 22:1	0.01	0.02	0.01	0.03	0.01	0.03	0.005	<0.001	0.994	0.338	
22:2n-6	<0.01	<0.01	<0.01	0.03	<0.01	0.04	0.005	<0.001	0.021	0.036	<0.001
22:5n-6	0.02	0.02	0.01	0.12	0.02	0.13	0.015	<0.001	0.621	0.899	
23:0	0.054	0.057	0.060	0.075	0.066	0.064	0.0088	0.382	0.577	0.096	0.602
24:0	0.04	0.05	0.04	0.05	0.04	0.06	0.007	0.035	0.496	0.155	
<i>cis</i> -15 24:1 <sup>7</sup>	0.03	0.03	0.04	0.10	0.03	0.09	0.014	<0.001	0.672	0.897	

<sup>1</sup>Data collected on d 0.

<sup>2</sup>SED = standard error of the difference.

<sup>3</sup>Probability of significant effect due to diet (D), time (T), and their interaction (D × T).

<sup>4</sup>Probability of the orthogonal contrast: FO-d30 *vs.* Control-d7 + Control-d30 + FO-d7.

<sup>5</sup>Contains *trans*-9 14:1 as minor component.

<sup>6</sup>Coelutes with *cis*-14 18:1.

<sup>7</sup>Coelutes with 22:4n-6.

- Bernard, L., Leroux, C., Rouel, J., Bonnet, M., and Chilliard, Y. 2012. Effect of level and type of starchy concentrate on tissue lipid metabolism, gene expression, and milk fatty acid secretion in Alpine goats receiving a diet rich in sunflower oil. *Brit. J. Nutr.* 107:1147-1159.
- Bichi, E., Frutos, P., Toral, P. G., Keisler, D., Hervás, G., and Loor, J. J. 2013. Dietary marine algae and its influence on tissue gene network expression during milk fat depression in dairy ewes. *Anim. Feed Sci. Technol.* 186:36-44.
- Bionaz, M., and Loor, J. J. 2007. Identification of reference genes for quantitative real-time PCR in the bovine mammary gland during the lactation cycle. *Physiol. Genomics* 29:312-319.
- Bionaz, M. and Loor, J. J. 2008. *ACSL1*, *AGPAT6*, *FABP3*, *LPIN1*, and *SLC27A6* are the most abundant isoforms in bovine mammary tissue and their expression is affected by stage of lactation. *J. Nutr.* 138:1019-1024.
- Bonnet, M., Bernard, L., Bes, S., and Leroux, C. 2013. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR normalisation in adipose tissue, muscle, liver and mammary gland from ruminants. *Animal* 7:1344-1353.
- Bonnet, M., Leroux, C., Faulconnier, Y., Hocquette, J. F., Bocquier, F., Martin, P., and Chilliard, Y. 2000. Lipoprotein lipase activity and mRNA are up-regulated by refeeding in adipose tissue and cardiac muscle of sheep. *J. Nutr.* 130:749-756.
- Faulconnier, Y., Chilliard, Y., Montazer Torbati, M. B., and Leroux, C. 2011. The transcriptomic profiles of adipose tissues are modified by feed deprivation in lactating goats. *Comp. Biochem. Physiol. D-Genomics Proteomics* 6:139-149.
- Harvatine, K. J., and 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. *J. Nutr.* 136:2468-2474.
- Hussein, M., Harvatine, K. H., Weerasinghe, W. M. P. B., Sinclair, L. A., and Bauman, D. E. 2013. Conjugated linoleic acid-induced milk fat depression in lactating ewes is accompanied by reduced expression of mammary genes involved in lipid synthesis. *J. Dairy Sci.* 96:3825-3834.
- Kadegowda, A. K. G., Bionaz, M., Thering, B., Piperova, L. S., Erdman, R. A., and Loor, J. J. 2009. Identification of internal control genes for quantitative polymerase chain reaction in mammary tissue of lactating cows receiving lipid supplements. *J. Dairy Sci.* 92:2007-2019.





## **DISCUSIÓN GENERAL**



El rumen es, con diferencia, la cámara de mayor tamaño dentro del aparato digestivo de los animales rumiantes y donde se concentra la principal actividad microbiana (Van Soest., 1994). Es en él donde las bacterias ruminales llevan a cabo la BH ruminal (Harfoot y Hazlewood, 1997), en la que se combinan reacciones de isomerización e hidrogenación de dobles enlaces reduciendo la toxicidad de los AG (Jenkins et al., 2008; Shingfield et al., 2012). Este proceso puede verse interrumpido por la adición en la dieta de inhibidores, como los utilizados en las Pruebas I, II y III.

En la Prueba I, prácticamente todos los taninos y dosis fueron capaces de modular la BH. El extracto de roble a una dosis aplicable en condiciones prácticas (2%) permitió aumentar la concentración ruminal de PUFA totales, 18:3 n-3, 18:2 n-6 y *trans*-11 18:1 y reducir el *trans*-10 18:1 y el 18:0. Los PUFA n-3 de cadena muy larga utilizados en la Prueba II también consiguieron inhibir la BH eficazmente. El efecto de EPA, DPA y DHA sobre el perfil lipídico del contenido ruminal fue publicado en Toral et al. (2017b), artículo que recoge un ensayo paralelo a la Prueba II en el que se observó, por ejemplo, un aumento del contenido de varios isómeros *trans* 18:1 y una reducción de la concentración de 18:0. Estos cambios en el perfil lipídico del contenido ruminal de la Prueba I y el trabajo de Toral et al. (2017b) estarían mediados por el impacto tanto de los taninos (Buccioni et al., 2011) como de los PUFA n-3 de cadena muy larga (Boeckeaert et al., 2008; Toral et al., 2010c) sobre las poblaciones bacterianas implicadas en las diferentes vías metabólicas de la BH ruminal.

Al final de la Prueba I se muestra el efecto del extracto de taninos de roble sobre la comunidad bacteriana del rumen analizada por T-RFLP y a lo largo de la Prueba II se estudia la respuesta del microbioma bacteriano, mediante la técnica de secuenciación masiva *Ion Torrent*, a la adición de EPA, DPA y DHA. Tanto el extracto de roble como los PUFA n-3 afectaron a la abundancia relativa de la familia *Lachnospiraceae*, que agrupa los principales géneros con capacidad demostrada *in vitro* de biohidrogenar AG insaturados (*Butyrivibrio* y *Pseudobutyrvibrio*; Kopecny et al., 2003; Paillard et al., 2007). Ahora bien, los

cambios detectados en este grupo bacteriano no podrían explicar por sí solos las diferencias observadas en el perfil lipídico del contenido ruminal al ser su abundancia relativamente baja, especialmente en el ovino, y resultar los cambios a menudo inconsistentes, por lo que es posible que in vivo no jueguen un papel dominante en la BH (Belenguer et al., 2010; Shingfield et al., 2012; Castro-Carrera et al., 2014). A diferencia del extracto de roble al 2%, los PUFA n-3 sí modificaron significativamente la estructura de la comunidad bacteriana, especialmente el EPA y DHA, con cambios relevantes en varios géneros que podrían también estar implicados en el metabolismo lipídico ruminal. Entre estos cambios cabe destacar los observados en *Anaerovorax*, *Barnesiella*, *Prevotella*, *Ruminobacter*, *Ruminococcus* y *Succinivibrio*. Aunque no ha sido posible conocer su implicación real en el proceso de BH, debido principalmente a la dificultad de conseguir cultivos puros que permitan realizar un análisis funcional (Lourenço et al., 2010; Shingfield y Wallace, 2014), sí que se pudieron relacionar los resultados de la Prueba II con los de trabajos anteriores en los que señalan algunos de estos grupos como posibles candidatos con un papel relevante en la BH ruminal (Huws et al. 2011, Castro-Carrera et al., 2014; Pallara et al., 2014). A raíz de estos resultados podría especularse que, a la misma dosis de inclusión, los lípidos marinos ejercerían un efecto más marcado que los taninos sobre la estructura y composición de la comunidad bacteriana. Sin embargo, es importante destacar que la técnica utilizada para el análisis de las poblaciones microbianas no fue la misma en ambas pruebas. En este sentido, la T-RFLP utilizada en la prueba de taninos ofrece menos información detallada que la obtenida con una plataforma de secuenciación de nueva generación (Castro-Carrera et al., 2014; De la Fuente et al., 2014), como la utilizada en el ensayo con EPA, DPA y DHA.

Al suplementar la dieta con lípidos marinos ricos en PUFA n-3 de cadena muy larga, su efecto sobre la comunidad bacteriana del rumen (Prueba II) conlleva cambios en las vías metabólicas implicadas en el proceso de BH. Esta alteración da lugar a la formación de varios AG intermedios en el rumen, como los que se observaron en el trabajo paralelo (Toral et al., 2017b). Entre los metabolitos

formados por la acción de las bacterias, existen algunos que tienen un posible o demostrado efecto antilipogénico en la glándula mamaria (e. g., *trans*-10 18:1, 10-oxo-18:0 y *trans*-10, *cis*-12 18:2; Baumgard et al., 2002; Shingfield et al., 2010, Toral et al., 2010a,b). El incremento en la concentración láctea de estos AG parece relacionarse con la aparición de MFD (Bauman y Griinari, 2001, Baumgard et al., 2002), como la inducida en la Prueba III.

En la Prueba II, el descenso en la abundancia relativa observado en algunas bacterias con capacidad demostrada para biohidrogenar AG insaturados in vitro (Kopečný et al., 2003; Paillard et al., 2007), como *Butyrivibrio* y *Pseudobutyrvibrio*, o el aumento de otros grupos bacterianos que también podrían estar implicados en la BH ruminal (Huws et al., 2011, Castro-Carrera et al., 2014), como *Barnesiella*, *Ruminobacter*, *Ruminococcus* y *Succinivibrio*, pudo estar relacionado con el incremento en la concentración de *trans*-10 en el contenido ruminal publicado en el trabajo paralelo (Toral et al., 2017b). Este AG tiene un papel controvertido en la aparición de la MFD y, aunque en vacuno se ha observado en numerosas ocasiones un paralelismo entre su aumento y la reducción del contenido de grasa láctea (Loor et al., 2005; Hinrichsen et al., 2006), en el ovino se han detectado niveles altos en la leche cuando aparece MFD inducida por lípidos marinos (Prueba III, Toral et al., 2010a,b) pero también cuando no se produce MFD al suplementar con aceites vegetales (Gómez-Cortés et al., 2008; Castro-Carrera et al., 2015), por lo que su intervención es aún materia de estudio.

El efecto observado sobre los no clasificados de la familia *Veillonellaceae* también pudo influir en el aumento en la concentración ruminal de 10-oxo-18:0 señalado en el trabajo de Toral et al. (2017b). Al igual que el *trans*-10 18:1, el papel de este cetoácido en la aparición de la MFD inducida por el consumo de lípidos marinos es aún controvertido, aunque también podría estar potencialmente relacionado (Toral et al., 2015). Su aumento a nivel ruminal, en el ensayo paralelo, concuerda con su concentración en la leche de ovejas que recibieron FO en la Prueba III.

En la Prueba II, la abundancia relativa de *Megasphaera*, propuesta como una de las posibles formadoras de *trans*-10, *cis*-12 18:2 (Kim et al., 2002), no se vio afectada en el ovino, mientras sí lo hizo en el contenido ruminal del vacuno. Este AG es, hasta el momento, el único AG del que se ha demostrado un inequívoco efecto antilipogénico en la glándula mamaria (Baumgard et al., 2002; Shingfield et al., 2010). Tampoco se observó un incremento de *trans*-10, *cis*-12 18:2 en el contenido ruminal del ovino en el estudio publicado por Toral et al. (2017b) y, aunque es cierto que en la Prueba III su concentración láctea fue superior en el grupo FO, los niveles se mantuvieron relativamente bajos, como se ha visto en trabajos anteriores en ovejas lecheras que recibieron una dieta suplementada con lípidos marinos (Toral et al., 2010a,b; Bichi et al., 2013). Por ello, su papel en el desarrollo de la MFD inducida por lípidos marinos en ovino no está claro e incluso parece poco determinante (Shingfield et al., 2010; Bichi et al., 2013; Toral et al., 2015, 2017a).

En relación con el *trans*-10, *cis*-12 18:2, en vacuno se ha señalado que su incremento en la leche durante la MFD inducida por el consumo de lípidos marinos podría estar relacionado con la represión génica de varias enzimas implicadas en la síntesis de grasa en la glándula mamaria (Harvatine y Bauman, 2006; Angulo et al., 2012). En este sentido, el aumento de este AG y otros potencialmente antilipogénicos en la leche de las ovejas con MFD de la Prueba III estuvo acompañado de la represión coordinada en la mayoría de los genes analizados en el tejido secretor mamario (e. g., *ACACA*, *FASN*, *SCD1*, *AGPAT6*), así como del factor de transcripción *SREBF1* que podría estar jugando un papel fundamental en la regulación del resto de genes (Desvergne et al., 2006; Harvatine y Bauman, 2006; Bionaz y Loor, 2008). Trabajos más recientes del grupo de investigación en el que se ha llevado a cabo esta tesis doctoral (Toral et al., 2016, 2017a, Frutos et al., 2017) han corroborado los resultados obtenidos en la Prueba III, reforzando así la hipótesis de que en el ovino lechero la MFD inducida por lípidos marinos podría estar mediada por mecanismos transcripcionales. Además, es importante mencionar que estos tres últimos trabajos incluyen una notable

mejoría en la recogida de muestra para los análisis de nutrigenómica. Así, se ha sustituido la biopsia de tejido glandular mamario por la extracción de ARNm a partir de células somáticas de la leche. Esta innovadora técnica no solo supone un importante beneficio al no ser invasiva para el animal de experimentación, sino que también permite recoger un mayor número de muestras. Esto podría ser fundamental para hacer un seguimiento de los cambios en los mecanismos transcripcionales ya que tal y como se menciona en la Prueba III y en el trabajo en ovejas de Ticiani et al. (2016), la abundancia de ARNm de las enzimas implicadas en la lipogénesis podría variar a lo largo de la lactación.

Conocer la relación existente entre los cambios observados en las poblaciones bacterianas que participan en la BH ruminal, los AG con efecto antilipogénicos y los mecanismos transcripcionales implicados en la lipogénesis mamaria, es esencial para entender de manera más global cómo la nutrición permite regular el metabolismo lipídico en el rumen y la glándula mamaria de animales rumiantes. De este modo, se podrán desarrollar nuevas estrategias de alimentación que mejoren el perfil de ácidos grasos de la leche de oveja y aumenten su valor nutricional sin afectar al rendimiento productivo de los animales.

## REFERENCIAS

- Angulo, J., L. Mahecha, K. Nuernberg, G. Nuernberg, D. Dannenberger, M. Olivera, M. Boutinaud, C. Leroux, E. Albrecht, and L. Bernard. 2012. Effects of polyunsaturated fatty acids from plant oils and algae on milk fat yield and composition are associated with mammary lipogenic and *SREBF1* gene expression. *Animal* 6:1961-1972.
- Bauman, D. E., and Griinari, J. M. 2001. Regulation and nutritional manipulation of milk fat: low-fat milk syndrome. *Livest. Prod. Sci.* 70:15-29.
- Baumgard, L. H., Matitashvili, E., Corl, B. A., Dwyer, D. A., and Bauman, D. E. 2002. *Trans-10, cis-12* conjugated linoleic acid decreases lipogenic rates and expression of genes involved in milk lipid synthesis in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 85:2155-2163.
- Belenguer, A., Toral, P. G., Frutos, P., and Hervás, G. 2010. Changes in the rumen bacterial community in response to sunflower oil and fish oil supplements in the diet of dairy sheep. *J. Dairy Sci.* 93:3275-3286.
- Bichi, E., Hervás, G., Toral, P. G., Loor, J. J., and Frutos, P. 2013. Milk fat depression induced by dietary marine algae in dairy ewes: Persistency of milk fatty acid composition and animal performance responses. *J. Dairy Sci.* 96:524-532.

- Bionaz, M., and Loor, J. J. 2008. Gene networks driving bovine milk fat synthesis during the lactation cycle. *BMC Genomics* 9:366.
- Boeckaert, C., Vlaeminck, B., Fievez, V., Maignien, L., Dijkstra, J., and Boon, N. 2008. Accumulation of *trans* C-18:1 fatty acids in the rumen after dietary algal supplementation is associated with changes in the *Butyrivibrio* community. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:6923-6930.
- Buccioni, A., Minieri, S., Rapaccini, S., Antongiovanni, M., and Mele, M., 2011. Effect of chestnut and quebracho tannins on fatty acid profile in rumen liquid- and solid-associated bacteria: an in vitro study. *Animal* 5:1521-1530.
- Castro-Carrera, T., Frutos, P., Leroux, C., Chilliard, Y., Hervás, G., Belenguer, A., Bernard, L., and Toral, P. G. 2015. Dietary sunflower oil modulates milk fatty acid composition without major changes in adipose and mammary tissue fatty acid profile or related gene mRNA abundance in sheep. *Animal* 9:582-591.
- Castro-Carrera, T., Toral, P. G., Frutos, P., McEwan, N. R., Hervás, G., Abecia, L., Pinloche, E., Girdwood, S. E., and Belenguer, A. 2014. Rumen bacterial community evaluated by 454 pyrosequencing and terminal restriction fragment length polymorphism analyses in dairy sheep fed marine algae. *J. Dairy Sci.* 97:1661-1669.
- De la Fuente G., Belanche A., Girwood S. E., Pinloche E., Wilkinson T., Newbold C. J. 2014. Pros and cons of ion-torrent next generation sequencing versus terminal restriction fragment length polymorphism T-RFLP for studying the rumen bacterial community. *Plos One.* 9:1-13.
- Desvergne, B., Michalik, L., and Wahli, W. 2006. Transcriptional regulation of metabolism. *Physiol. Rev.* 86:465-514.
- Frutos, P., Toral, P. G., and Hervás, G. 2017. Individual variation of the extent of milk fat depression in dairy ewes fed fish oil: Milk fatty acid profile and mRNA abundance of candidate genes involved in mammary lipogenesis. *J. Dairy Sci.* 100:9611-9622.
- Gómez-Cortés, P., Frutos, P., Mantecón, A. R., Juárez, M., de la Fuente, M. A., and Hervás, G. 2008. Milk production, conjugated linoleic acid content, and in vitro ruminal fermentation in response to high levels of soybean oil in dairy ewe diet. *J. Dairy Sci.* 91:1560-1569.
- Harfoot, C. G., and Hazlewood, G. P. 1997. Lipid metabolism in the rumen. In: *The rumen microbial ecosystem*. Hobson, P. N., and Stewart, C. S. (eds.). Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, pp: 382-426.
- Harvatine, K. J., and Bauman, D. E. 2006. SREBP1 and thyroid hormone responsive to spot 14 (S14) are involved in the regulation of bovine mammary lipid synthesis during diet-induced milk fat depression and treatment with CLA. *J. Nutr.* 136:2468-2474.
- Hinrichsen, T., A. L. Lock, and D. E. Bauman. 2006. The relationship between *trans*-10 18:1 and milk fat yield in cows fed high oleic acid or high linoleic acid plant oil supplements. Euro-Fed Lipid Congress, October 2006, Madrid, Spain.
- Huws, S. A., Kim, E. J., Lee, M. R. F., Scott, M. B., Tweed, J. K. S., Pinloche, E., Wallace, R. J., and Scollan, N. D. 2011. As yet uncultured bacteria phylogenetically classified as *Prevotella*, *Lachnospiraceae incertae sedis* and unclassified *Bacteroidales*, *Clostridiales* and *Ruminococcaceae* may play a predominant role in ruminal biohydrogenation. *Environ. Microbiol.* 13:1500-1512.



- Jenkins, T. C., Wallace, R. J., Moate, P. J., and Mosley, E. E. 2008. Board-invited review: Recent advances in biohydrogenation of unsaturated fatty acids within the rumen microbial ecosystem. *J. Anim. Sci.* 86:397-412.
- Kim, Y. J., Liu, R. H., Rychlik, J. L., and Russell, J. B. 2002. The enrichment of a ruminal bacterium (*Megasphaera elsdenii* YJ-4) that produces the *trans*-10, *cis*-12 isomer of conjugated linoleic acid. *J. Appl. Microbiol.* 5:976-82.
- Kopecny, J., Zorec, M., Mrazek, J., Kobayashi, Y., and Marinsek-Logar, R. 2003. *Butyrivibrio hungatei* sp. nov. and *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* sp. nov., butyrate-producing bacteria from the rumen. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53:201-209.
- Loor, J. J., Doreau, M., Chardigny, J. M., Ollier, A., Sebedio, J. L., and Chilliard, Y. 2005. Effects of ruminal or duodenal supply of fish oil on milk fat secretion and profiles of *trans*-fatty acids and conjugated linoleic acid isomers in dairy cows fed maize silage. *Anim. Feed Sci. Technol.* 119:227-246.
- Lourenço, M., Ramos-Morales, E., and Wallace, R. J. 2010. The role of microbes in rumen lipolysis and biohydrogenation and their manipulation. *Animal* 4:1024-1036.
- Paillard D., McKain N., Chaudhary L. C., Walker N. D., Pizette F., Koppova I., McEwan N. R., Kopecny J., Vercoe P. E., Louis P., and Wallace R. J. 2007. Relation between phylogenetic position, lipid metabolism and butyrate production by different *Butyrivibrio*-like bacteria from the rumen. *Anton. Leeuw. Int. J. G.* 91:417-422.
- Pallara G., Buccioni A., Pastorelli R., Minieri S., Mele M., Rapaccini S., Messini A., Pauselli M., Servili M., Giovannetti L., and Viti C. 2014. Effect of stoned olive pomace on rumen microbial communities and polyunsaturated fatty acid biohydrogenation: an in vitro study. *BMC Veterinary Research.* 10:271.
- Shingfield, K. J., Bernard, L., Leroux, C., and Chilliard, Y. 2010. Role of *trans* fatty acids in the nutritional regulation of mammary lipogenesis in ruminants. *Animal* 4:1140-1166.
- Shingfield, K. J., Kairenius, P., Aröla, A., Paillard, D., Muetzel, S., Ahvenjärvi, S., Vanhatalo, A., Huhtanen, P., Toivonen, V., Griinari, J. M., and Wallace, R. J. 2012. Dietary fish oil supplements modify ruminal biohydrogenation, alter the flow of fatty acids at the omasum, and induce changes in the ruminal *Butyrivibrio* population in lactating cows. *J. Nutr.* 142:1437-1448.
- Shingfield, K. J., and Wallace, R. J. 2014. Synthesis of conjugated linoleic acid in ruminants and humans. In: *Conjugated linoleic acids and conjugated vegetable oils*, Sels B and Philippaerts A, eds. The Royal Society of Chemistry, Oxford, UK, pp: 1-65.
- Ticiani, E., Urio, M., Ferreira, R., Harvatine, K. J., and de Oliveira, D. E. 2016. Transcriptional regulation of acetyl-CoA carboxylase  $\alpha$  isoforms in dairy ewes during conjugated linoleic acid induced milk fat depression. *Animal* 10:1677-1683.
- Toral, P. G., Frutos, P., Hervás, G., Gómez-Cortés, P., Juárez, M., and de la Fuente, M. A. 2010a. Changes in milk fatty acid profile and animal performance in response to fish oil supplementation, alone or in combination with sunflower oil, in dairy ewes. *J. Dairy Sci.* 93:1604-1615.
- Toral, P. G., Hervás, G., Belenguer, A., Carreño, D., Frutos, P. 2017a. mRNA abundance of genes involved in mammary lipogenesis during fish oil- or *trans*-10 *cis*-12 CLA-induced milk fat depression in dairy ewes. *J. Dairy Sci.* 100:3182-3192. doi: 10.3168/jds.2016-11814.

- Toral, P. G., Hervás, G., Carreño, D., Belenguer, A., and Frutos, P. 2015. Comparison of milk fatty acid responses during fish oil- and *trans*-10 *cis*-12 18:2-induced milk fat depression in dairy ewes. *Anim. Feed Sci. Technol.* 210:66-73.
- Toral, P. G., Hervás, G., Carreño, D., Leskinen, H., Belenguer, A., Shingfield, K. J., and Frutos, P. 2017b. In vitro response to EPA, DPA, and DHA: Comparison of effects on ruminal fermentation and biohydrogenation of 18-carbon fatty acids in cows and ewes. *J. Dairy Sci.* 100:6187-6198.
- Toral, P. G., Hervás, G., Gómez-Cortés, P., Frutos, P., Juárez, M., and de la Fuente, M. A. 2010b. Milk fatty acid profile and dairy sheep performance in response to diet supplementation with sunflower oil plus incremental levels of marine algae. *J. Dairy Sci.* 93, 1655-1667.
- Toral, P. G., Hervás, G., Suárez-Vega, A., Arranz, J. J., and Frutos, P. 2016. Isolation of RNA from milk somatic cells as an alternative to biopsies of mammary tissue for nutrigenomic studies in dairy ewes. *J. Dairy Sci.* 99:8461-8471. doi: 10.3168
- Toral, P. G., Shingfield, K. J., Hervás, G., Toivonen, V., and Frutos, P. 2010c. Effect of fish oil and sunflower oil on rumen fermentation characteristics and fatty acid composition of digesta in ewes fed a high concentrate diet. *J. Dairy Sci.* 93:4804-4817.
- Van Soest, P. J. 1994. *Nutritional ecology of the ruminants*. Cornell University Press, Ithaca, New York, USA.

## **CONCLUSIONES**



**Primera.** Los cuatro extractos de taninos enológicos examinados (quebracho, uva, castaño y roble) son capaces de modular la biohidrogenación in vitro de los ácidos grasos insaturados de la dieta. Sin embargo, pese a la eficacia demostrada, su uso en condiciones prácticas podría ser inviable, en algunos casos, debido a la elevada dosis requerida.

**Segunda.** La incorporación en una dieta completa mezclada de 20 g de extracto de taninos de roble por kg de materia seca (lo que podría considerarse una dosis utilizable en condiciones prácticas), permite aumentar la concentración en el rumen de 18:3 n-3, 18:2 n-6, *trans*-11 18:1 y ácidos grasos poliinsaturados totales, y reducir la de *trans*-10 18:1 y 18:0 sin afectar negativamente a la estructura de la comunidad bacteriana o a la fermentación ruminal (por ejemplo, a la producción de gas, al pH o a las concentraciones de amoníaco o ácidos grasos volátiles).

**Tercera.** En estudios in vitro se observa que la suplementación de una dieta completa mezclada con un 2% de EPA y DHA afecta a la estructura y composición de la comunidad bacteriana ruminal de ovejas y vacas. En cambio, la adición de la misma dosis de DPA no origina una respuesta relevante en el ovino y su efecto en el vacuno es menor que el de EPA y DHA, lo que sugiere una menor contribución de este PUFA n-3 al efecto global de los lípidos marinos. El microbioma bacteriano ruminal procedente de las vacas es menos estable que el de las ovejas frente a la adición de estos tres ácidos grasos.

**Cuarta.** La abundancia relativa de diversos filos, familias y géneros de bacterias potencialmente relacionados con la biohidrogenación ruminal, como *Anaerovorax*, *Barnesiella*, *Butyrivibrio*, *Prevotella*, *Ruminobacter*, *Ruminococcus* y *Succinivibrio*, se ve afectada tras 24 horas de incubación in vitro en presencia de EPA, DPA o DHA. Aunque la mayoría de los cambios debidos a estos PUFA n-3 de cadena muy larga son comparables en vacuno y ovino, existen algunas diferencias entre ambas especies de rumiantes. Por ejemplo, la abundancia relativa de *Hallella*, *Megasphaera*, *Phocaeicola*, *Ruminococcus*, *Ruminobacter* y *Tannerella* únicamente varía

en los cultivos con inóculo ruminal procedente de vacas, mientras que la de *Oscillibacter* y *Paraprevotella* solo lo hace en los de ovejas.

**Quinta.** A los 7 días de incluir en la dieta de ovejas lecheras un 1,7% de aceite de pescado, ya se detecta en la leche un incremento en la proporción de ácidos grasos con posible efecto antilipogénico, aunque aún no hay cambios en la concentración y producción de grasa. A los 30 días de consumo de dicha dieta suplementada, las reducciones en el porcentaje y producción de grasa láctea alcanzan un 25 y 22%, respectivamente, y persiste el aumento de ácidos grasos con carácter potencialmente antilipogénico.

**Sexta.** En las condiciones de este estudio, los incrementos en la concentración de ácidos grasos con posible efecto antilipogénico están acompañados de reducciones en la abundancia de ARNm de genes candidatos implicados en la lipogénesis mamaria. Esto secunda la relación entre dichos ácidos grasos y genes, y sugiere que el síndrome de baja grasa en la leche, inducido por el consumo de lípidos marinos, estaría mediado por mecanismos de regulación transcripcional. La naturaleza coordinada de la represión génica, que afecta a la mayor parte de las vías metabólicas implicadas en la lipogénesis mamaria, incluyendo la activación de ácidos grasos (*ACSS1*), síntesis de novo (*ACACA* y *FASN*), captación y transporte (*LPL* y *FABP3*), desaturación (*SCD1*) y esterificación (*AGAPT6*), apunta a la existencia de un regulador central de la síntesis de grasa en la glándula mamaria. Sin descartar la posible contribución de otros factores de transcripción, como *PPARG*, los resultados sugieren que *SREBF1* podría jugar un papel relevante en el desarrollo de la depresión de grasa láctea inducida por lípidos marinos en el ovino de leche.

## CONCLUSIONS





**First.** The four oenological tannin extracts that were examined (quebracho, grape, chestnut and oak) are able to modulate the *in vitro* BH of dietary unsaturated FA. However, their efficacy would be rather limited in terms of animal feeding due to the high dose required in many cases.

**Second.** Supplementation of a total mixed ration with oak tannin extract at a practical dose of 20 g/kg dry matter, allows to increase total polyunsaturated fatty acids, 18:3n-3, 18:2n-6 and *trans*-11 18:1, and decrease *trans*-10 18:1 and 18:0 rumen concentrations without eliciting any negative response on ruminal bacterial community structure or fermentation (for example, gas production kinetic parameters, pH, ammonia and volatile fatty acids).

**Third.** Under *in vitro* experimental conditions, supplementation of a total mixed ration with EPA and DHA at 2% diet dry matter affects ruminal bacterial community structure and composition of cows and sheep. In contrast, DPA at the same dose does not modify them in sheep, and shows a lower effect compared to EPA and DHA in cattle, suggesting a low contribution of this FA to the action of marine lipids. Ruminal bacterial microbiome from cows is less stable than that of sheep against the addition of these three fatty acids.

**Fourth.** The relative abundance of several bacterial phyla, families and genera that might potentially be involved in ruminal biohydrogenation, namely *Anaerovorax*, *Barnesiella*, *Butyrivibrio*, *Prevotella*, *Ruminobacter*, *Ruminococcus* and *Succinivibrio*, is affected after 24 hours of *in vitro* incubation with EPA, DPA or DHA. Although most changes due to these PUFA are comparable in bovine and ovine, there are also changes exclusive to each ruminant species. For example, the relative abundance of *Hallella*, *Megasphaera*, *Phocaeicola*, *Ruminococcus*, *Ruminobacter* and *Tannerella* only varies in the incubations with rumen inocula from cows, while that of *Oscillibacter* and *Paraprevotella* only change in those from sheep.

**Fifth.** In dairy ewes, increases in potentially antilipogenic fatty acids in milk are already detectable after 7 days consuming a diet supplemented with 1.7% dry matter of fish oil, while there are no changes yet in milk fat concentration and yield. After 30 days on that diet, reductions in milk fat concentration and yield reach up to 25 and 22%, respectively, persisting the increments in fatty acids with a potential antilipogenic action.

**Sixth.** Under our experimental conditions, the increments in potentially antilipogenic fatty acids in milk are accompanied by decreases in the mRNA abundance of candidate genes encoding key lipogenic enzymes. This supports a relationship between them and suggests that fish oil-induced milk fat depression in dairy ewes would be mediated by transcriptional mechanisms. The coordinated nature of the downregulation, which tends to affect most studied metabolic pathways, including FA activation (*ACSS1*), de novo synthesis (*ACACA* and *FASN*), uptake and transport (*LPL* and *FABP3*), desaturation (*SCD1*) and esterification (*AGAPT6*), suggests the involvement of a central regulator of milk fat synthesis. Without ruling out the potential contribution of *PPARG*, our results suggest that the *SREBF1* transcription factor might play a relevant role in the milk fat depression syndrome in lactating sheep fed fish oil.