



**universidad  
de león**

**TESIS DOCTORAL**

**VARIACIÓN INDIVIDUAL EN LA INTENSIDAD DEL  
SÍNDROME DE BAJA GRASA EN LA LECHE EN OVEJAS Y  
CABRAS: RELACIÓN CON EL RENDIMIENTO PRODUCTIVO,  
EL PERFIL LIPÍDICO DE LA LECHE Y LOS PROCESOS DE  
FERMENTACIÓN Y BIOHIDROGENACIÓN RUMINAL**

**Antonella Della Badia**

Programa de doctorado: Ciencias veterinarias y de los alimentos

Tutora: Dra. Pilar de Frutos Fernández

Dirigida por: Dra. Pilar de Frutos Fernández,  
Dr. Gonzalo Hervás Angulo y Dr. Pablo Gutiérrez Toral

**León, 2023**





Instituto de Ganadería de Montaña (IGM)

**VARIACIÓN INDIVIDUAL EN LA INTENSIDAD DEL  
SÍNDROME DE BAJA GRASA EN LA LECHE EN OVEJAS Y  
CABRAS: RELACIÓN CON EL RENDIMIENTO PRODUCTIVO,  
EL PERFIL LIPÍDICO DE LA LECHE Y LOS PROCESOS DE  
FERMENTACIÓN Y BIOHIDROGENACIÓN RUMINAL**

*INDIVIDUAL VARIATION IN THE EXTENT OF MILK FAT  
DEPRESSION IN DAIRY SHEEP AND GOATS: RELATIONSHIP  
WITH ANIMAL PERFORMANCE, MILK LIPID PROFILE AND  
RUMINAL FERMENTATION AND BIOHYDROGENATION  
PROCESSES*

Memoria de Tesis Doctoral presentada por

Antonella Della Badia

dirigida por

Dra. Pilar de Frutos Fernández,

Dr. Gonzalo Hervás Angulo y

Dr. Pablo Gutiérrez Toral

para acceder al grado de Doctor, dentro del programa de Doctorado  
“Ciencias veterinarias y de los alimentos” de la Universidad de León.

León, junio de 2023



La autora de esta memoria ha disfrutado de un contrato predoctoral para la formación de doctores (PRE2018-086174) financiado por el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, la Agencia Estatal de Investigación y el Fondo Social Europeo (FSE).

Los trabajos que componen esta memoria forman parte de los proyectos AGL2017-87812-R (financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad, la Agencia Estatal de Investigación y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional; MINECO/AEI/FEDER, UE) y PID-2020-113441RB-I00 (financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación y la Agencia Estatal de Investigación; MCIN/AEI/10.13039/501100011033/).



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
Índice .....	iii
Índice en inglés ( <i>Index</i> ) .....	vii
Abreviaciones/ <i>Abbreviations</i> .....	xi
RESUMEN .....	1
RESUMEN EN INGLÉS ( <i>Summary</i> ) .....	9
RESUMEN EN ITALIANO ( <i>Riassunto</i> ) .....	17
INTRODUCCIÓN .....	25
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	35
<b>1. Leche de ovejas y cabras. Composición y compuestos bioactivos</b> .....	<b>37</b>
1.1. Ácidos grasos .....	38
1.2. Origen y secreción de los ácidos grasos .....	45
1.2.1. Metabolismo lipídico en el rumen .....	46
1.2.2. Metabolismo lipídico en la glándula mamaria .....	50
1.2.2.1. Síntesis de ácidos grasos <i>de novo</i> .....	52
1.2.2.2. Captación de los ácidos grasos preformados .....	53
1.2.3. Otras rutas metabólicas .....	53
1.3. Regulación nutricional de la lipogénesis en la glándula mamaria .....	56
<b>2. Suplementación de la dieta con lípidos para mejorar el perfil de ácidos grasos de la leche</b> .....	<b>59</b>
2.1. Suplementación de la dieta con aceites vegetales .....	62
2.2. Suplementación de la dieta con lípidos marinos .....	64
<b>3. Síndrome de baja grasa en la leche en ovejas y cabras</b> .....	<b>67</b>
3.1. Teorías que tratan de explicar el síndrome de baja grasa en la leche (MFD) .....	68
3.1.1. Teorías iniciales .....	69
3.1.2. Teoría de la biohidrogenación .....	72
3.1.3. Otras teorías .....	76
3.2. Comparación interespecífica .....	80

<b>4. REFERENCIAS .....</b>	<b>83</b>
<b>CAPÍTULO I – Variación individual en la respuesta al síndrome de baja grasa en la leche inducido por la dieta en ovejas y cabras lecheras .....</b>	<b>107</b>
<b>Resumen .....</b>	<b>111</b>
<b>1. Introducción .....</b>	<b>113</b>
<b>2. Materiales y métodos .....</b>	<b>115</b>
2.1. Declaraciones éticas .....	115
2.2. Animales, dietas experimentales y manejo .....	115
2.3. Medidas y recogida de muestras .....	117
2.3.1. Dietas .....	117
2.3.2. Leche .....	117
2.4. Análisis químicos .....	117
2.4.1. Dietas .....	117
2.4.2. Leche .....	118
2.5. Cálculos y análisis estadísticos .....	119
<b>3. Resultados .....</b>	<b>120</b>
3.1. Variaciones preexistentes (periodo Control) .....	120
3.2. Diferencias en la respuesta a la suplementación con aceite de pescado .....	121
<b>4. Discusión .....</b>	<b>136</b>
4.1. Variaciones preexistentes (periodo Control) .....	137
4.2. Diferencias en la respuesta a la suplementación con aceite de pescado .....	138
<b>5. Conclusiones .....</b>	<b>143</b>
<b>6. Referencias .....</b>	<b>143</b>
<b>7. Material suplementario .....</b>	<b>149</b>
<b>CAPÍTULO II – Susceptibilidad al síndrome de baja grasa en la leche en ovejas y cabras lecheras: variación individual en la fermentación y la biohidrogenación ruminal .....</b>	<b>153</b>
<b>Resumen .....</b>	<b>157</b>
<b>1. Introducción .....</b>	<b>159</b>
<b>2. Materiales y métodos .....</b>	<b>161</b>

2.1. Declaraciones éticas .....	161
2.2. Animales y tratamientos experimentales .....	161
2.3. Procedimiento de muestreo ruminal .....	162
2.4. Análisis químicos .....	162
2.5. Análisis estadístico .....	164
<b>3. Resultados .....</b>	<b>164</b>
3.1. Variaciones preexistentes (periodo Control) .....	165
3.2. Diferencias en la respuesta a la suplementación con aceite de pescado .....	175
<b>4. Discusión .....</b>	<b>182</b>
4.1. Variaciones preexistentes (periodo Control) .....	182
4.2. Diferencias en la respuesta a la suplementación con aceite de pescado .....	184
<b>5. Conclusiones .....</b>	<b>188</b>
<b>6. Referencias .....</b>	<b>188</b>
<b>7. Material suplementario .....</b>	<b>194</b>
<b>CAPÍTULO III – Analisis de los factores que predisponen al síndrome de baja grasa en la leche en ovino .....</b>	<b>205</b>
<b>Resumen .....</b>	<b>209</b>
<b>1. Introducción .....</b>	<b>211</b>
<b>2. Materiales y métodos .....</b>	<b>212</b>
2.1. Preparación y cálculos de la base de datos .....	212
2.2. Cálculo del cambio en la concentración y producción de grasa de la leche .....	214
2.3. Categorización de individuos por la concentración y producción de grasa de la leche .....	215
2.4. Análisis estadísticos .....	215
<b>3. Resultados y discusión .....</b>	<b>218</b>
3.1. Análisis de la distribución .....	219
3.2. Análisis bivariante .....	222
3.2.1. Peso vivo e ingestión de materia seca inicial .....	223
3.2.2. Producción de leche inicial .....	223

3.2.3. Concentración y producción de grasa inicial .....	231
3.2.4. Otros parámetros de rendimiento productivo .....	233
3.2.5. Principales grupos de ácidos grasos de la leche .....	234
3.2.6. Concentración inicial de los ácidos grasos individuales de la leche .....	235
3.3. Análisis multivariante .....	241
3.4. Análisis de componentes principales .....	247
<b>5. Conclusiones</b> .....	<b>250</b>
<b>6. Referencias</b> .....	<b>250</b>
<b>7. Material suplementario</b> .....	<b>255</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>259</b>
<b>CONCLUSIONES EN INGLÉS (CONCLUSIONS)</b> .....	<b>263</b>

# INDEX

	Page
CONTENTS (CONTENIDOS) .....	i
<b>Index in Spanish</b> .....	iii
<b>Index</b> .....	vii
<b>Abbreviations/Abreviaciones</b> .....	xi
SUMMARY IN SPANISH .....	1
SUMMARY .....	8
SUMMARY IN ITALIAN .....	17
INTRODUCTION .....	25
LITERATURE REVIEW .....	35
<b>1. Sheep and goat milk. Composition and bioactive component</b> .....	<b>37</b>
1.1. Fatty acids .....	38
1.2. Origin and secretion of fatty acids .....	45
1.2.1. Rumen lipid metabolism .....	46
1.2.2. Lipid synthesis in the mammary gland .....	50
1.2.2.1. <i>De novo</i> fatty acids synthesis .....	52
1.2.2.2. Uptake of preformed fatty acids .....	53
1.2.3. Other metabolic pathways .....	53
1.3. Nutritional regulation of lipogenesis in the mammary gland .....	56
<b>2. Dietary lipid supplementation to improve milk fatty acid profile</b> .....	<b>59</b>
2.1. Dietary supplementation with vegetable oils .....	62
2.2. Dietary supplementation with marine lipids .....	64
<b>3. Milk fat depression in sheep and goats</b> .....	<b>67</b>
3.1. Theory attempting to explain milk fat depression (MFD) .....	68
3.1.1. Initial theories .....	69
3.1.2. Biohydrogenation theory .....	72
3.1.3. Other theories .....	76
3.2. Interspecific comparison .....	80
<b>4. REFERENCES</b> .....	<b>84</b>

<b>CHAPTER I – Individual differences in responsiveness to diet-induced milk fat depression in dairy sheep and goats</b> .....	107
<b>Abstract</b> .....	111
<b>1. Introduction</b> .....	113
<b>2. Materials and methods</b> .....	115
2.1. Ethic Statements .....	115
2.2. Animals, experimental diets and management .....	115
2.3. Measurements and sampling procedures .....	117
2.3.1. Diets .....	117
2.3.2. Milk .....	117
2.4. Chemical analyses .....	117
2.4.1. Diets .....	117
2.4.2. Milk .....	118
2.5. Calculations and statistical analysis .....	119
<b>3. Results</b> .....	120
3.1. Pre-existing variation (Control period) .....	120
3.2. Differences in the response to FO supplementation .....	121
<b>4. Discussion</b> .....	136
4.1. Pre-existing variation (Control period) .....	137
4.2. Differences in the response to FO supplementation .....	138
<b>5. Conclusions</b> .....	143
<b>6. References</b> .....	143
<b>7. Supplementary material</b> .....	149
<b>CHAPTER II – Susceptibility to milk fat depression in dairy sheep and goats: Individual variation in ruminal fermentation and biohydrogenation</b> .....	153
<b>Abstract</b> .....	157
<b>1. Introduction</b> .....	159
<b>2. Materials and methods</b> .....	161



2.1. Ethic Statements .....	161
2.2. Animals and experimental treatments .....	161
2.3. Rumen sampling procedure .....	162
2.4. Chemical analyses .....	162
2.5. Statistical analysis .....	164
<b>3. Results .....</b>	<b>164</b>
3.1. Pre-existing variation (Control period) .....	165
3.2. Differences in the response to FO supplementation .....	175
<b>4. Discussion .....</b>	<b>182</b>
4.1. Pre-existing variation (Control period) .....	182
4.2. Differences in the response to FO supplementation .....	184
<b>5. Conclusions .....</b>	<b>188</b>
<b>6. References .....</b>	<b>188</b>
<b>7. Supplementary material .....</b>	<b>194</b>
<b>CHAPTER III. – Analysis of factors predisposing dairy ewes to diet-induced milk fat depression .....</b>	<b>205</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>209</b>
<b>1. Introduction .....</b>	<b>211</b>
<b>2. Materials and methods .....</b>	<b>212</b>
2.1. Database preparation and calculations .....	212
2.2. Calculating the change in milk fat concentration and yield .....	214
2.3. Categorization of individuals by milk fat concentration and yield..	215
2.4. Statistical analysis .....	215
<b>3. Results and discusión .....</b>	<b>218</b>
3.1. Distribution analysis .....	219
3.2. Bivariate analyses .....	222
3.2.1. Pretrial body weight and dry matter intake .....	223
3.2.2. Pretrial milk yield .....	223
3.2.3. Pretrial milk fat concentration and yield .....	231
3.2.4. Other performance traits .....	233

3.2.5. Pretrial major milk fatty acids groups .....	234
3.2.6. Pretrial individual milk fatty acids .....	235
3.3. Multivariate analysis .....	241
3.4. Principle component analysis .....	247
<b>5. Conclusions .....</b>	<b>250</b>
<b>6. References .....</b>	<b>250</b>
<b>7. Supplementary material .....</b>	<b>255</b>
<b>CONCLUSIONS IN SPANISH .....</b>	<b>259</b>
<b>CONCLUSIONS .....</b>	<b>263</b>

## ABREVIACIONES / ABBREVIATIONS

<C16	.....	ácidos grasos <i>de novo</i> / <i>de novo fatty acids</i>
>C16	.....	ácidos grasos preformados / <i>preformed fatty acids</i>
ADF	.....	<i>acid detergent fiber</i>
AG	.....	ácido graso
AGT	.....	ácidos grasos <i>trans</i>
AGV	.....	ácido grasos volátiles
ARA	.....	ácido araquidónico / <i>arachidonic acid</i>
BCFA	.....	ácidos grasos de cadena ramificada / <i>branched-chain fatty acids</i>
BH	.....	biohidrogenación / <i>biohydrogenation</i>
BW	.....	<i>body weight</i>
C16	.....	ácidos grasos de origen mixto / <i>mixed-source fatty acids</i>
C18 FA	.....	18 carbon <i>fatty acids</i>
C20-22 FA	..	20-22 carbon <i>fatty acids</i>
CLA	.....	ácido linoleico conjugado / <i>conjugated linoleic acid</i>
CLnA	.....	ácido linolénico conjugado / <i>conjugated linolenic acid</i>
CP	.....	<i>crude protein</i>
<i>d</i>	.....	<i>days</i>
DHA	.....	ácido docosahexaenoico / <i>docosahexaenoic acid</i>
DIM	.....	<i>day in milk</i>
DM	.....	<i>dry matter</i>
DMI	.....	<i>dry matter intake</i>
DMOX	.....	4,4-dimethyloxazoline
DPA	.....	ácido docosapentaenoico / <i>docosapentaenoic acid</i>
ECM	.....	<i>energy corrected milk</i>
EPA	.....	ácido eicosapentaenoico / <i>eicosapentaenoic acid</i>
FA	.....	<i>fatty acid</i>
FAME	.....	<i>fatty acid methyl ester</i>
FID	.....	<i>flame ionization detector</i>
FO	.....	aceite de pescado / <i>fish oil</i>
GC	.....	cromatografía de gases / <i>gas chromatography</i>
GC-FID	.....	<i>gas chromatography with flame ionization detection</i>
GC-MS	.....	<i>gas chromatography-mass spectrometry</i>
LA	.....	ácido linoleico / <i>linoleic acid</i>
LNA	.....	ácido linolénico / <i>linolenic acid</i>
MA	.....	<i>marine algae</i>
MFD	.....	síndrome de baja grasa en la leche / <i>milk fat depression</i>
MS	.....	materia seca
MUFA	.....	ácidos grasos monoisaturados / <i>monounsaturated fatty acids</i>
NDF	.....	<i>neutral detergent fiber</i>
OA	.....	ácido oleico / <i>oleic acid</i>
OBCFA	.....	ácidos grasos impares y ramificados / <i>odd- and branched-chain fatty acids</i>
OCFA	.....	ácidos grasos impares / <i>odd-chain fatty acids</i>
OM	.....	<i>organic matter</i>

## Contenidos

---

<i>P</i>	<i>probability</i>
PCA	<i>principal component analysis</i>
pf	<i>punto de fusión</i>
PUFA	<i>ácidos grasos poliinsaturados / polyunsaturated fatty acid</i>
R <sup>2</sup>	<i>coefficient of determination</i>
RA	<i>ácido ruménico / rumenic acid</i>
Res	<i>responsiveness</i>
RMSE	<i>root mean squared error</i>
SA	<i>ácido esterico / stearic acid</i>
SAFO	<i>stearic acid plus fish oil</i>
SCC	<i>somatic cell count</i>
SCD	<i>estearoil-CoA desaturasa</i>
SED	<i>standard error of the difference</i>
SO	<i>sunflower oil</i>
SOFO	<i>sunflower oil plus fish oil</i>
SOMA	<i>sunflower oil plus marine algae</i>
Sp	<i>species</i>
TAG	<i>triacylglycerols</i>
TMR	<i>total mixed ration</i>
TS	<i>total solid</i>
UFA	<i>ácidos grasos insaturados / unsaturated fatty acids</i>
VA	<i>ácido vaccénico / vaccenic acid</i>
VFA	<i>volatile fatty acid</i>
VLDL	<i>lipoproteínas de muy baja densidad</i>

## **RESUMEN**



La suplementación de la dieta del ganado lechero con lípidos de origen marino permite modular el perfil de ácidos grasos (AG) de la leche y aumentar el contenido de ciertos lípidos bioactivos, potencialmente saludables para los consumidores. Desafortunadamente, produce el síndrome de baja grasa en la leche (MFD, por las siglas en inglés de milk fat depression), que se caracteriza por una inhibición de la síntesis de grasa en la glándula mamaria. Durante mucho tiempo se pensó que las vacas sufrían MFD, mientras que las ovejas y las cabras eran tolerantes, pero posteriormente se demostró que el ovino y el caprino, al igual que el vacuno, desarrollan este síndrome cuando su dieta se suplementa con lípidos marinos. Además, se ha visto que los animales pueden mostrar grados individuales muy diferentes de depresión de la grasa láctea, lo que podría explicar algunas contradicciones en la literatura. Dado que el efecto antilipogénico de ciertos ácidos grasos (AG) es el origen más probable de la MFD, la caracterización del perfil de AG en la leche de los animales que muestran diferentes grados de MFD podría ser útil para comprender la base fisiológica de las diferencias en la intensidad del síndrome. Analizar si ciertos rasgos fenotípicos pueden predeterminar la respuesta individual también sería relevante para cumplir este objetivo. Sin embargo, la información sobre estos aspectos es aún escasa, no sólo en ovino y caprino sino en rumiantes en general.

Por todo ello, en el capítulo I de esta tesis se compararon las divergencias en la respuesta individual en términos de severidad del síndrome de MFD en ovino y caprino en lo que respecta al rendimiento productivo y el perfil lipídico de la leche, lo que permitiría, por una parte, detectar variaciones interespecíficas y, por otra, basándose especialmente en las respuestas comunes, avanzar en el conocimiento de la MFD. Un segundo

objetivo fue analizar si algunos rasgos fenotípicos de las cabras y ovejas (en concreto, su rendimiento productivo y composición de AG de la leche) pueden predeterminar una mayor tolerancia o susceptibilidad individual a la MFD. Para cumplir ambos objetivos, se realizó una prueba experimental con 25 cabras de raza murciano-granadina y 23 ovejas de raza assaf que fueron alimentadas con una ración completa mezclada sin suplementación lipídica, durante 3 semanas (periodo Control). A continuación, todos los animales recibieron la misma dieta basal suplementada con un 2% de aceite de pescado (FO) durante 5 semanas adicionales (periodo MFD). Finalizado este segundo periodo, y en función de la caída de la concentración de grasa láctea inducida por el FO, se seleccionaron los 5 animales con una respuesta más marcada (RESPON+) y los 5 cuya respuesta fue más leve (RESPON-) dentro de cada especie (20 en total). Al final de cada periodo se examinó la producción y composición de la leche, incluido un perfil detallado de los AG. De acuerdo con el diseño experimental, hubo diferencias sustanciales en la concentración y producción de grasa láctea entre RESPON+ y RESPON-, pero no se detectó ninguna interacción significativa con el efecto de la especie. La caída media de la concentración y la producción de grasa fue del 26% en RESPON+ y del 6% en RESPON-. Los resultados del estudio no permitieron sugerir que la respuesta a la MFD esté claramente predeterminada ni por los parámetros productivos estudiados ni por el perfil de AG de la leche, pero podría existir cierta relación con el balance energético. Además, la variación individual en la susceptibilidad a la MFD en ovejas y cabras también podría estar relacionada con cambios en la concentración láctea de ciertos AG con efecto potencialmente antilipogénico, como el *trans*-10 18:1 y el *cis*-9 16:1, mientras que el *trans*-10,*cis*-12 CLA sólo tendría un papel secundario en la intensidad del



síndrome. Las variaciones en la producción molar de AG *de novo* y preformados sugieren diferencias relevantes en los mecanismos responsables del desarrollo de la MFD en RESPON+ y RESPON-, con variaciones entre ovino y caprino sólo en los individuos más tolerantes.

A partir de estos resultados, se hacía necesario ampliar la investigación para avanzar en el conocimiento de los mecanismos que determinan la mayor o menor sensibilidad a la MFD. Por ello, basándose en que el perfil de AG de la leche sólo se examina en la grasa que ha sido secretada con éxito, lo que puede no ser una representación exacta de los AG que se forman en el rumen y llegan a la glándula mamaria, planteamos que las diferencias individuales podrían detectarse más fácilmente en el fluido ruminal que en la leche. Esta hipótesis, aplicable tanto a las ovejas como a las cabras, fue la base del trabajo presentado en el capítulo II. En el mismo, se partió de los mismos animales seleccionados en la prueba descrita en el capítulo anterior y se investigó si los procesos de fermentación y biohidrogenación ruminal podrían predeterminar su mayor tolerancia o susceptibilidad a la MFD, y si la gravedad del síndrome depende exclusivamente de la respuesta a la dieta. Los parámetros de fermentación ruminal y los perfiles de AG se examinaron en muestras de líquido ruminal recogidas al final de cada periodo experimental (Control y MFD). En general, la variación individual en el grado de MFD en las ovejas y las cabras no pareció estar predeterminada por rasgos relacionados con la fermentación y la biohidrogenación ruminal, incluidos los AG que sirven como biomarcadores de la microbiota. En cuanto a las diferencias en la respuesta al FO, los resultados sugieren que no hay relación entre la susceptibilidad a la MFD y la concentración de los isómeros C18, C20 y C22 con un doble enlace *trans*-10. Los resultados también descartarían que la

variación individual en el grado de MFD se explique por una menor disponibilidad mamaria de acetato y 18:0 de origen ruminal, dada la ausencia de diferencias entre RESPON+ y RESPON-. Sin embargo, el contenido de AG insaturados aportados por el aceite marino (por ejemplo, *cis*-9 16:1, *cis*-11 18:1 y 20:5n-3) fue mayor en el rumen de las ovejas y cabras RESPON+ que en las RESPON-. Por lo tanto, aunque se necesita más investigación, cabe especular que la extensión de la biohidrogenación de estos AG podría estar asociada con la tolerancia o susceptibilidad a la MFD.

Por último, y centrándose en el ovino (por ser la especie en la que se disponía de más datos), se planteó profundizar, mediante un metanálisis, en la identificación de rasgos fenotípicos de las ovejas, tanto de rendimiento productivo como de composición lipídica de la leche, que pudieran predisponer a cambios más o menos intensos en la síntesis de grasa láctea cuando se usan lípidos marinos para mejorar su perfil. Así, en el tercer estudio (presentado en el capítulo III) se recogieron los datos iniciales de rendimiento productivo y perfil de AG de la leche de 10 experimentos, en los que 160 ovejas assaf fueron alimentadas con 16 dietas que incluían FO o microalgas marinas durante 3-5 semanas. La caída de la concentración y producción de grasa láctea se calculó de 3 formas: cambio absoluto (valor final – valor inicial), cambio relativo (como porcentaje del valor inicial) y cambio potencial (relativo a la máxima MFD esperada, asumiendo que la grasa láctea no podría caer por debajo del 3%). Se utilizaron análisis de tipo bi- y multivariante para explorar la relación del rendimiento productivo y el perfil de AG de la leche con la predisposición a sufrir MFD. Según el primer tipo de análisis, existiría una relación lineal entre la concentración inicial de grasa láctea y los cambios absoluto ( $R^2 = 0,46$ ;  $R^2$  parcial de 0,08), relativo ( $R^2 = 0,39$ ;  $R^2$  parcial de 0,06) y potencial en el contenido de grasa de

la leche durante la MFD ( $R^2 = 0,17$ ;  $R^2$  parcial =  $0,03$ ). Así, en ovejas que reciben lípidos marinos, cuanto mayor sea el contenido inicial de grasa, mayor sería la intensidad de la MFD. Este hallazgo se vio reforzado por los resultados de un segundo análisis bivariante (en el que se categorizó a las ovejas según su contenido y producción de grasa inicial) y los análisis multivariantes. También puede existir una relación, aunque más débil, entre la intensidad del síndrome y tanto la producción de leche como la concentración de proteína previas al consumo de la dieta que causa MFD. Además, la mayor MFD en las ovejas más sensibles podría estar relacionada con alteraciones de la función ruminal que aumenten la concentración láctea de AG potencialmente antilipogénicos, como el *trans*-10 18:1. Aunque el papel de los AG de la leche como factores predeterminantes de la MFD sigue sin estar claro, los resultados de este metanálisis apuntaron a que el mecanismo de captación mamaria de los AG preformados (>C16) jugaría un papel relevante, por lo que convendría profundizar en su estudio. También sería aconsejable seguir investigando las bases fisiológicas de la relación entre la magnitud de la depresión y la concentración de grasa láctea previa al consumo de la dieta inductora de MFD.



## **SUMMARY**



Supplementation of dairy ewe diet with marine lipids can modulate the fatty acid (FA) profile of milk and increase the content of certain bioactive lipids that are potentially healthy for consumers. However, it causes the milk fat depression syndrome (MFD), which is characterized by an inhibition of fat synthesis in the mammary gland. For a long time, it was thought that cows were susceptible to MFD, whereas goats and sheep were tolerant, but it was later shown that caprine and ovine species, as well as bovine, are also susceptible to suffer this syndrome when their diet is supplemented with marine lipids. In addition, it has been observed that animals can display very different individual degrees of milk fat depression, which may explain some apparent contradictions in the literature. Because the antilipogenic effect of certain fatty acids (FA) is the most likely origin of MFD, characterising the milk FA profile of animals showing different degrees of MFD seems a helpful step to understand the physiological basis of the tolerance or susceptibility to the syndrome. Analysing whether certain phenotypic traits can predetermine a particular responsiveness would also be of relevance to meet this aim. However, information about these aspects is scant, not only in goats and sheep but in ruminants in general.

Therefore, in Chapter I of this thesis, divergences in individual response in terms of severity of MFD syndrome in sheep and goats were compared in terms of production performance and milk lipid profile. This would allow, first, to detect interspecific variations, and second, based mainly on the common responses, to strengthen our knowledge of MFD. A second objective was to examine whether some phenotypic traits of goats and sheep (specifically their productive performance and milk FA profile) may predetermine individual tolerance or susceptibility to MFD. In order to meet both objectives, an experimental trial was conducted with 25

Murciano-Granadina goats and 23 Assaf sheep that were fed a complete mixed ration without lipid supplementation for 3 weeks (Control period). Then, all animals received the same basal diet supplemented with 2% of fish oil (FO) for 5 additional weeks (MFD period). At the end of this second period, and on the basis of the extent of FO-induced decreases in milk fat concentration, the 5 most responsive (RESPON+) and the 5 least responsive (RESPON-) animals were selected within each species (20 in total). At the end of each period, milk yield and composition, including a comprehensive FA profile, was examined. By design, between-group variation in milk fat concentration and yield was substantial, but no significant interaction with the effect of species was detected. Reductions in these two performance traits averaged 6% in RESPON- and 26% in RESPON+. Results do not allow suggesting that responsiveness to MFD would be clearly predetermined neither by the studied performance traits nor by milk FA profile, although a certain relationship with energy balance might exist. Furthermore, variations in ewes and does displaying different individual degrees of MFD may be associated with changes in certain candidate milk fat inhibitors, such as *trans*-10 18:1 and *cis*-9 16:1, whereas *trans*-10,*cis*-12 CLA would only have a minor role in determining MFD severity. Alterations in the molar yield of *de novo* and preformed FA suggest relevant differences in the mechanisms underlying MFD in RESPON+ and RESPON-, with inter-species effects being only observed in more tolerant animals.

Based on these findings, we considered that a deeper understanding of the mechanisms that might predetermine a particular individual tolerance or susceptibility to MFD was required. Therefore, considering that the milk FA profile is only examined in fat that has been successfully secreted, which may not be an accurate representation of FA leaving the



rumen and reaching the mammary gland, we proposed that individual differences may be better detected in rumen fluid than in milk. This hypothesis, common to both sheep and goats, represented the basis for the second study, which is shown in Chapter II and was conducted using the same animals as in Chapter I. Our specific aims were to elucidate whether variations in ruminal fermentation and biohydrogenation could predetermine a higher tolerance or susceptibility to MFD, and whether the severity of MFD depends exclusively on the response to the diet. On the last day of each period (Control and MFD), ruminal fluid samples were collected to examine fermentation parameters and fatty acid profiles. In general, the individual degree of MFD in sheep and goats did not seem to be predetermined by traits related to ruminal fermentation and biohydrogenation, including fatty acids that may serve as biomarkers of microorganisms. Regarding differences in the response to FO, the results suggest no link between MFD susceptibility and concentration of biohydrogenation intermediates such as *trans*-10-containing C18, C20, and C22 metabolites. The explanation for individual responses based on a shortage of ruminal acetate and 18:0 for mammary uptake also seems to be dismissed, based on the lack of variation in these compounds between RESPON+ and RESPON-. However, the concentration of unsaturated fatty acids provided by FO (e.g., *cis*-9 16:1, *cis*-11 18:1 and 20:5n-3) was higher in the rumen of RESPON+ than RESPON- ewes and does. Thus, although further research is needed, it seems that the extent of biohydrogenation of these fatty acids might be associated with tolerance or susceptibility to MFD.

Finally, and focusing on the ovine (as this was the species for which most data was available), a meta-analytical approach was used to identify phenotypic traits, both in productive parameters and milk lipid

composition, that may predetermine individual MFD extension when marine lipids are used to improve milk FA profile. Thus, in the third study (presented in Chapter III) initial data of animal performance and milk FA profile was collected from 10 trials in which 160 Assaf ewes were fed 16 diets including FO or marine algae for 3 to 5 weeks. The decrease in milk fat concentration and yield was calculated using 3 approaches: absolute change (final – initial), relative change as a percent of pretrial value, and potential change relative to the maximal expected MFD (assuming a maximal decrease to 3% milk fat). Bivariate and multivariate analyses were used to explore whether individual performance and milk FA profile are related with subsequent MFD extent. According to bivariate analyses, there was a linear relationship between initial milk fat concentration and the absolute ( $R^2 = 0,46$ ; partial  $R^2$  of 0,08), relative ( $R^2 = 0,39$ ; partial  $R^2$  of 0,06), and potential changes in milk fat concentration during MFD ( $R^2 = 0,17$ ; partial  $R^2 = 0,03$ ). Thus, when ewes were fed marine lipids, the higher the initial milk fat content, the greater the extent of MFD. This finding was supported by a second bivariate analysis (categorizing ewes by initial milk fat concentration and yield) and multivariate analyses. A weaker relationship may also exist between MFD intensity and milk yield and protein concentration before consuming the MFD inducing diet. In addition, MFD in more responsive ewes may be related to rumen function alterations that increase milk concentrations of candidate antilipogenic metabolites, such as *trans*-10 18:1, as suggested by bivariate and multivariate analyses. Although the role of milk FA as predisposing factors for MFD remained unclear, results from this meta-analysis suggest the involvement of preformed FA (>C16) uptake in the syndrome and warrant further investigation. Further research would

also be advisable to elucidate the physiological basis underlying the greater susceptibility to MFD of ewes with higher milk fat concentration.



## **RIASSUNTO**



L' inclusione di lipidi marini della dieta del bestiame da latte permette di migliorare il profilo acidico del latte e di aumentare il contenuto di alcuni lipidi bioattivi, potenzialmente salutari per i consumatori. Allo stesso tempo, questa loro inclusione può indurre la sindrome da basso grasso del latte (dall'inglese *milk fat depression*, MFD), che consiste nell'inibizione della sintesi del grasso nella ghiandola mammaria. Precedentemente, si riteneva che solo le vacche fossero soggette a MFD, mentre pecore e capre fossero tolleranti, ma in seguito è stato dimostrato che anche ovini e caprini possono sviluppare la MFD quando i lipidi marini vengono aggiunti alla loro razione. Inoltre, è stato dimostrato che gli animali possono presentare diversi gradi della sindrome da basso grasso del latte, il che potrebbe spiegare alcune contraddizioni presenti in letteratura. Poiché l'effetto antilipogenico di alcuni acidi grassi (in inglese *fatty acid*, FA) rappresenta la causa più plausibile della MFD, la caratterizzazione del profilo acidico del latte degli animali che presentano diversi gradi di MFD potrebbe essere utile per comprendere le basi fisiologiche delle differenze nell'intensità della sindrome. A tale scopo, sarebbe importante anche analizzare se alcuni tratti fenotipici possano predeterminare la risposta individuale alla sindrome.

Pertanto, nel Capitolo I di questa tesi, sono state comparate le differenze di risposta individuale in termini di intensità della sindrome della MFD in pecore e capre, in relazione ai parametri produttivi ed al profilo lipidico del latte. Tale comparazione consentirebbe, da un lato, di individuare le variazioni interspecifiche e, dall'altro, basandosi soprattutto sulle risposte comuni, di progredire nella conoscenza della MFD. Un secondo obiettivo è stato quello di analizzare se alcuni tratti fenotipici di capre e pecore (in particolare, i loro parametri produttivi e la composizione degli acidi grassi del latte) possano predeterminare una maggiore tolleranza

o suscettibilità individuale alla MFD. Per raggiungere entrambi gli obiettivi, è stata realizzata una prova sperimentale con 25 capre Murciano-Granadina e 23 pecore Assaf alimentate con una razione mista completa senza ulteriori inclusioni di lipidi per 3 settimane (periodo Controllo). Successivamente, tutti gli animali hanno ricevuto la stessa dieta basale, alla quale è stato aggiunto il 2% di olio di pesce (FO, per la sua sigla in inglese *fish oil*) per altre 5 settimane (periodo MFD). Una volta terminato questo secondo periodo, in funzione della diminuzione della concentrazione del grasso del latte indotta dal FO, sono stati selezionati 5 animali la cui risposta al trattamento era stata più intensa (RESPON+), e 5 con una risposta meno intensa (RESPON-) per ogni specie (20 in totale). Alla fine di ogni periodo, sono state esaminate la produzione e composizione del latte, compreso un profilo acido dettagliato. Come previsto dal disegno sperimentale, sono state riscontrate differenze sostanziali nella concentrazione e produzione di grasso del latte tra RESPON+ e RESPON-, ma non è stata riscontrata nessuna interazione significativa tra questi parametri e l'effetto della specie. La riduzione media della concentrazione e della produzione di grasso è stata del 26% in RESPON+ e del 6% in RESPON-. I risultati dello studio non hanno permesso di suggerire se la risposta alla MFD sia chiaramente predeterminata dai parametri produttivi presi in considerazione o dal profilo FA del latte, tuttavia potrebbe esserci una relazione con il bilancio energetico. Inoltre, la variazione individuale della suscettibilità alla MFD negli ovini e nei caprini potrebbe anche essere relazionata a cambiamenti nella concentrazione nel latte di alcuni FA con un potenziale effetto antilipogenico, come il *trans*-10 18:1 e il *cis*-9 16:1, mentre il *trans*-10,*cis*-12 CLA giocherebbe solo un ruolo minore nell'intensità della sindrome. Le variazioni nella produzione molare di FA *de novo* e preformati suggeriscono differenze rilevanti nei meccanismi



responsabili dello sviluppo della MFD in RESPON+ e RESPON-, con variazioni tra pecore e capre solo negli individui più tolleranti. Sulla base di questi risultati, erano necessarie ulteriori ricerche per approfondire la comprensione dei meccanismi che determinano una maggiore o minore sensibilità alla MFD. Pertanto, partendo dal presupposto che il profilo di FA del latte viene esaminato solo nel grasso che è stato secreto con successo, il che potrebbe non essere una rappresentazione accurata dei FA che si formano nel ruminale e che raggiungono la ghiandola mammaria, abbiamo proposto che le differenze individuali possano essere rilevate più facilmente nel liquido del ruminale che nel latte. Questa ipotesi, applicabile sia agli ovini che ai caprini, è stata la base dello studio presentato nel Capitolo II. Esso è basato sugli stessi animali selezionati nella prova descritta nel Capitolo I e ha permesso di esaminare se i processi di fermentazione e bioidrogenazione ruminale possano predeterminare maggiore tolleranza o suscettibilità alla MFD in capre e pecore, e se la gravità della sindrome dipenda esclusivamente dalla risposta alla dieta. I parametri di fermentazione ruminale e il profilo acidico sono stati esaminati in campioni di liquido ruminale raccolti alla fine di ciascun periodo sperimentale (Controllo e MFD). In generale, la variazione individuale del grado di MFD negli ovini e nei caprini non sembra essere predeterminata dai parametri legati alla fermentazione e alla bioidrogenazione ruminale, compresi gli acidi grassi che agiscono da biomarcatori del microbiota ruminale. Per quanto riguarda le differenze nella risposta al FO, i risultati suggeriscono che non vi è alcuna relazione tra la suscettibilità alla MFD e la concentrazione di isomeri C18, C20 e C22 con un doppio legame *trans*-10. I risultati escludono inoltre che la variazione individuale del grado di MFD si spieghi con una minore disponibilità mammaria di acetato e 18:0 di origine ruminale, data l'assenza

di differenze tra RESPON+ e RESPON-. Ciò nonostante, il contenuto di FA insaturi contenuti nell'olio di pesce (ad esempio *cis*-9 16:1, *cis*-11 18:1 e 20:5n-3) era più alto nel ruminante di pecore e capre RESPON+ rispetto a RESPON-. Pertanto, sebbene siano necessarie ulteriori ricerche, si può ipotizzare che l'entità della bioidrogenazione di questi FA possa essere associata alla tolleranza o alla suscettibilità alla MFD.

Infine, concentrandosi sugli ovini (in quanto specie per la quale era disponibile la maggior parte dei dati), l'obiettivo è stato quello di effettuare una meta-analisi per identificare i tratti fenotipici delle pecore, sia in termini di parametri produttivi che di composizione lipidica del latte, che potrebbero predisporre a cambiamenti più o meno intensi nella sintesi del grasso del latte quando i lipidi marini vengono utilizzati per migliorarne il profilo. A tal proposito, nel terzo studio (presentato nel Capitolo III) sono stati raccolti dati iniziali del rendimento produttivo e del profilo acidico del latte in 10 esperimenti, in cui 160 pecore Assaf sono state alimentate con 16 diete che includevano olio di pesce o microalghe marine per 3-5 settimane. La diminuzione della concentrazione e della produzione di grasso del latte è stata calcolata in tre modalità: variazione assoluta (valore finale - valore iniziale), variazione relativa (espressa come percentuale del valore iniziale) e variazione potenziale (relativa alla massima MFD prevista, supponendo che il grasso del latte non possa diminuire oltre il 3%). Sono state utilizzate analisi bi- e multivariate per analizzare la relazione tra i parametri produttivi e il profilo acidico del latte e la predisposizione alla MFD. Secondo il primo tipo di analisi, è stata riscontrata una relazione lineare tra la concentrazione iniziale di grasso del latte e le variazioni assolute ( $R^2 = 0,46$ ;  $R^2$  parziale di 0,08), relativo ( $R^2 = 0,39$ ;  $R^2$  parziale di 0,06) e potenziale del contenuto di grasso del latte durante la MFD ( $R^2 = 0,17$ ;  $R^2$  parziale =

0,03). Quindi, nelle pecore alimentate con lipidi marini, maggiore è il contenuto iniziale di grasso, maggiore è l'intensità della MFD. Questo risultato è stato rafforzato dai risultati di una seconda analisi bivariata (in cui le pecore sono state classificate in base alla concentrazione e produzione iniziale di grasso del latte) e dalle analisi multivariate. Potrebbe anche esistere una relazione, sebbene più debole, tra l'intensità della sindrome, la produzione di latte e la concentrazione di proteine prima del consumo della dieta che causa la MFD. Inoltre, l'intensità della MFD nelle pecore più sensibili potrebbe essere correlata ad alterazioni della funzione ruminale che aumentano la concentrazione nel latte di FA potenzialmente antilipogenici, come il *trans*-10 18:1. Sebbene il ruolo dei FA del latte come fattori predeterminanti della MFD rimanga poco chiaro, i risultati di questa meta-analisi suggeriscono che il meccanismo di assorbimento mammario degli acidi grassi preformati (>C16) abbia un ruolo rilevante e dovrebbe essere ulteriormente studiato. Sarebbe inoltre opportuno approfondire le basi fisiologiche della relazione tra l'entità della depressione e la concentrazione di grasso del latte prima del consumo della dieta che induce la MFD.



## **INTRODUCCIÓN**



La grasa de la leche de los rumiantes ha sufrido una desacertada desacreditación en las últimas décadas. Sin embargo, posee un elevado valor nutricional y efectos saludables para los consumidores, debido a la presencia de ciertos lípidos bioactivos (Guillocheau et al., 2020).

Existe cada vez mayor evidencia sobre la viabilidad de diversas estrategias de alimentación del ganado para incrementar de forma natural y efectiva el contenido de dichos lípidos bioactivos (Dewanckele et al., 2020). Desafortunadamente, algunas de ellas producen el síndrome de baja grasa en la leche [milk fat depression (MFD), por sus siglas en inglés], que se caracteriza por un descenso de la producción de grasa láctea, sin que, en general, se vea afectada la producción de leche y de otros componentes de la misma (Bauman y Griinari, 2001, 2003).

Durante mucho tiempo, se pensó que las vacas sufrían MFD, mientras que las cabras eran tolerantes (Kitessa et al., 2001; Chilliard et al., 2007; Sanz Sampelayo et al., 2007). En cuanto a las ovejas, Shingfield et al. especularon en 2010 que serían más similares al caprino que al bovino. Unos años después, Bernard et al. (2018) sugirieron que la susceptibilidad del ovino sería intermedia entre la de las vacas y la de las cabras.

Cuando se describieron mejor los diferentes tipos de MFD inducidos por la dieta, se confirmó que las tres especies podían sufrir este síndrome (Mavrommatis et al., 2018; Toral et al., 2020a; Copelin et al., 2021). No obstante, los pequeños rumiantes serían más tolerantes porque las dietas ricas en carbohidratos rápidamente fermentables o bajas en fibra efectiva no reducen su producción de grasa láctea, como sí ocurre en el vacuno (Dewanckele et al., 2020; Nudda et al., 2020). En cambio, ovejas y cabras, al igual que las vacas, desarrollan MFD cuando su dieta se suplementa con lipídicos de origen marino, usados precisamente para modular el perfil de

ácidos grasos (AG) de su leche (Toral et al., 2016a; Bernard et al., 2017; Martin et al., 2021).

La depresión de la grasa láctea tiene una elevada importancia en el ovino y caprino lechero (objetivo ambos de esta tesis doctoral) porque la mayor parte de su leche se destina a la elaboración de derivados lácteos, especialmente queso. Ahora bien, aún es necesaria más investigación en ovejas y cabras, ya que la mayor parte se ha llevado a cabo en el vacuno.

A pesar de la confirmación del desarrollo de MFD en vacas, ovejas y cabras, casi todas las comparaciones entre ellas son indirectas, a partir de datos publicados en la literatura de forma independiente para cada especie. Sin embargo, estas comparaciones tienen una utilidad bastante limitada, al ser el MFD un síndrome multifactorial y complejo, con una serie de factores de riesgo aún sin desentrañar (p. ej., la dieta basal, el nivel de producción, la microbiota ruminal, la lipogénesis mamaria, etc.; Bernard et al., 2018; Dewanckele et al., 2019, 2020). Por ello, es imperativo realizar ensayos directos en los que las especies comparadas se encuentren en las mismas condiciones.

Si se conoce poco sobre las diferencias entre especies de rumiantes en el desarrollo de la depresión de la grasa láctea, menos se sabe aún sobre la variación intraespecífica en respuesta a las dietas causantes de dicha MFD. Pese a ello, las diferencias individuales en el grado de reducción de la grasa láctea podrían contribuir a explicar posibles contradicciones encontradas en la literatura. Por ejemplo, algunos autores (Papadopoulos et al., 2002; Reynolds et al., 2006; Tsiplakou y Zervas, 2013a) sólo encontraron una tendencia a una MFD leve, ninguna variación o incluso aumentos en el porcentaje de grasa láctea cuando las ovejas consumían dietas suplementadas con lípidos marinos. Por el contrario, en el grupo de



investigación en el que se ha realizado esta tesis doctoral, se han observado disminuciones medias de hasta el 25% (Frutos et al., 2017). En cabras ocurre algo similar, con variaciones que abarcan desde la ausencia de MFD (Gagliostro et al., 2006; Tsiplakou y Zervas, 2013b; Pajor et al., 2019) hasta reducciones del 33% (Cattaneo et al., 2006; Toral et al., 2015; Mavrommatis et al., 2018). Aunque los mecanismos subyacentes son aún inciertos y es posible que algunas de estas aparentes incoherencias se deban a la dieta, una parte importante sería atribuible a la variación individual en la susceptibilidad a la MFD.

Una de las primeras y más aceptadas teorías sobre la MFD apunta a una alteración del ambiente ruminal, y con ello de su microbiota, que propiciaría la formación de metabolitos intermedios de la biohidrogenación (BH) con actividad antilipogénica en la glándula mamaria (Bauman y Griinari, 2001; Harvatine et al., 2009; Shingfield et al., 2010).

Por ello, en este trabajo planteamos la hipótesis de que el perfil lipídico de la leche, y más concretamente el de AG antilipogénicos procedentes de la BH ruminal, permitiría explicar las diferencias en la intensidad de la MFD no solo entre especies (en concreto, entre ovino y caprino) sino también dentro de cada especie. Esta hipótesis constituyó la base del primer trabajo, presentado en el capítulo I.

Basándonos en que el perfil de AG de la leche sólo se examina en la grasa que ha sido secretada con éxito, lo que puede no ser una representación exacta de los AG que se forman en el rumen y llegan a la glándula mamaria (Glasser et al., 2007), planteamos como segunda hipótesis que las diferencias individuales podrían detectarse más fácilmente en el fluido ruminal que en la leche. Esta hipótesis, aplicable tanto a las ovejas

como a las cabras, fue la base del segundo trabajo, presentado en el capítulo II.

Según algunos estudios, la variación individual en el grado de MFD podría estar predeterminada por diferencias en ciertos rasgos fenotípicos de los animales (*e. g.*, el nivel de producción de leche o de grasa láctea), pero la información al respecto es escasa e inconsistente. Así, por ejemplo, Baldin et al. (2018) señalaron que la susceptibilidad al síndrome de MFD era mayor en vacas de alta producción que en vacas de baja producción. Sin embargo, Dewanckele et al. (2019) observaron justo lo contrario. Muy recientemente, Padilha et al. (2022) sugirieron que en un escenario de MFD, el peso vivo de las ovejas podría interferir en los cambios en la síntesis de grasa láctea, algo que también podría ocurrir con algunos AG de la leche. Los datos, no obstante, son aún muy insuficientes, especialmente en pequeños rumiantes, lo que evidencia la necesidad de continuar investigando.

Sobre este último aspecto, propusimos la hipótesis de que podrían existir ciertas variables de los animales que predeterminaran una mayor o menor sensibilidad al desarrollo de MFD cuando consumen dietas enriquecidas con lípidos de origen marino para mejorar el perfil lipídico de su leche. Esta hipótesis se analizó en los dos primeros estudios (capítulos I y II) y sirvió de base para plantear el tercero (capítulo III).

### Objetivos

Por todo ello, esta tesis doctoral se llevó a cabo con ovejas y cabras lecheras con los siguientes objetivos principales:

- 1) Comparar las divergencias en la respuesta individual en términos de severidad del síndrome de MFD en ovino y caprino en lo que respecta al rendimiento productivo, el perfil lipídico de la leche y los procesos

de fermentación y biohidrogenación ruminal. Esta comparación debería permitirnos, por una parte, detectar variaciones interespecíficas y, por otra, basándonos especialmente en las respuestas comunes, avanzar en el conocimiento del síndrome de baja grasa en la leche. Como se ya se ha apuntado, tanto el primer estudio como el segundo (presentados en los capítulos I y II, respectivamente) se propusieron para cumplir este objetivo.

- 2) Analizar si algunos rasgos fenotípicos de las cabras y ovejas (en concreto, relacionados con su rendimiento productivo, con la composición de ácidos grasos de la leche y con los procesos de fermentación y biohidrogenación ruminal) pueden predeterminar una mayor tolerancia o susceptibilidad individual a la MFD. Los dos primeros estudios (presentados en los capítulos I y II) contribuyeron a cumplir este objetivo.

Además, y centrándose en el ovino (por ser la especie de la que se disponía de más datos), se planteó un tercer objetivo, derivado del segundo:

- 3) Profundizar, mediante un metanálisis, en la identificación de rasgos de las ovejas, tanto de rendimiento productivo como de composición de ácidos grasos de la leche, que pudieran predisponer a cambios más o menos intensos en la síntesis de grasa láctea cuando se usan aceites marinos para mejorar el perfil lipídico de la leche. Conocer los factores que predisponen a una mayor MFD podría proporcionar una visión adicional de los mecanismos subyacentes y permitir mejores predicciones de su ocurrencia en condiciones prácticas. El tercer estudio (presentado en el capítulo III) responde a este objetivo.

## REFERENCIAS

- Baldin, M., G. I. Zanton, and K. J. Harvatine. 2018. Effect of 2-hydroxy-4-(methylthio)butanoate (HMTBa) on risk of biohydrogenation-induced milk fat depression. *J. Dairy Sci.* 101:376–385. doi:10.3168/jds.2017-13446.
- Bauman, D. E., and J. M. Griinari. 2001. Regulation and nutritional manipulation of milk fat: Low-fat milk syndrome. *Livest. Prod. Sci.* 70:15–29. doi:10.1016/S0301-6226(01)00195-6.
- Bauman, D. E., and J. M. Griinari. 2003. Nutritional regulation of milk fat synthesis. *Annu. Rev. Nutr.* 23:203–227. doi:10.1146/annurev.nutr.23.011702.073408.
- Bernard, L., M. Bonnet, C. Delavaud, M. Delosière, A. Ferlay, H. Fougère, and B. Graulet. 2018. Milk fat globule in ruminant: Major and minor compounds, nutritional regulation and differences among species. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 120:1700039. doi:10.1002/ejlt.201700039.
- Bernard, L., P. G. Toral, and Y. Chilliard. 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. doi:10.3168/jds.2017-12789.
- Cattaneo, D., V. Dell’Orto, G. Varisco, A. Agazzi, and G. Savoini. 2006. Enrichment in n-3 fatty acids of goat’s colostrum and milk by maternal fish oil supplementation. *Small Rumin. Res.* 64:22–29. doi:10.1016/j.smallrumres.2005.03.013.
- Chilliard, Y., F. Glasser, A. Ferlay, L. Bernard, J. Rouel, and M. Doreau. 2007. Diet, rumen biohydrogenation and nutritional quality of cow and goat milk fat. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 109:828–855. doi:10.1002/ejlt.200700080.
- Copelin, J. E., J. L. Firkins, M. T. Socha, and C. Lee. 2021. Effects of diet fermentability and supplementation of 2-hydroxy-4-(methylthio)-butanoic acid and isoacids on milk fat depression: 1. Production, milk fatty acid profile, and nutrient digestibility. *J. Dairy Sci.* 104:1591–1603. doi:10.3168/jds.2020-18949.
- Dewanckele, L., L. Jing, B. Stefańska, B. Vlaeminck, J. Jeyanathan, W.M. Van Straalen, A. Koopmans, and V. Fievez. 2019. Distinct blood and milk 18-carbon fatty acid proportions and buccal bacterial populations in dairy cows differing in reticulorumen pH response to dietary supplementation of rapidly fermentable carbohydrates. *J. Dairy Sci.* 102:4025–4040. doi:10.3168/jds.2018-15823.
- Dewanckele, L., P. G. Toral, B. Vlaeminck, and V. Fievez. 2020. Invited review: Role of rumen biohydrogenation intermediates and rumen microbes in diet-induced milk fat depression: An update. *J. Dairy Sci.* 103:7655–7681. doi:10.3168/jds.2019-17662.
- Frutos, P., P. G. Toral, and G. Hervás. 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. doi:10.3168/jds.2017-13354.
- Gagliostro, G. A., A. Rodriguez, P. A. Pellegrini, P. Gatti, G. Muset, R. A. Castañeda, D. Colombo, and Y. Chilliard. 2006. Effects of fish oil or sunflower plus fish oil supplementation on conjugated linoleic acid (CLA) and omega 3 fatty acids in goat milk. *Rev. Argent. Prod. Anim.* 26:71–87.
- Glasser, F., M. Doreau, A. Ferlay, and Y. Chilliard. 2007. Technical note: Estimation of milk fatty acid yield from milk fat data. *J. Dairy Sci.* 90:2302–2304. doi:10.3168/jds.2006-870.
- Guillocheau, E., M. Milard, V. Rioux, C. Bourlieu, and M.-C. Michalski. 2020. Nutritional significance of milk lipids: From bioactive fatty acids to supramolecular structures impacting metabolism. In: *Advanced Dairy Chemistry Vol. 2: Lipids*. Fox, P.F., and McSweeney, P. L. H. (eds.) Springer, New York, USA, pp: 307-344.
- Harvatine, K. J., Y. R. Boisclair, and D. E. Bauman. 2009. Recent advances in the regulation of milk fat synthesis. *Animal* 3:40–54. doi:10.1017/S1751731108003133.
- Kitessa, S. M., S. K. Gulati, J. R. Ashes, E. Fleck, T. W. Scott, and P. D. Nichols. 2001. Utilisation of fish oil in ruminants: II. Transfer of fish oil fatty acids into goats' milk. *Anim. Feed Sci. Technol.* 89:201–208. doi:10.1016/S0377-8401(00)00232-7.
- Martin, C., M. Coppa, H. Fougère, A. Bougouin, R. Baumont, M. Eugène, and L. Bernard. 2021. Diets supplemented with corn oil and wheat starch, marine algae, or hydrogenated palm oil modulate methane emissions similarly in dairy goats and cows, but not feeding behavior. *Anim. Feed Sci. Technol.* 272:114783. doi:10.1016/j.anifeedsci.2020.114783.
- Mavrommatis, A., E. G. Chronopoulou, K. Sotirakoglou, N. E. Labrou, G. Zervas, and E. Tsiplakou. 2018. The impact of the dietary supplementation level with *Schizochytrium sp.* on the oxidative capacity of both goats' organism and milk. *Livest. Sci.* 218:37–43. doi:10.1016/j.livsci.2018.10.014.
- Nudda, A., A. Cannas, F. Correddu, A. S. Atzori, M. F. Lunesu, G. Battacone, and G. Pulina. 2020. Sheep and goats respond differently to feeding strategies directed to improve the fatty acid profile of milk fat. *Animals* 10:1290. doi:10.3390/ani10081290.
- Padilha, C. G., C. V. D. M. Ribeiro, and D.E. Oliveira. 2022. Milk fatty acids as covariates in multiple regression analysis is a robust approach to model the decrease in milk fat concentration and yield in small ruminants. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 1-7. doi:10.1111/jpn.13792.
- Pajor, F., I. Egerszegi, O. Steiber, Á. Bodnár, and P. Póti. 2019. Effect of marine algae supplementation on the fatty acid profile of milk of dairy goats kept indoor and on pasture. *J. Anim. Feed Sci.* 28:169–176. doi:10.22358/jafs/109955/2019.

- Papadopoulos, G., C. Goulas, E. Apostolaki, and R. Abril. 2002. Effects of dietary supplements of algae, containing polyunsaturated fatty acids, on milk yield and the composition of milk products in dairy ewes. *J. Dairy Res.* 69:357–365. doi:10.1017/S0022029902005599.
- Reynolds, C. K., V. L. Cannon, and S. C. Loerch. 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. doi:10.1016/j.anifeedsci.2006.06.015.
- Sanz Sampelayo, M. R., Y. Chilliard, Ph. Schmidely, and J. Boza. 2007. Influence of type of diet on the fat constituents of goat and sheep milk. *Small Rumin. Res.* 68:42–63. doi:10.1016/j.smallrumres.2006.09.017.
- Shingfield, K. J., L. Bernard, C. Leroux, and Y. Chilliard. 2010. Role of *trans* fatty acids in the nutritional regulation of mammary lipogenesis in ruminants. *Animal* 4:1140–1166. doi:10.1017/S1751731110000510.
- Toral, P. G., L. Bernard, A. Belenguer, J. Rouel, G. Hervás, Y. Chilliard, and P. Frutos. 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. doi:10.3168/jds.2015-10292.
- Toral, P. G., Y. Chilliard, J. Rouel, H. Leskinen, K. J. Shingfield, and L. Bernard. 2015. Comparison of the nutritional regulation of milk fat secretion and composition in cows and goats. *J. Dairy Sci.* 98:7277–7297. doi:10.3168/jds.2015-9649.
- Toral, P. G., R. Gervais, G. Hervás, M.-P. Létourneau-Montminy, and P. Frutos. 2020. Relationships between *trans*-10 shift indicators and milk fat traits in dairy ewes: Insights into milk fat depression. *Anim. Feed Sci. Technol.* 261:114389. doi:10.1016/j.anifeedsci.2020.114389.
- Tsiplakou, E., and G. Zervas. 2013a. Changes in milk and plasma fatty acid profile in response to fish and soybean oil supplementation in dairy sheep. *J. Dairy Res.* 80:205–213. doi:10.1017/S0022029913000137.
- Tsiplakou, E., and G. Zervas. 2013b. The effect of fish and soybean oil inclusion in goat diet on their milk and plasma fatty acid profile. *Livest. Sci.* 155:236–243. doi:10.1016/j.livsci.2013.05.020.

## **REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**





## 1. LECHE DE OVEJAS Y CABRAS. COMPOSICIÓN Y COMPUESTOS BIOACTIVOS

La leche de cabras y ovejas representa un alimento beneficioso para la salud humana, ya sea directamente o como derivado lácteo, por la presencia de nutrientes con elevada calidad biológica. Según Park et al. (2007), el contenido de proteínas en la leche presenta una media de 3,4% en cabras y 6,2% en ovejas, destacando las caseínas, inmunoglobulinas y péptidos bioactivos. De estos últimos compuestos se han descrito propiedades antihipertensivas, antimicrobianas, antioxidantes e inmunomoduladores.

La lactosa es el carbohidrato mayoritario de la leche, al que se le reconocen numerosos efectos, como por ejemplo regulación del equilibrio osmótico entre la sangre y células alveolares de la glándula mamaria durante la producción de leche (Park, 2017), o promoción de la absorción de calcio, magnesio y fósforo (Campbell y Marshall, 1975). El contenido medio de este nutriente en la leche de cabras y ovejas es muy estable y parece rondar el 4,5 y 4,6%, respectivamente (Recio et al., 2009; Park, 2017).

Otra característica de la leche de estas dos especies es una mayor digestibilidad respecto a la de vaca debido, quizás en parte, al tamaño de los glóbulos de grasa. De hecho, el tamaño de los glóbulos de grasa de la leche de vaca varía entre 2,5 y 5,7  $\mu\text{m}$  (Logan et al., 2014); en ovejas entre 2,8 y 4,0  $\mu\text{m}$  (El-Zeini, 2006) y en cabras entre 2,2 y 3,9  $\mu\text{m}$  (Pisanu et al., 2013). Por otro lado, es necesario señalar que, de las tres especies de rumiantes, la leche de ovejas es la que muestra el contenido más alto en sólidos totales y nutrientes, en torno al 18,4% en ovejas *vs.* un contenido medio aproximado de 13,2% en vacas y cabras (Park et al., 2007; Gantner et al., 2015).

La grasa láctea es un nutriente importante debido a sus numerosas propiedades. Los lípidos contenidos en la leche representan en cabras el 5,6% y en ovejas el 6,6%, según Jensen (2002), aunque su concentración es muy variable. Es posible clasificarlos en lípidos simples y lípidos complejos. Del primer grupo destacan los mono-, di- y triacilgliceroles; en tanto que fosfolípidos, glicolípidos y compuestos liposolubles (esteroles, ésteres de colesterol) pertenecen al segundo grupo (Park, 2007; Wendorff y Haenlein, 2017).

Como consecuencia de su elevado contenido en sólidos totales y de la calidad nutricional de grasa y proteínas, la leche de ovejas es muy adecuada para la producción de queso (Pulina y Nudda, 2002; Park et al., 2007), mientras que la de cabras, además de para quesos, puede usarse como fuente de leche alternativa para las personas con intolerancia a la leche de vaca (Tziboula-Clarke, 2003). Debido a sus efectos potenciales en la salud, hoy en día la grasa de la leche es uno de los nutrientes más estudiados. Algunos de sus lípidos presentan carácter bioactivo sobre la salud humana.

### 1.1. ÁCIDOS GRASOS

Los triacilgliceroles (TAG) constituyen aproximadamente el 95% de los lípidos de la leche, en los cuales se encuentran, de forma esterificada, los ácidos grasos (AG). Estos representan el componente principal de la grasa láctea (MacGibbon y Taylor, 2006), que está constituido por numerosos AG que resultan de distintos procesos a nivel ruminal y mamario. Algunos autores han estimado que existirían aproximativamente 400 AG en la leche, que se diferencian en la longitud de la cadena carbonada, grado de insaturación, geometría y posición de dobles enlaces (Jensen, 2002). Por ello, se pueden clasificar en saturados (ningún doble enlace), monoinsaturados

(un doble enlace) y polinsaturados (dos o más dobles enlaces; Gutnikov, 1995; Jensen, 2002).

Una de las principales diferencias entre la leche de cabras y ovejas y la de vaca estriba en la cantidad de AG de cadena corta y media ( $\leq C16$ ), pues presentan un contenido medio más alto en ovejas y cabras que en vacas (Tabla 1; Toral et al., 2010a, 2015; Frutos et al., 2017). El elevado contenido en caproico (6:0), caprílico (8:0) y cáprico (10:0) confiere a la leche de estas dos especies una elevada digestibilidad, por lo que se recomienda su consumo en sujetos que sufren de patologías de malabsorción e insuficiencia pancreática (Elwood et al., 2008). Por otro lado, el consumo de AG saturados, como por ejemplo el láurico (12:0), mirístico (14:0) y palmítico (16:0), se ha relacionado con el desarrollo de patologías coronarias y el aumento de los niveles séricos de colesterol (Parodi, 2009b). Sin embargo, aunque la leche de los rumiantes cuenta con un considerable contenido en este grupo de AG (Jensen, 2002), los compuestos con presunto efecto negativo no se consumen individualmente, sino en combinación con otros nutrientes presentes en la leche, lo que podría anular o compensar un posible efecto negativo (Parodi, 2009a).

La leche de estas dos especies también contiene ácidos grasos impares y ramificados (OBCFA, por las siglas en inglés). De los AG impares lineales (OCFA), el AG pentadecanoico (15:0) y el heptadecanoico (17:0) son los más abundantes y representativos (Fievez et al., 2012). Los AG ramificados (BCFA) se pueden clasificar a su vez en tres subgrupos: isoácidos de cadena par, isoácidos de cadena impar y anteisoácidos de cadena impar (Vlaeminck et al., 2006; Shingfield et al., 2008).

Tabla 1. Perfil de ácidos grasos de la leche en vacas, ovejas y cabras<sup>1</sup>.

AG (g/100 g AG totales)	Especie			P
	Vacas	Cabras	Ovejas	
4:0	3,17 <sup>B</sup>	2,27 <sup>C</sup>	4,12 <sup>A</sup>	<0,001
6:0	1,97 <sup>C</sup>	2,40 <sup>B</sup>	2,97 <sup>A</sup>	<0,001
8:0	1,11 <sup>B</sup>	2,79 <sup>A</sup>	2,74 <sup>A</sup>	<0,001
10:0	2,42 <sup>C</sup>	8,97 <sup>A</sup>	7,71 <sup>B</sup>	<0,001
12:0	2,80 <sup>B</sup>	4,08 <sup>A</sup>	4,34 <sup>A</sup>	<0,001
14:0	9,99	9,55	10,1	0,620
<i>cis</i> -9 14:1	0,89 <sup>A</sup>	0,14 <sup>B</sup>	0,17 <sup>B</sup>	<0,001
16:0	24,6	23,6	22,7	0,155
∑C16:1	1,72 <sup>A</sup>	1,09 <sup>B</sup>	1,78 <sup>A</sup>	0,003
18:0	10,9 <sup>A</sup>	9,28 <sup>B</sup>	7,50 <sup>B</sup>	<0,001
<i>cis</i> -9 18:1	20,6 <sup>A</sup>	17,3 <sup>B</sup>	15,5 <sup>B</sup>	<0,001
<i>trans</i> -10 18:1	2,00 <sup>A</sup>	0,66 <sup>B</sup>	2,10 <sup>A</sup>	0,043
<i>trans</i> -11 18:1	2,81 <sup>B</sup>	3,71 <sup>AB</sup>	4,62 <sup>A</sup>	0,010
<i>trans</i> -12 18:1	0,65 <sup>A</sup>	0,51 <sup>B</sup>	0,55 <sup>AB</sup>	0,047
∑ <i>cis</i> 18:1	21,7 <sup>A</sup>	18,3 <sup>B</sup>	16,5 <sup>B</sup>	<0,001
∑ <i>trans</i> 18:1	7,24 <sup>A</sup>	6,24 <sup>b</sup>	8,93 <sup>a</sup>	0,095
18:2n-6	2,14	2,12	2,33	0,712
<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 CLA	1,25 <sup>B</sup>	1,83 <sup>A</sup>	1,43 <sup>AB</sup>	0,048
<i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12-CLA	0,04 <sup>a</sup>	0,01 <sup>b</sup>	0,03 <sup>ab</sup>	0,066
<i>trans</i> -11, <i>cis</i> -15 18:2	0,51	0,36	0,46	0,635
∑CLA	1,36 <sup>B</sup>	1,98 <sup>A</sup>	1,67 <sup>AB</sup>	0,035
∑18:2 no conjugados	2,73	2,71	3,15	0,321
∑18:2	4,10 <sup>B</sup>	4,70 <sup>AB</sup>	5,02 <sup>A</sup>	0,040
18:3n3	0,65	0,57	0,81	0,327
∑18:3	0,64	0,60	0,86	0,146
∑C18	44,6 <sup>A</sup>	39,1 <sup>B</sup>	39,0 <sup>B</sup>	0,003
Sumatorios				
∑<C16	23,6 <sup>B</sup>	31,8 <sup>A</sup>	33,6 <sup>A</sup>	<0,001
∑C16	26,2	24,7	24,5	0,176
∑>C16	45,9 <sup>A</sup>	40,3 <sup>B</sup>	40,7 <sup>B</sup>	0,004
∑C4-C14 de cadena par	22,5 <sup>A</sup>	30,3 <sup>A</sup>	32,2 <sup>A</sup>	<0,001
∑4:0+6:0	5,14 <sup>B</sup>	4,67 <sup>B</sup>	7,09 <sup>A</sup>	<0,001
∑C8-C14 de cadena par	17,3 <sup>B</sup>	25,6 <sup>A</sup>	25,2 <sup>A</sup>	<0,001

A-C, a-b Para cada fila, los distintos superíndices indican diferencias significativas (A-C;  $P < 0,05$ ) o una tendencia a la significación (a-b;  $P < 0,10$ ).

<sup>1</sup>Datos procedentes de 70 publicaciones que corresponden a 79 experimentos y 278 tratamientos experimentales: 170, 58 y 50 tratamientos experimentales para vacas, cabras y ovejas, respectivamente. La lista de publicaciones está disponible en el material suplementario de Toral et al. (2013).

Entre ellos destacan los isómeros de los AG tridecanoico (*iso* 13:0 y *anteiso* 13:0), tetradecanoico (*iso* 14:0), pentadecanoico (*iso* 15:0 y *anteiso* 15:0), hexadecanoico (*iso* 16:0), heptadecanoico (*iso* 17:0 y *anteiso* 17:0) y octadecanoico (*iso* 18:0). En comparaciones indirectas, la leche de oveja parece ser la que presenta un mayor contenido de OBCFA (aproximadamente 4.4%; Toral et al., 2010a; Nudda et al., 2021), mientras que el contenido en la de vacas rondaría el 3.8% (AlZahal et al., 2009; Baumann et al., 2016) y en cabras el 2.8% (Gómez-Cortés et al., 2018; Nudda et al., 2021).

En los últimos años, los OBCFA han despertado la atención de muchos investigadores debido a sus numerosas propiedades saludables: por ejemplo, parece haber evidencias de que una mayor ingestión y niveles séricos de OCFA podrían reducir el riesgo de inflamación crónica, enfermedades cardiovasculares, síndrome metabólico, diabetes de tipo 2 y otras patologías (Yang et al. 2000; Venn-Watson et al., 2020).

También se ha señalado que los BCFA se correlacionan inversamente con la insulina sérica, los triglicéridos y la concentración de proteína C reactiva (Mika et al., 2016). Asimismo, de los BCFA se han descrito propiedades antiinflamatorias y anticancerígenas contra células de adenocarcinoma de mama humano (Dąbrowski y Konopka, 2022). Algunos autores proponen su potencial como posibles marcadores de la ingestión de grasa láctea, ya que estos AG no se sintetizan en humanos (Brevik et al., 2005; Nudda et al., 2021).

También se han sugerido como indicadores de la fermentación ruminal y de la lipogénesis microbiana (Vlaeminck et al., 2006; Fievez et al., 2012).

Otro grupo interesante de AG de la leche es el de los monoinsaturados (MUFA, por las siglas en inglés), que se caracterizan químicamente por tener un solo doble enlace en su cadena carbonada. En la leche, así como en los alimentos, es posible encontrarlos en las configuraciones *cis* y *trans* (Lock et al., 2005). De ellos, los que han recibido mayor atención debido al papel que juegan sobre la salud humana y a nivel metabólico del animal, son el ácido oleico (*cis*-9 18:1; OA) y el ácido vaccénico (*trans*-11 18:1; VA). Al OA se le reconoce un efecto potencialmente positivo sobre la reducción de enfermedades coronarias y parece contribuir a un bajo contenido de colesterol en el plasma de los consumidores (Parodi, 2009b). Además, su bajo punto de fusión permite el mantenimiento de la fluidez de la grasa de la leche (Timmen y Patton, 1988; MacGibbon y Taylor, 2006). De las transformaciones bacterianas del OA en el rumen pueden surgir varios AG, como el ácido hidroxiesteárico (10-OH-18:0) y el ácido cetoesteárico (10-O-18:0; Márquez-Ruiz et al., 2011). Se ha sugerido que los ceto y los hidroxi AG podrían ser saludables para los consumidores, ya que presentan una actividad inhibidora del crecimiento celular y apoptosis de las células  $\beta$  inducida por las citoquinas (Kokotou et al., 2020), así como potentes efectos citotóxicos en el desarrollo del melanoma humano (Abe y Sugiyama, 2005).

Los AG *trans* 18:1 (AGT) se han considerado de forma generalizada como perjudiciales para la salud humana, debido a su posible contribución al desarrollo de las enfermedades cardiovasculares (Alves et al., 2021). Sin embargo, esta aseveración debe ser matizada. Las fuentes de AGT para los consumidores son básicamente cuatro: los aceites vegetales parcialmente hidrogenados de origen industrial, los AGT producidos durante procesos térmicos, los AGT que se encuentran de forma natural en los productos de los rumiantes (fundamentalmente los productos lácteos) y los AGT

sintetizados para su utilización como suplementos lipídicos (Aldai et al., 2013). Es importante discernir el origen de estas fuentes, ya que los AGT procedentes de la industria o tratados térmicamente se producen durante la hidrogenación parcial de los aceites vegetales, lo que resulta en una distribución aleatoria de los isómeros de los AGT. Por el contrario, los AGT de la leche y productos lácteos se generan enzimáticamente mediante transformaciones bacterianas de los AG insaturados de la dieta (Aldai et al., 2013). Cabe destacar que ambas fuentes constan de los mismos isómeros *trans*, pero difieren en su distribución y cantidad. Así, el AGT predominante en los productos de los rumiantes es el VA (Li et al., 2019). De los isómeros de los AGT industriales se han descrito numerosos efectos potencialmente perjudiciales para los consumidores, como el aumento de los niveles de colesterol, aterosclerosis, inducción de apoptosis e inflamación (Brouwer et al., 2010). En cambio, los AGT de origen animal podrían ejercer propiedades saludables, como es el caso del VA. La importancia del VA radica, en primer lugar, en ser el precursor para la síntesis en la glándula mamaria, mediante la  $\Delta^9$ -desaturasa, del isómero mayoritario del ácido linoleico conjugado (CLA), el ácido ruménico (*cis-9,trans-11* CLA; RA; Lock y Bauman, 2004). Algunos autores han mostrado que la grasa láctea enriquecida naturalmente en VA y RA es anticancerígena y antiaterogénica en modelos de laboratorio (Lock et al., 2004). También se ha evidenciado que el RA podría combatir la inflamación y reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares (Stender y Dyerberg, 2004), e incluso prevenir ciertos trastornos metabólicos crónicos (Fuke y Nornberg, 2017). Por otra parte, algunos autores han descrito un efecto prolipogénico de algunos isómeros *trans* en hígado de ratones (p. ej., *trans-13+14* 18:1; Pachikian et al., 2018).

Otro AG con propiedades potencialmente beneficiosas para la salud humana es el ácido linoleico conjugado. Este término se refiere a una serie de isómeros posicionales y geométricos del ácido linoleico (18:2n-6; LA), con un doble enlace conjugado principalmente en las posiciones 7-9, 8-10, 9-11, 10-12, 11-13 y 12-14 y una configuración geométrica *cis/cis*, *cis/trans*, *trans/cis* y *trans/trans* (Luna et al., 2005). En los productos derivados de los rumiantes, estos isómeros proceden de la biohidrogenación ruminal y de procesos de desaturación en los tejidos corporales (Kramer et al., 2004). Los productos de los rumiantes, especialmente la leche y sus derivados, son las principales fuentes de los isómeros del CLA en la dieta. El isómero mayoritario del CLA es el RA, que representa el 78–89% del CLA total en la leche de ovejas (Toral et al., 2010a). Su origen se debe a la biohidrogenación ruminal, gracias a las bacterias presentes en el rumen, y a la acción de la  $\Delta^9$ -desaturasa sobre el VA en la glándula mamaria. Muchos estudios *in vitro* han sugerido su potencial en la prevención de tumores del colon (Wahle et al., 2004), efecto antiaterogénico (Kritchevsky et al., 2004) e inmunomodulatorio (Yu et al., 2002). El segundo isómero más abundante del CLA, pero en mucha menor concentración, suele ser el *trans*-10,*cis*-12 CLA, del que se han descrito tanto efectos potencialmente beneficiosos (p. ej., efecto antilipogénico para tratar la obesidad; West et al., 2000; Whigham et al., 2007) como perjudiciales (p. ej., hígado graso y resistencia a la insulina; Benjamin y Spener, 2009) para los consumidores. También cabe destacar sus efectos a nivel metabólico en el propio animal: numerosos estudios demuestran su efecto antilipogénico sobre la síntesis de grasa láctea (Bauman y Griinari, 2001), como se tratará más adelante.

Los isómeros del CLA pertenecen al grupo de los AG poliinsaturados (PUFA). Para la salud humana, otros PUFA que presentan características



nutricionales de interés son los de la familia omega-3 y omega-6 (n-3 o n-6, respectivamente). El ácido  $\alpha$ -linolénico es el precursor de los PUFA n-3 de cadena muy larga, como el ácido eicosapentaenoico (20:5n-3; EPA) y el ácido docosahexaenoico (22:6n-3; DHA); mientras que el ácido araquidónico (20:4n-6; ARA) y el ácido docosapentaenoico (22:5n-6; DPA) proceden del ácido linoleico.

Pruebas epidemiológicas y experimentales han mostrado algunos de los efectos de los PUFA: bien sobre la oxidación (Jump, 2002), sobre la posición, la cantidad y la función de las proteínas de membrana (Bazinet y Layé, 2014) o bien sobre la transmisión de señales (Luchtman y Song, 2013). Aunque se han mostrado efectos positivos de los PUFA de ambas familias para la salud humana, el consumo de productos con un mayor contenido en n-6 se ha relacionado en ocasiones con un posible aumento de la incidencia de enfermedades crónicas, quizás porque los n-6 participan en la reacción pro inflamatoria, mientras que los n-3 parecen tener un efecto antiinflamatorio (Simopoulos y DiNicolantonio, 2016; Sokoła-Wysoczańska et al., 2018; Simopoulos, 2020). Sin embargo, aún existen mucha controversia respecto a la relación PUFA n-6:n-3 y sus implicaciones para la salud humana son objeto de debate; encontrándose este índice cada vez más cuestionado (Salter, 2013).

## 1.2. ORIGEN Y SECRECIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS

El proceso de síntesis *de novo* en la glándula mamaria representa el origen mayoritario de los AG de hasta C14 y de aproximadamente el 50% de los C16. La captación del torrente sanguíneo de los lípidos procedentes de la dieta o del metabolismo lipídico ruminal constituye la fuente de los AG de cadena larga y de la otra mitad del C16 (Palmquist, 2006). La

composición de los perfiles de AG de la leche puede variar entre las especies de rumiantes debido a las diferencias que existen a nivel metabólico.

### **1.1.1. Metabolismo lipídico en el rumen**

Bacterias, protozoos, hongos y arqueas constituyen la microbiota ruminal, que realiza funciones metabólicas necesarias para la nutrición, el desarrollo y la salud de los rumiantes (Lourenço et al., 2010). El resultado de los procesos digestivos permite la producción, entre otros, de ácidos grasos volátiles (AGV), de proteína de alta calidad y de vitaminas. Al igual que en la glándula mamaria, también en el rumen tiene lugar una síntesis *de novo* de AG, pero microbiana, resultando en la producción, entre otros, de AG de cadena impar y ramificada (Or-Rashid et al., 2007). Algunos aminoácidos de la dieta, como leucina, isoleucina y valina, representan los precursores de los BCFA, que son transformados por la microbiota ruminal a ácidos isovalérico, 2-metilbutírico e isobutírico. Del primero se originan los AG *iso* pares, mientras que los ácidos isovalérico y 2-metilbutírico representan la fuente para la producción de los AG *iso* y *anteiso* de cadena impar. Pasando a los OCFA, el precursor es el propiónico que resulta de la fermentación de los carbohidratos de la dieta (Vlaeminck et al., 2006). Un estudio realizado en los últimos años ha demostrado que la dieta, y en particular su contenido de lípidos, influye en la concentración de estos AG en la leche (Toral et al., 2020b).

Generalmente, los lípidos de la dieta presentan un alto contenido de AG insaturados, la mayoría de 18 átomos de carbono, como el ácido linoleico (18:2n-6) y oleico (*cis*-9 18:1), presentes principalmente en el ensilado de maíz y alimentos concentrados, como las semillas de oleaginosas (p. ej., las de girasol y la soja), y el ácido  $\alpha$ -linolénico (18:3n-3), que se encuentra en

mayor proporción en el pasto fresco y el aceite de linaza (Palmquist y Jenkins, 2003; Ferlay et al., 2017). Una vez en el rumen, la microbiota ruminal intenta convertir los AG de la dieta en AG saturados. Este proceso es bastante complejo y se puede dividir en dos partes: lipólisis y biohidrogenación.

La lipólisis tiene como resultado la producción de AG libres (saturados e insaturados) y glicerol (Ferlay et al., 2017), mediante la acción de las lipasas (principalmente bacterianas) que hidrolizan y liberan los AG sin esterificar en el rumen. Tras la lipólisis, los AG insaturados son convertidos en AG saturados por las poblaciones bacterianas presentes en el rumen, con el fin de reducir los efectos tóxicos que podrían provocar en el ambiente ruminal (Doreau et al., 2016). Este proceso, conocido como biohidrogenación ruminal (BH), se caracteriza por una serie de reacciones de isomerización e hidrogenación que dan lugar a una multitud de isómeros de los AG (Bauman et al., 2003).

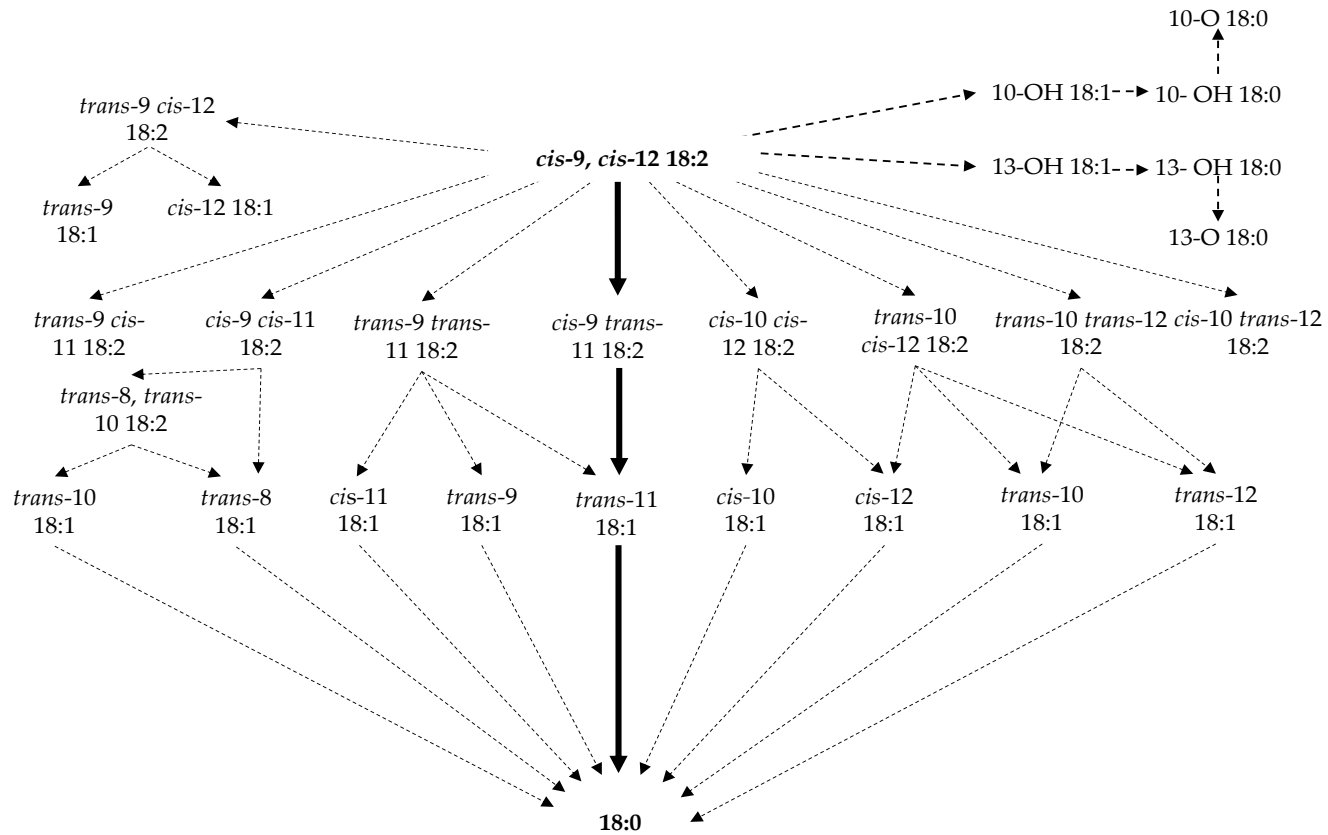
Por ejemplo, en condiciones normales y de forma muy simplificada, la conversión del *cis*-9 18:1 se ha resumido como una hidrogenación directa a 18:0 (Shingfield y Wallace, 2014). Además de la hidrogenación directa, sus vías metabólicas también incluyen la formación de 10-OH-18:0 y 10-O-18:0, mediante una primera hidratación y siguiente oxidación (Jenkins et al., 2006); otros autores han descrito la formación de isómeros *trans* (p. ej., *trans*-6,-7,-9,-10,-11,-12,-13,-14,-15,-16 18:1; Mosley et al. 2002).

Respecto a las rutas de BH del 18:2n-6, de manera muy simple (incluso simplista), la ruta de BH principal del LA se puede resumir en tres pasos: isomerización a *cis*-9,*trans*-11 CLA e hidrogenación primero a *trans*-11 18:1 y después a 18:0 (ácido esteárico; Bauman y Griinari 2003; Harvatine et al., 2009a).

Si bien los productos mayoritarios son el *cis-9,trans-11* CLA y *trans-11* 18:1, este proceso es dinámico y en función de las condiciones del ambiente ruminal, da lugar a una amplia gama de isómeros posicionales y geométricos, como por ejemplo el *trans-10,cis-12* CLA y *trans-10* 18:1, así como la acumulación de otros metabolitos intermedios 18:2 (Figura 1; Honkanen et al., 2012). También se ha demostrado que de la BH del LA resultan numerosos isómeros *trans* 18:1 (p. ej., *trans-4*, -5, -6+7+8, -9, -10, -11, -12, -13 y -14) y *cis* 18:1 (*cis-9*, -10, -11, -12 y -13; Jouany et al., 2007; Shingfield y Wallace, 2014). Asimismo, se ha descrito una posible hidratación del 18:2n-6, que puede dar lugar a la producción de 10-OH, *cis-12* 18:1 y *cis-9*, 13-OH 18:1 (Hudson et al., 1998; Kim y Oh, 2013). Por último, también se ha señalado que la BH de este AG da lugar a la formación de *cis-6,cis-12* 18:2, *cis-7,cis-12* 18:2 y *cis-8,cis-12* 18:2 (Honkanen et al., 2012).

Por su parte, de manera también muy simple, el 18:3n-3 (ácido linolénico; LNA) se isomerizaría principalmente a ácido linolénico conjugado (CLnA; *cis-9,trans-11,cis-15* 18:3), seguido de una hidrogenación a *trans-11,cis-15* 18:2 y *trans-11* 18:1, y, finalmente, a 18:0. Ensayos *in vitro* han permitido evidenciar que las vías de BH del 18:3n-3 presentan una producción de isómeros mucho más amplia y compleja que para el OA y LA (Shingfield y Wallace, 2014). Por ejemplo, la primera isomerización del 18:3n-3 puede resultar en la producción de *trans-9,trans-11,cis-15* 18:3 (Wasowska et al., 2006). También se han descrito muchos otros metabolitos intermedios, como por ejemplo numerosos 18:2 conjugados (*cis-9,cis-11* 18:2, *cis-11,trans-13* 18:2 y *trans-11,trans-13* 18:2), 18:2 no conjugados (*cis-9,cis-15* 18:2, *cis-9,trans-13* 18:2, *trans-9,cis-12* 18:2, *trans-11,cis-15* 18:2, *trans-9,trans-12* 18:2), *trans* 18:1 (-6+7+8, -9, -11, -12, -13, -14, -15 y -16) y *cis* 18:1 (-13 y -15).

Figura 1. Posibles vías que describen el metabolismo del 18:2n-6 en el rumen. Las flechas con líneas continuas indican la vía principal de biohidrogenación, mientras que las flechas con líneas discontinuas representan la formación de metabolitos secundarios. Figura adaptada de Shingfield et al. (2010).



De las rutas de BH y metabolitos intermedios del EPA y DHA (AG en los que son ricos los lípidos marinos), contamos con pocos estudios detallados. Pruebas *in vivo* han demostrado que estos AG se metabolizan extensamente en el rumen (Shingfield et al., 2003), lo que resulta en una baja eficiencia de su transferencia a la leche de los rumiantes (Ashes et al., 1992; Loor et al., 2005). Para tratar de explicar su rutas de BH, algunos autores han propuesto una primera isomerización que daría lugar a la formación de metabolitos intermedios conjugados de 20 y 22 carbonos; mientras que otros han sugerido una posible saturación directa como primer paso de la BH (Toral et al., 2018a; Kairenius et al., 2011; Jeyanathan et al., 2016). Apoyando la primera hipótesis, Aldai et al. (2018) detectaron isómeros de 22:6 en la digesta ruminal de las ovejas. Puesto que el DPA, AG también presente en los lípidos marinos, es el que presenta mayor transferencia a la leche (Loor et al., 2005; Castañeda-Gutiérrez et al., 2007), en un estudio de Toral et al. (2018a) se especuló sobre su implicación como metabolito intermedio en las rutas de BH del 22:6n-3. Sin embargo, los resultados obtenidos evidenciaron que el DPA no parece ser un intermediario importante de las posibles rutas de BH del DHA y que el proceso de BH de ambos AG (DPA y DHA) podría seguir vías separadas, con la acumulación de numerosos metabolitos únicos en cada caso.

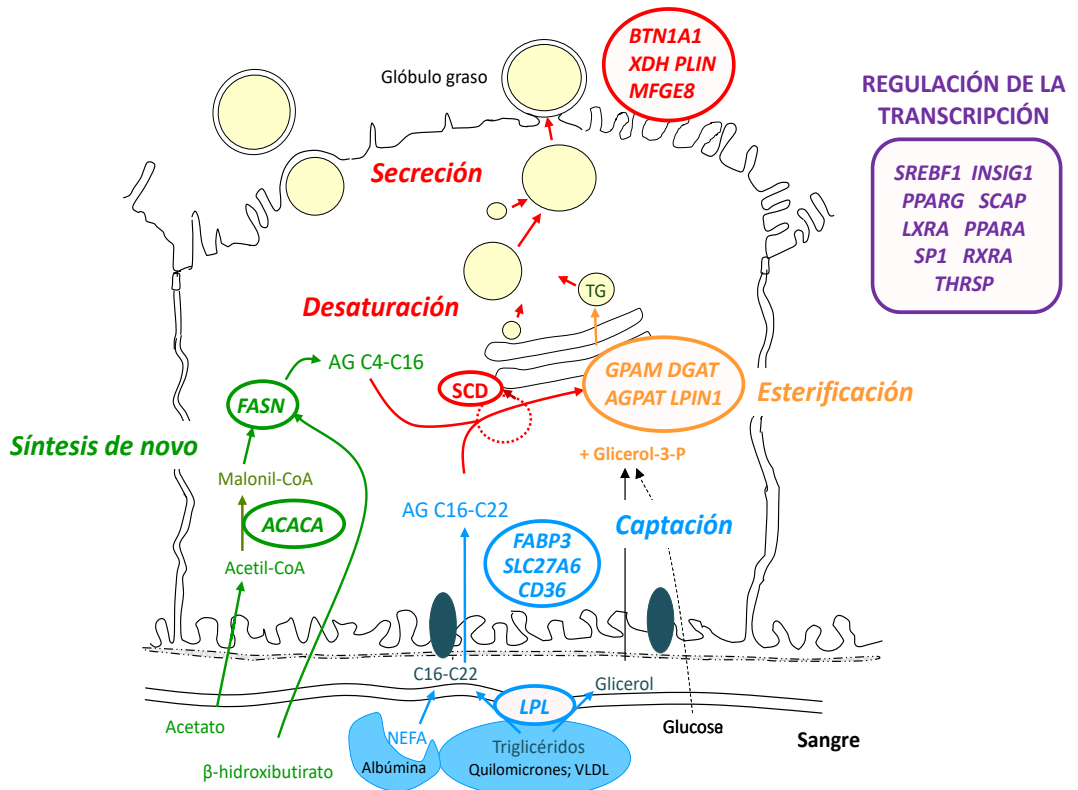
Como ya se ha mencionado, las vías de la BH de los AG descritos son solo una simplificación para entender el proceso, pero este es mucho más complejo.

### ***1.2.2. Metabolismo lipídico en la glándula mamaria***

Las células epiteliales de la glándula mamaria están organizadas de manera que pueden realizar una compleja conversión de los nutrientes

captados desde la sangre, dando lugar a los componentes de la leche. En concreto, el proceso de secreción de la grasa de la leche es muy complejo y su cantidad y composición final está fuertemente influida por numerosos factores, entre los que destaca la alimentación (Bauman et al., 2006). La síntesis de AG en la glándula mamaria ha sido ampliamente descrita por Barber et al. (1997), siendo dos los procesos principales a partir de los que se originan los AG: síntesis *de novo* y captación de los AG preformados (Figura 2). A continuación, se describen brevemente dichos procesos.

Figura 2. Principales procesos implicados en la lipogénesis en una célula epitelial del tejido secretor mamario de rumiantes. Figura adaptada de Bernard et al. (2008).



### 1.2.2.1. Síntesis de ácidos grasos de novo

Los AG volátiles procedentes de la fermentación ruminal de los carbohidratos de la dieta son los precursores para la síntesis *de novo* de los AG de la leche (Bauman y Davis, 1974; Bernard et al., 2008). El acetato (2:0) y  $\beta$ -hidroxibutirato (4:0) son las principales fuentes de carbono para la síntesis de AG, mientras que el propiónico (3:0) es utilizado en menor medida (Palmquist, 2006). Estos AGV son captados de la sangre y utilizados por las células del epitelio mamario para la formación de los AG de la leche (Bauman et al., 2011). La enzima acetil-CoA sintetasa citoplasmática, codificada por el gen *ACSS2* (Moore y Christie, 1981), permite la unión del acetato y  $\beta$ -hidroxibutirato a la coenzima-A, empezando así el proceso de síntesis (Bernard et al., 2008). Este paso lleva a la producción de acetil-CoA o butiril-CoA. La acetil-CoA carboxilasa (codificada por el gen *ACACA*; Bernard et al., 2008) cataliza la formación de malonil-CoA a partir de acetil-CoA, y butiril-CoA a partir del  $\beta$ -hidroxibutirato. El butiril-CoA contribuirá como precursor en la síntesis de los primeros carbonos de AG, mientras que el acetil-CoA será utilizado tanto como precursor como en la elongación de los AG (Bauman et al., 2011). La elongación de la cadena lipídica es llevada a cabo por la enzima ácidos grasos sintasa (codificada por el gen *FASN*; Bernard et al., 2008) que añade moléculas de acetil-CoA a la cadena lipídica, para producir ácidos grasos de cadena más larga (hasta C16; Bauman et al., 2011).

La glándula mamaria también puede utilizar otras fuentes en el proceso de síntesis, como por ejemplo el propionato, el metilmalonato o los AG volátiles de cadena ramificada (isovalérico, isobutírico y 2-metilbutírico). El uso de dichas fuentes para la síntesis *de novo* de los AG resulta en la producción de OBCFA (Palmquist, 2006).



### **1.2.2.2. Captación de ácidos grasos preformados**

La captación de los AG de la sangre representa el segundo proceso de síntesis de AG de la leche. Los triglicéridos plasmáticos presentes en el torrente sanguíneo, unidos a quilomicrones o lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL, por las siglas en inglés), son captados por las células de la glándula mamaria gracias a la acción de la lipoproteinlipasa (codificada por el gen *LPL*) situada en la superficie del endotelio capilar (Barber et al., 1997; Bionaz y Loor, 2008). La lipoproteinlipasa puede hidrolizar el TAG de las VLDL en glicerol y AG no esterificados. Además, los AG libres circulantes en el plasma también pueden ser incorporados por la glándula mamaria. Mediante la presencia de lipoproteínas transportadoras, como la isoforma 3 de la proteína transportadora de AG (codificada por el gen *FABP3*), la translocasa de AG (codificada por el gen *CD36*) y diferentes isoformas de la familia de proteínas transportadoras FATP (codificadas por el gen *SLC27A*), los AG preformados parecen ser transportados a través de la membrana plasmática de la glándula mamaria, donde se transformarán en ésteres de CoA (Bernard et al., 2008; Bionaz y Loor, 2008).

### **1.2.3. Otras rutas metabólicas**

Si bien la síntesis *de novo* de los AG y captación de los AG preformados representan las rutas principales para la producción de los AG en la leche, también existen otros procesos metabólicos que dan lugar a la formación de distintas clases de AG, como por ejemplo los monoinsaturados (p. ej., *cis*-9 18:1), utilizados para la síntesis de los triglicéridos, los fosfolípidos y los ésteres del colesterol (Palmquist et al., 2005).

En la glándula mamaria, la enzima esteroil-CoA desaturasa (SCD o  $\Delta^9$ -desaturasa) media el proceso de desaturación, en el que participan la NADH-citocromo-b5 reductasa, el citocromo b5, la acil-CoA sintasa y la propia  $\Delta^9$ -desaturasa. La  $\Delta^9$ -desaturasa cataliza la síntesis de los AG insaturados introduciendo un doble enlace *cis* en la posición 9 de la cadena carbonada (Ntambi y Miyazaki, 2003). En los rumiantes se han descrito dos isoformas del gen que codifica la SCD: *SCD1* y *SCD5* (Lengi y Corl, 2010). Los principales sustratos de la SCD son el 18:0 y el *trans*-11 18:1, aunque también puede haber otros. La desaturación del 18:0 permite la síntesis del *cis*-9 18:1 (Palmquist et al., 2005; Bernard et al., 2013a), mientras que el *trans*-11 18:1 es desaturado a RA.

Además, se ha identificado otro grupo de genes que codifican enzimas implicadas en otros procesos de desaturación de AG, que incluyen la *FADS1* ( $\Delta^5$ -desaturasa), la *FADS2* ( $\Delta^6$ -desaturasa) y la *FADS3* ( $\Delta^{13}$ -desaturasa; Rioux y Legrand, 2019). La  $\Delta^6$ -desaturasa introduce un doble enlace entre el carbono 6 y 7 de la cadena carbonada del AG, mientras que la  $\Delta^5$ -desaturasa introduce el doble enlace en la posición 5 del AG (Nakamura y Nara, 2004).

Los productos de la desaturación son componentes importantes de los fosfolípidos y los triglicéridos que intervienen en la fluidez de las membranas celulares (Griinari et al., 2000). La mayoría de los AG que proceden del rumen son saturados y presentan un punto de fusión muy alto (e. g., 18:0, *pf* 69°C; Timmen y Patton, 1988). En cambio, algunos de los AG insaturados presentan un punto de fusión más bajo (e. g. *cis*-9 18:1, *pf* 14°C), por lo que la desaturación de los AG saturados garantiza el mantenimiento de la fluidez de la grasa de la leche y de las membranas celulares (Timmen y Patton, 1988; Bauman et al., 2011). Se considera que la fluidez de la grasa de la leche se mantiene dentro del rango fisiológico cuando el punto de

fusión medio de los AG no supera la temperatura corporal del animal (Ntambi y Miyazaki, 2003).

Los AG representan los principales componentes de los triglicéridos, cuya síntesis tiene lugar mediante los enzimas localizados en la parte interna y externa de las mitocondrias y del retículo endoplásmico (Coleman et al., 2004). El proceso empieza con la unión de los AG con glicerol-3-fosfato, que procede de la glucólisis (Kinsella, 1968). Aproximadamente entre el 56% y el 62% de los AG saturados de cadena media y larga (10:0 a 18:0) se esterifican en las posiciones *sn*-1 y *sn*-2 del esqueleto de glicerol, mediante la acción de la glicerol-3-fosfato aciltransferasa mitocondrial (codificada por el gen *GPAM*) y 1-acilglicerol-3-fosfato O-aciltransferasa (codificada por el gen *AGPAT*; Coleman y Lee, 2004; Bernard et al., 2008), respectivamente. El 16:0 se distribuye equitativamente entre las posiciones *sn*-1 y *sn*-2, mientras que el 8:0, 10:0, 12:0 y 14:0 están más concentrados en la posición *sn*-2, y el 18:0 está más concentrado en la posición *sn*-1. Además, el 24% de los AG esterificados en la posición *sn*-1 son isómeros 18:1; el 44% de los AG esterificados en la posición *sn*-3 (por la diacilglicerol O-aciltransferasa 1, codificada por el gen *DGAT1*; Jensen, 2002; Bernard et al., 2008) son ácidos grasos de cadena corta (4:0, 6:0, 8:0) y el 27% es ácido oleico.

Una vez sintetizados, los triglicéridos se transportarán desde el retículo endoplasmático rugoso y se liberarán en el citoplasma en forma de microgotas lipídicas (Keenan y Mather, 2006). Durante el transporte, algunas microgotas pueden combinarse dando lugar a gotas de mayor tamaño (4  $\mu\text{m}$  de diámetro) que, una vez liberadas en el lumen alveolar, se recubrirán de una capa, llamada membrana del glóbulo graso, que impide la coalescencia de los glóbulos de grasa y su degradación enzimática (Dewettinck et al., 2008). La composición de la membrana del glóbulo graso

es compleja e incluye la presencia de fosfolípidos, esfingolípidos y glucoproteínas. Entre las últimas, es importante mencionar la translocasa de ácidos grasos (CD36), la butirofilina subfamilia 1, miembro A1 (BTN1A1), la xantina deshidrogenasa (XDH) y la adipofilina (ADFP o PLIN2), que participan en el proceso de excreción de la gota lipídica (Keenan y Mather, 2006; McManaman et al., 2007).

### 1.3. REGULACIÓN NUTRICIONAL DE LA LIPOGÉNESIS EN LA GLÁNDULA MAMARIA

La lipogénesis en la glándula mamaria se ve afectada por factores como la genética o la nutrición. Esta última representa la herramienta más eficaz para modificar la concentración y producción de la grasa láctea en los rumiantes (Chilliard et al., 2003; Lock y Bauman, 2004; Harvatine et al., 2009a; Bauman et al., 2011). La grasa de la leche también puede sufrir alteraciones por el tipo de forraje y nivel de concentrado utilizados en la dieta, inclusión de suplementos lipídicos y estacionalidad (Chilliard et al., 2014).

Concretamente, se ha descrito que el uso de AG poliinsaturados en las dietas de los rumiantes puede tener un efecto sobre la grasa de la leche, que varía según el tipo de suplemento lipídico utilizado. Por ejemplo, el uso de lípidos marinos, ricos en EPA y DHA, puede regular la expresión de genes implicados en la lipogénesis de la glándula mamaria. De hecho, algunos estudios han señalado que la suplementación con lípidos marinos puede reducir la síntesis de grasa de la leche, debido a la inhibición de la expresión de la esteroil-CoA desaturasa (*SCD1*), la ácido graso sintasa (*FASN*), la

acetil-CoA carboxilasa (*ACACA*), la lipoproteína lipasa (*LPL*) y la proteína 3 de unión a ácidos grasos (*FABP3*; Bauman et al., 2006).

Las interacciones que tienen lugar entre los nutrientes y la expresión de los genes son objeto de estudio de la nutrigenómica (Bionaz et al., 2015). El uso de esta disciplina en los sistemas de producción de rumiantes puede ayudar a conocer los mecanismos que explican los cambios observados con la dieta.

En vacas, cabras y ovejas, se ha descrito que algunos isómeros de la BH ruminal (p. ej., *trans*-10,*cis*-12 CLA) podrían jugar un papel clave en la regulación nutricional de la lipogénesis en la glándula mamaria, especialmente a través de su efecto sobre algunos factores de transcripción (Baumgard et al., 2001; Shingfield et al., 2013).

Los factores de transcripción son proteínas activadas por señales citoplasmáticas, que cooperan en la transcripción de los genes (incluyendo los implicados en los procesos de la síntesis de grasa en la glándula mamaria, activación y transporte de los AG, desaturación, síntesis de los triglicéridos, formación y secreción de los glóbulos de grasa, etc.) y parecen tener un elevado peso en las alteraciones debidas a la interacción dieta-animal (Shi et al., 2014; Bionaz et al., 2015; Vargas-Bello-Pérez et al., 2019).

Los principales factores de transcripción descritos como implicados en el proceso de lipogénesis mamaria son el regulador de transcripción del factor 1 de elementos reguladores del esterol, SREBP1 (codificado por el gen *SREBF1*) y los receptores activados por el receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas PPAR (Ma y Corl, 2012; Bionaz et al., 2015; Osorio et al., 2016).

Del SREBP1 se han descrito al menos dos isoformas (SREBP1a y SREBP1c), cada una con una función distinta (Shimomura et al., 1999; Bernard et al., 2008; Shimano, 2009). La isoforma SREBP1a parece más implicada en el metabolismo del colesterol; la isoforma SREBP1c activa la transcripción de genes implicados en la síntesis de ácidos grasos y triglicéridos, como los que codifican *ACACA*, *FASN* y *SCD1* (Li et al., 2014).

Los PPAR están implicados en la transcripción de genes en diferentes vías del metabolismo de los lípidos, como el transporte de triglicéridos en el plasma, la captación y la oxidación peroxisomal y mitocondrial (Schoonjans et al., 1996; Bernard et al., 2008). De los varios receptores PPAR identificados ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ), PPAR  $\alpha$  se expresa principalmente en el hígado, pero también en el corazón, riñón, mucosa intestinal y tejido adiposo pardo. Por su parte, PPAR  $\gamma$  es el más abundante en el tejido adiposo blanco (Schoonjans et al., 1996) y parece ser uno de los receptores más estudiados debido a su papel central en la regulación del metabolismo en relación con la composición y concentración de AG de cadena larga presentes en la célula (Desvergne et al., 2006; Bionaz et al., 2015; Osorio et al., 2017). Por último, PPAR  $\beta/\delta$  están expresados principalmente en los riñones y la placenta, seguidos de los tejidos adiposos y el rumen (Bionaz et al., 2013).

La actividad de SREBP1 tiene una gran influencia sobre la de PPAR  $\gamma$ , ya que, si el primero resulta inhibido, el segundo no es capaz de restablecer la síntesis de grasa láctea (Bionaz et al., 2015; Osorio et al., 2017).

A día de hoy, entre los pocos factores de transcripción que se sabe que son modulados por los AG, los datos apoyan la activación de PPAR por los AG saturados y la inhibición de SREBP1 por los AG poliinsaturados en las vacas lecheras (Bionaz et al., 2020). Las funciones de SREBP1 y PPAR  $\gamma$  parecen claras en el tejido mamario, ya que intervienen en la regulación de

la síntesis de grasa láctea, pero la función y regulación de otros factores de transcripción es aún incierta (Bionaz et al., 2020).

## **2. SUPLEMENTACIÓN DE LA DIETA CON LÍPIDOS PARA MEJORAR EL PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS DE LA LECHE**

El uso de suplementos lipídicos en la dieta de los rumiantes es una estrategia que permite aumentar el contenido de AG saludables para la salud humana en la leche y en la carne, así como disminuir otros que se consideran potencialmente perjudiciales (Shingfield et al., 2013). Los suplementos lipídicos más utilizados en los estudios llevados a cabo en cabras y ovejas para evaluar los cambios en la composición de los AG de la leche son los aceites vegetales y los de origen marino (Tabla 2; Nudda et al., 2020).

El interés por aumentar el contenido de AG saludables y reducir el de aquellos no deseables en la leche y sus derivados se basa en las recomendaciones nutricionales generales, que sugieren disminuir el consumo de algunos AG saturados (p. ej., el 12:0 y el 14:0) que podrían resultar negativos para la salud humana y aumentar el de insaturados (WHO/FAO, 2013). Sin embargo, en los últimos años esta noción se ha reevaluado en gran medida, ya que la leche contiene algunos AG saturados que son inocuos o incluso positivos para la salud (German et al., 2009; Parodi, 2009a).

Otro aspecto que hay que considerar cuando se utilizan suplementos lipídicos en las dietas de los rumiantes es el efecto que estos últimos pueden tener sobre el rendimiento productivo de los animales (Harvatine y Allen, 2006).

Tabla 2. Perfil de ácidos grasos de la leche de vacas, cabras y ovejas alimentadas con dietas sin suplementación lipídica o suplementadas con fuentes lipídicas ricas en ácidos grasos con distinto grado de insaturación.

Especie	Dieta	Ácidos grasos (g/100g AG totales)								
		∑4:0+6:0	10:0	<i>cis</i> -9 14:1	18:0	<i>trans</i> -10 18:1	<i>trans</i> -11 18:1	18:2n-6	<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 CLA	∑18:3
Vacuno										
	Sin suplementación	5,75 <sup>B</sup>	3,16 <sup>G</sup>	1,05 <sup>A</sup>	9,56 <sup>DE</sup>	0,44 <sup>f</sup>	1,68 <sup>G</sup>	1,94 <sup>EF</sup>	0,82 <sup>EF</sup>	0,59 <sup>cd</sup>
	<i>cis</i> -9 18:1	5,00 <sup>CD</sup>	2,32 <sup>H</sup>	0,86 <sup>B</sup>	12,4 <sup>ABC</sup>	1,52 <sup>def</sup>	2,12 <sup>DFG</sup>	1,92 <sup>EF</sup>	0,96 <sup>DEF</sup>	0,47 <sup>cd</sup>
	18:2n-6	4,71 <sup>D</sup>	2,00 <sup>H</sup>	0,80 <sup>B</sup>	12,1 <sup>ABC</sup>	3,62 <sup>ab</sup>	2,76 <sup>CDF</sup>	2,94 <sup>AB</sup>	1,29 <sup>CD</sup>	0,52 <sup>cd</sup>
	18:3n-3	5,13 <sup>C</sup>	2,30 <sup>H</sup>	0,71 <sup>C</sup>	12,7 <sup>A</sup>	1,33 <sup>de</sup>	2,97 <sup>CDF</sup>	1,88 <sup>EF</sup>	1,25 <sup>CD</sup>	1,03 <sup>b</sup>
	20:5n-3+22:6n-3	5,11 <sup>CD</sup>	2,31 <sup>H</sup>	1,01 <sup>A</sup>	7,84 <sup>FG</sup>	3,10 <sup>bc</sup>	4,51 <sup>BE</sup>	2,02 <sup>EF</sup>	1,92 <sup>B</sup>	0,60 <sup>cd</sup>
Caprino										
	Sin suplementación	4,62 <sup>CD</sup>	10,1 <sup>A</sup>	0,18 <sup>D</sup>	7,46 <sup>FG</sup>	0,31 <sup>ef</sup>	0,89 <sup>G</sup>	2,17 <sup>DEF</sup>	0,55 <sup>F</sup>	0,49 <sup>cd</sup>
	<i>cis</i> -9 18:1	4,70 <sup>CD</sup>	8,44 <sup>CD</sup>	0,11 <sup>D</sup>	12,6 <sup>AB</sup>	0,60 <sup>def</sup>	1,88 <sup>DFG</sup>	1,86 <sup>EF</sup>	0,82 <sup>DEF</sup>	0,49 <sup>cd</sup>
	18:2n-6	4,62 <sup>CD</sup>	8,21 <sup>CDE</sup>	0,12 <sup>D</sup>	10,5 <sup>CD</sup>	1,06 <sup>def</sup>	4,90 <sup>B</sup>	2,68 <sup>ABC</sup>	2,36 <sup>AB</sup>	0,38 <sup>d</sup>
	18:3n-3	4,94 <sup>CD</sup>	8,93 <sup>BC</sup>	0,11 <sup>D</sup>	10,5 <sup>CDE</sup>	0,56 <sup>def</sup>	4,45 <sup>BCE</sup>	1,95 <sup>DEF</sup>	1,75 <sup>BC</sup>	1,14 <sup>b</sup>
	20:5n-3+22:6n-3	4,49 <sup>BCD</sup>	9,19 <sup>ABCDE</sup>	0,19 <sup>D</sup>	5,34 <sup>GHI</sup>	0,77 <sup>bcdef</sup>	6,42 <sup>ABC</sup>	1,93 <sup>ABCD</sup>	3,66 <sup>A</sup>	0,52 <sup>cd</sup>
Ovino										
	Sin suplementación	7,18 <sup>A</sup>	9,51 <sup>AB</sup>	0,20 <sup>D</sup>	6,97 <sup>G</sup>	0,71 <sup>ef</sup>	2,04 <sup>FG</sup>	2,61 <sup>ABCD</sup>	0,83 <sup>DEF</sup>	0,71 <sup>c</sup>
	<i>cis</i> -9 18:1	7,12 <sup>A</sup>	6,91 <sup>DEF</sup>	0,15 <sup>D</sup>	9,55 <sup>BCDEFG</sup>	2,47 <sup>abcdef</sup>	1,76 <sup>DEFG</sup>	1,62 <sup>F</sup>	0,56 <sup>DEF</sup>	0,54 <sup>cd</sup>
	18:2n-6	7,00 <sup>A</sup>	6,89 <sup>F</sup>	0,16 <sup>D</sup>	8,38 <sup>EFH</sup>	1,97 <sup>cd</sup>	5,82 <sup>B</sup>	2,91 <sup>A</sup>	2,06 <sup>B</sup>	0,62 <sup>cd</sup>
	18:3n-3	7,01 <sup>A</sup>	6,77 <sup>EF</sup>	0,15 <sup>D</sup>	10,0 <sup>ABCDEFG</sup>	0,77 <sup>def</sup>	4,56 <sup>BCD</sup>	2,09 <sup>CDEF</sup>	1,64 <sup>BCDE</sup>	1,76 <sup>a</sup>
	20:5n-3+22:6n-3	7,12 <sup>A</sup>	8,47 <sup>CD</sup>	0,18 <sup>D</sup>	2,61 <sup>I</sup>	4,56 <sup>a</sup>	8,89 <sup>A</sup>	2,42 <sup>BCDE</sup>	2,05 <sup>B</sup>	0,66 <sup>cd</sup>
	<i>P</i> (especie × dieta)	0,011	0,029	<0,001	0,047	0,051	<0,001	0,048	<0,001	0,081

<sup>A-I; a-f</sup> Para cada columna, los diferentes superíndices indican diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) o una tendencia hacia la significación ( $a-f$ ;  $P < 0,10$ ) para el efecto de la interacción entre especie y dieta.



Uno de los efectos más descritos al suplementar con lípidos es una disminución de la ingestión de alimento, debido al aumento en la densidad energética de la ración (Chilliard y Ferlay, 2004). Una excesiva cantidad de grasa en la dieta de los rumiantes también puede reducir la digestibilidad de la fibra y la producción de AG volátiles en el rumen, lo que puede llevar a una disminución en la producción de leche y carne (Chilliard et al., 2014). Sin embargo, a las dosis generalmente utilizadas para modular el perfil de AG de la leche, no suele darse este inconveniente (Toral et al., 2010c).

Por otra parte, la biohidrogenación ruminal de los AG presentes en la dieta puede dar lugar a la formación de metabolitos intermedios, como el *trans*-10 18:1 y *trans*-10,*cis*-12 CLA, que se han relacionado con el síndrome de baja grasa en la leche (Griinari et al., 1998; Baumgard et al., 2000; Bauman y Griinari, 2003; Moate et al., 2008). En vacas, se han descrito efectos negativos del *trans*-10,*cis*-12 CLA sobre la síntesis de la grasa de la leche (Bauman y Griinari, 2003) que indican que algunos de estos compuestos biológicos pueden ser muy activos incluso a concentraciones muy bajas.

Cuando la dieta se suplementa con lípidos, la respuesta en términos de producción de leche varía no solo entre las tres principales especies de rumiantes domésticos (vacas, ovejas y cabras; Shingfield et al., 2010), sino también dependiendo de la dieta basal (Chilliard y Ferlay, 2004). Además, es importante asegurarse de que la cantidad de lípidos en la dieta se ajuste a las necesidades nutricionales de los animales y no sean perjudiciales para su fermentación ruminal (Doreau y Chilliard, 1997; Chilliard et al., 2007).

## 2.1. SUPLEMENTACIÓN DE LA DIETA CON ACEITES VEGETALES

La inclusión de aceites vegetales en las dietas de los rumiantes representa una de las estrategias más estudiadas en nutrición animal, ya que puede aumentar las concentraciones de algunos AG saludables para los consumidores, como el *cis*-9 18:1, *trans*-11 18:1, RA y PUFA n-3 (Palmquist et al., 1993; Chilliard y Ferlay, 2004; Jenkins y Harvatine, 2014). Maximizar el contenido de los AG saludables previamente mencionados es posible mediante el aumento de la ingestión de AG insaturados de la dieta (Palmquist et al., 1993, 2005; Shingfield y Wallace, 2014). Muchos son los estudios en los que se examina el efecto de los aceites vegetales y la respuestas de los rumiantes, en particular las modificaciones que se producen en el rumen debido al extenso metabolismo de los AG presentes en estos aceites y los consecuentes cambios que tienen lugar en la composición de AG de la leche tras la suplementación (Palmquist et al., 1993; Dewhurst et al., 2006; Chilliard et al., 2014; Toral et al., 2018c).

Los aceites vegetales más utilizados en los estudios en rumiantes son el aceite de colza, girasol, linaza y soja, ricos en AG insaturados como 18:1n-9, 18:2n-6 y 18:3n-3 (Lock y Bauman, 2004; Hervás et al., 2008; Nudda et al., 2020).

El aceite de colza presenta AG monoinsaturados y polinsaturados (como el ácido linoleico y  $\alpha$ -linolénico), aunque el AG que más destaca es el *cis*-9 18:1, puesto que representa alrededor del 60-70% de los AG totales (Fenwick y Curtis, 1980; Xie et al., 2019). Los AG mayoritarios del aceite de girasol son el linoleico (de media, aproximadamente 60-70%), *cis*-9 18:1 (alrededor del 20-30%) y el ácido palmítico y esteárico (aproximadamente,

10%; Garcés et al., 2009; Shingfield et al., 2013). Por su parte, el aceite de linaza presenta elevadas concentraciones de ácido  $\alpha$ -linolénico (de media, en torno al 50-60%), ácido linoleico (entre 14-20%, aproximadamente) y, en menor medida, de *cis*-9 18:1 (Chilliard et al., 2009; Manso et al., 2016). Por último, el aceite de soja es rico en ácido oleico (de media, 22%), linoleico (aproximadamente, 40%) y linolénico (en torno al 5%; McNiven et al., 2004; AlZahal et al., 2009).

Los efectos de la inclusión de los aceites vegetales en el animal y su producción son distintos en función de la especie de rumiante estudiada (Sanz Sampelayo et al., 2007; Toral et al., 2015; Tsiplakou et al., 2017; Delavaud et al., 2019). en la literatura existe escasa información sobre comparaciones directas en vacas, cabras y ovejas, se suele recurrir a comparaciones indirectas para evaluar la respuesta de la especie al tipo de suplemento incluido en su dieta. Estudios en cabras (Mir et al., 1999) y ovejas (Parente et al., 2018) que recibían aceite de colza evidenciaron una disminución en el contenido de los AG de corta cadena y un aumento de *cis*-9 18:1, *trans*-11 18:1 y 18:0.

En los estudios llevados a cabo con aceite de linaza en cabras y ovejas es posible evidenciar un aumento en el contenido del ácido  $\alpha$ -linolénico y PUFA n-3 y una disminución de los AG saturados y de la relación n-6/n-3 en la leche (Bernard et al., 2009; Manso et al., 2011; Nudda et al., 2020).

Cuando se evalúan los efectos de la suplementación con aceite de girasol y soja, tanto en cabras como en ovejas, se describe un aumento de las concentraciones de ácido ruménico y vaccénico (Bouattour et al., 2008; Hervás et al., 2008; Ollier et al., 2009; Nudda et al., 2020).

Es destacable que comparando los estudios en los que se examina la respuesta de cabras y ovejas a la suplementación con aceite de girasol o de soja, se detectan diferencias entre las dos especies (Nudda et al., 2020). En el caso de las cabras, el aumento de las concentraciones de RA y VA es mucho más efectiva al suplementar con aceite de girasol (Ollier et al., 2009; Bernard et al., 2016), mientras que el aceite de soja parece ser más efectivo en ovejas (Bodas et al., 2010).

En todos los estudios previamente descritos, la suplementación de la dieta con aceites vegetales permite aumentar el contenido de algunos de la AG saludables para la salud humana. Sin embargo, debido a su extensa biohidrogenación ruminal, resulta difícil aumentar el contenido de algunos PUFA n-3.

## 2.2. SUPLEMENTACIÓN DE LA DIETA CON LÍPIDOS MARINOS

Los ácidos grasos poliinsaturados de cadena muy larga, como el EPA y el DHA, presentan efectos saludables para las personas, como la prevención de enfermedades crónicas relacionadas con el sistema cardiovascular y nervioso (Bourre, 2005; Simopoulos y DiNicolantonio, 2016). Sin embargo, estos PUFA n-3 de cadena muy larga se encuentran en bajas concentraciones en la leche y sus derivados, lo que ha llevado al uso de lípidos marinos en estudios con rumiantes, como posible herramienta para aumentar su contenido en la leche (Lock y Bauman, 2004; Boeckert et al., 2008). Lo más utilizados son el aceite de pescado y las microalgas marinas (Lor et al., 2005; Toral et al., 2010a; Shingfield et al., 2013), aunque el aumento de los PUFA n-3 en la leche es limitado. Esto parece explicarse no solo por la extensa biohidrogenación ruminal que sufren estos AG

(Shingfield et al., 2003), sino también por su baja captación a nivel mamario (Kitessa et al., 2001).

En vacas, ovejas y cabras se han descrito porcentajes variables de transferencia del EPA y DHA desde la dieta a la leche, quizás debido, entre otros factores, a las diferencias que podría haber en el metabolismo lipídico entre las tres especies. En las vacas se ha descrito una baja transferencia de EPA y DHA a la leche con valores medios del 2% (Chilliard et al., 2001; Loor et al., 2005). En el estudio de Kitessa et al. (2001) en cabras, la transferencia a la leche de EPA y DHA presentaba una media del 5%. Por otro lado, Toral et al. (2015) no detectaron diferencias entre las cabras y las vacas en la transferencia de estos AG a la leche, con una media del 3,2 y 4,7% para el 20:5n-3 y 22:6n-3, respectivamente. Por último, la transferencia de estos AG a la leche en las ovejas parece presentar un promedio más alto, de en torno al 9% (Reynolds et al., 2006; Chilliard et al., 2007; Bichi et al., 2013).

A pesar de la baja transferencia de estos AG a la leche, los EPA y DHA presentes en los suplementos lipídicos de origen marino han sido ampliamente utilizados en estudios en rumiantes dirigidos a caracterizar sus rutas de biohidrogenación ruminal, así como a examinar su potente efecto inhibitor del último paso de la biohidrogenación ruminal. Esta inhibición afecta a la conversión del *trans*-11 18:1 a 18:0, con el consecuente aumento en las concentraciones de VA y también de *cis*-9,*trans*-11 CLA (procedente este último principalmente de la desaturación mamaria del anterior, es decir, del *trans*-11 18:1; Shingfield et al., 2012; Toral et al., 2017). De hecho, la estrategia más eficaz para incrementar el contenido lácteo del *cis*-9,*trans*-11 CLA sería la combinación de aceites vegetales con lípidos marinos (Loor et al., 2005; Or-Rashid et al., 2008; Bodkowski et al., 2016). Toral et al. (2010a), al suplementar con aceite de girasol solo o en

combinación con aceite de pescado, describieron un aumento considerable del contenido de *cis-9,trans-11* CLA y *trans-11* 18:1.

Además, la suplementación de las dietas de cabras y ovejas con lípidos marinos también parece dar lugar a una inhibición de la hidrogenación ruminal de los isómeros *cis* 18:1 (Toral et al., 2017). En la leche, se han descrito disminuciones en el contenido de los AG de 4:0 a 14:0, aumentos en las concentraciones de los AG *trans* 18:1 y, en menor medida, en el porcentaje de *cis* y de *trans* 16:1, así como aumentos en las concentraciones de otros isómeros del CLA y AG 18:2 no conjugados (Whitlock et al., 2002; Shingfield et al., 2005; Dewhurst et al., 2006; Toral et al., 2010a; Frutos et al., 2017).

En ovejas, algunos autores han demostrado que los lípidos marinos inducen un aumento marcado de la concentración de *trans-10* 18:1 en el contenido ruminal y en la leche (Boeckert et al., 2008; Shingfield et al., 2012; Toral et al., 2017), mientras que en las cabras dichos aumentos parecen menos acusados (Toral et al., 2015). Tal y como se ha indicado anteriormente, el *trans-10* 18:1 es un isómero que, junto con el *trans-10,cis-12* CLA, ha sido asociado con una reducción del contenido y de la producción de grasa de la leche, no solo en las vacas (Harvatine et al., 2009a; Bauman et al., 2011), sino también en pequeños rumiantes (Toral et al., 2010b; Hussein et al., 2013; Frutos et al., 2017). Como ya se ha mencionado, ambos AG parecen estar implicados en cambios de la expresión de ciertos genes lipogénicos en la glándula mamaria (Ticiani et al., 2016; Suárez-Vega et al., 2017). Sin embargo, los aumentos del *trans-10,cis-12* CLA en respuesta al uso de lípidos marinos en la dieta suelen ser pequeños o inexistentes (Toral et al., 2015; Carreño et al., 2016; Frutos et al., 2017).

Este efecto secundario no deseable, conocido como “síndrome de baja grasa en la leche” (o MFD, del inglés *milk fat depression*; Bauman y Griinari,

2001; Toral et al., 2010a; Frutos et al., 2017), ha recibido mucha atención en nutrición de rumiantes, puesto que tiene un impacto directo sobre el nivel de producción de los animales y desventajas económicas para los ganaderos. Aunque en condiciones prácticas se observa básicamente en el vacuno, su descripción también en los pequeños rumiantes impediría la aplicación de las estrategias basadas en el uso de lípidos marinos en ovejas y cabras.

### **3. SÍNDROME DE BAJA GRASA EN LA LECHE EN OVEJAS Y CABRAS**

El síndrome de baja grasa en la leche se ha definido generalmente como una reducción de la concentración y producción de grasa de la leche, con alteraciones concomitantes en las vías de BH ruminal, sin efecto sobre la producción total de leche o de los otros componentes de la misma (Bauman y Griinari, 2001). Sin embargo, como indicaron Dewanckele et al. (2020), con el tiempo se ha visto una variabilidad significativa en los fenotipos de MFD inducidos por la dieta, lo que sugiere que algunas situaciones de MFD pueden no encajar totalmente en esta definición clásica del síndrome. Además, aunque al principio se pensaba que los pequeños rumiantes no padecían MFD, con el tiempo se ha ido demostrando que tanto cabras como ovejas pueden padecerla (Toral et al., 2010a; Kairenius et al., 2011; Baldin et al., 2014; Dewanckele et al., 2020).

En la revisión de Palmquist y Jenkins (2017) se recoge información relativa a los cambios que tienen lugar en la grasa láctea del vacuno bajo ciertas condiciones alimentarias y que comenzaron a ser descritos hace más de un siglo. Dichas condiciones pueden ser muy distintas, pero normalmente incluyen dietas bajas en forrajes o fibra efectiva, elevados contenidos de almidón o carbohidratos altamente solubles y la

suplementación con lípidos insaturados o semillas oleaginosas. De forma paralela, entre los cambios más observados en rumiantes que padecen MFD se detecta una alteración de las vías de BH ruminal, con una inversión de la ratio *trans*-11:*trans*-10 18:1 (Bauman y Griinari, 2001; Alves y Bessa, 2014).

Para tratar de explicar los factores implicados en el desarrollo de la MFD inducida por la dieta han sido postuladas muchas teorías o hipótesis (Bauman y Griinari, 2001). Sin embargo, la mayoría de ellas no se ajusta a lo que sucede cuando los pequeños rumiantes desarrollan este síndrome (Davis y Brown, 1970; Bauman y Griinari, 2003). Así, la MFD parece diferir entre las tres especies de rumiantes previamente citadas (Dewanckele et al., 2020).

Averiguar los factores responsables del síndrome de MFD es un reto relevante, puesto que una disminución de la grasa láctea podría reducir el rendimiento quesero y la calidad de la leche, y por lo tanto la rentabilidad para los ganaderos (Pulina y Bencini, 2004; Nudda et al., 2020).

### 3.1. TEORÍAS QUE TRATAN DE EXPLICAR LA MFD

En el 2001, Bauman y Griinari clasificaron en dos categorías las teorías existentes hasta ese momento para explicar la MFD: (1) teorías que atribuyen la reducción de la grasa de la leche a una falta de precursores para la lipogénesis en la glándula mamaria, y (2) teorías que la relacionan con la inhibición directa de uno o más pasos de la lipogénesis mamaria. En la primera categoría se incluyen la teoría del acetato y  $\beta$ -hidroxibutirato y la del propionato. La teoría de la vitamina B<sub>12</sub> / metilmalonato forma parte de la segunda categoría y, junto con las anteriores, constituye las consideradas como teorías iniciales. Además, los mismos autores postularon la teoría de



la biohidrogenación, que sigue siendo la más aceptada de las que han sido propuestas.

### **3.1.1. Teorías iniciales**

La primera información disponible sobre el síndrome de baja grasa en la leche se remonta al 1845 (citado por Bauman y Griinari, 2001), cuando el químico francés Jean Boussingault describió una reducción en el contenido de grasa de la leche en vacas alimentadas con remolacha azucarera (Bauman y Griinari, 2001). La hipótesis de Boussingault para explicar esta observación se basaba en el bajo contenido de grasa de la dieta, lo que se traducía en una falta de precursores para la síntesis de AG en la glándula mamaria. Sin embargo, otros estudios demostraron que el síndrome también se producía con elevadas concentraciones de lípidos en la dieta (Sebelien, 1894; citado por Bauman y Griinari, 2001).

Con los años, se fueron identificando las circunstancias en las que se producía una reducción en el contenido de grasa láctea. Brevemente, algunas de las que se relacionaban con la dieta incluían la suplementación con aceite de hígado de bacalao (Goldin et al., 1926; citado por Bauman y Griinari, 2001) y aceites vegetales (Williams et al., 1939; citado por Bauman y Griinari, 2001), así como raciones poco equilibradas por su bajo contenido de fibra (Powell, 1939; citado por Bauman y Griinari, 2001).

Otros estudios plantearon como posible responsable del desarrollo de la MFD una baja relación acetato:propionato en el rumen, situación que tiene lugar al utilizar niveles elevados de concentrado en las dietas de los rumiantes. El acetato es la principal fuente para la síntesis *de novo* de los AG en glándula mamaria, por lo que es lógico pensar que una disminución de su contenido puede influir sobre la concentración y producción de la grasa

de la leche. Sin embargo, las infusiones de acetato en vacas, llevadas a cabo por Davis y Brown (1970), no indujeron ninguna mejora en la síntesis de grasa láctea, por lo que en aquel momento se descartó este factor como posible determinante de la MFD (Bauman y Griinari, 2001). En los últimos años se ha vuelto a investigar sobre el papel del acetato en la MFD (Urrutia y Harvatine, 2017a; Matamoros et al., 2022). Así, ensayos realizados en bovino y caprino (*in vitro* e *in vivo*) han mostrado reducciones en las concentraciones de acetato ruminal y en la relación acetato:propionato con el uso de lípidos marinos (AbuGhazaleh y Ishlak, 2014; Zhu et al., 2016). Por su parte, Urrutia y Harvatine (2017b) mostraron que, al suplementar vacas lecheras con acetato, la síntesis de grasa láctea aumentaba debido a un incremento en las concentraciones de los AG de C16 y en menor medida de los <C16. En este estudio, entre los posibles mecanismos que podrían explicar tal incremento, los autores plantearon: 1) una mayor disponibilidad de acetato para la absorción mamaria y, con ello, para la síntesis de grasa, 2) una mayor producción de  $\beta$ -hidroxibutirato en las células epiteliales del rumen (este compuesto actúa como fuente de carbono para el inicio de la lipogénesis mamaria) y 3) cambios en el metabolismo a través de receptores sensores de nutrientes (receptores acoplados a proteínas G) que son ligandos para los AG de <C16. También en un estudio llevado a cabo en ovejas lecheras con MFD inducida por la suplementación con aceite de pescado (Frutos et al., 2018), se observaron menores concentraciones de acetato en el líquido ruminal de las ovejas que mostraban una MFD más acusada en comparación con las que mostraban una MFD más leve.

Sin embargo, aunque otros estudios en los que se ha realizado una suplementación con acetato demuestran un papel relevante del mismo en la síntesis de la grasa de la leche, las teorías sobre la falta de acetato para tratar

de explicar la MFD no explican bien los cambios que tienen lugar durante este síndrome, por lo que han de estar implicados otros factores más relevantes.

Entre las denominadas teorías iniciales, también se especuló sobre el papel de otro ácido graso volátil en la MFD: el propionato. Según se recoge en la revisión bibliográfica de Bauman y Griinari (2001), se planteó que elevadas concentraciones de propionato podrían inducir un aumento de los niveles plasmáticos de glucosa, lo que aumentaría a su vez la concentración de insulina. Esta hormona favorece el depósito de los AG en el tejido adiposo, con una consecuente disminución de su movilización (Vallance y McClymont, 1959; citado por Bauman y Griinari, 2001). La insulina influye en la tasa de lipogénesis y lipólisis en otros tejidos de los rumiantes y reduce la disponibilidad de nutrientes para la glándula mamaria (Bauman y Griinari, 2003). Sin embargo, tras diversos estudios realizados con el objetivo de relacionar el aumento de insulina con la MFD (Davis y Brown, 1970; McGuire et al., 1995; Bauman y Griinari, 2001), se observó que las alteraciones inducidas por los cambios en la insulina se explicaban principalmente por cambios en el balance energético, siendo distintos a las variaciones observadas durante la MFD (Griinari et al., 1997; Mackle et al., 1999; Corl et al., 2006). Por ello, esta hipótesis fue descartada.

Otra teoría formulada para explicar la MFD fue la de la vitamina B<sub>12</sub>/metilmalonato. La vitamina B<sub>12</sub> es un componente esencial de la enzima metilmalonil CoA mutasa; de hecho, desempeña un papel importante en el metabolismo del propionato (Bauman y Griinari, 2001). Las bases de esta tercera teoría apuntan a la disminución de la producción ruminal de vitamina B<sub>12</sub> y un incremento de la producción de propionato, lo que provocaría una acumulación de metilmalonato en el hígado. En condiciones

normales, el propionato se metaboliza por una vía que implica: 1) la conversión en propionil-CoA, 2) la carboxilación en metilmalonil-CoA y 3) la conversión del metilmalonil-CoA en succinil-CoA (Wood et al., 1964). La metilmalonil-CoA isomerasa, que es la enzima responsable de la última conversión, requiere vitamina B<sub>12</sub> como cofactor, por lo que el aporte inadecuado de esta vitamina cuando existe un aumento del propionato causaría a su vez una inhibición de las enzimas implicadas en la síntesis *de novo* de AG (Frobish y Davis, 1977). También en este caso se realizaron distintos estudios para confirmar o descartar la hipótesis planteada. Por ejemplo, el trabajo de Walker et al. (1972) apoyaba esta teoría, puesto que el tipo de dieta suministrada a las vacas lecheras alteraba tanto la concentración de vitamina B<sub>12</sub> como la producción de grasa láctea. Sin embargo, los resultados obtenidos en los experimentos de Elliot et al. (1979) y Croom et al. (1981), al suplementar con vitamina B<sub>12</sub> para aliviar la reducción de la grasa láctea, no fueron los esperados. Por ello, se concluyó que esta teoría tampoco explicaría la MFD.

### ***3.1.2. Teoría de la biohidrogenación***

La teoría de la biohidrogenación se fundamenta a su vez en otra anterior, la de los AG *trans*, propuesta por Davis y Brown (1970).

La teoría de los AG *trans* se basaba en la hipótesis de que la disminución de la síntesis mamaria de AG durante la MFD se produce por una acumulación de isómeros *trans* 18:1 producidos en el rumen debido a la BH ruminal incompleta de los AG de la dieta. En este sentido, numerosas investigaciones han relacionado directamente los aumentos del contenido de algunos *trans* 18:1 en la grasa de la leche con el desarrollo de la MFD inducida por la dieta. Sin embargo, el aumento general de los isómeros *trans* 18:1 como causa de

la MFD presentaba ciertas incoherencias. Así, Griinari et al. (1998) demostraron que no todos los AG *trans* 18:1 ejercen un efecto antilipogénico a nivel mamario. Un ejemplo es el *trans*-11 18:1, un intermediario de las vías de BH del ácido linoleico y linolénico, precursor del ácido ruménico en la glándula mamaria (Shingfield et al., 2007; Hervás et al., 2020). Por otro lado, del *trans*-10 18:1, producido también durante la BH ruminal del LA, LNA y OA, existe controversia sobre sus efectos, puesto que algunos estudios lo han propuesto como AG antilipogénico (Kadegowda et al., 2009) y otros no observaron ningún efecto sobre la síntesis de grasa de la leche (Lock et al., 2007). Además, estudios realizados en ovejas lecheras confirmaron que este AG puede alcanzar niveles muy elevados en la leche tanto en ausencia de MFD (por ejemplo, al suplementar con aceites vegetales; Gómez-Cortés et al., 2008) como en presencia de MFD inducida por el consumo de lípidos marinos (Bichi et al., 2013). Por ello, el *trans*-10 18:1, no podría explicar la MFD por sí solo (Griinari et al., 1999; Baumgard et al., 2000). Debido a este tipo de inconsistencias, la teoría de los AG *trans* fue descartada, aunque al mismo tiempo sentó las bases para la teoría de la BH, que hoy en día es la más aceptada entre las teorías que tratan de explicar la MFD.

La teoría de la BH propone que, en determinadas condiciones alimentarias, las vías de la BH ruminal sufren alteraciones que dan lugar a la producción de metabolitos intermedios con un potente efecto antilipogénico sobre la síntesis de grasa láctea (Bauman y Griinari, 2003; Harvatine et al., 2009b).

Las investigaciones llevadas a cabo en el vacuno demostraron que el aumento del *trans*-10,*cis*-12 CLA, tanto en el rumen como en la leche, se relaciona con la MFD inducida por la dieta (Harvatine et al., 2009a; Rico y Harvatine, 2013; Toral et al., 2016a). Aunque esta asociación no implica

necesariamente causalidad, otros estudios han confirmado un papel inhibitor del *trans*-10,*cis*-12 CLA en la síntesis de grasa láctea, mediante su infusión postruminal, por ejemplo, con un efecto dosis dependiente (Baumgard et al., 2002). Por ello, el papel de este isómero del CLA en la MFD ha sido objeto de numerosas investigaciones, que confirman su potente efecto inhibitor de la síntesis de la grasa de la leche también en ovejas y cabras (Lock et al., 2006, 2008; Hussein et al., 2013; Zhang et al., 2018). Esta inhibición parece explicarse por una reducción de la expresión de los genes implicados en la síntesis mamaria de AG *de novo* (Baumgard et al., 2002; Hussein et al., 2013).

Sin embargo, en la MFD inducida por los lípidos marinos no suele observarse ningún cambio en la concentración de este isómero del CLA, o los cambios son menores (Kairenius et al., 2015; Toral et al., 2015; Fougère et al., 2018). Dewanckele et al. (2020) evaluaron los efectos del *trans*-10,*cis*-12 CLA sobre la grasa de la leche en 23 estudios en los que se suplementó con lípidos marinos y mostraron que la proporción de *trans*-10,*cis*-12 CLA en la leche solo explicaría entre el 27 y 29% de la variación en el contenido y producción de grasa láctea, lo que hace especular que otros metabolitos intermedios de la BH también podrían ejercer efectos antilipogénicos, o que otros factores y mecanismos están implicados a su vez en la regulación de la síntesis de grasa láctea.

Otro metabolito de la BH con presunto efecto antilipogénico es el *trans*-10 18:1, del que se ha hablado anteriormente (Bauman y Griinari, 2001). Esta especulación surge en parte de la asociación ente los aumentos del *trans*-10 18:1 en la leche y la MFD en vacas (Shingfield y Griinari, 2007). Además, el efecto antilipogénico del *trans*-10 18:1 parecía respaldado por un efecto inhibitorio de la expresión génica de *FASN*, *SCD* y *SREBF1* en las

células epiteliales mamarias en un estudio *in vitro* (Kadegowda et al., 2009). Sin embargo, infusiones abomasales con *trans*-10 18:1 puro no disminuyeron la síntesis de grasa en vacas (Lock et al., 2007), por lo que su efecto antilipogénico no pudo ser confirmado.

Toral et al. (2020a) llevaron a cabo un metanálisis con ovejas con y sin MFD. En este estudio, el *trans*-10 18:1 fue asociado con reducciones en la concentración y producción de los AG <C16, pero solo una parte de los casos se traducían en MFD. Así, en las ovejas que no padecían MFD, la menor secreción de AG <C16 parecía contrarrestada por incrementos de los AG >C16.

El papel del *cis*-10,*trans*-12 18:2, otro posible candidato a estar implicado en el desarrollo de la MFD, se fundamentó inicialmente en la menor deposición de grasa en ratones a los que se suministró una mezcla de isómeros del CLA, constituida mayormente por el *cis*-10,*trans*-12 18:2 y el *trans*-11,*cis*-13 CLA (Park y Pariza, 2001), y en la similitud de su estructura con la del *trans*-10,*cis*-12 CLA. Posteriormente, Sæbø et al. (2005) llevaron a cabo un estudio en vacas lecheras con infusiones abomasales de isómeros del CLA (una mezcla de *cis*-10,*trans*-12 18:2 y *trans*-10,*cis*-12 CLA, o este último de forma aislada) y observaron una reducción en el contenido de grasa de la leche similar en ambos casos, lo que sería atribuible a un efecto antilipogénico del *cis*-10,*trans*-12 18:2. Sin embargo, la presencia natural de *cis*-10,*trans*-12 18:2 en la leche es tan baja que, en la mayor parte de estudios, no se llega a cuantificar ni siquiera en condiciones de MFD, por lo que, en principio, no parece ser uno de los principales responsables de la misma (Dewanckele et al., 2020).

Otro isómero del CLA al que se le ha atribuido un papel en la MFD es el *trans*-9,*cis*-11 CLA. Perfield et al. (2007) infundieron por vía abomasal este

isómero, lo que resultó en una reducción tanto del contenido de grasa láctea como de su producción, aunque menor del observado normalmente durante la MFD inducida por la dieta. Además, las concentraciones de *trans-9,cis-11* CLA cuantificadas en la leche en este estudio fueron mucho mayores que las que han sido descritas por cambios en la dieta (Dewanckele et al., 2020), por lo que esta MFD no se podría atribuir de forma única a su efecto antilipogénico.

Por último, y a causa de la presencia del enlace *trans-10* en su estructura, también el *trans-8,trans-10* 18:2 y el *trans-10,cis-15* 18:2 se han propuesto como posibles candidatos antilipogénicos. Así, Ventto et al. (2017) especularon que, en vacas lecheras, los aumentos en las concentraciones omasales del *trans-8,trans-10* 18:2 podrían estar relacionados con el desarrollo de la MFD. Sin embargo, debido a sus bajas concentraciones en la leche, su papel ha sido cuestionado (Conte et al., 2018; Dewanckele et al., 2020). En el caso del *trans-10,cis-15* 18:2, algunos estudios han destacado los grandes aumentos en su concentración durante la MFD inducida por la dieta (Ventto et al., 2017; Leskinen et al., 2019). Sin embargo, en el estudio de Vahmani et al. (2016) este AG no demostró efectos antilipogénicos en cultivo *in vitro* de adipocitos de vacuno.

### **3.1.3. Otras teorías**

Aunque la teoría de la BH ha sentado las bases para explicar la MFD inducida por la dieta, no puede explicar ni todos los cambios que tienen lugar cuando la función ruminal está alterada ni, lo que es más importante, todos los tipos de MFD descritos. Así, se ha propuesto una extensión de la teoría de la BH para intentar explicar algunos casos de MFD inducida por la dieta que no se ajustaban a lo previsto. En ella, Shingfield y Griinari (2007)



plantearon que la regulación de la fluidez de la grasa de la leche para mantenerla dentro de límites fisiológicos podría explicar la MFD inducida por los lípidos marinos. Este mecanismo estaría mediado por cambios en la disponibilidad de los AG preformados para la captación por la glándula mamaria.

En condiciones normales, una parte del 18:0, que presenta un punto de fusión de 69°C, se desatura a *cis*-9 18:1, cuyo punto de fusión es de 14°C, garantizando así la secreción del glóbulo de grasa (Shingfield et al., 2006; Toral et al., 2016b). Cuando la dieta de los rumiantes se suplementa con lípidos ricos en EPA y DHA se observa una inhibición de la saturación de los *trans* 18:1 a 18:0 (Loor y Herbein, 2003; Loor et al., 2005; Shingfield et al., 2006), lo que resulta en una reducción del 18:0 y un aumento de los *trans* 18:1, cuyo punto de fusión es también bastante alto (e. g., el del *trans*-10 18:1 es 53°C; Gunstone, 2004; Toral et al., 2016b).

Por todo ello, estos cambios podrían suponer un reto para la capacidad de la glándula mamaria de mantener el punto de fusión de la grasa láctea por debajo de la temperatura corporal (Timmen y Patton, 1988). Si esto no se consigue, se perjudicaría la fluidez de la grasa de la leche y su secreción (Shingfield y Griinari, 2007).

A este respecto, Toral et al. (2016b) estudiaron si la suplementación con 18:0 podía aliviar la MFD en las ovejas lecheras que recibían aceite de pescado. Los resultados indicaron que las ovejas cuya dieta se suplementaba con aceite de pescado solo o en combinación con 18:0 mostraron una reducción de la grasa de la leche similar. El hecho de que la inclusión de 18:0 en la dieta no resultara eficaz para aliviar el síndrome cuestionó la hipótesis de la fluidez de la grasa de la leche. Así, parece razonable sospechar que otros mecanismos deben estar contribuyendo al desarrollo de la MFD

inducida por los lípidos marinos, probablemente a través de la formación de metabolitos intermedios antilipogénicos (Bauman y Griinari, 2001; Shingfield y Griinari, 2007).

En la revisión exhaustiva de Dewanckele et al. (2020) se indican los estudios llevados a cabo en vacas, ovejas y cabras en los que se ha sugerido o especulado una relación entre la MFD inducida por los lípidos marinos y el *cis*-9 16:1, *cis*-11 18:1, 10-oxo-18:0 y los PUFA n-3 de cadena muy larga, a partir de su aumento tanto en el líquido ruminal como en la leche (Kairenius et al., 2015; Carreño et al., 2016; Ventto et al., 2017; Leskinen et al., 2019). La presencia del *cis*-9 16:1 en la leche puede resultar de la desaturación del 16:0, por la acción de la  $\Delta^9$ -desaturasa, o de su absorción a partir de la dieta, sobre todo con la suplementación de lípidos marinos (Duckett et al., 2014). Por su parte, el *cis*-11 18:1 procede, entre otros, de la elongación del *cis*-9 16:1 (Burns et al., 2012). En los estudios de Frutos et al. (2017, 2018), las ovejas con una MFD más acusada presentaban concentraciones elevadas de ambos AG, por lo que se especuló sobre su posible papel en la MFD inducida por lípidos marinos. Por su parte, Toral et al. (2015) describieron un aumento del *cis*-9 16:1 en cabras y vacas suplementadas con aceite de pescado, siendo el aumento mucho mayor en las vacas. Asimismo, observaron aumentos en ambas especies en las concentraciones del *trans*-10 18:1, *cis*-11 18:1 y de los PUFA C20 y C22 con un doble enlace *trans*-10.

Se ha demostrado que el *cis*-9 16:1 reduce el tamaño de los adipocitos intramusculares y el contenido de lípidos en el tejido muscular de las ovejas (Duckett et al., 2014). Respecto a los posibles efectos biológicos del *cis*-11 18:1, Shingfield y Griinari (2007) observaron que la infusión postruminal de *cis*-11 18:1 aumentó su concentración en la leche de vacas sin cambios en la producción de grasa. Sin embargo, un estudio *in vitro* posterior mostró que

este AG inhibía la lipogénesis y la expresión del gen *FASN* en adipocitos bovinos (Burns et al., 2012). Por todo ello, cabe esperar que estos AG (*cis*-9 16:1 y *cis*-11 18:1) jueguen un papel en el desarrollo de la MFD inducida por lípidos marinos, pero es difícil determinar si su efecto es independiente o si actúan en combinación con los PUFA de cadena muy larga u otros AG con carácter antilipogénico.

Respecto a los PUFA n-3 de cadena muy larga (aquellos que tienen 20 o más átomos de carbono y más de dos enlaces dobles), el aceite de pescado es una fuente lipídica rica en EPA y DHA, mientras que las microalgas marinas presentan elevadas concentraciones sobre todo de DHA (Nudda et al., 2020), pero no existen muchos estudios que permitan atribuirles una inhibición directa de la síntesis de grasa láctea. Entre ellos, Kadegowda et al. (2008) observaron que el 20:5n-3 reduce la abundancia de genes implicados en la lipogénesis mamaria, como *SREBF1*, *SCAP*, *INSIG1*, y *LPL*, en células epiteliales mamarias bovinas *in vitro*. Además, aunque no se han establecido con exactitud las vías de biohidrogenación del EPA y DHA, es necesario considerar que, tanto en vacas como en ovejas, su metabolismo ruminal está asociado con la aparición de muchos intermediarios de 20 y 22 carbonos, de los que se desconoce su actividad biológica (Escobar et al., 2016; Jeyanathan et al., 2016; Aldai et al., 2018).

Otro grupo de AG sobre el que se ha especulado que pueda tener un papel en la MFD, es el de los AG oxo. Como demostraron (Jenkins et al., 2006) y, más recientemente, Toral et al. (2018b), estos AG resultan de una vía metabólica paralela a la BH, que involucra mecanismos de hidratación y oxidación de los AG de la dieta (Hudson et al., 2000). Sin embargo, es necesario señalar que no siempre hay aumento en las concentraciones de estos AG en la MFD. Por ejemplo, en los animales que reciben dietas ricas

en concentrado y aceites vegetales, el contenido de estos AG no aumenta (Toral et al., 2016b). En cambio, parece haber una relación positiva entre las concentraciones de 10-oxo-18:0 en la leche y la MFD inducida por los lípidos marinos en vacas, cabras y ovejas (Bernard et al., 2015; Kairenius et al., 2015; Carreño et al., 2016). Por ello, resulta difícil establecer una relación causa-efecto y su implicación en la MFD.

A partir de todo lo anterior, parece que ni el cambio de *trans*-11 a *trans*-10, ni el aumento de algunos metabolitos de la BH, ni los otros mecanismos anteriormente citados, podrían explicar por sí mismos la MFD inducida por los lípidos marinos en pequeños rumiantes. Por lo tanto, todo apunta a que este tipo de MFD es un síndrome complejo que no se ajusta únicamente a una hipótesis o teoría y tendría un carácter multifactorial (Dewanckele et al., 2020; Toral et al., 2020a).

### 3.2. COMPARACIÓN INTERESPECÍFICA

Los cambios que tienen lugar en la concentración y producción de la grasa de la leche dependen de muchos factores, como el potencial genético del animal, su balance energético y fase de lactación, ritmos circadianos y gestión de la alimentación (Chilliard et al., 2001; Toral et al., 2018c; Dewanckele et al., 2020). Tal y como se mencionó anteriormente, se ha demostrado que ciertas estrategias nutricionales, como el uso de dietas con un elevado contenido de carbohidratos rápidamente fermentables y bajas en forraje o fibra efectiva, así como la suplementación con lípidos insaturados, parecen tener un papel relevante en el desarrollo de la MFD.

En el caso del vacuno, cuando la dieta tiene estas características, se observan con frecuencia reducciones en la concentración y producción de grasa de la leche (Bauman y Griinari, 2003; Dewanckele et al., 2020).

Concretamente, se ha descrito una disminución en las proporciones de los AG de cadena corta y media (<C16 y C16), acompañada de aumentos en las concentraciones de algunos isómeros 18:1 y 18:2 procedentes de la BH, como el *trans*-10,*cis*-12 CLA y *trans*-10 18:1; la concentración de los AG totales de cadena larga (>C16) suele aumentar, pero en algunos casos no cambia (Rico y Harvatine, 2013; Toral et al., 2015; Dewanckele et al., 2020).

Baumgard et al. (2002) demostraron que infusiones abomasales del isómero *trans*-10,*cis*-12 CLA reducían el contenido y producción de grasa láctea, a la vez que aumentaba la concentración de este isómero del CLA en la leche. Además, vieron una reducción del contenido de AG de 4:0 a 16:0 y de la expresión de los genes que codifican para las enzimas implicadas en la síntesis *de novo* y la desaturación de AG y en la síntesis de triglicéridos en la glándula mamaria.

En pequeños rumiantes, las dietas con un elevado contenido de carbohidratos rápidamente fermentables con o sin suplementación con aceites vegetales pueden inhibir la síntesis mamaria de AG *de novo*, pero raramente reducen la síntesis de grasa total de la leche (Toral et al., 2010a; Bernard et al., 2015; Shi et al., 2015). Además, tras comparar indirectamente las concentraciones de la leche del *trans*-10,*cis*-12 CLA en las ovejas, cabras y vacas, los aumentos en las dos primeras especies son menos marcados que en el vacuno (Hervás et al., 2008; Harvatine et al., 2009a; Bernard et al., 2012). Asimismo, el cambio en las vías de la BH de *trans*-11 a *trans*-10 al suplementar con aceites vegetales en ovejas y cabras no parece ser tan acusado como en las vacas, en las que se llega con frecuencia a inversiones de la ratio *trans*-11:*trans*-10 18:1 (Toral et al., 2010a; Fougère et al., 2018).

Como sugirieron Toral et al. (2020a), el desarrollo de MFD en las ovejas que reciben aceites vegetales o dietas ricas en almidón podría estar

contrarrestado por los incrementos en la captación por la glándula mamaria de AG preformados, lo que compensaría la inhibición de la síntesis de AG *de novo*. Esto parece aplicarse también a las cabras (Shingfield et al., 2010; Martin et al., 2021).

Sin embargo, tanto cabras como ovejas experimentan reducciones en la concentración y producción de grasa de la leche cuando sus dietas se suplementan con aceite de pescado o microalgas marinas para tratar de mejorar el perfil de AG de su leche (Kitessa et al., 2001; Bichi et al., 2013; Fougère et al., 2018). De la misma manera, también en vacuno se ha descrito MFD al suplementar la ración con lípidos marinos (Boeckert et al., 2008).

Aunque la respuesta a la MFD inducida por los lípidos marinos puede parecer similar en las tres especies de rumiantes, existen algunas diferencias. Por ejemplo, en las primeras comparaciones indirectas entre cabras y vacas, las cabras no parecían mostrar MFD al suplementar con aceite de pescado con dosis similares a las que causan este síndrome en las vacas (Gagliostro et al., 2006; Gama et al., 2008; Toral et al., 2014). Sin embargo, en una comparación directa posterior entre estas dos especies, las cabras mostraron una reducción similar a las vacas en el contenido de grasa de la leche (Toral et al., 2015). En este estudio se sugiere que las diferencias entre cabras y vacas en las comparaciones indirectas previas podría estar relacionada con el nivel de enriquecimiento del 20:5n-3 y 22:6n-3 en los distintos aceites de pescado. Aun así, Bernard et al. (2018) han propuesto que, en términos de reducción de la grasa láctea, las vacas son las más sensibles, seguidas por las ovejas y, por último, por las cabras, que serían las más resistentes al síndrome MFD inducido por lípidos marinos (Bernard et al., 2013b; Toral et al., 2015; Frutos et al., 2017).

Respecto a los cambios del perfil de AG al suplementar con lípidos marinos, se observa un patrón general similar al comparar indirectamente las tres especies, con una inhibición potente del último paso de la BH ruminal (Kitessa et al., 2001; Boeckeaert et al., 2007; Frutos et al., 2018), lo que resulta en un aumento de las proporciones de los isómeros *trans* 18:1 en la leche (Shingfield et al., 2012; Dewanckele et al., 2020).

Centrándose en cambios más específicos en el perfil de AG de la leche, en las ovejas, la suplementación con lípidos marinos aumenta consistentemente las concentraciones de AG potencialmente saludables, como el *cis-9,trans-11* CLA, *trans-11* 18:1, 20:5n-3 y 22:6n-3, además de otros AG como el *cis-9* 16:1, *trans-10* y *cis-11* 18:1 y 10-oxo-18:0 (Toral et al., 2010a; Carreño et al., 2016; Frutos et al., 2017). También las cabras y vacas muestran aumentos del *cis-9,trans-11* CLA y *trans-11* 18:1 (Toral et al., 2015). Sin embargo, en la comparación de ambas especies, se registró un aumento mucho mayor del *cis-9* 16:1, *trans-10* y *cis-11* 18:1 y 10-oxo-18:0 en la leche de las vacas que en la de las cabras, tras la suplementación con aceite de pescado, pero inferior en el caso del 20:5n-3 (Toral et al., 2015).

En la suplementación con algas marinas se han observado aumentos significativos en los PUFA de larga cadena, como 20:5n-3, 22:5n-3 y 22:6n-3, en la leche de vacas, ovejas y cabras (Bichi et al., 2013; Fougère y Bernard, 2019). De igual forma, en las tres especies de rumiantes se han obtenido disminuciones en las concentraciones del 18:0 y *cis-9* 18:1 y aumentos de los *trans* 18:1 en la leche (Toral et al., 2015, 2018c; Fougère et al., 2018). Respecto a los cambios descritos a nivel ruminal, se ha detectado una reducción general de los AG saturados y un aumento de los AG mono y polinsaturados en las tres especies (Boeckeaert et al., 2008; Bernard et al., 2015; Kairenius et al., 2015; Toral et al., 2016a). Un estudio *in vitro* con vacas y ovejas señaló

que la suplementación con lípidos marinos fue eficaz en ambas especies a la hora de inhibir la saturación del *trans*-11 18:1 a 18:0 (Toral et al., 2017), siendo esta inhibición más potente en cabras que en vacas (Toral et al., 2016a).

Los efectos del aceite de pescado o las microalgas marinas sobre la expresión génica en la glándula mamaria se comenzaron a estudiar en vacas lecheras, en las que se observó una reducción de la expresión de *SCD1*, *FASN*, *ACACA*, *LPL* y *SREBF1*, entre otros (Ahnadi et al., 2002; Angulo et al., 2012; Vahmani et al., 2014). En las ovejas lecheras también se vio que la suplementación con aceite de pescado tendía a reducir la abundancia de mRNA de genes lipogénicos, como *ACSS2*, *FASN*, *LPIN1*, *FADS2* e *INSIG1*. Los pocos estudios disponibles en cabras sugieren una mayor estabilidad en la abundancia del mRNA en respuesta al uso de lípidos marinos (e. g., Bernard et al., 2017; Fougère y Bernard, 2019).

Por último, cabe destacar que, tal y como se ha demostrado especialmente en vacas y ovejas, la respuesta a la MFD inducida por la dieta varía notablemente entre individuos, con animales que muestran una MFD de mucha mayor amplitud que otros cuando están sometidos a las mismas condiciones de alimentación (Weimer, 2015; Frutos et al., 2017, 2018).

#### 4. REFERENCIAS

- Abe, A., and K. Sugiyama. 2005. Growth inhibition and apoptosis induction of human melanoma cells by  $\omega$ -hydroxy fatty acids. *Anticancer. Drugs* 16:543–549. doi: 10.1097/00001813-200506000-00010.
- AbuGhazaleh, A. A., and A. Ishlak. 2014. Effects of incremental amounts of fish oil on *trans* fatty acids and *Butyrivibrio* bacteria in continuous culture fermenters. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 98:271–278. doi:10.1111/jpn.12077.
- Ahnadi, C. E., N. Beswick, L. Delbecchi, J. J. Kennelly, and P. Lacasse. 2002. Addition of fish oil to diets for dairy cows. Effects on milk fat and gene expression of mammary lipogenic enzymes. *J. Dairy Res.* 69:521–531. doi:10.1017/s0022029902005769.



- Aldai, N., P. Delmonte, S. P. Alves, R. J. B. Bessa, and J. K. G. Kramer. 2018. Evidence for the initial steps of DHA biohydrogenation by mixed ruminal microorganisms from sheep involves formation of conjugated fatty acids. *J. Agric. Food Chem.* 66:842–855. doi:10.1021/acs.jafc.7b04563.
- Aldai, N., M. de Renobales, L. J. R. Barron, and J. K. G. Kramer. 2013. What are the *trans* fatty acids issues in foods after discontinuation of industrially produced *trans* fats? Ruminant products, vegetable oils, and synthetic supplements. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 115:1378–1401. doi:10.1002/ejlt.201300072.
- Alves, S. P., and R. J. B. Bessa. 2014. The *trans*-10,*cis*-15 18:2: A missing intermediate of *trans*-10 shifted rumen biohydrogenation pathway? *Lipids* 49:527–541. doi:10.1007/s11745-014-3897-4.
- Alves, S. P., P. Vahmani, C. Mapiye, T. A. McAllister, R. J. B. Bessa, and M. E. R. Dugan. 2021. *Trans*-10 18:1 in ruminant meats: A review. *Lipids* 56:539–562. doi:10.1002/lipd.12324.
- AlZahal, O., M. M. Or-Rashid, S. L. Greenwood, M. S. Douglas, and B. W. McBride. 2009. The effect of dietary fiber level on milk fat concentration and fatty acid profile of cows fed diets containing low levels of polyunsaturated fatty acids. *J. Dairy Sci.* 92:1108–1116. doi:10.3168/jds.2008-1472.
- Angulo, J., L. Mahecha, K. Nuernberg, G. Nuernberg, D. Dannenberger, M. Olivera, and L. 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. doi.org/10.1017/S1751731112000845.
- Ashes, J. R., B. D. Siebert, S. K. Gulati, A. Z. Cuthbertson, and T. W. Scott. 1992. Incorporation of n-3 fatty acids of fish oil into tissue and serum lipids of ruminants. *Lipids* 27:629–631. doi:10.1007/BF02536122.
- Baldin, M., R. Dresch, J. Souza, D. Fernandes, M. A. S. Gama, K. J. Harvatine, and D. E. Oliveira. 2014. CLA induced milk fat depression reduced dry matter intake and improved energy balance in dairy goats. *Small Rumin. Res.* 116:44–50. doi:10.1016/j.smallrumres.2013.10.001.
- Barber, M. C., R. A. Clegg, M. T. Travers, and R.G. Vernon. 1997. Lipid metabolism in the lactating mammary gland. *Biochimica et Biophysica Acta* 1347:101-126.
- Bauman, E., P. Y. Chouinard, Y. Lebeuf, D. E. Rico, and R. Gervais. 2016. Effect of lipid supplementation on milk odd- and branched-chain fatty acids in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 99:6311–6323. doi:10.3168/jds.2015-10746.
- Bauman, D. E., and C. L. Davis. 1974. Biosynthesis of milk fat. In: *Lactation: A comprehensive treatise*. Larson, B.L., and V.R. Smith (eds.). Academic Press, New York, USA, 2, pp: 31-75.

- Bauman, D. E., and J. M. Griinari. 2001. Regulation and nutritional manipulation of milk fat: Low-fat milk syndrome. *Livest. Prod. Sci.* 70:15–29. doi:10.1016/S0301-6226(01)00195-6.
- Bauman, D. E., and J. M. Griinari. 2003. Nutritional regulation of milk fat synthesis. *Annu. Rev. Nutr.* 23:203–227. doi:10.1146/annurev.nutr.23.011702.073408.
- Bauman, D. E., K. J. Harvatine, and A. L. Lock. 2011. Nutrigenomics, rumen-derived bioactive fatty acids, and the regulation of milk fat synthesis. *Annu. Rev. Nutr.* 31:299–319. doi:10.1146/annurev.nutr.012809.104648.
- Bauman, D. E., I. H. Mather, R. J. Wall, and A. L. Lock. 2006. Major advances associated with the biosynthesis of milk. *J. Dairy Sci.* 89:1235–1243. doi:10.3168/jds.S0022-0302(06)72192-0.
- Bauman, D. E., J. W. Perfield, M. J. De Veth, and A. L. Lock. 2003. New perspectives on lipid digestion and metabolism in ruminants. In *Proc. Cornell Nutr. Conf.* 65:175-189. New York, USA: Cornell University.
- Baumgard, L. H., B. A. Corl, D. A. Dwyer, A. Saebø, and D. E. Bauman. 2000. Identification of the conjugated linoleic acid isomer that inhibits milk fat synthesis. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 278:179-184. doi:10.1152/ajpregu.2000.278.1.R179.
- Baumgard, L. H., E. Matitashvili, B. A. Corl, D. A. Dwyer, and D. E. Bauman. 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. doi:10.3168/jds.S0022-0302(02)74294-X.
- Baumgard, L. H., J. K. Sangster, and D. E. Bauman. 2001. Milk fat synthesis in dairy cows is progressively reduced by increasing supplemental amounts of *trans*-10,*cis*-12 conjugated linoleic acid (CLA). *J. Nutr.* 131:1764–1769. doi:10.1093/jn/131.6.1764.
- Bazinet, R. P., and S. Layé. 2014. Polyunsaturated fatty acids and their metabolites in brain function and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 15:771–785. doi:10.1038/nrn3820.
- Benjamin, S., and F. Spener. 2009. Conjugated linoleic acids as functional food: An insight into their health benefits. *Nutr. Metab.* 6:36. doi:10.1186/1743-7075-6-36.
- Bernard, L., C. Leroux, and Y. Chilliard. 2008. Expression and nutritional regulation of lipogenic genes in the ruminant lactating mammary gland. *Adv. Exp. Med. Biol.* 606:67–108. doi:10.1007/978-0-387-74087-4\_2.
- Bernard, L., C. Leroux, and Y. Chilliard. 2013a. 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., C. Leroux, J. Rouel, M. Bonnet, and Y. Chilliard. 2012. Effect of the 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-seed oil. *Br. J. Nutr.* 107:1147–1159. doi:10.1017/S0007114511004181.
- Bernard, L., C. Leroux, J. Rouel, C. Delavaud, K. J. Shingfield, and Y. Chilliard. 2015. Effect of extruded linseeds alone or in combination with fish oil on intake, milk production, plasma metabolite concentrations and milk fatty acid composition in lactating goats. *Animal* 9:810–821. doi:10.1017/S1751731114003048.
- Bernard, L., K. J. Shingfield, J. Rouel, A. Ferlay, and Y. Chilliard. 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. *Br. J. Nutr.* 101:213–224. doi:10.1017/S0007114508006533.
- Bernard, L., P. G. Toral, J. Rouel, and Y. Chilliard. 2016. Effects of extruded linseed and level and type of starchy concentrate in a diet containing fish oil on dairy goat performance and milk fatty acid composition. *Anim. Feed Sci. Technol.* 222:31–42. doi:10.1016/j.anifeedsci.2016.09.011.
- Bernard, L., P. G. Toral, and Y. Chilliard. 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. doi.org/10.3168/jds.2017-12789.
- Bernard, L., M. B. M. Torbati, B. Graulet, C. Leroux, and Y. Chilliard. 2013b. Long-chain fatty acids differentially alter lipogenesis in bovine and caprine mammary slices. *J. Dairy Res.* 80:89–95. doi:10.1017/S0022029912000726.
- Bichi, E., G. Hervás, P. G. Toral, J. J. Loor, and P. Frutos. 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. doi:10.3168/jds.2012-5875.
- Bionaz, M., S. Chen, M. J. Khan, and J. J. Loor. 2013. Functional role of PPARs in ruminants: Potential targets for fine-tuning metabolism during growth and lactation. *PPAR Res.* 2013:684159. doi:10.1155/2013/684159.
- Bionaz, M., and J. J. Loor. 2008. Gene networks driving bovine milk fat synthesis during the lactation cycle. *BMC genomics*, 9:1-21. doi.org/10.1186/1471-2164-9-366.
- Bionaz, M., J. Osorio and J. J. Loor. 2015. Triennial Lactation Symposium: Nutrigenomics in dairy cows: Nutrients, transcription factors, and techniques. *J. Anim. Sci.* 93. doi:10.2527/jas.2015-9192.
- Bionaz, M., E. Vargas-Bello-Pérez, and S. Busato. 2020. Advances in fatty acids nutrition in dairy cows: From gut to cells and effects on performance. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 11:110. doi:10.1186/s40104-020-00512-8.
- Bodas, R., T. Manso, A. Mantecón, M. Juárez, M. A. de la Fuente, and P. Gómez-Cortés. 2010. Comparison of the fatty acid profiles in cheeses from ewes fed

- diets supplemented with different plant oils. *J. Agric. Food Chem.* 58:10493–10502. doi:10.1021/jf101760u.
- Bodkowski, R., K. Czyż, R. Kupczyński, B. Patkowska-Sokoła, P. Nowakowski, and A. Wiliczek. 2016. Lipid complex effect on fatty acid profile and chemical composition of cow milk and cheese. *J. Dairy Sci.* 99:57–67. doi:10.3168/jds.2015-9321.
- Boeckaert, C., V. Fievez, D. Van Hecke, W. Verstraete, and N. Boon. 2007. Changes in rumen biohydrogenation intermediates and ciliate protozoa diversity after algae supplementation to dairy cattle. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 109:767–777. doi:10.1002/ejlt.200700052.
- Boeckaert, C., B. Vlaeminck, V. Fievez, L. Maignien, J. Dijkstra, and N. Boon. 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. doi:10.1128/AEM.01473-08.
- Bouattour, M. A., R. Casals, E. Albanell, X. Such, and G. Caja. 2008. Feeding soybean oil to dairy goats increases conjugated linoleic acid in milk. *J. Dairy Sci.* 91:2399–2407. doi:10.3168/jds.2007-0753.
- Bourre, J. M. 2005. Where to find omega-3 fatty acids and how feeding animals with diet enriched in omega-3 fatty acids to increase nutritional value of derived products for human: What is actually useful? *J. Nutr. Health Aging* 9:232–242. PMID: 15980924.
- Brevik, A., M. B. Veierød, C. A. Drevon, and L. F. Andersen. 2005. Evaluation of the odd fatty acids 15:0 and 17:0 in serum and adipose tissue as markers of intake of milk and dairy fat. *Eur. J. Clin. Nutr.* 59:1417–1422. doi:10.1038/sj.ejcn.1602256.
- Brouwer, I. A., A. J. Wanders, and M. B. Katan. 2010. Effect of animal and industrial *trans* fatty acids on HDL and LDL cholesterol levels in humans: A quantitative review. *PLOS One* 5:e9434. doi:10.1371/journal.pone.0009434.
- Burns, T. A., A. K. G. Kadegowda, S. K. Duckett, S. L. Pratt, and T. C. Jenkins. 2012. Palmitoleic (16:1 *cis*-9) and *cis*-vaccenic (18:1 *cis*-11) acid alter lipogenesis in bovine adipocyte cultures. *Lipids* 47:1143–1153. doi:10.1007/s11745-012-3723-9.
- Campbell, J. R., and R. T. Marshall. 1975. *The science of providing milk for man.* McGraw Hill Book Company. New York, USA.
- Carreño, D., G. Hervás, P. G. Toral, T. Castro-Carrera, and P. Frutos. 2016. Fish oil-induced milk fat depression and associated downregulation of mammary lipogenic genes in dairy ewes. *J. Dairy Sci.* 99:7971–7981. doi:10.3168/jds.2016-11019.
- Castañeda-Gutiérrez, E., M. J. de Veth, A. L. Lock, D. A. Dwyer, K. D. Murphy, and D. E. Bauman. 2007. Effect of supplementation with calcium salts of fish oil on n-3 fatty acids in milk fat. *J. Dairy Sci.* 90:4149–4156. doi:10.3168/jds.2006-856.

- Chilliard, Y., and A. Ferlay. 2004. Dietary lipids and forages interactions on cow and goat milk fatty acid composition and sensory properties. *Reprod. Nutr. Dev.* 44:467–492. doi:10.1051/rnd:2004052.
- Chilliard, Y., A. Ferlay, and M. Doreau. 2001. Effect of different types of forages, animal fat or marine oils in cow's diet on milk fat secretion and composition, especially conjugated linoleic acid (CLA) and polyunsaturated fatty acids. *Livest. Prod. Sci.* 70:31–48. doi:10.1016/S0301-6226(01)00196-8.
- Chilliard, Y., A. Ferlay, R. M. Mansbridge, and M. Doreau. 2000. Ruminant milk fat plasticity: Nutritional control of saturated, polyunsaturated, *trans* and conjugated fatty acids. *Ann. Zootech.* 49:181–205. doi:10.1051/animres:2000117.
- Chilliard, Y., A. Ferlay, J. Rouel, and G. Lamberet. 2003. A review of nutritional and physiological factors affecting goat milk lipid synthesis and lipolysis. *J. Dairy Sci.* 86:1751–1770. doi:10.3168/jds.S0022-0302(03)73761-8.
- Chilliard, Y., F. Glasser, A. Ferlay, L. Bernard, J. Rouel, and M. Doreau. 2007. Diet, rumen biohydrogenation and nutritional quality of cow and goat milk fat. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 109:828–855. doi:10.1002/ejlt.200700080.
- Chilliard, Y., C. Martin, J. Rouel, and M. Doreau. 2009. Milk fatty acids in dairy cows fed whole crude linseed, extruded linseed, or linseed oil, and their relationship with methane output. *J. Dairy Sci.* 92:5199–5211. doi:10.3168/jds.2009-2375.
- Chilliard, Y., P. G. Toral, K. J. Shingfield, J. Rouel, C. Leroux, and L. Bernard. 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. doi:10.1016/j.smallrumres.2014.07.014.
- Coleman, R. A., and D. P. Lee. 2004. Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation. *Progress in lipid research*, 4: 134-176. doi: 10.1016/s0163-7827(03)00051-1.
- Conte, G., C. Dimauro, A. Serra, N. P. P. Macciotta, and M. Mele. 2018. A canonical discriminant analysis to study the association between milk fatty acids of ruminal origin and milk fat depression in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 101:6497–6510. doi:10.3168/jds.2017-13941.
- Corl, B. A., S. T. Butler, W. R. Butler, and D. E. Bauman. 2006. Short communication: Regulation of milk fat yield and fatty acid composition by insulin. *J. Dairy Sci.* 89:4172–4175. doi:10.3168/jds.S0022-0302(06)72462-6.
- Croom, W. J., A. H. Rakes, A. C. Linnerud, G. A. Ducharme, and J. M. Elliot. 1981. Vitamin B<sub>12</sub> administration for milk fat synthesis in lactating dairy cows fed a low fiber diet. *J. Dairy Sci.* 64:1555–1560. doi:10.3168/jds.S0022-0302(81)82725-7.
- Dąbrowski, G., and I. Konopka. 2022. Update on food sources and biological activity of odd-chain, branched and cyclic fatty acids: A review. *Trends Food Sci. Technol.* 119:514–529. doi:10.1016/j.tifs.2021.12.019.

- Davis, C. L., and R. E. Brown. 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.
- Delavaud, C., H. Fougère, Y. Chilliard, and L. Bernard. 2019. The dietary addition of fish oil or sunflower oil plus starch differently modulates the lipid classes in plasma of lactating cows and goats. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 121:1900075. doi:10.1002/ejlt.201900075.
- Desvergne, B., L. Michalik, and W. Wahli. 2006. Transcriptional regulation of metabolism. *Physiological reviews*, 8:465-514. /doi.org/10.1152/physrev.00025.2005
- Dewanckele, L., P. G. Toral, B. Vlaeminck, and V. Fievez. 2020. Invited review: Role of rumen biohydrogenation intermediates and rumen microbes in diet-induced milk fat depression: An update. *J. Dairy Sci.* 103:7655–7681. doi:10.3168/jds.2019-17662.
- Dewettinck, K., R. Rombaut, N. Thienpont, T. T. Le, K. Messens, and J. Van Camp. 2008. Nutritional and technological aspects of milk fat globule membrane material. *International Dairy Journal*, 18:436-457. doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.10.014.
- Dewhurst, R. J., K. J. Shingfield, M. R. F. Lee, and N. D. Scollan. 2006. Increasing the concentrations of beneficial polyunsaturated fatty acids in milk produced by dairy cows in high-forage systems. *Anim. Feed Sci. Technol.* 131:168–206. doi:10.1016/j.anifeedsci.2006.04.016.
- Doreau, M., and Y. Chilliard. 1997. Effects of ruminal or postruminal fish oil supplementation on intake and digestion in dairy cows. *Reprod. Nutr. Dev.* 37:113–124. doi:10.1051/rnd:19970112.
- Doreau, M., A. Meynadier, V. Fievez, and A. Ferlay. 2016. Ruminal metabolism of fatty acids: Modulation of polyunsaturated, conjugated, and *trans* fatty acids in meat and milk. In *Handbook of lipids in human function*. 521-542. US: AOCS Press.
- Duckett, S. K., G. Volpi-Lagreca, M. Alende, and N. M. Long. 2014. Palmitoleic acid reduces intramuscular lipid and restores insulin sensitivity in obese sheep. *Diabetes Metab. Syndr. Obes.* 7:553–563. doi:10.2147/DMSO.S72695.
- Elliot, J. M., E. P. Barton, and J. A. Williams. 1979. Milk fat as related to vitamin B<sub>12</sub> status. *J. Dairy Sci.* 62:642–645. doi:10.3168/jds.s0022-0302(79)83302-0.
- Elwood, P. C., D. I. Givens, A. D. Beswick, A. M. Fehily, J. E. Pickering, and J. Gallacher. 2008. The survival advantage of milk and dairy consumption: An overview of evidence from cohort studies of vascular diseases, diabetes and cancer. *J. Am. Coll. Nutr.* 27:723-734. doi:10.1080/07315724.2008.10719750.

- El-Zeini, H. M. 2006. Microstructure, rheological and geometrical properties of fat globules of milk from different animal species. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 56:147–154.
- Escobar, M., B. Vlaeminck, J. Jeyanathan, L. P. Thanh, K. J. Shingfield, R. J. Wallace, and V. Fievez. 2016. Effect of adsorbants on *in vitro* biohydrogenation of 22:6n-3 by mixed cultures of rumen microorganisms. *Anim. Int. J. Anim. Biosci.* 10:1439–1447. doi:10.1017/S1751731116000367.
- Fenwick, G. R., and R. F. Curtis. 1980. Rapeseed meal and its use in poultry diets. A review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 5:255–298. doi:10.1016/0377-8401(80)90016-4.
- Ferlay, A., L. Bernard, A. Meynadier, and C. Malpuech-Brugère. 2017. Production of *trans* and conjugated fatty acids in dairy ruminants and their putative effects on human health: A review. *Biochimie* 141:107–120. doi:10.1016/j.biochi.2017.08.006.
- Fievez, V., E. Colman, J. M. Castro-Montoya, I. Stefanov, and B. Vlaeminck. 2012. Milk odd- and branched-chain fatty acids as biomarkers of rumen function—An update. *Anim. Feed Sci. Technol.* 172:51–65. doi:10.1016/j.anifeedsci.2011.12.008.
- Fougère, H., and L. Bernard. 2019. Effect of diets supplemented with starch and corn oil, marine algae, or hydrogenated palm oil on mammary lipogenic gene expression in cows and goats: A comparative study. *J. Dairy Sci.* 102:768–779. doi:10.3168/jds.2018-15288.
- Fougère, H., C. Delavaud, and L. Bernard. 2018. Diets supplemented with starch and corn oil, marine algae, or hydrogenated palm oil differentially modulate milk fat secretion and composition in cows and goats: A comparative study. *J. Dairy Sci.* 101:8429–8445. doi:10.3168/jds.2018-14483.
- Frobish, R. A., and C. L. Davis. 1977. Theory involving propionate and vitamin B<sub>12</sub> in the low-milk fat syndrome. *J. Dairy Sci.* 60:268–273. doi:10.3168/jds.S0022-0302(77)83863-0.
- Frutos, P., P. G. Toral, A. Belenguer, and G. Hervás. 2018. Milk fat depression in dairy ewes fed fish oil: Might differences in rumen biohydrogenation, fermentation, or bacterial community explain the individual variation? *J. Dairy Sci.* 101:6122–6132. doi:10.3168/jds.2018-14632.
- Frutos, P., P. G. Toral, and G. Hervás. 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. doi:10.3168/jds.2017-13354.
- Fuke, G., and J. L. Nornberg. 2017. Systematic evaluation on the effectiveness of conjugated linoleic acid in human health. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 57:1–7. doi:10.1080/10408398.2012.716800.

- Gagliostro, G. A., A. Rodriguez, P. A. Pellegrini, P. Gatti, G. Muset, R. A. Castañeda D. Colombo, Y. Chilliard. 2006. Effects of fish oil or sunflower plus fish oil supplementation on conjugated linoleic acid (CLA) and omega 3 fatty acids in goat milk. *Revista Argentina de Producción Animal* 26, 71–87.
- Gama, M. A. S., P. C. Garnsworthy, J. M. Griinari, P. R. Leme, P. H. M. Rodrigues, L. W. O. Souza, and D. P. D. Lanna. 2008. Diet-induced milk fat depression: Association with changes in milk fatty acid composition and fluidity of milk fat. *Liv. Sci.* 115: 319–331. doi.org/10.1016/j.livsci.2007.08.006.
- Gantner, V., P. Mijić, M. Baban, Z. Škrtić, and A. Turalija. 2015. The overall and fat composition of milk of various species. *Mljekarstvo* 65:223–231. doi.org/10.15567/mljekarstvo.2015.0401.
- Garcés, R., E. Martínez-Force, J. J. Salas, and M. Venegas-Calación. 2009. Current advances in sunflower oil and its applications. *Lipid Technol.* 21:79–82. doi:10.1002/lite.200900016.
- German, J. B., R. A. Gibson, R. M. Krauss, P. Nestel, B. Lamarche, W. A. van Staveren, J. M. Steijns, L. C. P. G. M. de Groot, A. L. Lock, and F. Destailats. 2009. A reappraisal of the impact of dairy foods and milk fat on cardiovascular disease risk. *Eur. J. Nutr.* 48:191–203. doi:10.1007/s00394-009-0002-5.
- Gómez-Cortés, P., A. Cívico, M. A. de la Fuente, N. Núñez Sánchez, F. Peña Blanco, and A. L. Martínez Marín. 2018. Effects of dietary concentrate composition and linseed oil supplementation on the milk fatty acid profile of goats. *Animal* 12:2310–2317. doi:10.1017/S1751731118000381.
- Gómez-Cortés, P., P. Frutos, A. Mantecón, M. Juárez, M. A. de la Fuente, and G. Hervás. 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. doi:10.3168/jds.2007-0722.
- Griinari, J. M., B. A. Corl, S. H. Lacy, P. Y. Chouinard, K. V. V. Nurmela, and D. E. Bauman. 2000. Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by  $\Delta^9$ -desaturase. *J. Nutr.* 130:2285–2291. doi:10.1093/jn/130.9.2285.
- Griinari, J. M., D. A. Dwyer, M. A. McGuire, D. E. Bauman, D. L. Palmquist, and K. V. V. Nurmela. 1998. *Trans*-octadecenoic acids and milk fat depression in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 81:1251–1261. doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75686-3.
- Griinari, J. M., M. A. McGuire, D. A. Dwyer, D. E. Bauman, and D. L. Palmquist. 1997. Role of insulin in the regulation of milk fat synthesis in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 80:1076–1084. doi:10.3168/jds.S0022-0302(97)76032-6.
- Gunstone, F. D. 2004. *Rapeseed and Canola Oil: Production, Processing, Properties and Uses*. London: Blackwell Publishing Ltd.



- Gutnikov, G. 1995. Fatty acid profiles of lipid samples. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App.* 671:71–89. doi:10.1016/0378-4347(95)00116-Z.
- Harvatine, K. J., and M. S. Allen. 2006. Effects of fatty acid supplements on milk yield and energy balance of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 89:1081–1091. doi:10.3168/jds.S0022-0302(06)72176-2.
- Harvatine, K. J., Y. R. Boisclair, and D. E. Bauman. 2009a. Recent advances in the regulation of milk fat synthesis. *Animal* 3:40–54. doi:10.1017/S1751731108003133.
- Harvatine, K. J., J. W. Perfield, and D. E. Bauman. 2009b. 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. doi:10.3945/jn.108.099994.
- Hervás, G., P. Frutos, and P. G. Toral. 2020. Endogenous synthesis of milk *cis-9,trans-11* conjugated linoleic acid in dairy ewes: Quantification using <sup>13</sup>C-labeled vaccenic acid and comparison with estimates based on cobalt administration. *J. Dairy Sci.* 103:368–378. doi:10.3168/jds.2019-17050.
- Hervás, G., P. Luna, A. Mantecón, N. Castañares, M. A. de la Fuente, M. Juárez, and P. Frutos. 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. doi:10.1017/S0022029908003506.
- Honkanen, A. M., J. M. Griinari, A. Vanhatalo, S. Ahvenjärvi, V. Toivonen, and K. J. Shingfield. 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. doi:10.3168/jds.2011-4390.
- Hudson, J. A., Y. Cai, R. J. Corner, B. Morvan, and K. N. Joblin. 2000. Identification and enumeration of oleic acid and linoleic acid hydrating bacteria in the rumen of sheep and cows. *J. Appl. Microbiol.* 88:286–292. doi:10.1046/j.1365-2672.2000.00968.x.
- Hudson, J. A., B. Morvan, and K. N. Joblin. 1998. Hydration of linoleic acid by bacteria isolated from ruminants. *FEMS Microbiol. Lett.* 169:277–282. doi:10.1111/j.1574-6968.1998.tb13329.x.
- Hussein, M., K. J. Harvatine, W. M. P. B. Weerasinghe, L. A. Sinclair, and D. E. Bauman. 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. doi:10.3168/jds.2013-6576.
- Jenkins, T. C., A. A. Abughazaleh, S. Freeman, and E. J. Thies. 2006. The production of 10-hydroxystearic and 10-ketostearic acids is an alternative route of oleic acid transformation by the ruminal microbiota in cattle. *J. Nutr.* 136:926–931. doi:10.1093/jn/136.4.926.

- Jenkins, T. C., and K. J. Harvatine. 2014. Lipid feeding and milk fat depression. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 30:623–642. doi:10.1016/j.cvfa.2014.07.006.
- Jensen, R. G. 2002. The composition of bovine milk lipids: January 1995 to December 2000. *J. Dairy Sci.* 85:295–350. doi:10.3168/jds.S0022-0302(02)74079-4.
- Jeyanathan, J., M. Escobar, R. J. Wallace, V. Fievez, and B. Vlaeminck. 2016. Biohydrogenation of 22:6n-3 by *Butyrivibrio proteoclasticus* P18. *BMC Microbiol.* 16:104. doi:10.1186/s12866-016-0720-9.
- Jouany, J. -P., B. Lassalas, M. Doreau, and F. Glasser. 2007. Dynamic features of the rumen metabolism of linoleic acid, linolenic acid and linseed oil measured *in vitro*. *Lipids* 42:351–360. doi:10.1007/s11745-007-3032-x.
- Jump, D. B. 2002. Dietary polyunsaturated fatty acids and regulation of gene transcription. In *Curr. Opin. Lipidol.* 13:155–164. doi.org/10.1097/00041433-200204000-00007.
- Kadegowda, A. K. G., M. Bionaz, L. S. Piperova, R. A. Erdman, and J. J. Loor. 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. doi:10.3168/jds.2008-1932.
- Kadegowda, A. K. G., L. S. Piperova, and R. A. Erdman. 2008. Principal component and multivariate analysis of milk long-chain fatty acid composition during diet-induced milk fat depression. *J. Dairy Sci.* 91:749–759. doi:10.3168/jds.2007-0265.
- Kairenius, P., A. Ärölä, H. Leskinen, V. Toivonen, S. Ahvenjärvi, A. Vanhatalo, P. Huhtanen, T. Hurme, J. M. Griinari, and K. J. Shingfield. 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. doi:10.3168/jds.2015-9548.
- Kairenius, P., V. Toivonen, and K. J. Shingfield. 2011. Identification and ruminal outflow of long-chain fatty acid biohydrogenation intermediates in cows fed diets containing fish oil. *Lipids* 46:587–606. doi:10.1007/s11745-011-3561-1.
- Keenan, T. W., and I. H. Mather. 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.
- Kinsella, J. E., 1968. The incorporation of [ $^{14}\text{C}$ ] glycerol into lipids by dispersed bovine mammary cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*,164: 540-549. doi.org/10.1016/0005-2760(68)90183-5.
- Kim, K. -R., and D.-K. Oh. 2013. Production of hydroxy fatty acids by microbial fatty acid-hydroxylation enzymes. *Biotechnol. Adv.* 31:1473–1485. doi:10.1016/j.biotechadv.2013.07.004.

- Kitessa, S. M., S. K. Gulati, J. R. Ashes, E. Fleck, T. W. Scott, and P. D. Nichols. 2001. Utilisation of fish oil in ruminants: II. Transfer of fish oil fatty acids into goats' milk. *Anim. Feed Sci. Technol.* 89:201–208. doi:10.1016/S0377-8401(00)00232-7.
- Kokotou, M. G., A. C. Kokotos, D. Gkikas, O. G. Mountanea, C. Mantzourani, A. Almutairi, X. Lei, S. Ramanadham, P. K. Politis, and G. Kokotos. 2020. Saturated hydroxy fatty acids exhibit a cell growth inhibitory activity and suppress the cytokine-induced  $\beta$ -cell apoptosis. *J. Med. Chem.* 63:12666–12681. doi:10.1021/acs.jmedchem.0c00844.
- Kramer, J. K., C. Cruz-Hernandez, Z. Deng, J. Zhou, G. Jahreis, and M. E. Dugan. 2004. Analysis of conjugated linoleic acid and *trans* 18:1 isomers in synthetic and animal products. *Am. J. Clin. Nutr.* 79:1137S-1145S. doi:10.1093/ajcn/79.6.1137S.
- Kritchevsky, D., S. A. Tepper, S. Wright, S. K. Czarnecki, T. A. Wilson, and R. J. Nicolosi. 2004. Conjugated linoleic acid isomer effects in atherosclerosis: Growth and regression of lesions. *Lipids* 39:611. doi:10.1007/s11745-004-1273-8.
- Lengi, A. J., and B. A. Corl. 2010. Short communication: Identification of the bovine sterol regulatory element binding protein-1c promoter and its activation by liver X receptor. *J. Dairy Sci.* 93:5831–5836. doi:10.3168/jds.2010-3236.
- Leskinen, H., L. Ventto, P. Kairenius, K. J. Shingfield, and J. Vilkki. 2019. Temporal changes in milk fatty acid composition during diet-induced milk fat depression in lactating cows. *J. Dairy Sci.* 102:5148–5160. doi:10.3168/jds.2018-15860.
- Li, C. 2019. Global surveillance of *trans*-fatty acids. *Prev. Chronic. Dis.* 16. doi:10.5888/pcd16.190121.
- Li, N., F. Zhao, C. Wei, M. Liang, N. Zhang, C. Wang, Q. -Z. Li, and X. -J. Gao. 2014. Function of SREBP1 in the milk fat synthesis of dairy cow mammary epithelial cells. *Int. J. Mol. Sci.* 15:16998–17013. doi:10.3390/ijms150916998.
- Lock, A. L., and D. E. Bauman. 2004. Modifying milk fat composition of dairy cows to enhance fatty acids beneficial to human health. *Lipids* 39:1197–1206. doi:10.1007/s11745-004-1348-6.
- Lock, A. L., B. A. Corl, D. M. Barbano, D. E. Bauman, and C. Ip. 2004. The anticarcinogenic effect of *trans*-11 18:1 is dependent on its conversion to *cis*-9,*trans*-11 CLA by  $\Delta^9$ -desaturase in rats. *J. Nutr.* 134:2698–2704. doi:10.1093/jn/134.10.2698.
- Lock, A. L., P. W. Parodi, and D. E. Bauman. 2005. The biology of *trans* fatty acids: Implications for human health and the dairy industry. *Aust. J. Dairy Technol.* 60:134–142.
- Lock, A. L., M. Rovai, T. A. Gipson, M. J. de Veth, and D. E. Bauman. 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. doi:10.3168/jds.2008-1071.

- Lock, A. L., B. M. Teles, J. W. Perfield, D. E. Bauman, and L. A. Sinclair. 2006. A conjugated linoleic acid supplement containing *trans*-10,*cis*-12 reduces milk fat synthesis in lactating sheep. *J. Dairy Sci.* 89:1525–1532. doi:10.3168/jds.S0022-0302(06)72220-2.
- Lock, A. L., C. Tyburczy, D. A. Dwyer, K. J. Harvatine, F. Destailats, Z. Mouloungui, L. Candy, and D. E. Bauman. 2007. *Trans*-10 octadecenoic acid does not reduce milk fat synthesis in dairy cows. *J. Nutr.* 137:71–76. doi:10.1093/jn/137.1.71.
- Logan, A., L. Day, A. Pin, M. Auld, A. Leis, A. Puvanenthiran, and M. A. Augustin. 2014. Interactive effects of milk fat globule and casein micelle size on the renneting properties of milk. *Food Bioprocess Technol.* 7:3175–3185. doi:10.1007/s11947-014-1362-2.
- Loor, J. J., M. Doreau, J. M. Chardigny, A. Ollier, J. L. Sebedio, and Y. Chilliard. 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. doi:10.1016/j.anifeedsci.2004.12.016.
- Loor, J. J., and J. H. Herbein. 2003. Reduced fatty acid synthesis and desaturation due to exogenous *trans*-10,*cis*-12-CLA in cows fed oleic or linoleic oil. *J. Dairy Sci.* 86:1354–1369. doi:10.3168/jds.S0022-0302(03)73720-5.
- Lourenço, M., E. Ramos-Morales, and R. J. Wallace. 2010. The role of microbes in rumen lipolysis and biohydrogenation and their manipulation. *Animal* 4:1008–1023. doi:10.1017/S175173111000042X.
- Luchtman, D. W., and C. Song. 2013. Cognitive enhancement by omega-3 fatty acids from child-hood to old age: Findings from animal and clinical studies. *Neuropharmacology* 64:550–565. doi:10.1016/j.neuropharm.2012.07.019.
- Luna, P., J. Fontecha, M. Juárez, and M. A. de la Fuente. 2005. Conjugated linoleic acid in ewe milk fat. *J. Dairy Res.* 72:415–424. doi:10.1017/S0022029905001032.
- Ma, L., and B. A. Corl. 2012. Transcriptional regulation of lipid synthesis in bovine mammary epithelial cells by sterol regulatory element binding protein-1. *J. Dairy Sci.* 95: 3743-3755. doi.org/10.3168/jds.2011-5083
- MacGibbon A. K. H. and M. W. Taylor. 2006. Composition and structure of bovine milk lipids. In: *Advanced Dairy Chemistry Vol. 2: Lipids*. Fox, P.F., and McSweeney, P. L. H. (eds.) Springer, New York, USA, pp: 1–42.
- Mackle, T. R., D. A. Dwyer, K. L. Ingvarstsen, P. Y. Chouinard, J. M. Lynch, D. M. Barbano, and D. E. Bauman. 1999. Effects of insulin and amino acids on milk protein concentration and yield from dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82:1512–1524. doi:10.3168/jds.S0022-0302(99)75378-6.

- Manso, T., R. Bodas, C. Vieira, A. Mantecón, and T. Castro. 2011. Feeding vegetable oils to lactating ewes modifies the fatty acid profile of suckling lambs. *Animal* 5:1659–1667. doi:10.1017/S1751731111000632.
- Manso, T., B. Gallardo, A. Salvá, C. Guerra-Rivas, A. Mantecón, P. Lavín, and M. A. de la Fuente. 2016. Influence of dietary grape pomace combined with linseed oil on fatty acid profile and milk composition. *J. Dairy Sci.* 99:1111–1120. doi:10.3168/jds.2015-9981.
- Márquez-Ruiz, G., V. Rodríguez-Pino, and M. A. de la Fuente. 2011. Determination of 10-hydroxystearic, 10-ketostearic, 8-hydroxypalmitic, and 8-ketopalmitic acids in milk fat by solid-phase extraction plus gas chromatography-mass spectrometry. *J. Dairy Sci.* 94:4810–4819. doi:10.3168/jds.2011-4424.
- Martin, C., M. Coppa, H. Fougère, A. Bougouin, R. Baumont, M. Eugène, and L. Bernard. 2021. Diets supplemented with corn oil and wheat starch, marine algae, or hydrogenated palm oil modulate methane emissions similarly in dairy goats and cows, but not feeding behavior. *Anim. Feed Sci. Technol.* 272:114783. doi:10.1016/j.anifeedsci.2020.114783.
- Matamoros, C., F. Hao, Y. Tian, A. D. Patterson, and K. J. Harvatine. 2022. Interaction of sodium acetate supplementation and dietary fiber level on feeding behavior, digestibility, milk synthesis, and plasma metabolites. *J. Dairy Sci.* 105:8824–8838. doi:10.3168/jds.2022-21911.
- McGuire, M. A., J. M. Griinari, D. A. Dwyer, and D. E. Bauman. 1995. Role of insulin in the regulation of mammary synthesis of fat and protein. *J. Dairy Sci.* 78:816–824. doi:10.3168/jds.S0022-0302(95)76693-0.
- McManaman, J. L., T. D. Russell, J. Schaack, D. J. Orlicky, and H. Robenek. 2007. Molecular determinants of milk lipid secretion. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 12:259–268. doi:10.1007/s10911-007-9053-5.
- McNiven, M. A., J. Duynisveld, E. Charmley, and A. Mitchell. 2004. Processing of soybean affects meat fatty acid composition and lipid peroxidation in beef cattle. *Anim. Feed Sci. Technol.* 116:175–184. doi:10.1016/j.anifeedsci.2004.07.005.
- Mika, A., P. Stepnowski, L. Kaska, M. Proczko, P. Wisniewski, M. Sledzinski, and T. Sledzinski. 2016. A comprehensive study of serum odd- and branched-chain fatty acids in patients with excess weight. *Obesity* 24:1669–1676. doi:10.1002/oby.21560.
- Mir, Z., L. A. Goonewardene, E. Okine, S. Jaegar, and H. D. Scheer. 1999. Effect of feeding canola oil on constituents, conjugated linoleic acid (CLA) and long chain fatty acids in goats milk. *Small Rumin. Res.* 33:137–143. doi:10.1016/S0921-4488(99)00016-4.
- Moate, P. J., W. Chalupa, R. C. Boston, and I. J. Lean. 2008. Milk fatty acids. II: Prediction of the production of individual fatty acids in bovine milk. *J. Dairy Sci.* 91:1175–1188. doi:10.3168/jds.2007-0226.

- Moore, J. H., and W. W. Christie. 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.
- Mosley, E. E., G. L. Powell, M. B. Riley, and T. C. Jenkins. 2002. Microbial biohydrogenation of oleic acid to *trans* isomers *in vitro*. J. Lipid Res. 43:290–296. doi:10.1016/S0022-2275(20)30171-1.
- Nakamura, M. T., and T. Y. Nara. 2004. Structure, function, and dietary regulation of  $\Delta^6$ ,  $\Delta^5$ , and  $\Delta^9$  desaturases. Annu. Rev. Nutr. 24:345–376. doi:10.1146/annurev.nutr.24.121803.063211.
- Ntambi, J. M., and M. Miyazaki. 2003. Recent insights into stearoyl-CoA desaturase. Curr. Opin. Lipidol. 14:255–261. doi:10.1097/01.mol.0000073502.41685.c7.
- Nudda, A., A. Cannas, F. Correddu, A. S. Atzori, M. F. Lunesu, G. Battacone, and G. Pulina. 2020. Sheep and goats respond differently to feeding strategies directed to improve the fatty acid profile of milk fat. Animals 10:1290. doi:10.3390/ani10081290.
- Nudda, A., F. Correddu, A. Cesarani, G. Pulina, and G. Battacone. 2021. Functional odd- and branched-chain fatty acid in sheep and goat milk and cheeses. Dairy 2:79–89. doi:10.3390/dairy2010008.
- Ollier, S., C. Leroux, A. de la Foye, L. Bernard, J. Rouel, and Y. Chilliard. 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. doi:10.3168/jds.2009-2022.
- OMS, 2003. Diet, Nutrition and the Prevention of Chronic disease. Report of a Joint WHO/FAO Expert Consultation, World Health Organization Technical Reports Series 916. Organización Mundial de la Salud, Ginebra, Suiza.
- Or-Rashid, M. M., N. E. Odongo, and B. W. McBride. 2007. Fatty acid composition of ruminal bacteria and protozoa, with emphasis on conjugated linoleic acid, vaccenic acid, and odd-chain and branched-chain fatty acids. J. Anim. Sci. 85:1228–1234. doi:10.2527/jas.2006-385.
- Osorio, J. S., M. Vailati-Riboni, A. Palladino, J. Luo, and J. J. Loor. 2017. Application of nutrigenomics in small ruminants: Lactation, growth, and beyond. Small Rumin. Res. 154:29–44. doi:10.1016/j.smallrumres.2017.06.021.
- Pachikian, B. D., C. Druart, E. Catry, L. B. Bindels, A. M. Neyrinck, Y. Larondelle, P. D. Cani, and N. M. Delzenne. 2018. Implication of *trans*-11,*trans*-13 conjugated linoleic acid in the development of hepatic steatosis. PLOS One 13. doi:10.1371/journal.pone.0192447.
- Palmquist, D. L. 2006. Milk fat: Origin of fatty acids and influence of nutritional factors thereon. In: Advanced Dairy Chemistry Vol. 2: Lipids. Fox, P.F., and

- McSweeney, P. L. H. (eds.) Springer, New York, USA, pp: 43-92. doi.org/10.1007/0-387-28813-9\_2.
- Palmquist, D. L., A. D. Beaulieu, and D. M. Barbano. 1993. Feed and animal factors influencing milk fat composition. *J. Dairy Sci.* 76:1753–1771. doi:10.3168/jds.S0022-0302(93)77508-6.
- Palmquist, D. L., and T. C. Jenkins. 2003. Challenges with fats and fatty acid methods. *J. Anim. Sci.* 81:3250–3254. doi:10.2527/2003.81123250x.
- Palmquist, D. L., and T. C. Jenkins. 2017. A 100-year review: Fat feeding of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 100:10061–10077. doi:10.3168/jds.2017-12924.
- Palmquist, D. L., A. L. Lock, K. J. Shingfield, and D. E. Bauman. 2005. Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants and humans. *Advances in Food and Nutrition* 50:179-217. doi.org/10.1016/S1043-4526(05)50006-8.
- Parente, M. O. M., I. Susin, C. P. Nolli, E. M. Ferreira, R. S. Gentil, D. M. Polizel, A. V. Pires, S. P. Alves, and R. J. B. Bessa. 2018. Effects of supplementation with vegetable oils, including castor oil, on milk production of ewes and on growth of their lambs. *J. Anim. Sci.* 96:354–363. doi:10.1093/jas/skx015.
- Park, Y. W. 2017. Goat milk – chemistry and nutrition. In: *Handbook of Milk of Non-Bovine Mammals*. 2: 42-83. doi.org/10.1002/9781119110316.ch2.2.
- Park, Y. W., M. Juárez, M. Ramos, and G. F. W. Haenlein. 2007. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Rumin. Res.* 68:88–113. doi:10.1016/j.smallrumres.2006.09.013.
- Park, Y., and M. W. Pariza. 2001. The effects of dietary conjugated nonadecadienoic acid on body composition in mice. *Biochim. Biophys. Acta* 1533(3):171–4. doi:10.1016/s1388-1981(01)00158-5.
- Parodi, P. W. 2009a. Milk fat nutrition. In: A. Y. Tamime (ed.), *Dairy fats and related products*. 28–51. doi.org/10.1002/9781444316223.ch2.
- Parodi, P. W. 2009b. Has the association between saturated fatty acids, serum cholesterol and coronary heart disease been over emphasized? *Int. Dairy J.* 19:345–361. doi:10.1016/j.idairyj.2009.01.001.
- Perfield, J. W., A. L. Lock, J. M. Griinari, A. Saebø, P. Delmonte, D. A. Dwyer, and D. E. Bauman. 2007. *Trans-9,cis-11* conjugated linoleic acid reduces milk fat synthesis in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90:2211–2218. doi:10.3168/jds.2006-745.
- Pisanu, S., G. Marogna, D. Pagnozzi, M. Piccinini, G. Leo, A. Tanca, A. M. Roggio, T. Roggio, S. Uzzau, and M. F. Addis. 2013. Characterization of size and composition of milk fat globules from Sarda and Saanen dairy goats. *Small Rumin. Res.* 109:141–151. doi:10.1016/j.smallrumres.2012.07.024.
- Pulina, G., and R. Bencini. 2004. *Dairy Sheep Nutrition*. Wallingtoon: CABI Publications, UK; pp: 1-22.

- Pulina, G. and A. Nudda. 2002. Milk production. In: Dairy sheep feeding and nutrition. Pulina, G. Avenue Media, Bologna, Italia, pp. 11–27.
- Recio, I., M. A. de la Fuente, M. Juárez, and M. Ramos. 2009. Bioactive components in sheep milk. In: Bioactive components in milk and dairy products. Y. W. Parl (ed.). Iowa, USA, pp: 83-104.
- Reynolds, C. K., V. L. Cannon, and S. C. Loerch. 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. doi:10.1016/j.anifeedsci.2006.06.015.
- Rico, D. E., and K. J. Harvatine. 2013. Induction of and recovery from milk fat depression occurs progressively in dairy cows switched between diets that differ in fiber and oil concentration. *J. Dairy Sci.* 96:6621–6630. doi:10.3168/jds.2013-6820.
- Rioux, V., and P. Legrand. 2019. Fatty acid sesaturase 3 (FADS3) is a specific  $\Delta^{13}$  desaturase of ruminant *trans*-vaccenic acid. *Lifestyle Genom.* 12:18–24. doi:10.1159/000502356.
- Sæbø, A., P. -C. Sæbø, J. M. Griinari, and K. J. Shingfield. 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. doi:10.1007/s11745-005-1444-7.
- Salter, A. M. 2013. Dietary fatty acids and cardiovascular disease. *Animal* 7:163–171. doi:10.1017/S1751731111002023.
- Sanz Sampelayo, M. R., Y. Chilliard, P. Schmidely, and J. Boza. 2007. Influence of type of diet on the fat constituents of goat and sheep milk. *Small Rumin. Res.* 68:42–63. doi:10.1016/j.smallrumres.2006.09.017.
- Schoonjans, K., J. Peinado-Onsurbe, A. M. Lefebvre, R. A. Heyman, M. Briggs, S. Deeb, and J. Auwerx. 1996. PPAR $\alpha$  and PPAR $\gamma$  activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. *The EMBO Journal*, 15:5336-5348. doi.org/10.1002/j.1460-2075.1996.tb00918.x.
- Shi, H., J. Luo, W. Zhang, and H. Sheng. 2015. Using safflower supplementation to improve the fatty acid profile in milk of dairy goat. *Small Rumin. Res.* 127:68–73. doi:10.1016/j.smallrumres.2015.04.001.
- Shi, H. B., W. S. Zhao, J. Luo, D. W. Yao, Y. T. Sun, J. Li, H. P. Shi, and J. J. Looor. 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. doi:10.3168/jds.2013-7863.
- Shingfield, K. J., S. Ahvenjärvi, V. Toivonen, A. Ärölä, K. V. V. Nurmela, P. Huhtanen, and J. M. Griinari. 2003. Effect of dietary fish oil on biohydrogenation of fatty acids and milk fatty acid content in cows. *Anim. Sci.* 77:165–179. doi:10.1017/S1357729800053765.



- Shingfield, K. J., S. Ahvenjärvi, V. Toivonen, A. Vanhatalo, and P. Huhtanen. 2007. Transfer of absorbed *cis-9,trans-11* conjugated linoleic acid into milk is biologically more efficient than endogenous synthesis from absorbed vaccenic acid in lactating cows. *J. Nutr.* 137:1154–1160. doi:10.1093/jn/137.5.1154.
- Shingfield, K. J., L. Bernard, C. Leroux, and Y. Chilliard. 2010. Role of *trans* fatty acids in the nutritional regulation of mammary lipogenesis in ruminants. *Animal*, 4:1140–1166. doi:10.1017/S1751731110000510.
- Shingfield, K. J., M. Bonnet, and N. D. Scollan. 2013. Recent developments in altering the fatty acid composition of ruminant-derived foods. *Animal* 7:132–162. doi:10.1017/S1751731112001681.
- Shingfield, K. J., Y. Chilliard, V. Toivonen, P. Kairenius, and D. I. Givens. 2008. *Trans* fatty acids and bioactive lipids in ruminant milk. *Bioactive Components of Milk* 3-65. doi.org/10.1007/978-0-387-74087-4\_1.
- Shingfield, K. J., and J. M. Griinari. 2007. Role of biohydrogenation intermediates in milk fat depression. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 109:799–816. doi:10.1002/ejlt.200700026.
- Shingfield, K. J., P. Kairenius, A. Ärölä, D. Paillard, S. Muetzel, S. Ahvenjärvi, A. Vanhatalo, P. Huhtanen, V. Toivonen, J. M. Griinari, and R. J. Wallace. 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. doi:10.3945/jn.112.158576.
- Shingfield, K. J., C. K. Reynolds, G. Hervás, J. M. Griinari, A. S. Grandison, and D. E. Beever. 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. doi:10.3168/jds.S0022-0302(06)72134-8.
- Shingfield, K. J., C. K. Reynolds, B. Lupoli, V. Toivonen, M. P. Yurawecz, P. Delmonte, J. M. Griinari, A. S. Grandison, and D. E. Beever. 2005. Effect of forage type and proportion of concentrate in the diet on milk fatty acid composition in cows given sunflower oil and fish oil. *Anim. Sci.* 80:225–238. doi:10.1079/ASC41820225.
- Shingfield, K. J., and R. J. Wallace. 2014. Synthesis of conjugated linoleic acid in ruminants and humans. In: *Conjugated linoleic acids and conjugated vegetables oils*. Sels, B., and Philippaerts, A (eds.). The Royal Society of Chemistry, Oxford, UK, pp: 1–65. doi:10.1039/9781782620211-00001.
- Shimano, H. 2009. SREBPs: physiology and pathophysiology of the SREBP family. *The FEBS Journal*, 276: 616-621. doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06806.x.
- Shimomura, I., Y. Bashmakov and J. D. Horton. 1999. Increased levels of nuclear SREBP-1c associated with fatty livers in two mouse models of diabetes mellitus. *J. Biol. Chem.* 274: 30028-30032. doi.org/10.1074/jbc.274.42.30028.

- Simopoulos, A. P. 2020. Omega-6 and omega-3 fatty acids: Endocannabinoids, genetics and obesity. *OCL* 27:7. doi:10.1051/ocl/2019046.
- Simopoulos, A. P., and J. J. DiNicolantonio. 2016. The importance of a balanced  $\omega$ -6 to  $\omega$ -3 ratio in the prevention and management of obesity. *Open Heart* 3:e000385. doi:10.1136/openhrt-2015-000385.
- Sokoła-Wysoczańska, E., T. Wysoczański, J. Wagner, K. Czyż, R. Bodkowski, S. Lochyński, and B. Patkowska-Sokoła. 2018. Polyunsaturated fatty acids and their potential therapeutic role in cardiovascular system disorders: A Review. *Nutrients* 10:1561. doi:10.3390/nu10101561.
- Stender, S., and J. Dyerberg. 2004. Influence of *trans* fatty acids on health. *Ann. Nutr. Metab.* 48:61–66. doi:10.1159/000075591.
- Suárez-Vega, A., P. G. Toral, B. Gutiérrez-Gil, G. Hervás, J. J. Arranz, and P. Frutos. 2017. Elucidating fish oil-induced milk fat depression in dairy sheep: Milk somatic cell transcriptome analysis. *Sci. Rep.* 7:45905. doi:10.1038/srep45905.
- Ticiani, E., M. Urio, R. Ferreira, K. J. Harvatine, and D. E. De Oliveira. 2016. Transcriptional regulation of acetyl-CoA carboxylase  $\alpha$  isoforms in dairy ewes during conjugated linoleic acid induced milk fat depression. *Animal* 10:1677–1683. doi:10.1017/S1751731116000677.
- Timmen, H., and S. Patton. 1988. Milk fat globules: Fatty acid composition, size and *in vivo* regulation of fat liquidity. *Lipids* 23:685–689. doi:10.1007/BF02535669.
- Toral, P. G., L. Bernard, A. Belenguer, J. Rouel, G. Hervás, Y. Chilliard, and P. Frutos. 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. doi:10.3168/jds.2015-10292.
- Toral, P. G., L. Bernard, Y. Chilliard, and F. Glasser. 2013. Diet-induced variations in milk fatty acid composition have minor effects on the estimated melting point of milk fat in cows, goats, and ewes: Insights from a meta-analysis. *J. Dairy Sci.* 96:1232–1236. doi.org/10.3168/jds.2012-6046.
- Toral, P. G., Y. Chilliard, J. Rouel, H. Leskinen, K. J. Shingfield, and L. Bernard. 2015. Comparison of the nutritional regulation of milk fat secretion and composition in cows and goats. *J. Dairy Sci.* 98:7277–7297. doi:10.3168/jds.2015-9649.
- Toral, P. G., P. Frutos, G. Hervás, P. Gómez-Cortés, M. Juárez, and M. A. de la Fuente. 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. doi:10.3168/jds.2009-2530.
- Toral, P. G., R. Gervais, G. Hervás, M. -P. Létourneau-Montminy, and P. Frutos. 2020a. Relationships between *trans*-10 shift indicators and milk fat traits in dairy ewes: Insights into milk fat depression. *Anim. Feed Sci. Technol.* 261:114389. doi:10.1016/j.anifeedsci.2020.114389.

- Toral, P. G., G. Hervás, P. Gómez-Cortés, P. Frutos, M. Juárez, and M. A. de la Fuente. 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. doi:10.3168/jds.2009-2769.
- Toral, P. G., G. Hervás, D. Carreño, and P. Frutos. 2016b. Does supplemental 18:0 alleviate fish oil-induced milk fat depression in dairy ewes? *J. Dairy Sci.* 99:1133–1144. doi:10.3168/jds.2015-10304.
- Toral, P. G., G. Hervás, D. Carreño, H. Leskinen, A. Belenguer, K. J. Shingfield, and P. Frutos. 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. doi:10.3168/jds.2017-12638.
- Toral, P. G., G. Hervás, H. Leskinen, K. J. Shingfield, and P. Frutos. 2018a. *In vitro* ruminal biohydrogenation of eicosapentaenoic (EPA), docosapentaenoic (DPA), and docosahexaenoic acid (DHA) in cows and ewes: Intermediate metabolites and pathways. *J. Dairy Sci.* 101:6109–6121. doi:10.3168/jds.2017-14183.
- Toral, P. G., G. Hervás, V. Peiró, and P. Frutos. 2018b. Conditions associated with marine lipid-induced milk fat depression in sheep cause shifts in the *in vitro* ruminal metabolism of 1-<sup>13</sup>C oleic acid. *Animals* 8:196. doi:10.3390/ani8110196.
- Toral, P. G., G. Hervás, A. Della Badia, R. Gervais, and P. Frutos. 2020b. Effect of dietary lipids and other nutrients on milk odd- and branched-chain fatty acid composition in dairy ewes. *J. Dairy Sci.* 103:11413–11423. doi:10.3168/jds.2020-18580.
- Toral, P. G., F. J. Monahan, G. Hervás, P. Frutos, and A. P. Moloney. 2018c. Review: Modulating ruminal lipid metabolism to improve the fatty acid composition of meat and milk. Challenges and opportunities. *Animal* 12:272–281. doi:10.1017/S1751731118001994.
- Toral, P. G., J. Rouel, J., L. Bernard, and Y. Chilliard. 2014. Interaction between fish oil and plant oils or starchy concentrates in the diet: Effects on dairy performance and milk fatty acid composition in goats. *Anim. Feed Sci. and Technol.* 198: 67-82. doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2014.09.019.
- Toral, P. G., K. J. Shingfield, G. Hervás, V. Toivonen, and P. Frutos. 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. doi:10.3168/jds.2010-3300.
- Tsiplakou, E., M. Chatzikonstantinou, C. Mitsiopolou, C. Karaiskou, A. Mavrommatis, K. Sotirakoglou, N. Labrou, and G. Zervas. 2017. Effect of soya bean and fish oil inclusion in diets on milk and plasma enzymes from sheep and goat related to oxidation. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 101:733–742. doi:10.1111/jpn.12516.

- Tziboula-Clarke, A., 2003. Goat milk. In: Encyclopedia of Dairy Sciences. H. Roguiski, J. Fuquay, P. Fox (eds.). Academic Press, Amsterdam, Netherlands, pp: 1270–1279.
- Urrutia, N., and K. J. Harvatine. 2017a. Effect of conjugated linoleic acid and acetate on milk fat synthesis and adipose lipogenesis in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 100:5792–5804. doi:10.3168/jds.2016-12369.
- Urrutia, N., and K. J. Harvatine. 2017b. Acetate dose-dependently stimulates milk fat synthesis in lactating dairy cows. *J. Nutr.* 147:763–769. doi:10.3945/jn.116.245001.
- Vahmani, P., K. E. Glover, and A. H. Fredeen. 2014. Effects of pasture versus confinement and marine oil supplementation on the expression of genes involved in lipid metabolism in mammary, liver, and adipose tissues of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 97:4174–4183. doi:10.3168/jds.2013-7290.
- Vahmani, P., W. J. Meadus, D. C. Rolland, P. Duff, and M. E. R. Dugan. 2016. *Trans*-10,*cis*-15 18:2 isolated from beef fat does not have the same anti-adipogenic properties as *trans*-10,*cis*-12-18:2 in 3T3-L1 adipocytes. *Lipids* 51:1231–1239. doi:10.1007/s11745-016-4192-3.
- Vargas-Bello-Pérez, E., W. Zhao, M. Bionaz, J. Luo, and J. J. Looor. 2019. Nutrigenomic effect of saturated and unsaturated long chain fatty acids on lipid-related genes in goat mammary epithelial cells: What is the role of PPAR $\gamma$ ? *Vet. Sci.* 6:54. doi:10.3390/vetsci6020054.
- Venn-Watson, S., R. Lumpkin, and E. A. Dennis. 2020. Efficacy of dietary odd-chain saturated fatty acid pentadecanoic acid parallels broad associated health benefits in humans: Could it be essential? *Sci. Rep.* 10:8161. doi:10.1038/s41598-020-64960-y.
- Ventto, L., H. Leskinen, P. Kairenius, T. Stefański, A. R. Bayat, J. Vilkkki, and K. J. Shingfield. 2017. Diet-induced milk fat depression is associated with alterations in ruminal biohydrogenation pathways and formation of novel fatty acid intermediates in lactating cows. *Br. J. Nutr.* 117:364–376. doi:10.1017/S0007114517000010.
- Vlaeminck, B., V. Fievez, A. R. J. Cabrita, A. J. M. Fonseca, and R. J. Dewhurst. 2006. Factors affecting odd- and branched-chain fatty acids in milk: A review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 131:389–417. doi:10.1016/j.anifeedsci.2006.06.017.
- Wahle, K. W. J., S. D. Heys, and D. Rotondo. 2004. Conjugated linoleic acids: Are they beneficial or detrimental to health? *Prog. Lipid Res.* 43:553–587. doi:10.1016/j.plipres.2004.08.002.
- Walker, C. K., and J. M. Elliot. 1972. Lactational trends in vitamin B<sub>12</sub> status on conventional and restricted-roughage rations. *J. Dairy Sci.* 55:474–479. doi:10.3168/jds.S0022-0302(72)85518-8.

- Wasowska, I., M. R. G. Maia, K. M. Niedźwiedzka, M. Czauderna, J. M. C. R. Ribeiro, E. Devillard, K. J. Shingfield, and R. J. Wallace. 2006. Influence of fish oil on ruminal biohydrogenation of C18 unsaturated fatty acids. *Br. J. Nutr.* 95:1199–1211. doi:10.1079/bjn20061783.
- Weimer, P. J. 2015. Redundancy, resilience, and host specificity of the ruminal microbiota: Implications for engineering improved ruminal fermentations. *Front. Microbiol.* 6:296. doi.org/10.3389/fmicb.2015.00296.
- Wendorff, W. L. and G. F. W. Haenlein. 2017. Sheep milk – Composition and nutrition. In: *Handbook of Milk of Non-Bovine Mammals*. John Wiley & Sons, Ltd. 210–221. doi.org/10.1002/9781119110316.
- West, D. B., F. Y. Blohm, A. A. Truett, and J. P DeLany. 2000. Conjugated linoleic acid persistently increases total energy expenditure in AKR/J mice without increasing uncoupling protein gene expression. *J Nutr.* 130:2471–2477. doi: 10.1093/jn/130.10.2471.
- Whigham, L. D., A. C. Watras, and D. A. Schoeller. 2007. Efficacy of conjugated linoleic acid for reducing fat mass: A meta-analysis in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 85:1203–1211. doi:10.1093/ajcn/85.5.1203.
- Whitlock, L. A., D. J. Schingoethe, A. R. Hippen, K. F. Kalscheur, R. J. Baer, N. Ramaswamy, and K. M. Kasperson. 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. doi:10.3168/jds.S0022-0302(02)74072-1.
- Wood, H. G., R. W. Kellermeyer, R. Stjernholm, and S. H. Allen. 1964. Metabolism of methylmalonyl-coa and the role of biotin and B<sub>12</sub> coenzymes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 112:660–679. doi:10.1111/j.1749-6632.1964.tb45043.x.
- Xie, Y., F. Wei, S. Xu, B. Wu, C. Zheng, X. Lv, Z. Wu, H. Chen, and F. Huang. 2019. Profiling and quantification of lipids in cold-pressed rapeseed oils based on direct infusion electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Food Chem.* 285:194–203. doi:10.1016/j.foodchem.2019.01.146.
- Yang, Z., S. Liu, X. Chen, H. Chen, M. Huang, and J. Zheng. 2000. Induction of apoptotic cell death and *in vivo* growth inhibition of human cancer cells by a saturated branched-chain fatty acid, 13-methyltetradecanoic acid. *Cancer Res.* 60:505–509. PMID: 10676625.
- Yu, Y., P. H. Correll, and J. P. Vanden Heuvel. 2002. Conjugated linoleic acid decreases production of pro-inflammatory products in macrophages: evidence for a PPAR $\gamma$ -dependent mechanism. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* 1581:89–99. doi:10.1016/S1388-1981(02)00126-9.
- Zhang, T. Y., J. T. Huang, H. B. Tian, Y. Ma, Z. Chen, J. J. Wang, H. P. Shi, and J. Luo. 2018. *Trans*-10,*cis*-12 conjugated linoleic acid alters lipid metabolism of goat mammary epithelial cells by regulation of *de novo* synthesis and the AMPK signaling pathway. *J. Dairy Sci.* 101:5571–5581. doi:10.3168/jds.2017-12822.

Zhu, H., V. Fievez, S. Mao, W. He, and W. Zhu. 2016. Dose and time response of ruminally infused algae on rumen fermentation characteristics, biohydrogenation and *Butyrivibrio* group bacteria in goats. J. Anim. Sci. Biotechnol. 7:22. doi:10.1186/s40104-016-0080-1.

## **CAPÍTULO I**





INDIVIDUAL DIFFERENCES IN RESPONSIVENESS TO  
DIET-INDUCED MILK FAT DEPRESSION IN DAIRY  
SHEEP AND GOATS

A. Della Badia, G. Hervás, P. G. Toral, and P. Frutos

*Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-University of León), Finca Marzanas  
s/n, 24346 Grulleros, León, Spain*

*Journal of Dairy Science, 104 (2021) 11509-11521*

[doi.org/10.3168/jds.2021-20414](https://doi.org/10.3168/jds.2021-20414)

Presentado en parte en las XIX Jornadas sobre Producción Animal AIDA.  
1-2 de junio de 2021. Zaragoza (España).



# INDIVIDUAL DIFFERENCES IN RESPONSIVENESS TO DIET-INDUCED MILK FAT DEPRESSION IN DAIRY SHEEP AND GOATS

A. Della Badia, G. Hervás, P. G. Toral, and P. Frutos

---

**Abstract.** Both sheep and goats can display very different individual degrees of milk fat depression (MFD), which might explain some apparent contradictions in the literature. Because the antilipogenic effect of certain fatty acids (FA) is the most likely origin of MFD, characterizing the milk FA profile of animals showing different degrees of MFD seems a helpful step to understand the physiological basis of the tolerance or susceptibility to the syndrome. Analyzing whether specific traits may predetermine a particular responsiveness would also be of relevance to meet this aim. However, information about these aspects is scant, not only in goats and sheep but in ruminants in general. This study was conducted with 25 Murciano-Granadina does and 23 Assaf ewes that were fed a total mixed ration without lipid supplementation, for 3 weeks (Control period). Then, all animals received the same basal diet supplemented with 2% of fish oil (FO) for 5 additional weeks (MFD period). At the end of this second period, and on the basis of the extent of FO-induced decreases in milk fat concentration, the 5 most responsive (RESPON+) and the 5 least responsive (RESPON-) animals were selected within each species, 20 in total. Milk yield and composition, including a comprehensive FA profile, were examined at the end of each period. By design, between-group variation in milk fat concentration and yield was substantial, but no significant interaction with the effect of species was detected. Reductions in these two performance traits averaged 6% in RESPON- and 26% in RESPON+. Results do not allow suggesting that responsiveness to MFD would be clearly predetermined neither by the studied performance traits nor by milk FA profile, although a certain relationship with energy balance might exist. Furthermore, variations in ewes and does displaying different individual degrees of MFD may be associated with changes in certain candidate milk fat inhibitors, such as *trans*-10 18:1 and *cis*-9 16:1, whereas *trans*-10,*cis*-12 CLA would only have a minor role in determining MFD severity. Alterations in the molar yield of *de novo* and preformed FA suggest relevant differences in the mechanisms underlying MFD in RESPON+ and RESPON-, with inter-species effects being only observed in more tolerant animals. Further research is still required to elucidate key determinants of responsiveness to MFD.

*Key words:* caprine, fatty acid, fish oil, ovine, performance

---



## **CAPÍTULO II**



SUSCEPTIBILITY TO MILK FAT DEPRESSION IN DAIRY SHEEP  
AND GOATS: INDIVIDUAL VARIATION IN RUMINAL  
FERMENTATION AND BIOHYDROGENATION

A. Della Badia, P. Frutos, P. G. Toral, and G. Hervás

*Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-University of León), Finca Marzanas  
s/n, 24346 Grulleros, León, Spain*

*Journal of Dairy Science, 106 (2023) 245-256*

[doi.org/10.3168/jds.2022-22248](https://doi.org/10.3168/jds.2022-22248)

Presentado en parte en las XIX Jornadas sobre Producción Animal (AIDA).  
1-2 de junio de 2021. Zaragoza (España) y en parte en FAO-CIHEAM Joint  
Seminar of Network on Pasture and Forage Crops and on Sheep and Goat  
Nutrition. 27-29 de septiembre de 2022. Catania (Italia).





## SUSCEPTIBILITY TO MILK FAT DEPRESSION IN DAIRY SHEEP AND GOATS: INDIVIDUAL VARIATION IN RUMINAL FERMENTATION AND BIOHYDROGENATION

A. Della Badia, P. Frutos, P. G. Toral, and G. Hervás

---

**Abstract.** Small ruminants are susceptible to milk fat depression (MFD) induced by marine lipid supplementation. However, as observed in dairy cows, there is wide individual variation in the response to MFD-inducing diets, which may be due to individual differences in ruminal processes. Therefore, we compared the ruminal responses of goats and sheep with varying degrees of MFD extent to improve our understanding of this complex syndrome. Our specific aims were to attempt to elucidate whether pre-existing variations in ruminal fermentation and biohydrogenation determine a higher tolerance or susceptibility to MFD, and whether the severity of MFD depends exclusively on the response to the diet. The trial was conducted with 25 does and 23 ewes fed a basal diet without lipid supplementation for 3 weeks (Control period). Then, 2% fish oil (FO) was added to the same diet for 5 additional weeks (MFD period). Based on the extent of the elicited MFD (i.e., the percentage variation between milk fat concentrations recorded at the end of the Control and MFD periods), the 5 most responsive (RESPON+) and the 5 least responsive (RESPON-) animals were selected within each species. On the last day of each period, ruminal fluid samples were collected to examine fermentation parameters and fatty acid profiles. In general, the individual degree of MFD in sheep and goats did not seem to be predetermined by traits related to ruminal fermentation and biohydrogenation, including fatty acids that may serve as biomarkers of microorganisms. Regarding differences in the response to FO, the results suggest no link between MFD susceptibility and concentration of biohydrogenation intermediates such as *trans*-10-containing C18, C20, and C22 metabolites. The explanation for individual responses based on a shortage of ruminal acetate and 18:0 for mammary uptake also seems to be dismissed, based on the lack of variation in these compounds between RESPON+ and RESPON-. However, the concentration of unsaturated fatty acids provided by FO (e.g., *cis*-9 16:1, *cis*-11 18:1 and 20:5n-3) was higher in the rumen of RESPON+ than RESPON- ewes and does. Thus, although further research is needed, the extent of biohydrogenation of these fatty acids might be associated with tolerance or susceptibility to MFD.

*Key words:* caprine, fatty acid, fish oil, ovine, performance

---



## **CAPÍTULO III**



ANALYSIS OF FACTORS PREDISPOSING DAIRY EWES TO  
DIET-INDUCED MILK FAT DEPRESSION

*Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-University of León),  
Finca Marzanas s/n, 24346 Grulleros, León, Spain*

*Department of Animal Science,  
Pennsylvania State University, University Park, 16802, USA.*

Presentado en parte en las XX Jornadas sobre Producción Animal (AIDA).  
13-14 de junio de 2023. Zaragoza (España) y en parte en American Dairy  
Science Association (ADSA) Annual Meeting. 25-28 de junio de 2023.  
Ottawa, (Canada).



## ANALYSIS OF FACTORS PREDISPOSING DAIRY EWES TO DIET-INDUCED MILK FAT DEPRESSION

---

**Abstract.** In sheep, diet-induced milk fat depression (MFD) results from ruminal alterations when ewes are fed marine lipids to modulate their milk fatty acid profile. However, there is little available information on the relationship between characteristics existing before the consumption of MFD-inducing diets and susceptibility to the syndrome. Understanding predisposing factors for this condition may provide additional insight into MFD and allow better predictions of its occurrence. Thus, a meta-analytical approach was used to identify traits that may predetermine individual MFD extension in sheep. Initial data was collected from 10 trials in which 160 Assaf ewes were subsequently fed 16 diets including fish oil or marine algae for 3 to 5 weeks. The decrease in milk fat concentration and yield was calculated using 3 approaches: absolute change (final – initial), relative change as a percent of pretrial value, and potential change relative to the maximal expected MFD (assuming a maximal decrease to 3% milk fat). Bivariate and multivariate analyses were used to explore whether individual performance and milk FA profile are related with subsequent MFD extent. According to bivariate analyses, there was a linear relationship between initial milk fat concentration and the absolute ( $R^2 = 0.46$ ; partial  $R^2$  of 0.08), relative ( $R^2 = 0.39$ ; partial  $R^2$  of 0.06), and potential changes in milk fat concentration during MFD ( $R^2 = 0.17$ ; partial  $R^2 = 0.03$ ). Thus, when ewes were fed marine lipids, the higher the initial milk fat content, the greater the extent of MFD. This finding was supported by a second bivariate analysis (categorizing ewes by initial milk fat concentration and yield) and multivariate analyses. A weaker relationship may also exist between MFD intensity and pretrial milk yield and protein concentration. In addition, MFD in more responsive ewes may be related to rumen function alterations that increase milk concentrations of candidate antilipogenic metabolites, such as *trans*-10 18:1, as suggested by bivariate and multivariate analyzes. Although the role of milk FA as predisposing factors for MFD remained unclear, results from this meta-analysis suggest the involvement of preformed FA uptake in the syndrome and warrant further investigation. Further research would also be advisable to elucidate the physiological basis underlying the greater susceptibility to MFD of ewes with higher milk fat concentration.

*Key words:* ewes, biohydrogenation, marine lipids

---

## **CONCLUSIONES**





**Primera.** Cuando la dieta de cabras y ovejas se suplementa con aceite de pescado (para mejorar el perfil lipídico de su grasa láctea), la susceptibilidad individual de los animales al síndrome de baja grasa en la leche (MFD) parece estar relacionada con cambios en la concentración en la leche de ciertos AG con efecto potencialmente antilipogénico, tales como el *trans*-10 18:1 y el *cis*-9 16:1, mientras que el *trans*-10,*cis*-12 CLA solo tendría un papel secundario. Además, las variaciones en las producciones molares de los ácidos grasos sintetizados *de novo* (<C16) o preformados (>C16) sugieren diferencias significativas en los mecanismos responsables del desarrollo de la MFD en los animales que muestran una menor o mayor tolerancia, con diferencias entre caprino y ovino solo en los individuos más tolerantes.

**Segunda.** Teniendo en cuenta la similitud de las respuestas ruminales en ambas especies de rumiantes (ovejas y cabras), la tolerancia o susceptibilidad al síndrome de baja grasa en la leche parece depender principalmente de diferencias individuales en el grado de biohidrogenación de ciertos ácidos grasos insaturados potencialmente antilipogénicos (por ejemplo, *cis*-9 16:1, *cis*-11 18:1, y 20:5n-3) proporcionados por el aceite de pescado, aunque aún se desconoce la actividad biológica de estos ácidos grasos en rumiantes lecheros.

**Tercera.** Los resultados de los experimentos individuales no permiten establecer una relación clara entre la predisposición a sufrir depresión de la grasa láctea y los valores iniciales de los parámetros de rendimiento productivo, fermentación y biohidrogenación ruminal o perfil de ácidos grasos de la leche.

Sin embargo, los resultados de un metanálisis con ovejas lecheras alimentadas con lípidos marinos sugieren que existe una relación entre la concentración de grasa láctea previa al consumo de la dieta inductora de MFD y la magnitud de la depresión: cuanto mayor sea el contenido inicial de grasa en la leche, mayor será la reducción en la concentración y producción de grasa láctea. También puede existir una relación, aunque más débil, entre la intensidad del síndrome y tanto la producción de leche como la concentración de proteína previas al consumo de la dieta que causa MFD. Aunque el papel de los ácidos grasos de la leche como factores predeterminantes del desarrollo de la depresión de la grasa láctea sigue sin estar claro, los resultados del metanálisis sugieren que el mecanismo de captación mamaria de los ácidos grasos preformados (>C16) jugaría un papel relevante.

## CONCLUSIONS



**First.** When the diet of goats and sheep is supplemented with fish oil (to improve their milk fat profile), the individual susceptibility of the animals to milk fat depression (MFD) seems to be related to changes in the milk concentration of certain FA with a potential antilipogenic effect, such as *trans*-10 18:1 and *cis*-9 16:1, while *trans*-10,*cis*-12 CLA would only play a secondary role. Furthermore, variations in the molar yields of fatty acids synthesised *de novo* (<C16) or preformed (>C16) suggest significant differences in the mechanisms responsible for the development of MFD in animals showing lower or higher tolerance, with differences between ovine and caprine only in more tolerant individuals.

**Second.** Given the similarity of ruminal responses in both ruminant species (sheep and goats), tolerance or susceptibility to milk fat depression may depend on individual differences in the degree of biohydrogenation of some potentially antilipogenic unsaturated fatty acids (e.g. *cis*-9 16:1, *cis*-11 18:1, and 20:5n-3) provided by fish oil, although the biological activity of these fatty acids in dairy ruminants is as yet uncertain.

**Third.** Results from individual trials do not allow to establish a clear relationship between predisposition to suffer milk fat depression and initial values of animal performance, ruminal fermentation and biohydrogenation parameters, or milk fatty acid profile.

However, results from a meta-analysis conducted in dairy ewes fed marine lipids suggest that there is a relationship between the milk fat concentration before consumption of the MFD-inducing diet and the extent of the syndrome: the higher the initial milk fat content, the greater the reduction in milk fat concentration and yield. There may also be a relationship, albeit

weaker, between the severity of the syndrome and both milk production and protein concentration prior to the consumption of the MFD-inducing diet.

Although the role of milk fatty acids as predetermining factors in the development of milk fat depression remains unclear, the results of the meta-analysis suggest that the mechanism of mammary uptake of preformed fatty acids (>C16) may play a relevant role.





