

UNIVERSIDAD DE LEÓN
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)
FACULTAD DE VETERINARIA
INSTITUTO DE GANADERÍA DE MONTAÑA (IGM)

Efecto de la frecuencia diaria de ordeño sobre la producción y composición de la leche y el estado sanitario de la ubre en ovejas de la raza assaf: interacción con el nivel de producción y el aporte de vitamina E y selenio.



La Cabra Amaltea de Bernini.

Efecto de la frecuencia diaria de ordeño sobre la producción y composición de la leche y el estado sanitario de la ubre en ovejas de la raza assaf: interacción con el nivel de producción y el aporte de vitamina E y selenio.

Effect of milking frequency on milk yield, milk composition and udder health in Assaf ewes: interaction with the level of production and vitamin E and selenium supplementation.

Memoria de tesis doctoral presentada por:

Edgar E. Pulido Chávez, MVZ

Para optar al grado de:

Doctor en Medicina, Sanidad y Producción Animal y Ciencia de los Alimentos,
por la **Universidad de León**

Dirigida por los Doctores:

Nuria Prieto Benavides

Miguel Fernández Gutiérrez

Fco. Javier Giráldez García

León, España. Julio de 2017

Durante la realización de estos trabajos, el autor de la presente memoria de tesis doctoral ha disfrutado de una beca-crédito completa del *Programa especial para estudios de maestría o doctorado* de la **Universidad de Guadalajara**, México.

La financiación para la realización de los trabajos que componen este trabajo de investigación se realizó a través del proyecto **PIE CSIC 201240E105**.

Deseo expresar mi agradecimiento a todas las instituciones y personas que han puesto a nuestra disposición los medios necesarios y sus conocimientos para la realización del presente trabajo. Especialmente a la **Universidad de Guadalajara, México**; al **Instituto de Ganadería de Montaña (Igm)** centro mixto de la **Universidad de León, España** y el **Consejo Superior de Investigaciones Científicas**; el *Istituto di Zootecnica, Università Cattolica del Sacro Cuore a Piacenza (UCSC), Italia* y *College of Veterinary Medicine, University of Illinois at Urbana-Champaign (UIUC), United States of America*.

Contenido.

1	INTRODUCCIÓN.	14
2	OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL.	20
3	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.	22
3.1	ANATOMÍA DE LA GLÁNDULA MAMARIA.	23
3.2	DESARROLLO DE LA GLÁNDULA MAMARIA Y LACTACIÓN.	25
3.2.1	MAMOGÉNESIS: RELACIÓN ENTRE CRECIMIENTO CORPORAL Y PROLIFERACIÓN CELULAR DE LA GLÁNDULA MAMARIA.	25
3.2.2	ETAPA PRENATAL.	26
3.2.3	ETAPA PREPUBERAL.	26
3.2.4	ETAPA POSTPUBERAL.	27
3.2.5	GESTACIÓN.	27
3.2.6	LACTACIÓN.	29
3.2.7	CONTROL HORMONAL DEL DESARROLLO MAMARIO.	29
3.3	LACTOGÉNESIS.	33
3.3.1	CAMBIOS EN LA ESTRUCTURA Y FUNCIÓN CELULAR.	34
3.3.2	CONTROL HORMONAL.	35
3.4	CALOSTROGÉNESIS.	37
3.5	GALACTOPOYESIS.	37
3.5.1	CONTROL HORMONAL.	38
3.6	INVOLUCIÓN DE LA GLÁNDULA MAMARIA.	39
3.6.1	ESTASIS DE LA LECHE E INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS LÁCTEA.	42
3.6.2	MUERTE CELULAR VÍA APOPTOSIS.	42
3.6.3	RESPUESTA INMUNOLÓGICA Y ELIMINACIÓN DE DESECHOS APOPTÓTICOS.	43
3.6.4	EVOLUCIÓN DEL COMPLEJO DE LAS TIGHT JUNCTIONS (TJ) Y SUS MECANISMOS DE REGULACIÓN.	43
3.6.5	LA REMODELACIÓN DE LA MATRIZ EXTRACELULAR (ECM) Y LA MEMBRANA BASAL (BM).	45
3.6.6	PROLIFERACIÓN DEL TEJIDO ADIPOSO.	45
3.6.7	REMODELACIÓN VASCULAR.	46
3.7	BIOSÍNTESIS Y SECRECIÓN DE LOS COMPONENTES MAYORITARIOS DE LA LECHE.	46
3.7.1	SÍNTESIS Y SECRECIÓN DE PROTEÍNA.	47
3.7.2	SÍNTESIS Y SECRECIÓN DE GRASA.	50
3.7.3	SÍNTESIS Y SECRECIÓN DE LACTOSA.	52
3.7.4	VITAMINAS Y MINERALES.	54
3.8	SALUD DE LA UBRE Y CALIDAD HIGIÉNICO-SANITARIA DE LA LECHE.	55
3.9	RELACIÓN ENTRE NUTRICIÓN, PRODUCCIÓN Y COMPOSICIÓN DE LA LECHE.	58
3.10	VITAMINA E Y SELENIO.	62
3.10.1	CONTENIDO EN LECHE Y FUENTES DE VARIACIÓN.	62
3.10.2	PAPEL ANTIOXIDANTE Y EFECTO SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS DE LA LECHE Y LA SALUD.	63
3.11	ORDEÑO MECÁNICO Y FISIOLOGÍA DEL ORDEÑO.	67
3.11.1	APTITUD AL ORDEÑO.	67
3.11.2	RELACIÓN ENTRE LOS PARÁMETROS ANATÓMICOS Y MORFOMÉTRICOS DE LA UBRE Y SU ADAPTACIÓN AL ORDEÑO.	68
3.11.3	EYECCIÓN DE LA LECHE.	69
3.11.4	FRACCIONAMIENTO DE LA LECHE EN LA UBRE.	71
3.12	FRECUENCIA DE ORDEÑO.	71
3.12.1	RELACIÓN CON LA ESTRUCTURA ANATÓMICA Y EL ESTADO SANITARIO DE LA UBRE.	73
3.12.2	RELACIÓN CON LA PRODUCCIÓN Y COMPOSICIÓN DE LA LECHE.	76
3.12.3	RELACIÓN CON LA NUTRICIÓN.	82
3.12.4	MECANISMOS DE ADAPTACIÓN DE LA GLÁNDULA MAMARIA FRENTE A LA MODIFICACIÓN DE LA FRECUENCIA DE ORDEÑO.	85

4 MATERIAL Y MÉTODOS.	92
4.1 EXPERIMENTO I. EFECTO DE LA FRECUENCIA DE ORDEÑO Y DE LA ADMINISTRACIÓN DE UN SUPLEMENTO ANTIOXIDANTE (VITAMINA E Y SELENIO) SOBRE LA INGESTIÓN, LA EVOLUCIÓN DE PESO, LA CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE VITAMINA E Y MINERALES, LA PRODUCCIÓN Y COMPOSICIÓN DE LA LECHE Y EL ESTADO SANITARIO DE LA GLÁNDULA MAMARIA.	93
4.1.1 ANIMALES Y DIETAS.	93
4.1.2 DESARROLLO EXPERIMENTAL.	95
4.1.3 ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICO E HISTOLÓGICO.	97
4.1.4 SANGRE Y PLASMA.	103
4.1.5 GLÁNDULA MAMARIA.	104
4.1.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	105
4.2 EXPERIMENTO II. EFECTO A CORTO Y MEDIO PLAZO DE LA FRECUENCIA DE ORDEÑO EN OVEJAS CON DIFERENTE POTENCIAL PRODUCTIVO Y CAPACIDAD CISTERNAL SOBRE LA PRODUCCIÓN Y COMPOSICIÓN DE LA LECHE, EL PERFIL METABÓLICO Y EL ESTADO SANITARIO DE LA UBRE.	108
4.2.1 ANIMALES Y DIETAS.	108
4.2.2 DESARROLLO EXPERIMENTAL.	110
4.2.3 ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICO.	112
4.2.4 CÁLCULOS MATEMÁTICOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	112
5 RESULTADOS.	115
5.1 EXPERIMENTO I. EFECTO DE LA FRECUENCIA DE ORDEÑO Y DE LA ADMINISTRACIÓN DE UN SUPLEMENTO ANTIOXIDANTE (VITAMINA E Y SELENIO) SOBRE LA INGESTIÓN, LA EVOLUCIÓN DE PESO, LA CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE VITAMINA E Y MINERALES, LA PRODUCCIÓN Y COMPOSICIÓN DE LA LECHE Y EL ESTADO SANITARIO DE LA GLÁNDULA MAMARIA.	116
5.1.1 INGESTIÓN Y EVOLUCIÓN DEL PESO VIVO.	116
5.1.2 PERFIL HEMÁTICO.	118
5.1.3 CONTENIDO DE MINERALES, VITAMINA E Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL PLASMA.	121
5.1.4 PRODUCCIÓN Y COMPOSICIÓN DE LA LECHE.	124
5.1.5 CONTENIDO MINERAL, VITAMÍNICO Y ESTABILIDAD A LA OXIDACIÓN DE LA LECHE.	128
5.1.6 PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS DE LA LECHE.	129
5.1.7 ESTADO SANITARIO Y ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO DE LA GLÁNDULA MAMARIA.	136
5.2 EXPERIMENTO II. EFECTO A CORTO Y MEDIO PLAZO DE LA FRECUENCIA DE ORDEÑO EN OVEJAS CON DIFERENTE POTENCIAL PRODUCTIVO Y CAPACIDAD CISTERNAL SOBRE LA PRODUCCIÓN Y COMPOSICIÓN DE LA LECHE, EL PERFIL METABÓLICO Y EL ESTADO SANITARIO DE LA UBRE.	142
5.2.1 PRODUCCIÓN DE LECHE A LO LARGO DEL PERIODO EXPERIMENTAL.	142
5.2.2 EFECTO A CORTO PLAZO (48 H) DE LA REDUCCIÓN DE LA FRECUENCIA DE ORDEÑO (2X A 1X) SOBRE LA PRODUCCIÓN DE LECHE Y RELACIÓN CON EL POTENCIAL PRODUCTIVO DEL ANIMAL Y LA CAPACIDAD DE LA CISTERNA DE LA GLÁNDULA.	147
5.2.3 EFECTO A MEDIO PLAZO (6 SEMANAS) DE LA REDUCCIÓN DE LA FRECUENCIA DE ORDEÑO (2X A 1X) SOBRE LA PRODUCCIÓN DE LECHE Y RELACIÓN CON EL POTENCIAL PRODUCTIVO DEL ANIMAL Y LA CAPACIDAD DE LA CISTERNA DE LA GLÁNDULA.	148
5.2.4 COMPOSICIÓN DE LA LECHE Y PRODUCCIÓN DE COMPONENTES.	151
5.2.5 ESTADO SANITARIO DE LA UBRE Y DEL METABOLISMO DE LAS OVEJAS.	156
6 DISCUSIÓN.	165
6.1 EXPERIMENTO I. EFECTO DE LA FRECUENCIA DE ORDEÑO Y DE LA ADMINISTRACIÓN DE UN SUPLEMENTO ANTIOXIDANTE (VITAMINA E Y SELENIO) SOBRE LA INGESTIÓN, LA EVOLUCIÓN DE PESO, LA CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE VITAMINA E Y MINERALES, LA PRODUCCIÓN Y COMPOSICIÓN DE LA LECHE Y EL ESTADO SANITARIO DE LA GLÁNDULA MAMARIA.	166
6.1.1 INGESTIÓN Y EVOLUCIÓN DEL PESO CORPORAL.	166
6.1.2 PERFIL HEMÁTICO: RECUENTO CELULAR.	168
6.1.3 PERFIL HEMÁTICO: CONCENTRACIÓN DE VITAMINA E Y MINERALES.	170

6.1.4	PRODUCCIÓN Y COMPOSICIÓN DE LECHE.	172
6.1.5	SALUD DE LA UBRE.	183
6.2	EXPERIMENTO II. EFECTO A CORTO Y MEDIO PLAZO DE LA FRECUENCIA DE ORDEÑO EN OVEJAS CON DIFERENTE POTENCIAL PRODUCTIVO Y CAPACIDAD CISTERNAL SOBRE LA PRODUCCIÓN Y COMPOSICIÓN DE LA LECHE, EL PERFIL METABÓLICO Y EL ESTADO SANITARIO DE LA UBRE.	188
6.2.1	PRODUCCIÓN Y COMPOSICIÓN DE LECHE: EFECTO DE LA FRECUENCIA DE ORDEÑO A CORTO PLAZO.	188
6.2.2	PRODUCCIÓN Y COMPOSICIÓN DE LECHE: EFECTO DE LA FRECUENCIA DE ORDEÑO A MEDIO PLAZO.	194
6.2.3	SALUD DE LA UBRE, CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE LACTOSA Y PERFIL METABÓLICO DE LAS OVEJAS.	198
7	CONCLUSIONES.	208
	CONCLUSIONES.	209
	CONCLUSIONI.	211
	CONCLUSIONS.	213
8	RESUMEN.	215
	RESUMEN.	216
	RIASSUNTO.	224
	SUMMARY.	231
9	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	238

Índice de figuras.

Figura 1 Cambios hormonales en el período periparto (Adaptado de Hurley, 2010).	36
Figura 2 Fases de la involución mamaria según Pai y Horseman (2011).	41
Figura 3 Cuadro resumen de la biosíntesis de la leche en las células secretoras (Wattiaux, 1998).	46
Figura 4 Proteograma.	49
Figura 5 Mecanismos de adaptación que ocurren en la glándula mamaria como respuesta a los cambios en la frecuencia de ordeño.	86
Figura 6 Rancimat®. Esquema de funcionamiento.	100
Figura 7 Cromatograma para la cuantificación de los niveles de vitamina E en leche.....	101
Figura 8 Evolución semanal de la ingestión de MS para cada grupo experimental [Control vs AOX(recibió el suplemento antioxidante)]......	117
Figura 9 Evolución del peso vivo a lo largo del experimento para cada grupo experimental [Control vs AOX(recibió el suplemento antioxidante)]......	117
Figura 10 Evolución del perfil hemático de las ovejas a lo largo del experimento para cada tratamiento (Control y AOX) y período [(Pdo1-2x vs 2x) y (Pdo2-1x vs 2x)]......	120
Figura 11 Evolución de la concentración plasmática de vitamina E, Se, Ca, P, Na, K, Cl y Mg y de la capacidad antioxidante a lo largo del experimento para cada tratamiento (Control y AOX) y período [(Pdo 1: días 14 y 21; 2x vs 2x) y (Pdo2: días 49 y 77 ; x vs 2x)].	123
Figura 12 Evolución de la producción de leche para cada grupo experimental y glándula a lo largo del experimento.....	124
Figura 13 Número de células epiteliales/alveolo, en las glándulas sometidas a 1 [Gland A (1x)] o 2 [Gland B (2x)] ordeños al día en los animales sacrificados del grupo Control y del grupo que recibió el suplemento antioxidante (AOX)......	138
Figura 14 Diámetro de los alveolos en las glándulas sometidas a 1 [Gland A (1x)] o 2 [Gland B (2x)] ordeños al día en los animales sacrificados del grupo Control y del grupo que recibió el suplemento antioxidante (AOX)......	139
Figura 15 Distribución (%) de casos según la presencia o ausencia de infiltrado celular inflamatorio en la cisterna o parénquima de las glándulas sometidas a 1 [Gland A (1x)] o 2 [Gland B (2x)] ordeños al día en los animales sacrificados del grupo Control y del grupo que recibió el suplemento antioxidante (AOX).	139
Figura 16 Distribución (%) de casos según la presencia e intensidad de inflamación en la cisterna o en el parénquima de las glándulas sometidas a 1 [Gland A (1x)] o 2 [Gland B (2x)] ordeños al día en los animales sacrificados del grupo Control y del grupo que recibió el suplemento antioxidante (AOX).	140
Figura 17 Comparación de las características histológicas de una glándula sin inflamación A(n) versus los diferentes grados de infiltración inflamatoria [B(+), C(++)] observado a diferentes aumentos ópticos (4X, 10X y 20X). El grado (+) se caracteriza por la presencia células mononucleares inflamatorias de forma aislada o formando pequeños agregados sin ocasionar una variación evidente en el diámetro de los alveolos afectados. El infiltrado de células inflamatorias de similares características pero en mayor número y distribución difusa se observa en el infiltrado inflamatorio de grado (++), donde un número evidente de alveolos mamarios muestra reducción de la luz y alteración de la forma.	141
Figura 18 Valores medios de la producción de leche a lo largo del periodo experimental para cada glándula (izquierda vs derecha) en cada uno de los grupos experimentales (AP: producción alta; MP: producción media; BP: producción baja).	142

Figura 19 Valores medios de la producción de leche a lo largo del periodo experimental para cada uno de los grupos experimentales (AP: producción alta; MP: producción media; BP: producción baja).....	143
Figura 20 Valores medios observados y estimados a partir del modelo de Wood (1967) de producción de leche tras el cambio de frecuencia de ordeño para cada grupo experimental (BP: producción baja; MP: producción media; AP: producción alta).....	148
Figura 21 Evolución de los valores medios de la producción de extracto seco, grasa, proteína y lactosa a lo largo del periodo experimental para cada uno de los grupos experimentales (AP: producción alta ; MP: producción media ; BP: producción baja).	155
Figura 22 Valores medios del recuento de células somáticas (log ₁₀ RCS) en la leche a lo largo del periodo experimental para cada grupo experimental.....	156
Figura 23 Relación entre la capacidad cisternal de la glándula y la reducción en la producción de leche cuando se reduce la frecuencia de dos (2x) a 1 (1x) ordeño al día.....	174
Figura 24 Relación entre la producción de leche registrada el día anterior al cambio de frecuencia de ordeño (g/oveja y día) y la reducción máxima registrada en la misma en las 48 horas siguientes al cambio de frecuencia para el conjunto de animales experimentales (BP: baja producción; MP: media producción; AP: alta producción).....	190
Figura 25 Relación entre la capacidad cisternal de la ubre (promedio de la capacidad de las dos glándulas) antes del cambio de frecuencia de ordeño y la reducción máxima registrada en la producción de leche en las 48 horas siguientes tras el cambio de frecuencia para el conjunto de animales experimentales (BP: baja producción; MP: media producción; AP: alta producción).	191
Figura 26 Relación entre la producción de leche (g/oveja y día; valor medio para las semanas 1,2,3 y 4) y su composición (% , valor medio ponderado para la producción de cada día)	192
Figura 27 Relación entre los valores observados y los estimados con diferentes modelos predictivos (empleando la producción del día anterior al cambio de frecuencia como variable independiente; * empleando la producción del día anterior al cambio de frecuencia y la capacidad cisternal como variables independientes) del nuevo pico de producción alcanzado tras el cambio de frecuencia de ordeño.....	195
Figura 28 Porcentaje de reducción en la producción de leche tras el cambio de frecuencia de ordeño para cada uno de los animales en los diferentes grupos experimentales y para el conjunto del periodo (semanas 4 a 10).	197
Figura 29 Coeficientes de correlación entre el recuento de células somáticas registrado en las muestras de leche recogidas antes del cambio de frecuencia de ordeño (día 28) y el registrado posteriormente (días 29, 30, 32, 35, 42, 49, 56, 63 y 70).	200

Índice de tablas.

Tabla 1 Proporción de ingredientes y composición química de la ración experimental.....	94
Tabla 2 Parámetros hemáticos analizados.	103
Tabla 3 Características (valor medio \pm esm1) de las ovejas de cada grupo experimental al inicio del experimento: edad, peso, días de lactación, producción media de leche, cociente entre las producciones de leche de cada glándula, proporción de leche cisternal y cociente entre las proporciones de cada glándula.	109
Tabla 4 Ingredientes y composición química de la ración consumida por los animales durante el periodo experimental.	110
Tabla 5 Valores medios de la ingestión diaria de materia seca(MSI), de peso vivo final (PVF) y de la ganancia diaria de peso (GDP) para cada grupo Control vs AOX(recibió el suplemento antioxidante) y periodo experimental (Pdo1: semanas 1 a 3 con dos ordeños diarios en cada glándula; Pdo2: semana 4 a 11 con dos ordeños diarios en una glándula y un ordeño diario en la otra glándula).....	116
Tabla 6 Valores medios de los principales componentes hemáticos [HCT= Hematocrito (%), RCB = Hematíes (millones/mm ³), WBC=Leucocitos totales (miles/mm ³), LYMF= Linfocitos (miles/mm ³) , GRAN= Granulocitos (miles/mm ³), MID= Monocitos (miles/mm ³), %LYMF= Porcentaje de linfocitos, %GRAN= Porcentaje de granulocitos, %MID= Porcentaje de monocitos] para cada grupo Control vs AOX(recibió el suplemento antioxidante) y en cada período experimental (periodo 1: días 14 y21; periodo 2: días 35, 49, 63 y 77).	118
Tabla 7 Valores medios del contenido plasmático de vitamina E (Vit. E) y de diferentes minerales así como de la capacidad antioxidante del plasma (Antiox), para cada grupo [Control vs AOX(recibió el suplemento antioxidante)] y en cada período experimental (periodo 1: día 21; periodo 2: día 77).....	121
Tabla 8 Valores medios de la producción y composición (componentes mayoritarios) de leche para cada grupo (Control y AOX) y glándula, correspondiente a cada periodo experimental (período 1 : ambas glándulas se ordeñaron dos veces al día; período 2 : glándula A se ordeñó una vez al día y glándula B dos veces al día).	126
Tabla 9 Valores medios de la producción de los componentes mayoritarios de la leche (grasa, proteína, lactosa y extracto seco) expresados en g por oveja y día para cada grupo (Control y AOX) y glándula, correspondiente a cada periodo experimental (período 1 : a mbas glándulas se ordeñaron dos veces al día; período 2 : glándula A se ordeñó una vez al día y glándula B dos veces al día).....	127
Tabla 10 Valores medios del contenido de selenio (Se), calcio (Ca), fósforo (P), sodio (Na), potasio (K), cloro (Cl), magnesio (Mg) y de vitamina E (Vit. E) de la leche y de la estabilidad a la oxidación de la grasa láctea (RANCIMAT) para cada grupo (Control y AOX) y glándula, correspondientes a cada periodo experimental (período 1: día 21, ambas glándulas se ordeñaron dos veces al día; período 2 : día 77, glándula A se ordeñó una vez al día y glándula B dos veces al día).....	128
Tabla 11 Valores medios para el porcentaje de los principales ácidos grasos de la leche para cada glándula y grupo experimental (Control y AOX), correspondientes al último día (21) del primer periodo experimental.	129
Tabla 12 Principales grupos de ácidos grasos de la leche y relaciones entre ellos e índices de desaturación para cada glándula y grupo experimental (Control y AOX), correspondientes al último día (21) del primer periodo experimental.	132
Tabla 13 Valores medios para el porcentaje de los principales ácidos grasos de la leche para cada glándula y grupo experimental (Control y AOX), correspondientes al último día (77) del segundo periodo experimental.	134

<i>Tabla 14 Principales grupos de ácidos grasos de la leche y relaciones entre ellos e índices de desaturación para cada glándula y grupo experimental (Control y AOX), correspondientes al último día (77) del segundo periodo experimental.</i>	136
<i>Tabla 15 Valores medios del Recuento de células somáticas (RCS, log10 células/mL) para cada grupo (Control y AOX) y glándula, correspondiente a cada periodo experimental (período 1: ambas glándulas se ordeñaron dos veces al día; período 2: glándula A se ordeñó una vez al día y glándula B dos veces al día).</i>	136
<i>Tabla 16 Diferencia (g/día) entre glándulas en la producción leche para cada grupo experimental (AP: producción alta; MP: producción media; BP: producción baja) y día de muestreo (días 0, 7, 14, 21 y 28 con frecuencia a de ordeño 2x; 29, 30, 32, 35, 42, 49, 56, 63 y 70, con frecuencia de ordeño 1x).....</i>	145
<i>Tabla 17 Valores medios de producción de leche (g/ oveja y día) para cada uno de los grupos (AP: producción alta; MP: producción media; BP: producción baja) y períodos experimentales (período pre: días 0, 7, 14, 21 y 28, con frecuencia de ordeño 2x; período pos t1: días 29 y 30 con frecuencia de ordeño 1x; período post2: días 32, 35, 42, 49, 56, 63 y 70, con frecuencia de ordeño 1x).....</i>	146
<i>Tabla 18 Valores medios de la reducción máxima registrada en la producción de leche en las 48 horas siguientes al cambio de frecuencia de ordeño, expresada en g/oveja y día o como porcentaje de la producción de leche previa al cambio de frecuencia, para cada uno de los grupos experimentales.</i>	147
<i>Tabla 19 Valores medios de los parámetros estimados del modelo de Wood, de la desviación estándar residual y del coeficiente de determinación ajustado para cada grupo experimental</i>	149
<i>Tabla 20 Valores medios del tiempo (T max) que se tardó en alcanzar un nuevo pico de producción tras el cambio de frecuencia de ordeño, de la producción de leche máxima (PLmax), expresada en g/oveja y día o como proporción de la producción de leche registrada el día anterior al cambio de frecuencia de ordeño para cada grupo experimental</i>	149
<i>Tabla 21 Valores medios de la persistencia de la producción de leche en el periodo previo ((PERS pre) al cambio de frecuencia (días 1 a 28) y en periodo posterior al cambio de frecuencia (PERS pos), después de alcanzar el nuevo pico de producción para cada grupo experimental.</i>	150
<i>Tabla 22 Valores medios del contenido de extracto seco, grasa, proteína y lactosa de la leche para cada uno de los grupos (AP: producción alta; MP: producción media; BP: producción baja) y períodos experimentales (período pre: días 1, 7, 14, 21 y 28, con frecuencia de ordeño 2x; período post1: días 29 y 30 con frecuencia de ordeño 1x; período post2: días 32, 35, 42, 49, 56, 63 y 70, con frecuencia de ordeño 1x).</i>	153
<i>Tabla 23 Valores medios de la producción de extracto seco, grasa, proteína y lactosa de la leche para cada uno de los grupos (AP: producción alta; MP: producción media; BP: producción baja) y períodos experimentales (período pre: días 1, 7, 14, 21 y 28, con frecuencia de ordeño 2x; período post1: días 29 y 30 con frecuencia de ordeño 1x; período post2: días 32, 35, 42, 49, 56, 63 y 70, con frecuencia de ordeño 1x).</i>	154
<i>Tabla 24 Valores medios del recuento de células somáticas (log10 RCS) para cada uno de los grupos (AP: producción alta; MP: producción media; BP: producción baja) y períodos experimentales (período pre: días 1, 7, 14, 21 y 28, con frecuencia de ordeño 2x; período pre: días 1, 7, 14, 21 y 28, con frecuencia de ordeño 2x; período post1: días 29 y 30 con frecuencia de ordeño 1x; período post2: días 32, 35, 42, 49, 56, 63 y 70, con frecuencia de ordeño 1x).</i>	158
<i>Tabla 25 Valores medios de la concentración plasmática de lactosa (mg/L) correspondientes a los días 28 (día del cambio de frecuencia de ordeño), 30, 32, 35, 49 y 70 del periodo experimental, para cada uno de los grupos experimentales lactosa (AP: producción alta; MP: producción media; BP: producción baja).</i>	158

Tabla 26 Valores medios de la concentración plasmática de parámetros indicativos de la respuesta inflamatoria de fase aguda correspondientes a los días 28 (día del cambio de frecuencia de ordeño), 30, 32, 35, 49 y 70 del periodo experimental, para cada uno de los grupos experimentales (AP: producción alta; MP: producción media; BP: producción baja). **160**

Tabla 27 Valores medios de la concentración plasmática de parámetros relacionados con el estatus antioxidante [ROM(reactive oxygen metabolites), FRAP(ferric reducing ability of plasma) y AST-GOT(aspartato aminotransferasa)] correspondientes a los días 28 (día de l cambio de frecuencia de ordeño), 30, 32, 35, 49 y 70 del periodo experimental, para cada uno de los grupos experimentales (AP: producción alta; MP: producción media; BP: producción baja). **161**

Tabla 28 Valores medios de la concentración plasmática de parámetros relacionados con el metabolismo energético y proteico correspondientes a los días 28 (día del cambio de frecuencia de ordeño), 30, 32, 35, 49 y 70 del periodo experimental, para cada uno de los grupos experimentales (AP: producción alta; MP: producción media; BP: producción baja). **164**

1 Introducción.

En la comunidad de Castilla y León se produce alrededor del 66% de toda la leche de oveja de España (552,5 millones de L de leche de oveja producida en 2012 en España; MAGRAMA, 2013). Esta producción se apoya en alrededor de 3500 explotaciones, siendo las razas churra y assaf las principales razas explotadas. De hecho, la raza churra, de la que existen 169.000 animales en pureza pero cuyo censo, incluyendo cruces, llega a las 964.000 cabezas (SEOC, 2013), se localiza exclusivamente en Castilla y León. Actualmente casi el 80% del censo total de la raza assaf está localizado en Castilla y León (116.000 animales de raza pura, ARCA MAGRAMA, 2013) que, junto con sus cruces, supone 810.000 animales localizados en esta comunidad autónoma (SEOC, 2013; Milán *et al.*, 2011).

La raza churra, en general, es explotada bajo sistemas semiintensivos, cuyas producciones (corderos y quesos) son vendidas al amparo de marcas de garantía europeas, como Denominación de Origen Protegida o Indicación Geográfica Protegida (Milán *et al.*, 2011). La raza Assaf tiene un potencial de producción mucho más elevado que la raza churra (ARCA, MAGRAMA, 2013; Ugarte *et al.*, 2001) y se explota en sistemas más intensivos, constituyendo la base principal de la producción de leche de oveja en Castilla y León.

Aunque, en términos generales, existen diferencias estructurales y productivas importantes entre las explotaciones que utilizan razas autóctonas y razas de terceros países más productivas, todas comparten un punto débil: las prácticas de manejo diarias son llevadas a cabo básicamente por miembros de la familia (Riveiro *et al.*, 2013; Milán *et al.*, 2011). Así, la mayoría de las explotaciones de producción de ovino no poseen personal externo al círculo familiar, siendo pequeña la proporción de explotaciones de producción de leche de mediano tamaño que poseen asalariados y, únicamente, adquiere importancia éste factor en las explotaciones de mayor tamaño (Sañudo y Cepero, 2009). Además, existe una gran dificultad para encontrar personal cualificado que permita cubrir las necesidades laborales que demanda una actividad como la producción de leche de ovino (Rodríguez, 2013).

Dentro de las actividades que se realizan en las explotaciones, el ordeño es la que más tiempo consume y obliga a realizar un trabajo diario los 365 días del año (Bodas *et al.*, 2013).

Establecer, por tanto, estrategias de ordeño que permitan bien reducir el tiempo dedicado a esta actividad, bien incrementar la producción para permitir la contratación de personal, puede contribuir a mejorar la calidad de vida del ganadero y su familia. Por otra

parte, disponer de tiempo para otras actividades podría también contribuir a incrementar la rentabilidad de la actividad. El desarrollo de la industria quesera artesanal, anexa a las explotaciones ovinas (sobre todo aquellas con carácter más tradicional y familiar) permite a los ganaderos, asumiendo mayores riesgos, aprovechar el valor añadido que suponen los derivados lácteos (Batalla *et al.*, 2014). Este hecho, si bien abre las puertas a una economía de mercado para los productos artesanales del ganado ovino lechero (Rodríguez, 2013), supone un gran esfuerzo personal y conlleva una inversión en mano de obra (familiar o asalariada) que en ocasiones puede llegar a comprometer el correcto manejo de ambas actividades (explotación para la producción de leche y elaboración y venta del queso). Sobre esta base, una de las posibles estrategias es reducir la frecuencia de ordeño, de dos a un ordeño al día.

Sin embargo, la reducción subsiguiente en la producción de leche al realizar un ordeño al día debe ser cuidadosamente cuantificada, ya que el cese en la retirada de leche de la glándula mamaria ocasiona una disminución en los niveles de hormonas lactogénicas e induce cambios morfológicos, fisiológicos y estructurales que pueden tener como resultado el inicio de la involución de la glándula (Stelwagen *et al.*, 2013).

Los estudios disponibles en la actualidad sobre el efecto de la reducción de la frecuencia de ordeño sobre la producción de leche y su composición han dado lugar a resultados muy variables, a veces incluso contradictorios, posiblemente debido a que son muchos los factores que parecen modular la respuesta (Koutsouli *et al.*, 2017; González-García *et al.*, 2015; Prieto *et al.*, 2013; Komara *et al.*, 2010; Castillo *et al.*, 2008; Ramella, 2002; Nudda *et al.*, 2002; Davis *et al.*, 1999; Labussière, 1988).

Esta variabilidad en la respuesta, lejos de ser un inconveniente, debe tomarse como una oportunidad, ya que permite plantear la hipótesis de que si se identifican estos factores y se puede intervenir sobre ellos sería posible establecer sistemas de producción basados en un ordeño al día, con rendimientos productivos aceptables. Por tanto, para avanzar en este objetivo es necesario identificar el mecanismo biológico que regula el efecto de la frecuencia de ordeño sobre la producción y composición de la leche y los factores que pueden modular la respuesta obtenida.

Un estudio reciente identifica a la serotonina como un posible factor inhibidor en la especie bovina (Hernández *et al.*, 2008). Este estudio se apoya en el efecto inhibidor de la producción de leche que ejerce la administración intramamaria de serotonina y el efecto opuesto que causa la administración de antagonistas de la serotonina. No obstante, la

serotonina es también un metabolito mediador en la respuesta inflamatoria y es plausible considerar que la acumulación de leche en la glándula mamaria puede desencadenar esta respuesta; así, entre otros efectos, el aumento de presión dentro de la glándula causa un estrés mecánico sobre las uniones intercelulares alterando su integridad y, como consecuencia de ello, el funcionamiento de las células (Delamaire y Guinard-Flament, 2006).

A medio plazo, se produce también una reducción del número de lactocitos. Es interesante mencionar que se ha observado que, durante un periodo corto de tiempo, la reducción de la frecuencia incrementa tanto la tasa de proliferación celular como la apoptosis, si bien el incremento de esta última es de mayor magnitud y se traduce en una pérdida neta de lactocitos (Bernier-Dodier *et al.*, 2010). Esta mayor actividad, en especial de la apoptosis, posiblemente también genere un mayor estrés oxidativo, con la acumulación de radicales libres de oxígeno, que también intervienen en la respuesta inflamatoria. De hecho, se ha observado que la administración intramamaria de antioxidantes reduce el daño celular causado por los granulocitos tras una infección microbiana en la glándula (Lauzon *et al.*, 2005).

Partiendo de la posible relación entre estrés oxidativo, respuesta inflamatoria y frecuencia de ordeño cabe formular la hipótesis de que modulando la capacidad antioxidante y la respuesta inflamatoria podría modificarse también la respuesta de la glándula mamaria a los cambios en la frecuencia de ordeño.

En la actualidad, es conocido que tanto la capacidad antioxidante como el estado inmunitario de los animales pueden ser modificados a través de la alimentación (Bertoni *et al.*, 2014). En las últimas décadas de la investigación veterinaria, biomédica y tecnología alimentaria, ha cobrado especial importancia el tema de los suplementos vitamínicos-minerales con propiedades antioxidantes (Joy *et al.*, 2011; Chappel *et al.*, 1985), sobre todo cuando han sido descritos a nivel molecular los mecanismos causantes de variadas patologías, cuya etiología se basa en la presencia de radicales libres. La existencia de estas sustancias y su capacidad de producir daño celular se ha convertido en uno de los principales objetivos de estudio de la medicina moderna.

Está ampliamente documentado que la vitamina E desempeña un papel central en los mecanismos antioxidantes tisulares, moderando los daños celulares y evitando las alteraciones oxidativas de los ácidos grasos insaturados, principales constituyentes del sistema de membranas celulares (Montuschi *et al.*, 2007; Finch *et al.*, 1996). Esta vitamina

actúa en sinergia con el selenio (Se), modificando los mecanismos de absorción de este mineral, el cual forma parte esencial de la enzima glutatión peroxidasa, una de las responsable de neutralizar los productos de oxidación (Underwood, 2001). También se ha observado que la administración de dosis farmacológicas de vitamina E reduce los niveles plasmáticos de diversas citoquinas proinflamatorias (Rizzo *et al.*, 2008). En lo que nosotros conocemos, sin embargo, no existen estudios publicados que hayan abordado la interacción entre la frecuencia de ordeño y el aporte de antioxidantes en la dieta recibida por los animales.

Por otra parte, la mayoría de los estudios relacionados con la frecuencia de ordeño y composición de la leche, se han centrado en los compuestos orgánicos mayoritarios (extracto seco, grasa, proteína y lactosa) y en los minerales (Prieto *et al.*, 2013; Castillo *et al.* 2008; Hervás *et al.*, 2006; Wall y McFadden 2008; Patton *et al.*, 2006; Dahl *et al.*, 2004; Klei *et al.*, 1997). Sin embargo, existen escasos estudios que aborden el efecto sobre el perfil de ácidos grasos (Lindman, 2015) y su estabilidad oxidativa, que son parámetros relevantes para la salud de los consumidores (Wiking, 2005).

Algunos estudios señalan que la captación de nutrientes por parte de la glándula mamaria y la actividad de enzimas implicadas en la síntesis de ácidos grasos resulta afectada por la frecuencia de ordeño (Guinard-Flament *et al.*, 2006; 2007; Nørgaard *et al.*, 2005; Hillerton *et al.*, 1990). Wiking *et al.* (2006) y, más recientemente, Lindman (2015) observaron que al aumentar la frecuencia de ordeño, de 2 a 4 ordeños, disminuía la proporción de ácidos grasos poliinsaturados y aumentaba la proporción de ácidos grasos libres, favoreciendo la lipólisis. Shields *et al.* (2011), sin embargo, no corroboraron este efecto. Se ha sugerido que las diferencias observadas en el perfil de ácidos grasos podría estar relacionada con el balance energético, de manera que la frecuencia de ordeño no influiría en la composición de la grasa en animales en balance de energía positivo (Chilliard *et al.*, 2005). No obstante, en lo que nosotros conocemos, en la especie ovina no se han realizado estudios para evaluar el efecto de la frecuencia de ordeño sobre el perfil de ácidos grasos.

Como se ha señalado anteriormente, los estudios realizados sobre el efecto de la frecuencia de ordeño ponen de manifiesto una respuesta muy variable en lo que respecta a la producción de leche (Murney *et al.*, 2015; Phyn *et al.*, 2010; McFadden *et al.*, 2008; Negrao *et al.*, 2001; Labussière, 1974). Estas contradicciones se extienden también a la composición química de la leche (Martin *et al.*, 2009; O'Brien *et al.*, 2002; Davis *et al.*, 1999; Lacy-Hulbert *et al.*, 1999; Auldist *et al.*, 1998; Stelwagen *et al.*, 1994) y al perfil

metabólico (González-García *et al.*, 2015; Grala *et al.*, 2014; Kay *et al.*, 2014; Patton *et al.*, 2006). Estas diferencias podrían ser, en parte, consecuencia de diferencias en el nivel de producción y en la capacidad cisternal del glándula o en la fase de lactación en la que se encuentren los animales utilizados (Stelwagen *et al.*, 2013; Castillo *et al.*, 2008; Knight *et al.*, 1994). En la especie ovina se ha utilizado la diferencia racial en la capacidad cisternal para explicar la diferente respuesta a la reducción de la frecuencia de ordeño (Castillo *et al.*, 2008; Nudda *et al.*, 2000; Ramella *et al.*, 2002; Wellnitz *et al.*, 1999). Sin embargo, no se ha establecido de forma concluyente si este factor es relevante para explicar las variaciones individuales dentro de una misma raza. De hecho, en la especie caprina no parece ser un factor determinante (Salama *et al.*, 2004; Bruckmaier *et al.*, 1992). Por otra parte, en los diseños experimentales no unilaterales (comparación entre glándulas dentro del mismo animal) se considera el animal como unidad experimental y en gran parte de ellos no se ha confirmado si las glándulas presentan diferencias en la producción o en su capacidad cisternal, por lo que los resultados podrían diferir dependiendo de este factor.

Por otra parte, los efectos a corto, medio y largo plazo podrían ser diferentes, ya que los mecanismos implicados son diferentes (Pai y Horseman, 2011; Wall y McFadden, 2008; Dahl *et al.*, 2004; Bar-Peled *et al.*, 1995; Soberon *et al.*, 2011). Sin embargo, existen muy pocos trabajos que incluyan y comparen los resultados obtenidos a corto plazo (días) y medio plazo (semanas).

2 Objetivos y planteamiento experimental.

Teniendo en consideración los antecedentes expuestos en la introducción, el objetivo general que se persiguió en este trabajo de investigación fue estudiar, en la especie ovina, el efecto a corto y medio plazo de la reducción del número de ordeños diarios (de 2 a 1) sobre la producción y composición de la leche y la salud de la glándula mamaria e identificar los factores que modulan la respuesta y los mecanismos implicados. Este objetivo general se desglosó en los dos objetivos concretos siguientes:

1. Determinar si el efecto de la frecuencia de ordeño sobre la producción y composición de la leche y la salud de la glándula mamaria podría ser modulado por el estado antioxidante de los animales.
2. Estudiar la relación entre el potencial de producción de leche de los animales, la capacidad cisternal de la glándula mamaria y el efecto a corto y medio plazo de la reducción de la frecuencia de ordeño sobre la producción y composición de la leche, la salud de la glándula mamaria y el perfil metabólico.

Para lograr ambos objetivos se diseñaron dos pruebas experimentales, que se describen con detalle en el apartado de material y métodos. No obstante, creemos oportuno mencionar que en el presente trabajo de investigación se optó por emplear, en la primera prueba, el modelo experimental de reducción unilateral (reducción de la frecuencia en una de las dos glándulas). Este modelo permite un mayor control de la variación individual, ya que diferencias entre glándulas pueden condicionar la respuesta cuando se considera el animal como unidad experimental. Este modelo experimental, además, requiere un menor número de animales experimentales, cumpliendo con el criterio de reducción (principio de las 3 R) que establece la normativa que regula la utilización de animales en procedimientos experimentales.

En la segunda prueba se utilizó un modelo experimental bilateral, con reducción simultánea de la frecuencia de ordeño en ambas glándulas, ya que se pretendía conocer también el efecto a corto y medio plazo de la frecuencia de ordeño sobre el perfil metabólico de los animales. Sin embargo, se seleccionaron animales con parámetros (producción y composición de la leche, RCS, capacidad cisternal) similares en ambas glándulas y se realizó el control por separado de ambas glándulas durante todo el desarrollo experimental, con objeto de asegurar que la respuesta era similar en ambas glándulas y podía utilizarse el animal como unidad experimental.

3 Revisión bibliográfica.

3.1 Anatomía de la glándula mamaria.

La ubre es el principal órgano implicado en la lactación y su producto, la leche, es la base de la industria láctea mundial (Pulina, 2004; Cunningham, 1999).

En los rumiantes se define como ubre al conjunto de las mamas, siendo la mama, en todos los mamíferos domésticos, el complejo glandular asociado a un pezón. En las ovejas, la ubre está localizada en la región inguinal y se divide en dos partes, separadas por el surco intermamario (*Sulcus intermamarius*). Los pezones (*Papilla mammae*) están situados lateralmente y ligeramente dirigidos hacia una posición craneal (Ruberte *et al.*, 1994).

La vascularización de la ubre de la oveja se realiza mediante la arteria pudenda externa, que a partir del tronco pudendo epigástrico atraviesa el canal inguinal para llegar a la base de cada mama. Por su parte, el drenaje venoso se realiza, fundamentalmente, a través de la vena pudenda externa. A su vez, los vasos linfáticos colectores desembocan en los nódulos linfáticos inguinales superficiales, también llamados nódulos linfáticos mamarios, que son accesibles a la palpación externa (Ruberte *et al.*, 1994; Sisson y Grossman, 1980).

La inervación sensitiva mamaria se realiza a partir del segundo, tercero y cuarto nervios lumbares (L_{2-3,4}), siendo los plexos mesentérico caudal, hipogástrico y pélvico los responsables de la inervación autónoma (Ruberte *et al.*, 1994; Turner, 1952).

Histológicamente, la ubre es una glándula epitelial exocrina, de tipo túbuloalveolar. La organización interna de la glándula mamaria está formada por dos estructuras principales: el parénquima y el estroma. La distribución de estas estructuras es la que determina las características anatómicas y fisiológicas de cada mama (Akers, 2002; Martinet, 1999; Peaker, 1977).

El origen embrionario de la ubre se sitúa en el endodermo y ectodermo. De la primera (endodermo) se forma el parénquima (tejido epitelial y túbuloalveolar) y de la segunda (ectodermo) el estroma (tejido conjuntivo y adiposo), a partir del cual se originan los sistemas vascular, linfático y nervioso (Pulina, 2007; Akers, 2002; Turner, 1952).

El alveolo es la unidad funcional de la glándula mamaria y está organizado en cavidades microscópicas en las que existe un epitelio monoestratificado cúbico, formado por lactocitos, que son células especializadas en la producción de leche. En el interior del alveolo (lumen) se almacena la leche secretada por los lactocitos. A su vez, las cavidades

están rodeadas por una capa de células mioepiteliales que, estimuladas por la oxitocina, se contraen para provocar la eyección o ``bajada de la leche`` a través de los conductos lactíferos. Éstos aumentan de calibre en su porción distal para convertirse, en el caso de la oveja, en un complejo de 6 conductos galactóforos, que drenan la leche hacia la cisterna de la glándula (Akers, 2002; Cunningham, 1999; Turner, 1952).

La cisterna de la glándula o *Sinus lactiferus* es una estructura cavernosa que se localiza por encima del pezón y cuya función consiste en almacenar la leche durante el intervalo de tiempo que transcurre entre cada ordeño (Cunningham, 1999; Turner, 1952). Dicha cisterna es un factor importante para establecer la frecuencia de ordeño, puesto que se ha observado una correlación positiva entre el volumen de ésta y la producción de leche en diferentes razas de ovino (Ramella, 2002; Nudda *et al.*, 2000; Caja *et al.*, 1999).

En la glándula mamaria, la leche se almacena extracelularmente, dividiéndose en dos fracciones: 1) cisternal, que es vertida desde los alveolos hasta la cisterna de la glándula y puede ser recuperada sin efecto de la oxitocina y 2) alveolar, que sólo puede ser obtenida después de producirse el reflejo de eyección (Castillo *et al.*, 2008; Brake *et al.*, 1986; Peaker, 1977; Donker, 1958).

Por otra parte, la morfología mamaria en algunas razas de ovejas lecheras ha sido estudiada para determinar la posible relación entre los diferentes rasgos anatómicos y la producción de leche o la adaptación al ordeño mecánico, entre otros parámetros (Makovicky *et al.*, 2014; Martínez *et al.*, 2011; Rovai *et al.*, 2008; de la Fuente *et al.*, 1996; Labussière, 1988).

Los elementos más importantes en la evaluación morfológica de la glándula mamaria son: el volumen de la ubre, el tamaño de la cisterna, la profundidad e inserción de la ubre y la verticalidad y el tamaño de los pezones (de la Fuente *et al.*, 1996). A partir de algunos de estos parámetros, se ha propuesto un modelo de evaluación para describir, de una manera homogénea, la morfología externa de la ubre que facilite la adaptación al ordeño mecánico y evaluar en qué medida estos caracteres son transmitidos genéticamente para su inclusión en programas de selección (de la Fuente *et al.*, 1996; Fernández *et al.*, 1995).

Algunos autores han observado una relación positiva entre el volumen de la glándula mamaria y la producción de leche (Ramella, 2002; Fernández, 1995; Labussière, 1988). Sin embargo, esta relación no siempre se hace patente (Rovai *et al.*, 2008). De hecho, en ovejas assaf, se observó que la forma de la ubre no influye en la producción de

leche y que la selección basada en este parámetro solo tiene efectos sobre la cinética de emisión (fraccionamiento) de la leche (Gootwine y Gadeesh, 1980).

3.2 Desarrollo de la glándula mamaria y lactación.

El proceso de desarrollo de la glándula mamaria y lactación se refiere al desarrollo tanto de las estructuras de soporte como de las estructuras con función secretora.

El proceso consta de diferentes etapas y complejos mecanismos que ocurren a lo largo del desarrollo de la hembra de los mamíferos. La mayor parte de estos cambios tienen lugar durante la gestación (Rowson *et al.*, 2012; Hurley, 2010; Akers, 2002; Martinet, 1999). Sin embargo, el desarrollo comienza en la etapa embrionaria temprana y se prolonga hasta después del parto cuando comienza la lactación, siendo el epitelio mamario uno de los pocos tejidos de los mamíferos capaz de repetir cíclicamente etapas de crecimiento, diferenciación celular e involución a lo largo de la vida de los animales (Rowson *et al.*, 2012; Hurley y Loor, 2011; Akers, 2002; Martinet, 1999).

En la glándula mamaria lactante, el parénquima está compuesto, básicamente, por estructuras epiteliales (los alveolos y sus conductos). Por su parte, el estroma está formado por elementos celulares y otros componentes estructurales circundantes a las estructuras epiteliales. Los elementos celulares del estroma incluyen fibroblastos, células endoteliales asociadas al sistema vascular y leucocitos tisulares; mientras que los componentes estructurales son complejos proteicos entre los que abunda el colágeno. Hasta la gestación también se encuentra, en el estroma, un depósito considerable de tejido adiposo blanco (Rowson *et al.*, 2012; Akers, 2002; Cunningham, 1999; Turner, 1952).

En el animal adulto, de manera general, se acepta que el crecimiento de la glándula mamaria se completa durante la gestación (mamogénesis), para tras el parto, y debido a la diferenciación celular, iniciar la secreción de leche (lactogénesis). La secreción de leche se mantiene durante la lactación (galactopoyesis) y al final de esta etapa la glándula mamaria comienza un periodo de reposo, denominado de regresión o involución (Akers, 2002; Martinet, 1999; Peaker, 1977; Turner, 1952).

3.2.1 Mamogénesis: relación entre crecimiento corporal y proliferación celular de la glándula mamaria.

Tal y como se ha descrito anteriormente, en la mayoría de los mamíferos el desarrollo de la glándula mamaria se realiza de manera progresiva en la vida fetal y juvenil con la aparición de diversas estructuras. Sin embargo, es a partir de la pubertad cuando los

ciclos de proliferación, diferenciación celular e involución están íntimamente ligados al ritmo de los ciclos de estro, gestación y lactación (Rowson *et al.*, 2012; Castañares, 2008; Jammes, 1988; Knight y Peaker, 1982).

Para facilitar el estudio y la comprensión de la mamogénesis se ha decidido dividir ésta en 5 etapas, teniendo en cuenta la importancia de los cambios que ocurren en cada una de ellas: prenatal, prepuberal, postpuberal, gestación y lactación (Rowson *et al.*, 2012; Hurley, 2010; Castañares, 2008).

3.2.2 Etapa prenatal.

En los primeros días de la gestación (30 días aprox.) pueden apreciarse en el embrión los esbozos mamarios, que son estructuras rudimentarias que se extienden desde el toráx hasta la región inguinal. Tienen apariencia de botones (8 pares) y constituyen los *cordones mamarios* (Rowson *et al.*, 2012; Jammes, 1988; Turner, 1952).

Entre los días 32 y 50 de gestación tiene lugar en los esbozos mamarios una proliferación celular que da origen a un canal primario que, rápidamente, se ramificará formando los canales secundarios, los cuales, durante el avance del desarrollo, originarán los canales lobulares. En este mismo periodo comienza a producirse un ensanchamiento en la parte distal del canal primario que se convierte en el esbozo de la cisterna de la glándula mamaria (Rowson *et al.*, 2012; Hurley, 2010; Turner, 1952).

Por otra parte, cuando ocurre la diferenciación sexual (también entre los días 32 y 50 de gestación) se produce una descarga de testosterona fetal, la cual provoca la involución de las células canaliculares, inhibiéndose la posterior formación de los pezones. Paralelamente, comienza una involución de los esbozos mamarios (*cordones mamarios*), manteniéndose, en el ovino, solamente el séptimo par con localización en la región inguinal (Jammes, 1988; Turner, 1952).

3.2.3 Etapa prepuberal.

En el momento del nacimiento del animal, la glándula mamaria es rudimentaria y tiene una ramificación primitiva de las estructuras canaliculares, no existiendo comunicación alguna entre sus estructuras (Rowson *et al.*, 2012; Hurley, 2010; Akers, 2002). En este momento del desarrollo es posible encontrar una almohadilla grasa y un sistema circulatorio desarrollado (Rowson *et al.*, 2012; Martinet, 1999; Turner, 1952).

A partir del segundo o tercer mes de vida, tiene lugar en la ubre un crecimiento alométrico positivo, es decir, un desarrollo más rápido con respecto al resto del organismo (Rowson *et al.*, 2012; Jammes, 1988; Turner, 1952).

Cuando se inicia la pubertad, la proliferación del tejido adiposo está acompañada de un rápido crecimiento de los canales lobulares. En esta etapa, la composición tisular de la glándula mamaria está constituida por 2/3 de grasa y 1/3 de parénquima mamario. Es necesario destacar, también, que en este periodo se ha descrito que existe una correlación positiva entre el peso vivo del animal y su madurez sexual (Sejrsen, *et al.*, 1982).

En este sentido, cabe mencionar que, en esta etapa del desarrollo de la glándula mamaria, una incorrecta estrategia de alimentación de los animales puede originar un aumento en la cantidad y distribución de tejido adiposo a expensas del parénquima mamario, lo que ocasionaría un considerable efecto negativo en la producción de leche durante la lactación (Hurley, 2010; Castañares, 2008; Sejrsen *et al.*, 1982).

Por otra parte, la fase juvenil prepuberal se caracteriza, por un alargamiento y ramificación de los canales que todavía están dentro del tejido adiposo, siendo la grasa la estructura que sirve de soporte y aporta el espacio necesario para el desarrollo de dichos canales. Finalmente, durante la gestación esta almohadilla grasa será sustituida, gradualmente, por el sistema túbulo-alveolar (Knight y Peaker, 1982).

3.2.4 Etapa postpuberal.

Tras la pubertad del animal, la glándula mamaria presenta un crecimiento isométrico y el desarrollo de los canales mamarios es dependiente de las hormonas sexuales, fundamentalmente las ováricas.

Así, en la fase folicular los estrógenos presentan altas concentraciones plasmáticas, lo que favorece la proliferación de los canales mamarios. Al contrario, en la fase luteínica existen elevados niveles de progesterona en plasma, observándose un marcado desarrollo de la ubre debido a la acción sinérgica de la progesterona con los estrógenos, existiendo, por tanto, una interacción entre el crecimiento mamario y los ciclos sexuales (Akers, 2002; Jammes, 1988).

3.2.5 Gestación.

En la gestación se observa una transformación notoria y progresiva de la glándula mamaria, pudiéndose cuadruplicar su peso y tamaño al final de la gestación (Rowson *et al.*, 2012; Turner, 1952). Por otra parte, a nivel celular se produce un considerable incremento

en la población de células secretoras, a la vez que tiene lugar un aumento exponencial de las células que forman los canales alveolares, dando, de esta manera, origen a una intensa ramificación del sistema colector de la ubre (Rowson *et al.*, 2012; Hurley, 2010; Jammes, 1988).

Durante el segundo mes de gestación aumenta el diámetro de los vasos sanguíneos (arterias pudendas externas y vasos abdominales subcutáneos). En el tercer mes, la ubre tiene un ligero aumento de tamaño, pero los vasos sanguíneos continúan su engrosamiento a la vez que los pezones aumentan de tamaño y se vuelven turgentes (Turner, 1952).

En los primeros días del cuarto mes de gestación se aprecia un claro aumento de tamaño de la ubre, siendo su apariencia más elástica debido a la acumulación de secreciones, que si son extraídas en este momento presentan una consistencia viscosa. Al término de este mes, la zona que ocupa el parénquima puede ser distinguida visualmente a la disección por su tonalidad de color marrón, mientras que el tejido adiposo presenta tonalidades amarillentas (Rowson *et al.*, 2012; Turner, 1952).

A los 140 días de gestación se observan grandes cambios en la ubre, tanto en su tamaño como en su peso, color y temperatura. Además, los pezones son mas alargados y distendidos que en los periodos anteriores. En esta etapa los vasos sanguíneos son muy prominentes, las venas se aprecian muy llenas y distendidas (Rowson *et al.*, 2012; Turner, 1952).

A partir de este momento, el sistema túbulo-alveolar se encuentra desarrollado, prácticamente, en su totalidad y ha ido sustituyendo, progresivamente, al tejido adiposo (Knight y Peaker, 1982). Además, el epitelio monoestratificado adquiere la capacidad de secreción y su estudio microscópico revela una organización celular propia de una glándula. Así, en sus células (lactocitos) se encuentra un aparato de Golgi de gran tamaño, un retículo endoplasmático rugoso rodeado por gran cantidad de vesículas, estructura propia del sistema de síntesis proteica, y una presencia importante de mitocondrias, así como diversas vesículas dispersas en el citoplasma (Hurley, 2010; Akers, 2002; Jammes, 1988).

En los días que preceden al parto se observa un incremento en el volumen de fluido de la glándula mamaria, cuya composición deriva de distintos elementos del suero, destacando la presencia de gran cantidad de inmunoglobulinas contenidas en el calostro y cuya ingesta en los rumiantes resulta esencial para la supervivencia del recién nacido (Stelwagen *et al.*, 2009; Akers, 2002).

3.2.6 Lactación.

La ubre presenta su mayor desarrollo desde el parto hasta alcanzar el pico de producción de leche. Conforme avanza el periodo de lactación tiene lugar un incremento de la apoptosis que, progresivamente, dará inicio a la involución mamaria. A la par de este proceso de reestructuración, las células mamarias disminuyen su capacidad y actividad secretora con la consiguiente caída de la producción láctea (Akers, 2002; Jammes, 1988).

El factor de mayor importancia para la producción de leche durante el período de lactación es la cantidad y calidad del tejido parenquimatoso presente en la glándula mamaria en el momento del parto (Pulina, 2004; Capuco *et al.*, 2001; Jammes, 1988; Tucker, 1987). De hecho, se han encontrado altos coeficientes de correlación (0,85) entre el número de células epiteliales mamarias y la producción de leche (Annen *et al.*, 2004; Tucker y Meites, 1965).

Knight y Wilde (1987) observaron, en un trabajo realizado con ratas, que el 75% de la proliferación celular tiene lugar durante la lactancia temprana, lo que podría explicar el aumento de la producción de leche diaria entre el parto y el pico de la lactación. Además, de dicha proliferación celular se produce un incremento de la actividad secretora de las células (Akers, 2002; Martinet, 1999). No obstante, Anderson y Wahab, (1990), a partir de la cuantificación de ADN en el tejido de la glándula mamaria, sugieren que en la especie ovina no existiría una proliferación celular durante la lactación temprana. En dicha especie, la variación en la producción durante la lactación parece estar más relacionada con un aumento en la actividad secretora de la ubre, como sugieren Castañares *et al.* (2013), en un trabajo en el que estudiaron la evolución del número de células epiteliales mamarias (MEC) por alveolo, número de alveolos por glándula y el volumen del lumen alveolar, a lo largo de la lactación.

3.2.7 Control hormonal del desarrollo mamario.

El desarrollo morfológico de la glándula mamaria y la expresión de sus funciones secretoras está mediado por distintas hormonas que intervienen de manera simultánea o mediante proceso secuencial (Neville *et al.*, 2002; Jammes, 1988; Neville, 1983). Por lo tanto, cualquier alteración en la actividad hormonal o en los factores de crecimiento que participan durante el desarrollo mamario podría tener un importante impacto sobre la producción de leche en el inmediato periodo de lactación (Hurley, 2010; Tucker, 2000).

En un intento de agrupar las hormonas que intervienen en el control endocrino para el desarrollo de la glándula mamaria, es posible definir tres grupos de estas hormonas y factores (Neville *et al.*, 2002; Cunningham, 1999):

- Hormonas metabólicas: hormona del crecimiento, glucocorticoides, hormona tiroidea e insulina.
- Hormonas reproductivas: estrógenos, progesterona, lactógeno placentario y prolactina.
- Hormonas mamarias: Péptido relacionado con la hormona paratiroidea, leptina y prolactina.

Las principales hormonas que intervienen en el proceso del desarrollo de la glándula mamaria y sus efectos específicos, explicados a diferentes niveles (sistémico, celular y en algunos casos, molecular) son las siguientes:

Hormona del crecimiento. Se ha podido observar que en animales tratados con la hormona del crecimiento se produce una disminución de los depósitos lipídicos. Este hecho permite que existan una mayor cantidad de nutrientes disponibles para satisfacer el aumento en la demanda durante los periodos de crecimiento tisular de la glándula mamaria (Squires, 2006). En hembras sanas a las que se administró hormona del crecimiento exógena se comprobó que se producía un considerable incremento en el volumen del parénquima mamario, al mismo tiempo que se incrementaba el número de células totales (Capuco *et al.*, 2001; Radcliff *et al.*, 1997). Esta hormona tiene importantes efectos sobre el metabolismo y, en el caso específico de la síntesis de la leche, sus efectos consisten en un incremento de la captación de nutrientes por la mama, debido a un mayor flujo sanguíneo hacia ella (Radcliff *et al.*, 1997).

Glucocorticoides. Tucker y Meites (1965) demostraron la intervención de los glucocorticoides en el desarrollo mamario induciendo la lactación en vacas secas, que tenían un buen desarrollo del sistema lóbulo-alveolar, mediante la administración de estas hormonas.

De este amplio grupo de hormonas esteroideas, es necesario destacar el papel del cortisol en la mamogénesis, actuando a nivel del aparato de Golgi para que ocurra la diferenciación del sistema lóbulo-alveolar (Squires, 2006). Este proceso permite la activación de los receptores para la prolactina y su posterior acción sobre la síntesis de proteínas lácteas (Squires, 2006; Tucker, 2000).

Hormonas tiroideas. Las hormonas tiroideas intervienen a nivel metabólico. Sin embargo, se acepta que en presencia de los esteroides ováricos tienen importantes efectos sobre el crecimiento mamario durante la gestación.

Así, el desarrollo de los conductos mamaros puede verse dañado o interrumpido en casos de hipotiroidismo (Akers, 2002). Además, parece existir una relación entre las hormonas tiroideas y los esteroides adrenales que permite un desarrollo y funcionamiento correcto de la glándula mamaria (Tucker, 2000).

En vacas lactantes se ha comprobado que las hormonas tiroideas se mantienen en niveles fisiológicos en la ubre, mientras que a nivel sistémico puede encontrarse un ligero hipotiroidismo, que podría ser debido a la excreción mamaria de los precursores de las hormonas tiroideas (Tucker, 2000).

Insulina. Esta hormona tiene escaso efecto sobre la mamogénesis *in vivo*. Sin embargo, en pruebas *in vitro*, donde se ha administrado a grandes dosis, puede llegar a sustituir la función del factor de crecimiento ligado a la insulina (IGF-I), con una importante función sobre el desarrollo mamario (Squires, 2006).

Akers (2002) observó que, en vacas lecheras, la insulina afecta principalmente a la partición de nutrientes para la síntesis de los componentes de la leche. En este sentido, el incremento de los niveles de insulina acompañado de la infusión venosa de una solución de glucosa, aumenta los niveles de proteína en la leche (Griinari *et al.*, 1997).

Estrógenos. Los estrógenos estimulan el crecimiento de los conductos mamaros y su interacción con otros factores de crecimiento y hormonas relacionadas con el desarrollo mamario ha sido descrito en pruebas *in vivo* (Tucker, 2000).

En este tipo de pruebas se pudo comprobar que la administración de estrógenos induce la secreción de otros factores endocrinos, ya que tras su inyección se incrementan los niveles de hormonas pituitarias y factores de crecimiento celular mamario (Driggers y Segars, 2002). Este efecto parece estar mediado por la actividad paracrina y autocrina de los estrógenos en el proceso de mamogénesis (Radcliff *et al.*, 1997).

Los niveles de estradiol y sus metabolitos intermedios en sangre están estrechamente relacionados con el inicio del desarrollo del sistema lóbulo-alveolar y con el aumento de los receptores para la progesterona durante la gestación, destacando que en

ovejás este desarrollo tiene lugar alrededor del día 115 de la gestación (Akers, 2002; Turner, 1952).

Progesterona. Esta hormona tiene una sinergia con los estrógenos para estimular el desarrollo lóbulo-alveolar (Squires, 2006).

En los ciclos sexuales de la mayoría de los rumiantes domésticos existen periodos alternados en los niveles plasmáticos de estrógenos y progesterona. De este modo, los niveles de estrógenos son mayores durante la fase folicular, mientras que los niveles más altos de progesterona ocurren en la fase luteínica, tras la ovulación (Hurley, 2010).

Estos cambios en las concentraciones séricas se traducen en un aumento de la expresión de los receptores para la progesterona, que tiene una presencia dominante en la segunda mitad de la gestación. Así el crecimiento lóbulo-alveolar se lleva a cabo, fundamentalmente, en la última parte de la gestación, mientras que el de los conductos de la glándula mamaria sucede, principalmente, en la primera mitad de la gestación (Akers, 2002; Tucker, 2000).

Lactógeno placentario. Esta hormona de origen peptídico fue descubierta, por primera vez, en la especie humana y, actualmente, se sabe que su síntesis se lleva a cabo en la placenta de la mayoría de las especies (Tucker, 2000; Josimovich y MacLaren, 1962). En roedores se ha observado un efecto de esta hormona en el proceso de la mamogénesis (Forsyth, 1986; Schams *et al.*, 1984). Sin embargo, en otras especies como los bovinos no está muy claro este efecto (Tucker, 2000; Hurley *et al.*, 1977).

En general, se aceptan como funciones del lactógeno placentario las siguientes: a) efecto proliferativo sobre las células luteínicas, sobre todo en los primeros 45-70 días de gestación y b) a nivel endocrino el lactógeno placentario tiene una sinergia con la prolactina y prostaglandina GE_2 , aumentando la secreción de la progesterona. Por el contrario, en el período comprendido entre los días 70-95 de gestación se ha observado un efecto antagónico a la prostaglandina $F_{2\alpha}$ y, por tanto, un efecto positivo sobre la protección del cuerpo lúteo (Gregoraszcuk *et al.*, 2000; Bassett *et al.*, 1998; Min *et al.*, 1997).

Prolactina. La prolactina es una de las hormonas más versátiles en términos de sus efectos biológicos puesto que éstos no sólo se observan a nivel local sino que también se han identificado efectos a nivel sistémico, durante la mamogénesis y en la etapa de transición hacia la lactogénesis (Knight, 2001).

Por otra parte, para que la galactopoyesis se lleve a cabo de forma satisfactoria es indispensable que se mantengan estables los niveles séricos de prolactina, aproximadamente, entre la 1ª a la 4ª semana de gestación. De hecho, Farmer (2001) encontró que un descenso de receptores celulares para esta hormona, provocado por la administración de un antagonista como la bromocriptina, puede ser un factor limitante para una adecuada mamogénesis y galactopoyesis.

A nivel molecular, el efecto de la prolactina tiene lugar mediante su unión a un receptor ubicado en las células epiteliales mamarias. Esta unión provoca la dimerización de dicho receptor y la activación de la JANUS quinasa de tipo 2 (JAK2), que, a su vez, actúa fosforilando y activando a los factores de transcripción STAT (transductores de señal y activadores de transcripción), los cuales promueven la expresión de genes que modulan la cantidad de receptores para la prolactina. Si estos genes fueran silenciados se produciría una interrupción de la lactación (Squires, 2006; Akers, 2002; Tucker, 2000).

Péptido relacionado con la hormona paratiroidea. Esta proteína tiene gran relevancia en la fase embrionaria para el desarrollo del epitelio glandular. Además, parece ser que es fundamental para la morfogénesis de los ductos mamarios en la etapa de la pubertad. En este sentido, Maureen (1999) en su trabajo realizado con ratones señala que cuando los genes responsables de la transcripción de esta proteína fueron silenciados, hubo una ausencia total de estructuras epiteliales en la glándula mamaria, desarrollándose solamente la almohadilla grasa.

Leptina. Esta hormona puede ser sintetizada por diferentes tipos de células presentes en la glándula mamaria y sus efectos han demostrado que está directamente relacionada con la diferenciación de las células mioepiteliales (Bonnet, 2002; Smith-Kirwin, 1998).

Finalmente, es preciso señalar que además del papel individual de cada una de las hormonas que participan en las diferentes etapas del desarrollo mamario, podemos encontrar una innumerable lista de interacciones entre ellas.

3.3 Lactogénesis.

La lactogénesis es el proceso mediante el que se inicia la lactación y durante el cual el tejido mamario sufre una serie de cambios drásticos tanto a nivel celular como a nivel molecular, que incluyen la proliferación de orgánulos celulares y una mayor velocidad de las reacciones metabólicas que en aquellos ocurren. Aunque en la segunda

mitad de la gestación ya existe leche en la glándula mamaria, la síntesis de sus componentes es limitada y sólo se incrementa considerablemente alrededor del parto (Akers, 2002; Martinet, 1999; Convey, 1974).

La lactogénesis es un proceso dependiente de un conjunto específico de hormonas, denominado “complejo de hormonas lactogénicas”, que incluye a la insulina, los glucocorticoides y la prolactina (Hurley, 2010).

Este mecanismo hormonal ha sido descrito mediante diversos estudios en los que el tejido mamario en estado no lactante fue inducido a un estado de lactogénesis, incluso en animales no gestantes, administrando altas dosis de estas hormonas. Sin embargo, los niveles de producción obtenidos mediante este procedimiento han sido inferiores a los que cabría esperar, teniendo en cuenta el potencial genético y el número de partos de los animales empleados en dichos estudios (Hurley, 2010; Malven, 1987; Pennington, 1985; Tucker, 1981; Akers, 1977).

3.3.1 Cambios en la estructura y función celular.

La lactogénesis puede dividirse en dos etapas en las que suceden cambios relevantes a nivel celular (Neville *et al.*, 2001):

Etapa I. Esta fase se caracteriza por la maduración enzimático-citológica de las células epiteliales mamarias (Convey, 1974). Antes de que tenga lugar esta etapa y mediante microscopía electrónica se observa que las células epiteliales presentan un núcleo de apariencia irregular, un retículo endoplasmático y un aparato de Golgi con un bajo desarrollo, mientras que en el área apical se observan microvacuolas y un escaso número de gotas de grasa láctea. A medida que se aproxima el momento del parto se produce un marcado incremento en el tamaño del retículo endoplasmático y del aparato de Golgi, en cuyo interior es posible encontrar vesículas que contienen caseína. Paralelamente, aumenta la presencia de grasa en el citoplasma de las células epiteliales. En este momento se produce la liberación de productos de la síntesis celular hacia el lumen alveolar. El núcleo celular se desplaza hacia la zona basal de la célula y polariza su sistema de membranas, proceso que facilita la respuesta al conjunto de señales electroquímicas que recibirá la glándula mamaria de aquí en adelante. También es necesario señalar que la primera etapa de la lactogénesis coincide con la formación de calostro (Baumrucker *et al.*, 2014; Hurley, 2010; Squires, 2006; Neville *et al.*, 2001).

Entre los cambios enzimáticos se puede destacar el incremento en la síntesis de acetil CoA carboxilasa y del complejo ácido graso sintasa. La modificación de los sistemas enzimáticos, en las células secretoras, provoca un aumento de la actividad en el sistema de transporte y captación de aminoácidos, glucosa, ácidos grasos de cadena corta y otros precursores necesarios para la síntesis de la leche. No obstante, en esta etapa la cantidad de α -lactoalbúmina es todavía baja, lo que explicaría que la síntesis de la lactosa no comience hasta la segunda fase de la lactogénesis (Hurley, 2010; Martinet, 1999; Neville *et al.*, 2001).

Etapa II. En esta etapa tiene lugar un incremento en la síntesis de lactosa que, debido a sus propiedades osmóticas, provoca un aumento en el transporte de líquido y electrolitos hacia el lumen alveolar. Además, los cambios hormonales asociados al parto originan una abundante secreción de todos los componentes de la leche. Este aumento en la secreción es debido, por una parte, a la disminución de los niveles de progesterona, aproximadamente 2 días antes del parto, ya que sus efectos son inhibitorios sobre la lactogénesis. Y, por otra, al aumento en la concentración sanguínea de prolactina y glucocorticoides, que estimulan dicha secreción (Hurley, 2010; Martinet, 1999).

A nivel molecular las interacciones hormonales promueven la transcripción del gen que codifica para la α -lactoalbúmina, la cual interactúa en el aparato de Golgi con la galatosiltransferasa y se sintetiza la lactosa. A su vez, la lactosa atrae osmóticamente agua hacia el aparato de Golgi, formándose vesículas secretoras. Todo este proceso provoca el aumento de la secreción de la leche (Gross *et al.*, 2014; Neville *et al.*, 2001; Martinet, 1999).

3.3.2 Control hormonal.

Alrededor del momento del parto se producen cambios drásticos en los niveles sanguíneos de determinadas hormonas (Figura 1), algunas de las cuales están implicadas en el control de la lactogénesis. Así, los niveles de progesterona, como se mencionó anteriormente, disminuyen pocos días antes del parto, aumentado, paralelamente, los niveles sanguíneos de estrógenos, los cuales estimulan la secreción de prolactina por la hipófisis anterior al mismo tiempo que provocan un aumento en el número de los receptores para esta hormona en la glándula mamaria. La prolactina promueve la traducción del mRNA que codifica para las proteínas lácteas (Hurley, 2010; Squires, 2006; Tucker, 2000).

Los glucocorticoides alcanzan su nivel sérico máximo durante el parto y tienen un efecto sinérgico con la prolactina. El mecanismo de acción consiste en su unión con los

receptores celulares del tejido mamario (bloqueados por la progesterona antes del parto) y bajo su efecto aumenta el desarrollo del retículo endoplasmático rugoso, contribuyendo a la síntesis de la α -lactoalbúmina y β -caseína (Squires, 2006).

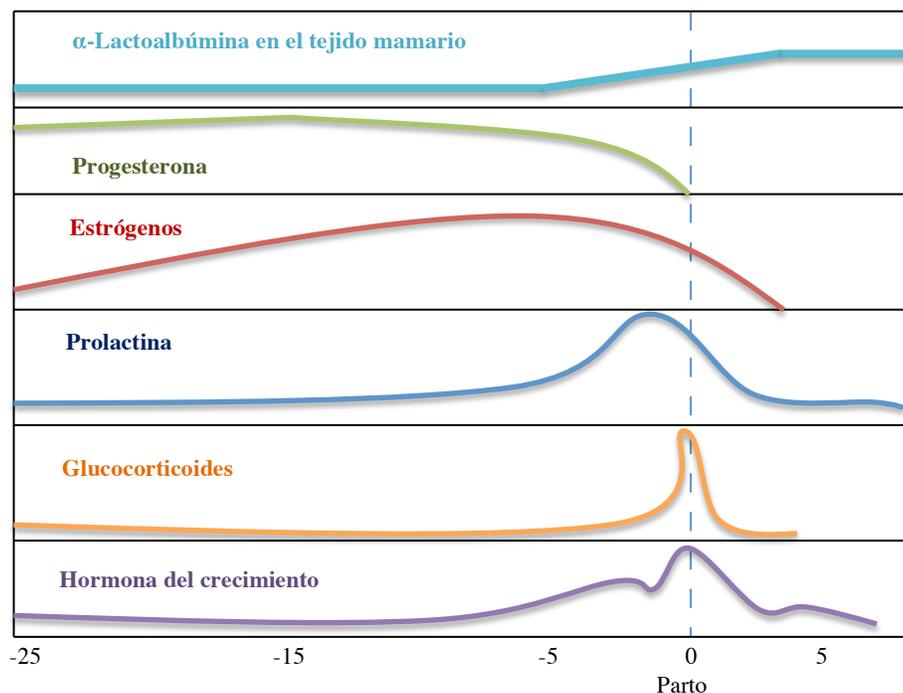


Figura 1 Cambios hormonales en el período periparto (Adaptado de Hurley, 2010).

Por otra parte, la insulina también juega un papel importante en el proceso de lactogénesis debido a su efecto sobre la captación de glucosa a nivel celular, contribuyendo, de esta manera, a facilitar la expresión de los genes que codifican para las proteínas lácteas. En este sentido, se ha podido establecer una relación entre la insulina y la producción del factor de crecimiento I ligado a la insulina (IGF-I), el cual es un potente factor de proliferación celular en la glándula mamaria (Squires, 2006; Tucker, 2000).

Este complejo de hormonas lactogénicas (insulina, prolactina y glucocorticoides) ha sido descrito para la mayoría de los rumiantes productores de leche. Sin embargo, la mayor parte de la información disponible proviene de estudios *in vitro* en los que la lactogénesis, o alguna fase de ella, ha sido inducida en cultivos de células epiteliales mamarias (Hurley, 2010; Squires, 2006; Tucker, 2000; Convey, 1974).

3.4 Calostrogénesis.

La calostrogénesis podría considerarse la etapa de transición entre la lactogénesis y la galactopoyesis, aunque en el tiempo coincide con la primera etapa de la lactogénesis, tal y como señalamos anteriormente.

Durante el período parto, etapa de duración muy corta y poco conocida, se obtiene el calostro, mayoritariamente, de la captación de inmunoglobulinas desde el torrente sanguíneo, destacando la IgG₁. De hecho, la concentración IgG podría considerarse un buen marcador para determinar el momento en el que comienza la calostrogénesis (Hurley, 2010).

El mecanismo para el transporte de estas inmunoglobulinas, aparentemente, no depende de la cantidad de tejido parenquimatoso presente en la mama, sino más bien de procesos de regulación endocrina, regulación local y de expresión génica relacionada con el proceso de transporte celular (Baumrucker *et al.* 2014, Baumrucker *et al.* 2010).

El complejo de hormonas lactogénicas es el responsable del control hormonal de la calostrogénesis. No obstante, los estrógenos y la progesterona tienen un papel fundamental para que se produzca la transferencia de IgG₁ desde la sangre hacia la glándula mamaria (Gross *et al.*, 2014; Barrington *et al.*, 2001).

Diversos trabajos (Baumrucker *et al.*, 2014; 2010; Barrington *et al.*, 2001) señalan que existe una clara evidencia de que la calostrogénesis se ve afectada también por mecanismos locales, ya que se han observado diferencias en la calidad y cantidad de inmunoglobulinas del calostro entre glándulas mamarias del mismo animal.

Por otra parte, Kehoe *et al.* (2011) observaron que, a partir de la segunda lactación, las vacas producen un calostro de mejor calidad (mayor cantidad de IgG).

3.5 Galactopoyesis.

La galactopoyesis o lactopoyesis es el término que se usa para describir el establecimiento y mantenimiento de la lactación. Este proceso involucra una larga lista de hormonas y otras citoquinas cuyas funciones todavía no han sido completamente esclarecidas. En las especies productoras de leche, el mantenimiento de la lactación depende de la interacción entre la secreción continua de hormonas, factores de regulación

local y de la remoción continúa de la leche, provocada por la liberación de la oxitocina en la hipófisis o pituitaria posterior (Marnet *et al.*,1998).

Para mantener la producción de leche a lo largo de la lactación, a nivel celular debe existir un equilibrio tanto entre la proliferación y la apoptosis de las células epiteliales mamarias, como en el nivel de la síntesis de los componentes de la leche (Hurley, 2010; Akers, 2002; Neville *et al.*, 2001).

3.5.1 Control hormonal.

En el mantenimiento de la producción de leche a lo largo del periodo de lactación intervienen dos elementos claves estrechamente relacionados: el primero, la secreción continuada de las hormonas lactogénicas y, el segundo, la extracción periódica de la leche presente en la glándula mamaria (Hurley, 2010; Tucker, 2000).

Algunos trabajos comprobaron (Squires, 2006; Knight, 1987) que la inhibición de la secreción de alguna de las hormonas lactogénicas deprimía la producción de leche en diferente grado dependiendo de la especie, la etapa de lactación y la hormona suprimida. Por el contrario, Boutinaud *et al.* (2003) observaron, en cabras en lactación, que la administración exógena de hormona del crecimiento (GH) mejoraba la producción de leche debido, probablemente, a una hipertrofia de las células epiteliales mamarias, que podría afectar al balance entre la actividad secretora y el número de células en proceso de apoptosis en lactación avanzada. En este sentido, en un trabajo reciente, el mismo autor (Boutinaud, 2004) observó, en animales de la especie caprina, que la administración en la lactación temprana de GH incrementa la producción de leche, debido al aumento de la expresión génica para codificar la proteína Stat5, la cual constituye una señal de proliferación celular e inhibe el proceso de apoptosis.

Además de las hormonas implicadas en la galactopoyesis, el vaciamiento frecuente de la glándula mamaria es indispensable para el mantenimiento de la lactación, debido a que algunos de los componentes de la leche tienen importantes efectos inhibitorios sobre su secreción (Burgoyne y Wilde, 1994; Knight, 1988). En este sentido, se ha podido comprobar, en la especie caprina, que el péptido FIL (*feedback inhibitor of lactation*) produce una potente inhibición de la lactación (Wilde *et al.*, 1995, 1988, 1987). En la especie bovina se ha observado que la serotonina tiene efectos sobre la producción y la composición de la leche, ya que es un importante regulador local de la homeostasis y la involución de la glándula mamaria, actuando en la modulación de la expresión génica para las proteínas lácteas, α -lactoalbúmina y β -caseína (Horseman y Collier, 2014; Hernández *et*

al., 2009). En este sentido, Hernández *et al.* (2011) comprobaron que la administración intramamaria de serotonina aumenta la permeabilidad de las uniones intercelulares estrechas (*Tigh Junctions*), medidas a través de los niveles plasmáticos de lactosa, sodio y potasio, lo que provocaría una importante disminución de la producción de leche.

Por otra parte, la extracción de la leche de la glándula mamaria favorece el flujo sanguíneo local, aumentando la cantidad de nutrientes disponibles en ella (Metcalf, 1992; Gorewit, 1989). La extracción de la leche también tiene un efecto físico sobre los alvéolos, ya que el vaciamiento de su contenido provoca un estado de deflación que les permite almacenar las nuevas secreciones lácteas (Wilde, 1987).

3.6 Involución de la glándula mamaria.

La involución de la glándula mamaria es el proceso mediante el cual ésta vuelve a una morfología similar a la de la pubertad. Durante esta etapa las células epiteliales mamarias que sobreviven, retornan a un estado de baja actividad metabólica (senescencia) (Akers, 2002; Jammes *et al.*, 1988). En los animales productores de leche se produce una caída en la producción tras el pico de lactación. El esclarecimiento de los mecanismos fisiológicos y moleculares implicados en este fenómeno ha sido uno de los objetivos principales de la investigación en la biología de la lactación. Además, desde un punto de vista estrictamente práctico, este proceso representa una importante pérdida de ingresos para los ganaderos (Stefanon *et al.*, 2002).

La propia dinámica celular de la glándula mamaria a lo largo del período de lactación determina la necesidad de establecer una etapa de reposo o período seco entre lactaciones, ya que es una condición necesaria para que haya un reemplazo de las células viejas y la restauración de la matriz extracelular, así como el completo restablecimiento de los complejos enzimáticos. Todos estos cambios permiten comenzar nuevas lactaciones con las suficientes garantías de éxito (Sørensen *et al.*, 2006; Akers, 2002; Stefanon *et al.*, 2002; Jammes, 1988).

La investigación actual de la involución mamaria tiene en cuenta, por una parte, el complejo sistema de factores que regulan la homeostasis del proceso de lactación y, por otra, situaciones como el destete o la estasis láctea sostenida, en las que se ha podido comprobar que ocurre una aceleración de la involución de la glándula mamaria (Pai y Horseman, 2011; Stefanon *et al.*, 2002).

Aunque los mecanismos que regulan la involución de la mama no han sido todavía completamente aclarados, ésta ha sido asociada, principalmente, con la apoptosis de las células epiteliales mamarias (Hernandez *et al.*, 2011; Stein *et al.*, 2007). En este sentido, Capuco y Akers, (1999) observaron que en los rumiantes productores de leche (vacas, cabras y ovejas) la involución mamaria se caracteriza por una tasa de proliferación y diferenciación celular continua pero insuficiente para compensar la tasa de apoptosis, que se acentúa conforme avanza el período de lactación. No obstante, a pesar de estos cambios, se mantiene la integridad morfológica de la ubre al contrario de lo que sucede en otras especies, tales como los roedores en los que los cambios en la arquitectura anatómica son más pronunciados que en los rumiantes, situándose la especie humana en una posición intermedia.

La reducción del tejido secretor como consecuencia de la apoptosis va acompañada de un aumento temporal en la actividad secretora del mismo, lo que podría atribuirse a una respuesta celular compensatoria (Sørensen *et al.*, 2006; Capuco y Akers, 1999).

Es necesario destacar que hay evidencias sobre la existencia en la glándula mamaria de líneas de células madre, cuya organización y procesos de regulación podrían intervenir en el mantenimiento del equilibrio entre la apoptosis, la proliferación celular y los cambios en la síntesis de leche. Este efecto se llevaría a cabo a través de la modulación de la expresión génica para la diferenciación de dichas células madre (Keymeulen *et al.*, 2011).

Por otra parte, se han estudiado una gran cantidad de procesos biológicos para tratar de explicar de una forma integral la involución mamaria, en la cual podrían estar implicados desde mecanismos endocrinos hasta cambios moleculares que ocurren como consecuencia de modificaciones en la regulación de la expresión génica. Todos ellos deben de suceder de forma armónica para que cumplan su función biológica. La involución mamaria, habitualmente, es dividida en dos fases, que dependiendo de los cambios que se producen a nivel celular son denominadas: 1) fase reversible y 2) fase irreversible (Figura 2).

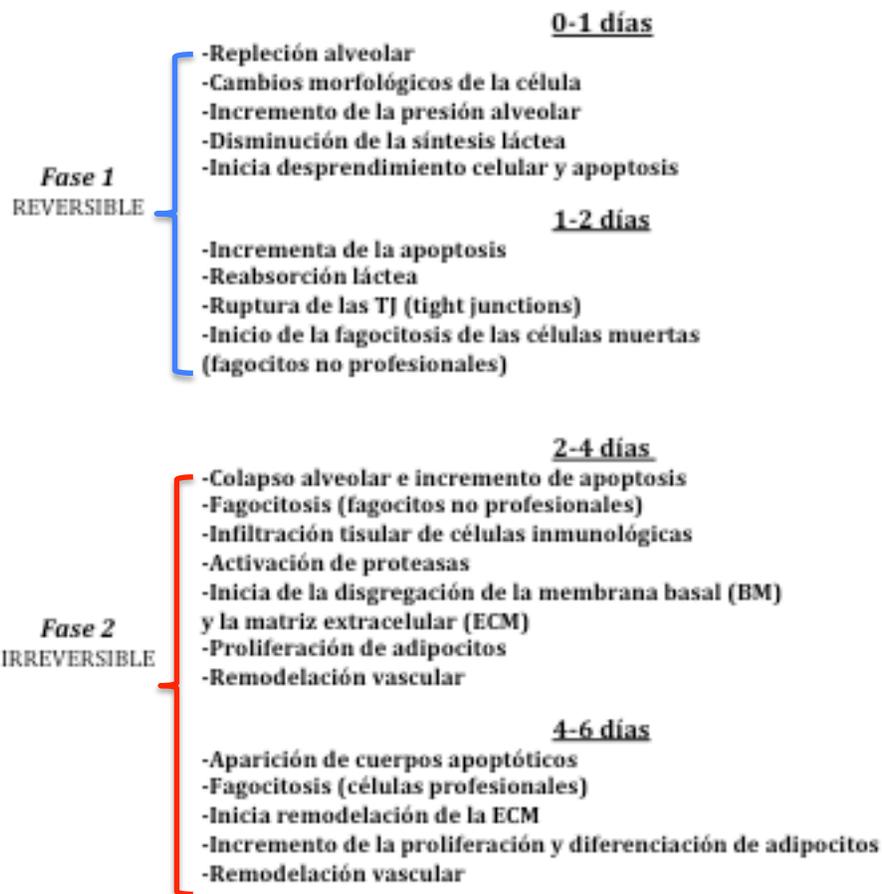


Figura 2 Fases de la involución mamaria según Pai y Horseman (2011).

Los principales procesos que intervienen en la involución de la glándula mamaria pueden ser divididos en las siguientes categorías (Pai y Horseman, 2011):

2. Estasis de la leche e inhibición de la síntesis láctea.
3. Regresión celular vía apoptosis.
4. Respuesta inmunológica para la eliminación de restos celulares.
5. Evolución del complejo de la *tigh junctions* y las barreras celulares.
6. La remodelación de la matriz extracelular (ECM).
7. Los procesos de proliferación del tejido adiposo.
8. Remodelación vascular.

3.6.1 Estasis de la leche e inhibición de la síntesis láctea.

La acumulación de leche en la glándula mamaria y la suspensión del ordeño activan los mecanismos fisiológicos que inhiben la secreción láctea. Durante este período las células epiteliales mamarias pasan a un estado morfológico parecido al de las células escamosas (Sharp *et al.*, 2007; Bruckmaier *et al.*, 1996). Estudios en los que se realizaron pruebas de ordeño unilateral han demostrado que este proceso tiene una regulación local y que ocurre incluso cuando el animal continúa teniendo altos niveles sistémicos de las hormonas lactogénicas (Li *et al.*, 1999; Feng *et al.*, 1995).

Por otra parte, cabe mencionar que la involución por estasis puede ser parcialmente reversible. En este sentido, Noble *et al.* (1999) observaron, en vacas lecheras, que la glándula mamaria recuperaba parcialmente su capacidad secretora cuando se suspendía el ordeño durante un período de tiempo corto (menor a 11 días). Prieto *et al.* (2013) en ovejas de raza assaf, que fueron sometidas a un tratamiento de reducción en su frecuencia de ordeño, pasando de dos a un ordeño diario durante 28 días, observaron una recuperación en la producción de leche al pasar, nuevamente, a dos ordeños diarios.

Finalmente, entre los factores locales más importantes que intervienen en la regulación de la estasis de la leche, destacan el FIL y la serotonina (5-HT) (Horseman y Collier, 2014; Hernández *et al.*, 2009; Wilde *et al.*, 1988) y su mecanismo de acción podría ser el bloqueo que ejercen sobre los receptores celulares para las hormonas lactogénicas (Pai y Horseman, 2011).

3.6.2 Muerte celular vía apoptosis.

En el proceso de involución de la glándula mamaria y debido a la muerte celular programada o apoptosis se observa una pérdida de hasta un 80% de las células epiteliales mamarias (Watson *et al.*, 2009; Baxter *et al.*, 2007; Marti *et al.*, 1994).

El grado de apoptosis puede ser evaluado por medio de la cuantificación de algunas proteínas involucradas en este proceso. Así, se ha podido comprobar este proceso con el estudio principalmente de dos tipos de proteínas: por una parte, las caspasas-3 y las Bax cuya función parece ser la promoción de la apoptosis y, por otra, las familias de proteínas Bcl-2 y la ki67 que actúan favoreciendo la proliferación celular, lo que inhibiría la apoptosis (Chedly *et al.*, 2010; Boutinaud *et al.*, 2008; Sørensen *et al.*, 2006; Jerry *et al.*, 2002; Wareski *et al.*, 2001; Colitti *et al.*, 2000).

3.6.3 Respuesta inmunológica y eliminación de desechos apoptóticos.

El proceso de involución mamaria origina grandes cantidades de residuos a partir de restos de leche y de cuerpos apoptóticos. La eliminación adecuada de estos residuos es crucial para la salud de la glándula mamaria, ya que, un fallo en este proceso, repercutiría negativamente en las siguientes lactaciones y se incrementaría el riesgo de desarrollo de enfermedades, tales como la ectasia en los conductos mamarios, mastitis y cáncer (Atabai *et al.*, 2007; Hanayama *et al.*, 2005).

La respuesta inmunológica asociada a la involución mamaria es la encargada de la remoción de los restos apoptóticos e incluye tres fases: a) activación primaria de los neutrófilos; b) una fase intermedia con la participación de macrófagos y una respuesta aguda a nivel local y c) una fase tardía en la que se produce una respuesta de los linfocitos-B sin que existan los signos típicos de infección (Pai y Horseman, 2011).

Por otra parte, la respuesta inmunológica asociada a la involución mamaria tiene algunas particularidades que la distinguen de otros procesos inflamatorios (Pai y Horseman, 2011). En primer lugar, tanto los neutrófilos como los leucocitos son reclutados hacia la glándula mamaria pero sus funciones están limitadas (fagocitos no profesionales) debido a la presencia de citoquinas inmunosupresoras y antiinflamatorias (Pai y Horseman, 2011). En segundo lugar, a medida que la involución mamaria progresa y se induce la respuesta aguda local, incrementa la participación de fagocitos (macrófagos y neutrófilos), siendo este proceso fundamental para la remoción completa de los cuerpos apoptóticos y residuos de la secreción láctea (Pai y Horseman, 2011).

3.6.4 Evolución del complejo de las tight junctions (TJ) y sus mecanismos de regulación.

En la glándula mamaria existe un complejo apical compuesto por los siguientes tipos de uniones intercelulares (Assémat *et al.*, 2008; Satohisa *et al.*, 2005):

- **Tight junctions** ó uniones estrechas, formadas por microdominios de membrana plasmática compuestos de múltiples puntos fusionados entre las caras exteriores de las membranas plasmáticas de las células adyacentes.
- **Adherens junctions (AJ)** ó uniones adherentes que se localizan por debajo de las TJ y están formadas, principalmente, por cadherinas unidas a microfilamentos de actina intraplasmática de las células adyacentes.

- **Desmosomas.** Son complejos proteicos, situados, fundamentalmente, por debajo de las uniones adherentes, aunque pueden encontrarse en otras zonas de la membrana celular.
- **Gap junctions (GJ).** Son uniones comunicantes que permiten el intercambio de pequeñas moléculas entre células adyacentes.

Las TJ están íntimamente asociadas con la polaridad de las células epiteliales y su función secretora a través de la superficie apical (Köhler *et al.*, 2005; Itoh *et al.*, 2003), formando una especie de sello entre las células epiteliales mamarias. Las TJ son una barrera efectiva en el transporte paracelular de fluidos y electrolitos entre el lumen alveolar y el espacio intersticial. Estas uniones epiteliales juegan un papel clave en el funcionamiento de la glándula mamaria y su ruptura es un factor que favorece la involución mamaria (Kohler *et al.*, 2005; Itoh *et al.*, 2003).

La suspensión del ordeño desencadena la involución mamaria, permaneciendo las TJ sin alteración durante un breve período de tiempo (18-24 horas en vacas y cabras), produciéndose, posteriormente, un incremento gradual en su permeabilidad (Stelwagen *et al.*, 2014, 1997, 1994). Sin embargo, parece ser que la apertura de las TJ es reversible si la suspensión del ordeño es breve (1-2 días). Pasados este tiempo se inicia la fase irreversible de ruptura (Noble *et al.*, 1999; Stelwagen *et al.*, 1997). Este hecho podría ser debido a que, tras la ruptura de las TJ, la leche entra hacia el espacio intersticial disparando otros factores causantes de cambios irreversibles, como por ejemplo la disgregación de la matriz extracelular (Shamay *et al.*, 2003; Stelwagen *et al.*, 1995).

Por otra parte y a nivel local han sido ampliamente estudiados los efectos que ejerce la serotonina sobre las TJ, la cual tiene efectos tanto potenciadores como inhibidores en la ruptura de las mismas (Horseman y Collier, 2014; Hernández *et al.*, 2009).

Finalmente, es necesario destacar que en los rumiantes productores de leche (cabras, vacas, y ovejas) se ha comprobado que los niveles de lactosa en sangre son un buen indicador para evaluar la integridad de las TJ, siendo también de interés, en algunos casos, los niveles sanguíneos de sodio y potasio (Chedly *et al.*, 2013, 2011; Hernandez *et al.*, 2011; Chedly *et al.*, 2010; Castillo *et al.*, 2008).

3.6.5 La remodelación de la matriz extracelular (ECM) y la membrana basal (BM).

El estroma de la glándula mamaria está formado, principalmente, por componentes vasculares, tejido adiposo y conectivo, fibrocitos y por la matriz extracelular (ECM). Además, existe una forma especializada de la ECM, llamada membrana basal (BM), la cual actúa como una plataforma de sujeción para las células epiteliales y mioepiteliales y juega un papel importante en la funcionalidad de la glándula mamaria, ya que genera diversas señales bioquímicas que intervienen en los procesos fisiológicos de ésta (Pai y Horseman, 2011).

Las células miopiteliales, inducidas por los fibroblastos y los adipocitos, sintetizan y secretan los componentes de la BM (Pai y Horseman, 2011), entre los que se encuentran: laminina, colágeno, fibronectina y varios tipos de integrinas ($\alpha 5$, $\alpha 6$, $\beta 1$ y $\beta 4$) situados, todos ellos, en la superficie basal de las células epiteliales mamarias.

Las integrinas juegan un papel fundamental en la involución mamaria, ya que estas proteínas regulan la transducción de señales bioquímicas y biofísicas, tales como proliferación, diferenciación, función celular y cambios en la forma de la célula a través del citoesqueleto (Pai y Horseman, 2011). Durante la primera fase de la involución, la actividad proteolítica es baja debido a una menor expresión génica, lo que permite la reversibilidad de la involución en esta fase (Pai y Horseman, 2011). Por el contrario, en la segunda fase, irreversible, las integrinas aumentan la expresión génica para las enzimas proteolíticas que desnaturalizan las ECM/BM (Pai y Horseman, 2011).

3.6.6 Proliferación del tejido adiposo.

La disminución, a medida que avanza la involución mamaria, en los niveles sistémicos de las hormonas lactogénicas favorece la diferenciación de los preadipocitos y la desintegración de la ECM, cuyos componentes se depositan alrededor de dichas células. Además, a nivel local los fragmentos de fibronectina e integrinas facilitan la reorganización de la BM y la vascularización del tejido adiposo, que aumenta la velocidad de deposición de grasa al incrementar el flujo sanguíneo (Pai y Horseman, 2011).

Todo este proceso provoca que el nuevo tejido adiposo sustituya al tejido glandular y ocupe su espacio en la ubre (Pai y Horseman, 2011).

3.6.7 Remodelación vascular.

La vascularización de la glándula mamaria, en estado de lactación, está constituida por una red de capilares altamente desarrollada, que alimenta a cada uno de los alveolos secretores que la componen (Djonov *et al.*, 2001).

La remodelación vascular consiste en dos procesos simultáneos: por una parte, la regresión de los vasos existentes en el tejido glandular y, por otra, la angiogénesis del tejido adiposo (Pai y Horseman, 2011). Este proceso está regulado por múltiples elementos, entre los que destacan: el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), la fagocitosis y el papel relevante que juega la prolactina (PRL) en la angiogénesis (Pai y Horseman, 2011).

Finalmente, la simultaneidad con la que sucede la regresión vascular del tejido secretor y la angiogénesis del tejido adiposo sugiere la presencia de un control local sobre la remodelación vascular de estos tejidos (Pai y Horseman, 2011).

3.7 Biosíntesis y secreción de los componentes mayoritarios de la leche.

La leche está compuesta mayoritariamente por agua, lactosa, grasa, proteína, minerales y vitaminas y otras sustancias con actividad biológica.

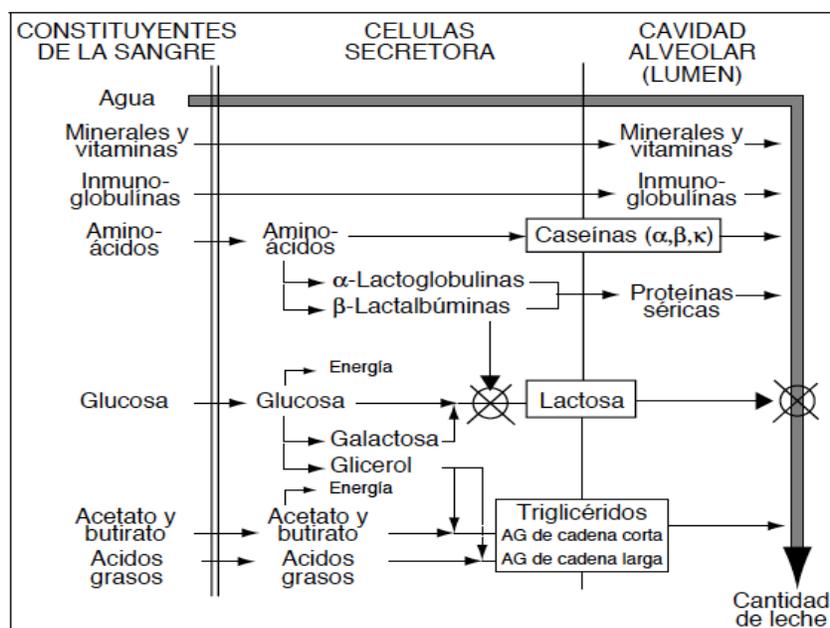


Figura 3 Cuadro resumen de la biosíntesis de la leche en las células secretoras (Wattiaux, 1998).

La leche es isotónica con el plasma sanguíneo pero no existe un equilibrio químico entre ambos, ya que aquella presenta mayor contenido de azúcar (aprox. 90 veces más),

calcio (aprox. 13 veces más), fósforo (aprox. 10 veces más), grasa (aprox. 9 veces más) y potasio (aprox. 5 veces más). Sin embargo, contiene la mitad de proteína y una sexta parte de sodio comparado con la sangre (Pulina, 2004). La presión osmótica de la leche es debida, principalmente, a la lactosa, observándose una relación inversa entre la concentración de lactosa y la suma de la concentración de sodio (Na) y de potasio (K) (Pulina, 2004).

La complejidad biológica de la leche también deriva del estado fisicoquímico en el que se encuentran sus componentes. Así las micelas de caseína se encuentran formando una **suspensión**, los glóbulos de grasa están en **emulsión** y, ambos, suspendidos en una fase acuosa que contiene, en forma de **solución**, a la lactosa, proteínas del suero, vitaminas hidrosolubles y algunos minerales (Hurley, 2010). Además, y aunque no son componentes propios de la leche, también es posible encontrar leucocitos y células muertas en fase de suspensión (Hurley, 2010; Peaker, 1977).

La mayoría de los componentes principales de la leche son sintetizados en las células epiteliales mamarias a partir de precursores químicos que circulan en la sangre, los cuales son derivados directos e indirectos de los alimentos ingeridos por el animal y pueden variar en función de la composición de la dieta (Pulina, 2004; Knight *et al.*, 1988; Peaker, 1975). Además, el epitelio mamario por efecto, principalmente, de las TJ actúa como una barrera selectiva que permite la transferencia de determinadas sustancias desde la sangre hasta el lumen alveolar (Figura 3). Algunas de estas sustancias no sufren cambios en su composición química y al mezclarse con los componentes sintetizados en el epitelio mamario dan origen a la leche (Ruckebusch, 1994; Knight *et al.*, 1988; Peaker, 1975).

3.7.1 Síntesis y secreción de proteína.

La proteína de la leche está compuesta por una gran diversidad de péptidos de diferentes tamaños con dos orígenes diferentes: el primero es la síntesis en el epitelio mamario (*e.g.* las caseínas) y, el segundo, las proteínas que proceden del suero sanguíneo (*e.g.* las albúminas y las globulinas) (Stelwagen, 2011).

Las proteínas de la leche se dividen, clásicamente, en dos grandes grupos: las caseínas (α -caseína, β -caseína, κ -caseína y γ -caseína) y las proteínas del suero lácteo, entre las que destacan la α -lactoalbúmina y la β -lactoglobulina. La composición proteica del lactosuero es de, aproximadamente, 50% de β -lactoglobulina, 20% α -lactoalbúmina, albúmina sérica, inmunoglobulinas, lactoferrina, transferrina y enzimas. Es importante

destacar que la α -lactoalbúmina interviene en la síntesis de la lactosa, puesto que es un componente importante de la enzima lactosa sintetasa (Wouters, 2012, Stelwagen, 2011; Walstra *et al.*, 1999).

El método clásico para separar los dos tipos de proteínas lácteas es la precipitación ácida en leche desnatada. Las caseínas precipitan a un pH de 4,6 mientras que las proteínas del suero se mantienen en solución (Stelwagen, 2011).

Las proteínas del suero fueron consideradas, hasta hace poco tiempo, un subproducto con un valor nutricional limitado y utilizadas, fundamentalmente, para la alimentación animal. Sin embargo, en la actualidad, algunas de estas proteínas son usadas en la industria alimentaria debido a sus valiosas propiedades, tales como sus posibles efectos anticancerígenos e inmunomoduladores (Roncada *et al.*, 2012; Wouters, 2012; Banerjee *et al.*, 1995).

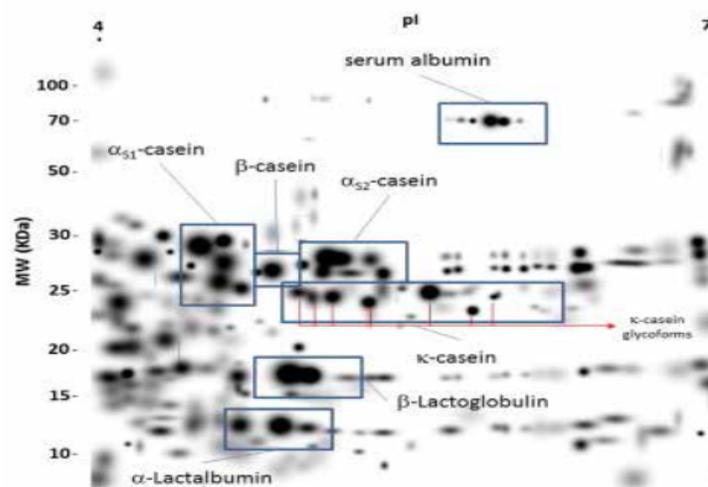
Los aminoácidos se utilizan como sustrato para la síntesis de las proteínas de la leche y son suministrados desde la sangre hacia la glándula mamaria a través de la membrana basolateral de las células epiteliales y mediante mecanismos de transporte celular. En este tipo de mecanismos de transporte celular intervienen iones facilitadores, como el sodio, y receptores celulares específicos para los diferentes grupos de aminoácidos. Sin embargo, distintos trabajos han sugerido la posibilidad de que algunos dipéptidos pasen íntegros al citoplasma celular, siendo, posteriormente, desdoblados para ser utilizados en la biosíntesis proteica (Stelwagen, 2011; Bequette *et al.*, 2000; Shennan y Peaker 2000).

El proceso de síntesis proteica en las células secretoras mamarias, una vez que los aminoácidos están en su interior, no se diferencia del de otros tejidos corporales. Este proceso se inicia con la transcripción de ADN en el núcleo de la célula y termina en el retículo endoplasmático rugoso (RER) con la traducción del ARNm en una proteína. La biosíntesis de las proteínas lácteas se desencadena por la interacción de un complejo de señales (hormonas, citoquinas, etc.) que regulan la expresión génica (Stelwagen, 2011). En este sentido, Loo *et al.* (2011) observaron que la expresión génica que codifica para la síntesis de las proteínas lácteas puede estar bajo efectos epigenéticos, lo que abriría la posibilidad de que el nivel de expresión de algunos de estos genes pueda ser modificado por las condiciones ambientales.

Por otra parte, en los últimos años, y debido a la importancia de las proteínas lácteas en la nutrición y salud humana, se está tratando de identificar componentes proteicos de la

leche que tienen menor presencia que las caseínas y las proteínas del lactosuero (Figura 5). Roncada *et al.* (2012) señalan que la leche de especies distintas presenta diferencias en el tamaño y composición de las micelas. También se ha descrito que las proteínas forman parte de la composición de la membrana del glóbulo de grasa y que podrían actuar como enzimas, desarrollando actividad antimicrobiana, incluso algunas proteínas pueden tener actividad biológica cuando son desnaturalizadas por procesos digestivos o de fermentación (Roncada *et al.*, 2012).

En este sentido, cabe destacar la importancia de la proteómica y de la bioinformática que, bajo nuevos enfoques, permiten caracterizar el proteoma de la leche de las diferentes especies. Así, los resultados publicados del primer análisis proteómico han revelado la existencia de, al menos, 718 componentes proteicos, de los que al menos 90 péptidos diferentes que podrían tener un papel importante en la defensa de la glándula mamaria frente a las infecciones. La mayoría de ellos son proteínas y pequeños péptidos que se encuentran en muy bajas concentraciones en el suero de la leche, algunos derivados de la sangre y otros, posiblemente, sintetizados en la glándula mamaria directamente o por la fragmentación de algunas proteínas (Figura 4) (Cunsolo *et al.*, 2017; Roncada *et al.*, 2012; Stelwagen, 2011).



Roncada *et al.*, 2012

Figura 4 Proteograma.

3.7.2 Síntesis y secreción de grasa.

La grasa es el componente con mayor variación en la composición de la leche. Su concentración puede ser modificada por influencia de diferentes factores que dependen tanto del animal (*e.g* raza, condición corporal o etapa de lactación) como del ambiente (*e.g* dieta, temperatura y estación del año) (Wouters, 2012; Bauman *et al.*, 2006).

En relación con la composición de la grasa láctea, es necesario destacar que más del 90% está formada por triglicéridos, fosfolípidos, colesterol y una pequeña proporción de ácidos grasos libres (Bauman *et al.*, 2011). Se estima que la leche de los rumiantes puede contener alrededor de 400 ácidos grasos (AG) diferentes. Además, y al contrario de lo que sucede en otras especies de mamíferos, la leche de los rumiantes es la única que posee ácidos grasos de cadena corta (4, 6, 8 y 10 átomos de carbono). De hecho, en los mamíferos no rumiantes, exceptuando al conejo, sólo se encuentran este tipo de AG en la grasa corporal (Wouters, 2012; Bauman *et al.*, 2011).

En los rumiantes, los AG de la leche provienen de dos fuentes principales: la primera es la síntesis *de novo* en las células epiteliales mamarias y, la segunda, la captación de ácidos grasos de cadena larga desde el torrente sanguíneo (Bauman *et al.*, 2011; Nielsen *et al.*, 1994). A partir de la primera de ellas se sintetiza entre el 45 y 60% del total de los AG presentes en la leche, siendo la mitad de los ácidos grasos de 16 átomos de carbono y todos los de 18 átomos de carbono o más obtenidos de la circulación sanguínea (Wouters, 2012; Bauman *et al.*, 2011).

Síntesis de *novo*

Los mamíferos rumiantes utilizan el acetato y el β -hidroxibutirato como la principal fuente de carbono para la síntesis de la grasa láctea, mientras que los monogástricos emplean, fundamentalmente, glucosa (Bauman *et al.*, 2011; Jenness, 1974).

La fermentación en el rumen de los carbohidratos de la dieta origina ácido acético y butírico, siendo este último transformado en β -hidroxibutirato en las paredes del rumen y en el hígado. Ambos compuestos pasan a la circulación sanguínea de donde son extraídos por la glándula mamaria. Una vez en la célula mamaria, el acetato y el β -hidroxibutirato entran al proceso de síntesis *de novo* por activación del acetil coenzima A, teniendo como producto final ácidos grasos cuya cadena va desde los 4 hasta los 16 átomos de carbono. Se estima que el β -hidroxibutirato contribuye sólo con el 8% del carbono presente en los ácidos grasos totales de la leche, mientras que el acetato aporta el resto de los carbonos

necesarios para la síntesis de ácidos grasos *de novo* (Wouters, 2012; Bauman *et al.*, 2011; Barber *et al.*, 1997).

Captación de ácidos grasos de la sangre.

Los ácidos grasos que circulan en la sangre, son la segunda fuente para la síntesis de la grasa láctea. Estos AG tienen su origen en los lípidos de la dieta que son absorbidos desde el tracto digestivo y en la movilización de las reservas corporales de grasa del animal. Todos ellos se caracterizan por no ser hidrosolubles y, por lo tanto, para circular en la sangre se encuentran empaquetados en lipoproteínas (Bauman *et al.*, 2011; Barber *et al.*, 1997).

Los triglicéridos son transportados en quilomicrones y lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) hacia la glándula mamaria. Por otra parte, los ácidos grasos no esterificados (NEFA) que proceden de la movilización de las reservas corporales de grasa del animal son transportados hacia la mama por proteínas transportadoras, como la albúmina sérica (Drackley y Andersen, 2006; Barber *et al.*, 1997). Una vez en la glándula mamaria, la enzima lipoproteinlipasa, localizada en la pared endotelial de los capilares del tejido secretor, rompe los enlaces éster y libera los AG que, posteriormente, se incorporan a la célula epitelial mamaria y al complejo enzimático de síntesis de la grasa láctea (Bauman *et al.*, 2011).

Los triglicéridos plasmáticos y los NEFA representan menos del 3% de los lípidos totales en el plasma. Sin embargo, el aporte de éstos a la grasa total de la leche es aproximadamente del 55% en peso y del 40% en base molar. La captación mamaria de NEFA es directamente proporcional a su concentración en plasma y ésta a su vez depende del balance de energía. Por lo tanto, el aporte sanguíneo de NEFA a la grasa de la leche está sujeto al estado fisiológico y al metabolismo energético de los animales (Wouters, 2012). Así, los animales que están en la primera etapa de la lactación, con una elevada producción de leche y un balance energético negativo, tienen una elevada tasa de movilización de sus reservas grasas corporales y un aumento en las concentraciones plasmáticas de NEFA y, por consiguiente, un mayor aporte de este tipo de AG a la grasa de la leche (Wouters, 2012; Barber *et al.*, 1997).

En la actualidad es un principio aceptado, entre la comunidad médica, que las dietas con un alto contenido de grasas saturadas aumentan el riesgo de sufrir accidentes vasculares, fundamentalmente, por ser un factor importante en el desarrollo de aterosclerosis en la especie humana. Sin embargo, y en lo que respecta al consumo de

leche, también se ha postulado los potenciales beneficios sobre el sistema cardiovascular que podrían tener los componentes minoritarios de la grasa láctea, en particular algunos isómeros del ácido linoleico conjugado (CLA) y los omega-3, con potenciales propiedades anticancerígenas (Bauman *et al.*, 2011; Larsson *et al.*, 2004; Clegg *et al.*, 2001). Por esta razón, se ha recuperado el interés por el estudio del metabolismo lipídico y, en particular, por las reacciones enzimáticas que potencialmente pueden influir en la composición y el perfil de ácidos grasos de la leche, haciendo posible intervenciones, como cambios en la dieta de los animales productores de leche, dirigidas a modificar la cantidad y la calidad de la grasa láctea (Chilliard *et al.*, 2014; Pires *et al.*, 2013; Faulconnier *et al.*, 2011; Clegg *et al.*, 2001).

La grasa es secretada en forma de gotas lipídicas ricas en triglicéridos. Éstas son vertidas desde la superficie apical de las células epiteliales mamarias por un proceso de exocitosis, lo que produce una encapsulación de cada una de las gotas de lípidos por una membrana, denominada membrana del glóbulo graso (MFGM). La MFGM podría desempeñar un papel beneficioso sobre las propiedades reológicas de la leche y sobre la salud humana (Wiking, 2005; Spitsberg, 2005; Barber *et al.*, 1997, Patton, 1975).

3.7.3 Síntesis y secreción de lactosa.

La lactosa es un disacárido constituido por dos moléculas de 6 carbonos cada una: una molécula de glucosa y otra de galactosa. La galactosa también deriva de la glucosa, así pues ésta se considera el único precursor de la lactosa (Stelwagen, 2011; Hurley 2010; Peaker, 1977).

En los animales rumiantes gran parte de los carbohidratos contenidos en el alimento son fermentados en el rumen por las bacterias y protozoos que lo habitan, obteniendo la energía que satisface sus propias necesidades. Además, la fermentación origina, entre otros productos, ácidos grasos volátiles (AGV), tales como el acético, propiónico y butírico, los cuales son absorbidos a través de la pared ruminal y transportados, por la circulación portal, hasta el hígado, donde el propiónico es transformado en glucosa (Stelwagen, 2011).

La glándula mamaria no posee la enzima glucosa-6-fosfatasa y, por lo tanto, no tiene la capacidad de sintetizar glucosa, siendo ésta suministrada a través de la circulación arterial mamaria. De hecho, en los rumiantes, durante el periodo de lactancia, alrededor del 85% de la glucosa circulante en la sangre es extraída por la glándula mamaria (Stelwagen, 2011; Martinet *et al.*, 1999).

La síntesis de lactosa se produce a través de varias etapas metabólicas mediadas por enzimas: en primer lugar, en el citoplasma de la célula, se transforma la glucosa en UDP-galactosa, que junto con otras moléculas de glucosa son transportadas por dos familias de proteínas (GLUT y SGLT) hasta el interior del aparato de Golgi (Zhao *et al.*, 2007; Wood *et al.*, 2003). Una vez aquí, la UDP-galactosa se transforma en galactosa y la lactosa sintetasa realiza la dimerización de ésta y de la glucosa para sintetizar la lactosa (Peaker, 1977; Trayer *et al.*, 1971; Brew *et al.*, 1972). Esta última enzima está compuesta por dos proteínas, la enzima galactosil transferasa (Heitzman, 1967) y la α -lactoalbúmina (Stelwagen, 2011; Kuhn *et al.*, 1980; Brew *et al.*, 1970). La galactosiltransferasa no es exclusiva de las células mamarias, sin embargo sólo al unirse a la α -lactoalbúmina tiene afinidad por la glucosa y, por tanto, la capacidad de sintetizar la lactosa, proceso único de las células epiteliales mamarias. La actividad de este complejo enzimático puede ser limitada por la presencia de cationes bivalentes, posiblemente manganeso, zinc y calcio (Wouters, 2012; Stelwagen, 2011).

Una vez que la lactosa ha sido sintetizada pasa a formar parte del contenido de las vesículas secretoras del aparato de Golgi. Dichas vesículas, que contienen también proteínas, salen del aparato de Golgi y son transportadas a través del citoplasma por acción, principalmente, de los microtúbulos del citoesqueleto, llegando a la zona apical de la célula, donde se fusionan con la membrana celular y liberan su contenido al lumen alveolar (Nickerson *et al.*, 1980). Sin embargo, el contenido de las vesículas hace que sean hipertónicas respecto al citoplasma, lo cual obliga a la entrada de agua hacia las vesículas secretoras hasta equilibrar la presión osmótica. Así pues, la lactosa sería la molécula limitante que determina la cantidad de agua en la leche y por lo tanto, la producción final de ésta (Stelwagen, 2011).

3.7.4 Vitaminas y minerales.

Las vitaminas y los minerales de la leche provienen del torrente sanguíneo y entran al citoplasma de las células epiteliales mamarias por ósmosis. Cuando la lactosa ha sido sintetizada dichas vitaminas y minerales acceden, también por ósmosis, al aparato de Golgi (Hurley, 2010).

Las vitaminas liposolubles (A, D, E, K) se encuentran en la grasa de la leche y sus niveles están directamente relacionados con el contenido de ellas en la dieta de los animales. Por su parte, las vitaminas del complejo B (hidrosolubles) están en la fase acuosa de la leche y son, fundamentalmente, sintetizadas por las bacterias del rumen y su contenido en aquella también depende, en gran medida, de sus concentraciones en plasma (Hurley, 2010). Algunos minerales también se encuentran en la fase acuosa, mientras que otros forman parte de la estructura de distintos componentes de la leche (tales como proteínas y ácidos grasos). Cabe resaltar que minerales como el fósforo y el calcio tienen una importante presencia en la estructura de las micelas de caseína.

La lactosa y los minerales, como señalamos anteriormente, son los moduladores de la cantidad de agua que hay en el interior de las vesículas secretoras formadas en el aparato de Golgi. El transporte de agua desde el espacio intersticial es facilitado por proteínas llamadas acuaporinas, identificadas en la membrana basal de las células (Wouters, 2012; Agre, 2006; Shennan *et al.*, 2000).

Los minerales también contribuyen a regular la capacidad tampón de la leche (Raynal *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2007; Gaucheron, 2005; Jandal, 1996).

3.8 Salud de la ubre y calidad higiénico-sanitaria de la leche.

La producción de leche de oveja con una adecuada calidad higiénico-sanitaria es una demanda tanto de la industria transformadora como de los consumidores, estableciendo la normativa vigente los parámetros que deben evaluarse, así como su valor, para determinar dicha calidad.

Los consumidores finales, además, cada vez tienen una mayor conciencia sobre el cuidado del medio ambiente y el bienestar de los animales productores de leche, lo que se traduce en una producción animal que evita, en la medida de lo posible, la presencia de enfermedad, eliminando, de esta manera, un gran número de los factores de riesgo que podrían afectar a la salud de dichos consumidores (Caroprese *et al.*, 2006; Abascal *et al.*, 2004). La normativa vigente (Reglamento (CE) n° 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo) establece que la leche cruda de oveja deberá proceder de explotaciones que hayan sido declaradas indemnes u oficialmente indemnes de brucelosis, siendo las colonias de gérmenes a 30°C permitidas por ml menor o igual a 1.500.000. Sin embargo, no se establece ningún parámetro respecto al contenido de células somáticas por ml de leche cruda. Este desafío no es una cuestión menor y sólo se puede lograr con la obtención de rebaños de ovejas con parámetros de salud en sus ubres que permitan expresar su capacidad para la producción de leche en la cantidad y calidad que requieren los actores antes mencionados: consumidor, industria y regulación sanitaria (Abascal, 2004).

En los rumiantes productores de leche, la mastitis es la patología más importante que afecta la salud de la ubre, tanto por su coste en términos económicos como por su alta presencia en el sistema productivo.

La mastitis tiene efectos sobre múltiples factores productivos, entre los que destacan (Consejo Nacional de Mastitis, 2006):

- reducción en la producción de leche (hasta 20%),
- penalización en el pago de leche por calidad,
- aumento de gastos por tratamientos veterinarios,
- muerte y desecho prematuro de animales infectados, y
- disminución en el avance de la mejora genética.

Según datos del Consejo Nacional de Mastitis (Reneau, 2001) esta enfermedad puede causar pérdidas económicas de hasta 150 euros anuales por cada animal infectado, que incluso pueden aumentar, sino se corrige el problema.

Las mastitis tienen dos formas de presentación: clínica y subclínica. La primera de ellas causa alteraciones de la leche y del estado de salud de los animales que son clínicamente observables (dolor, calor y rubor de la ubre y, a veces, afectaciones sistémicas) (Roncada *et al.*, 2012; Gonzalo *et al.*, 2004). En lo que respecta a la forma subclínica, sólo es detectada mediante pruebas indirectas en la leche, tales como la conductividad eléctrica, la actividad de la enzima lactato-deshidrogenasa y el recuento de células somáticas (RCS) (Roncada *et al.*, 2012; Gonzalo *et al.*, 2004, 2003, 1993). En general, se considera que el RCS debe ser inferior a 400.000 por ml de leche para considerar a la ubre sana (Gonzalo *et al.* 2002).

El recuento de células somáticas es, actualmente, el parámetro más utilizado, a nivel mundial, para evaluar la salud de la glándula mamaria, ya que el incremento de aquél es una respuesta a la agresión de la glándula mamaria y está modulado por mediadores de la inflamación, siendo la infección intramamaria el principal factor que influye en el RCS (Consejo Nacional de Mastitis, 2014; Gonzalo *et al.*, 2004, 2003; Bradley, 2002; Ruegg, 2001; Harmon, 1994). De hecho, González-Rodríguez *et al.*(1995), tras analizar 1382 muestras de leche de ovejas de las razas assaf, churra y castellana, concluyeron que alrededor del 81% de los RCS elevados estaban correlacionados con la presencia de infección intramamaria(IMI).

En este sentido y con la intención de analizar las pérdidas que representa la mastitis clínica y subclínica en la producción de leche ovina, Gonzalo *et al.* (2002) estudiaron los resultados de los análisis de RCS y microbiológicos de 9592 muestras de leche, provenientes del control lechero de 1322 ovejas churras, y observaron que existe una relación inversa entre el RCS y la producción de leche por oveja, determinando que la caída de la producción oscilaba entre un 8,8 y 10,1 % en ovejas con altos RCS, dependiendo de si la infección era unilateral o bilateral. Así pues, este estudio demuestra la importancia que los aspectos higiénico-sanitarios tienen sobre la renta de las explotaciones ovinas lecheras.

A nivel industrial el RCS en el tanque de leche se ha convertido en una medida rutinaria para analizar el estado general de la salud de la ubre del rebaño. Paape *et al.* (2001) realizaron un estudio en el que observaron una relación directa entre los altos RCS en tanque de leche y la caída de la producción de ésta y de su contenido en grasa a nivel

individual. Dicho estudio abarcó todo el período de lactación y también demostró que el sellado de los pezones tras el ordeño y la administración intramamaria de antibióticos en el secado disminuyeron la aparición de nuevas infecciones intramamarias en la siguiente lactación, mejorando los RCS en el tanque.

La glándula mamaria está protegida por múltiples mecanismos de defensa, que pueden ser divididos en dos categorías: inmunidad innata e inmunidad adquirida (Sordillo *et al.*, 2002, 1997).

La inmunidad innata está mediada por barreras físicas (tales como la piel, el esfínter del pezón o la queratina), macrófagos, neutrófilos, células *natural killer* (NK), así como por distintas proteínas entre las que destacan las citoquinas, lisozimas, lactoferrina y proteínas del sistema de complemento (Sordillo *et al.*, 2002, 1997; Lee *et al.*, 1989). La importancia de las barreras físicas ha sido comprobada por Mavrogianni *et al.* (2006) en ovejas lecheras, en las que observaron que las lesiones en la piel de sus pezones afectaban negativamente a las defensas de la ubre frente a las infecciones, ya que aceleraban el proceso inflamatorio y la severidad de la enfermedad en los animales.

La inmunidad adquirida involucra a los macrófagos capacitados y a los anticuerpos específicos producidos como resultado de la presentación del antígeno en la superficie celular, interviniendo también el sistema mayor de histocompatibilidad. Las inmunoglobulinas implicadas en este tipo de respuesta son, principalmente, la IgG₁, IgG₂, IgA e IgM (Sordillo *et al.*, 2002, 1997; Lee *et al.*, 1989). El conocimiento, cada vez mayor, de los mecanismos moleculares que intervienen en este tipo de respuesta inmunitaria están permitiendo la realización de múltiples trabajos, fundamentalmente en la especie bovina, que tratan de desarrollar vacunas que protejan contra patógenos como *Staphylococcus aureus*, el cual es uno de los principales causantes de mastitis y responsable de las mayores pérdidas en la producción de leche (Pereira *et al.*, 2011; Ruegg, 2001; González-Rodríguez *et al.*, 1995).

Existen numerosos factores (genéticos, fisiológicos y ambientales) que pueden comprometer los mecanismos de defensa del animal durante la transición fisiológica de la glándula mamaria en sus diferentes etapas de desarrollo. Así, por ejemplo, el estrés fisiológico asociado a la rápida diferenciación del parénquima secretor, el intenso crecimiento de la glándula mamaria y el inicio de la síntesis y secreción de leche se caracterizan por una alta demanda de energía y un aumento súbito en las necesidades de oxígeno. Este aumento de la demanda de oxígeno incrementa la producción de radicales

libres, también, llamados, genéricamente, sustancias reactivas de oxígeno (ROS). La acumulación excesiva de ROS puede provocar una respuesta inflamatoria no controlada, originando una condición de estrés oxidativo que favorece la aparición de graves lesiones tisulares (Sordillo, 2005).

En esta misma línea, y en lo que respecta a los factores genéticos, en un estudio realizado por Huntley *et al.* (2012), en ovejas lactantes, se observó que ubres globosas con pezones orientados lateralmente están asociadas con altos niveles de infección intramamaria.

Finalmente, señalar que Bergonier *et al.* (2003) y Menzies *et al.* (2001), en sendas revisiones bibliográficas, señalan que el recuento de células somáticas (RCS) es una buena herramienta para la detección de mastitis y la evaluación de su prevalencia, siendo más eficaz en la especie ovina que en la caprina. Estos trabajos también indican que la prevención de esta patología se basa en la adecuada gestión de la máquina de ordeño, la higiene del ordeño y el control de la producción. Mientras que la eliminación de la enfermedad estribaría, principalmente, en la separación del rebaño de los animales que presentan mastitis clínica y una recurrente infección intramamaria. Sin olvidar la importancia de la aplicación de antibioterapia intramamaria en el período de secado.

Por otra parte, en países como Francia, se han incluido, a nivel experimental, valores de heredabilidad para la resistencia a la mastitis en los programas de mejora genética (Bergonier *et al.*, 2003; Menzies *et al.* 2001).

3.9 Relación entre nutrición, producción y composición de la leche.

La mayor parte de la leche de oveja producida en el mundo es transformada en queso, yogur y otros productos lácteos. Las propiedades de la leche, tales como la coagulación y la viscosidad juegan un papel importante, en los procesos tecnológicos de su transformación (Park, 2007; Pulina *et al.*, 2006; Bencini *et al.*, 1997). Estas propiedades están muy influenciadas por los contenidos de grasa y de proteína, que dependen, entre otros factores, de la alimentación (Pulina *et al.*, 2006; Bencini *et al.*, 1997).

Además, la alimentación determina la presencia en la leche de otras sustancias con propiedades nutraceuticas, tales como el ácido linoleico conjugado (CLA), lactoferrina, κ -caseína y otras sustancias (ésteres, aldehídos, cetonas y alcoholes) que también pueden afectar tanto al sabor y olor de la leche como de los productos lácteos de ella obtenidos (Roncada *et al.*, 2012; Michaelidou, 2008; Pulina *et al.*, 2006; Bencini *et al.*, 1997).

Los resultados obtenidos en vacas lecheras sobre el efecto de la alimentación en la producción y composición de la leche fueron, durante mucho tiempo, extrapolados al ganado ovino lechero. Sin embargo, desde hace algunas décadas se han intensificado los estudios en los pequeños rumiantes, que tienen en cuenta las particularidades propias de la nutrición de estos animales (Regadas *et al.*, 2014; Cannas *et al.*, 2013; Rapisarda *et al.*, 2012; Tedeschi, *et al.*, 2010; Molle *et al.*, 2008; Vasta *et al.*, 2008; Pulina, 2004; Cannas *et al.*, 1998; Dunn *et al.*, 1979).

La concentración de grasa y proteína en la leche ovina depende, principalmente, de la producción láctea de los animales (Sanz Sampelayo *et al.*, 2007). Así, Emery *et al.* (1988) sostienen que existe una correlación negativa entre el contenido de grasa y proteína de la leche y el nivel de producción. De hecho, Pulina *et al.* (2005), en un estudio realizado con 6564 ovejas, determinaron que el nivel de producción de leche tiene mayor influencia en su contenido de grasa y proteína que los factores ambientales. Estos autores, no obstante, señalan que, con niveles similares de producción, el contenido de grasa y proteína en la leche de esta especie puede ser modificado por factores distintos a su potencial genético. En este mismo estudio también se determinó que los cambios en el nivel de producción de leche afectan en mayor medida al contenido de grasa que al contenido de proteína.

Existen diversos factores nutricionales que pueden afectar a la concentración y el perfil lipídico de la grasa en la leche de oveja (Bichi *et al.*, 2013; Prieto *et al.*, 2013; Toral *et al.*, 2010; Sanz Sampelayo *et al.*, 2007; Pulina *et al.*, 2006), destacando los siguientes: el balance energético de las ovejas (Bocquier *et al.*, 2001, 1993; Rossi *et al.*, 1991), la ingestión de fibra neutro detergente así como su fuente de procedencia (Nudda *et al.*, 2004; Cannas *et al.*, 2002; Serra, 1998), el contenido de carbohidratos no estructurales en la dieta (Mele *et al.*, 2005), el tamaño de partícula del alimento (Rossi *et al.*, 1991) y, en su caso, las características físicas y el perfil de ácidos grasos de los suplementos lipídicos (Sanz *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2006; Chilliard *et al.*, 2003; Kitessa *et al.*, 2003; Mele *et al.*, 2002; Zervas *et al.*, 1998; Palmquist, 1994; Chilliard, 1993; Wu *et al.*, 1991; Palmquist *et al.*, 1980). La interacción entre estos elementos, y algunos otros de menor importancia, pueden modificar el contenido lipídico de la leche y su perfil de ácidos grasos (Bichi *et al.*, 2012; Toral *et al.*, 2011; Pulina *et al.*, 2006; García *et al.*, 2005; Martini *et al.*, 2004; Antongiovanni *et al.*, 2002; Appeddu *et al.*, 2004; Sklan, 1992; Pulina *et al.*, 1990). Todos estos factores también se acepta que son importantes en el caso de la especie caprina (Chilliard *et al.*, 2003).

Es oportuno destacar que la inclusión de altas concentraciones de grasa en la dieta reduce la actividad fermentativa de las bacterias y de los protozoos del rumen (Castro-Carrera, 2014; Pulina *et al.*, 2006; Palmquist *et al.*, 1980). Esta alteración en la actividad de los microorganismos ruminales sería la responsable de la caída en la cantidad de metabolitos lipídicos disponibles para la glándula mamaria, de la reducción en la síntesis de ácidos grasos de cadena corta en las células epiteliales mamarias y, en parte, del síndrome de baja grasa (MFD, *milk fat depression*). Los principales ácidos grasos procedentes del rumen y que están implicados en el síndrome MFD son los *trans*-10, *cis*-12 CLA (Stoffel *et al.*, 2015; Toral, 2010; Pottier *et al.*, 2006) y los *trans*-11 18:1 (Griinari *et al.*, 1998; Gaynor *et al.*, 1995). Sin embargo, la administración de grasa protegida en la dieta podría atenuar los efectos negativos sobre la fermentación ruminal que causan estos suplementos (Pulina *et al.*, 2006).

El contenido de proteína en la leche, como se ha mencionado anteriormente, es menos sensible que el contenido de grasa a cambios en la dieta de los animales, aunque también puede ser modificado por ésta (Pulina *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 1994). En este sentido, Susin *et al.* (1995), en un trabajo realizado con ovejas en lactación temprana, observaron que los animales que consumían dietas con alto contenido energético tenían mayor producción y concentración de proteína en la leche que las ovejas alimentadas con una dieta con menor contenido de energía. Estos resultados fueron corroborados por Bocquier *et al.* (2001) cuando comprobaron que existe una correlación positiva ($r= 0,64$) entre el contenido energético de la dieta y la concentración de proteína en la leche. Sin embargo, Cannas *et al.* (1998) no encontraron ninguna diferencia en el contenido de proteína en la leche entre grupos de ovejas alimentadas con dietas que diferían en su contenido de energía. Igualmente controvertidos son los resultados cuando se modifica el contenido de proteína en la dieta, tal y como indican numerosos trabajos (Renna *et al.*, 2012; Mikolayunas-Sandrock *et al.*, 2009; Bocquier *et al.*, 2001; Cannas *et al.*, 1998; Hatfield *et al.*, 1995; Cowan *et al.*, 1981; Cortés *et al.*, 1977).

La información sobre el perfil proteico de la leche y sus fuentes de variación en ovejas es muy escasa (Zhang *et al.*, 2006; Goulas *et al.*, 2003). No obstante, Lynch *et al.* (1991) comprobaron que la suplementación con aminoácidos protegidos incrementa ligeramente el contenido de lisina y metionina en la leche. En vacas lecheras, en la última etapa de lactación, Walker *et al.* (2004) observaron que un bajo consumo de energía redujo el contenido de caseína y aumentó la presencia de proteínas del lactosuero (lactoalbúmina, lactoglobulina) en la leche y, en consecuencia, también se redujo el rendimiento quesero.

Cabe destacar también la interacción entre el contenido de proteína de la leche y la inclusión de lípidos en la ración (Martínez, 2011). En este sentido, se ha observado que la inclusión de fuentes de grasa en la dieta origina una reducción del contenido de proteína en la leche de vacas y ovejas, efecto que no se observa en cabras (Sanz Sampelayo *et al.*, 2007; Pulina *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2006; Goulas *et al.*, 2003). Schroeder *et al.* (2004) y Wu *et al.* (1994) comprobaron que en vacas dicho efecto negativo es mayor tras el pico de la lactación y aumenta con el grado de insaturación de los suplementos lipídicos de la dieta.

En relación con las distintas fracciones proteicas de la leche, Sanz Sampelayo *et al.* (2002) observaron que al incrementar la inclusión de suplementos lipídicos en la dieta se produjo un aumento de la seroalbúmina y una disminución de la α -caseína, sin que el porcentaje final de proteína sérica y de caseína se viera afectado, debido, probablemente, en ambos casos, a un incremento en el contenido de las restantes fracciones proteicas (Gargouri *et al.*, 2006; Bocquier *et al.*, 2001; Doreau *et al.*, 1992).

Wu *et al.* (1994b) indican que la reducción del contenido proteico de la leche, cuando se incluyen fuentes de grasa en la dieta, podría explicarse, en parte, por un aumento de la producción de leche sin ser acompañado por una mayor disponibilidad de aminoácidos para la síntesis de proteína en la glándula mamaria.

Por último, la alimentación también es responsable de la presencia de sustancias tóxicas (aflatoxina B₁, metales pesados, dioxinas) y otros componentes indeseables en la leche, los cuales permanecen en los productos lácteos transformados y suponen un riesgo para la inocuidad alimentaria (Michaelidou, 2008; Pulina *et al.*, 2006; Battacone *et al.*, 2003; Bencini *et al.*, 1997).

La contaminación de la leche de ovejas con metales pesados, dioxinas, micotoxinas y sustancias residuales de la actividad agrícola (Battacone *et al.*, 2005; Bocio *et al.*, 2005; Schechter *et al.*, 2003) representa un riesgo para el sistema de producción, principalmente, por dos motivos: en primer lugar, todas estas sustancias entran en la cadena alimentaria y tienen importantes riesgos para la salud de los consumidores, puesto que muchos de ellos pueden ser cancerígenos y, en segundo lugar, provocan alteraciones organolépticas en los productos derivados de la leche (Li *et al.*, 2009; Caggiano *et al.*, 2005; Coni *et al.*, 1999; Mehennaoui *et al.*, 1999).

3.10 Vitamina E y selenio.

3.10.1 Contenido en leche y fuentes de variación.

En la bibliografía se recogen datos del contenido de vitamina E y Se en la leche de oveja muy variables, oscilando entre 0,95 y 3,44 $\mu\text{g/g}$ en el caso de la vitamina E y 0,75 y 2,23 $\mu\text{g/g}$ en el caso del Se (Davis *et al.*, 2006; Capper *et al.*, 2005; Njeru *et al.*, 1994). Esta variación es debida, en parte, a la alimentación que reciben los animales durante la gestación o la lactación (Davis *et al.*, 2006; Capper *et al.*, 2005; Njeru *et al.*, 1994).

La vitamina E se encuentra en los alimentos, fundamentalmente, en forma de α - y γ -tocoferol. Ambas presentaciones son hidrolizadas por las enzimas pancreáticas en el lumen intestinal y convertidas en tocoferol, el cual es absorbido por difusión pasiva a través de los enterocitos, dependiendo la eficiencia de absorción de la cantidad y calidad de la grasa presente en la dieta (Pottier *et al.*, 2006; Debier y Larondelle, 2005; Dimitrov *et al.*, 1991; Atwal *et al.*, 1990). El transporte de la vitamina E en sangre se realiza por lipoproteínas inespecíficas hacia el hígado, donde es almacenada (Debier y Larondelle, 2005).

En ovejas lecheras las necesidades nutritivas de vitamina E se estiman entre 20- 40 UI/ kg de materia seca ingerida (INRA, 2007; NRC, 2007; Infascelli *et al.*, 2005) y las de selenio en 0,1-0,2 ppm/kg de materia seca ingerida (INRA, 2007; NRC, 2007; Moniello *et al.*, 2005).

Debier *et al.* (2005) y McDowell *et al.* (1996), tras una revisión exhaustiva sobre el efecto de la administración de vitamina E en rumiantes gestantes y en lactación, así como sobre la transferencia de ésta vitamina a través del calostro, concluyeron que los animales que recibieron un suplemento durante el período seco tenían niveles de vitamina E en el calostro mayores que los no suplementados y los niveles en el suero sanguíneo de dicha vitamina también fueron mayores en las crías nacidas de las hembras que recibieron el suplemento vitamínico. Es necesario resaltar que la concentración de vitamina E es mucho mayor en el calostro que en la leche, debido, posiblemente, a las variaciones en el tamaño de la membrana del glóbulo de la grasa en la leche (MFGM), lo que provocaría un efecto de dilución (Barbas *et al.*, 1998; Boersma *et al.*, 1991; Ruegg *et al.*, 1981). Por su parte, Hidiroglou, (1989) demostró la efectividad de la administración intraperitoneal de vitamina E para incrementar la concentración de ésta en la leche y en el plasma de vacas lecheras.

El contenido de Se en el calostro y en leche parece estar directamente relacionado con la cantidad ingerida por encima de los requerimientos (Rooke *et al.*, 2004). En ovejas se ha observado que dosis en torno a 2 mg/kg de materia seca ingerida pueden ser seguras y no provocan toxicidad en los corderos amamantados por las mismas (Davis *et al.*, 2006).

No obstante, la fuente de Se también parece afectar su contenido final en la leche. Así, Calamari *et al.* (2010) compararon dos fuentes de selenio (selenito de sodio vs selenio de un cultivo de *Saccharomyces cerevisiae*) y observaron que la concentración de selenio fue un 30% mayor en la leche de las vacas que recibieron el selenio procedente de un cultivo de levaduras. En animales de la especie caprina, alimentados con diferentes fuentes de selenio, se han obtenido resultados similares a los encontrados en vacas (Pechova *et al.*, 2008). Además, parece existir un efecto positivo en la estabilidad térmica de la leche que procede de cabras alimentadas con la fuente de selenio orgánico (Petrera *et al.*, 2009).

3.10.2 Papel antioxidante y efecto sobre las características de la leche y la salud.

El uso de suplementos vitamínico-minerales con propiedades antioxidantes para neutralizar a los radicales libres está cobrando una gran importancia, tanto en la nutrición y medicina humana como en la nutrición y producción animal (Joy *et al.*, 2011; Chappel *et al.*, 1985). En este sentido, cabe destacar la importancia de la vitamina E y del selenio.

En las últimas décadas se ha comprobado que distintas patologías (neoplasias, cáncer, síndrome metabólico, cardiopatías, etc.), en la especie humana y otras especies, podrían estar asociadas, a nivel molecular, con la presencia de radicales libres que tienen la capacidad para causar daño celular (Bramley *et al.*, 2000; Liebler, 1992; Ullrey, 1981).

La leche y los productos lácteos pueden proporcionar cantidades significativas de vitamina E y de Se a la dieta humana, éste último en forma de selenoproteínas, que constituyen una fuente de Se de alta biodisponibilidad para su absorción en el intestino (Walker *et al.*, 2004).

La vitamina E es uno de los antioxidantes liposolubles más importantes y se localiza en las membranas lipídicas de las células, actuando como un escudo protector contra la acción de las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Nordberg *et al.*, 2001; Frei, 1994; Miller *et al.*, 1993; Halliwell, 1991; Putman *et al.*, 1988; Rice *et al.*, 1988). De hecho, los PUFAS, ubicados en el sistema de membranas celulares, son especialmente sensibles a la acción de las ROS, lo que desencadenaría un proceso bioquímico que involucra a una serie de reacciones de lipólisis y oxidación que podrían destruir la membrana de la célula (Montuschi *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 1997; Finch *et al.*, 1996; Putman *et al.*, 1988).

La vitamina E actúa en sinergia con el selenio, que es un componente esencial de la enzima glutatión peroxidasa (GPx). Esta enzima juega un papel importante en la reducción de radicales libres (Yang *et al.*, 2011; Underwood, 1999). Estos radicales libres provocan la amplificación de la respuesta inflamatoria ya iniciada y aumentan las probabilidades de invasión de la glándula mamaria por microorganismos patógenos. La vitamina E controla la peroxidación y reduce la formación de dichos radicales libres (Lauzon *et al.*, 2005; Grimble, 1998; Smith *et al.*, 1997; Craven *et al.*, 1987).

El complejo formado por la vitamina E y el selenio actúa bloqueando las rutas metabólicas implicadas en el proceso inflamatorio, ya que evita que el ácido araquidónico sea transformado, por el complejo enzimático de las ciclooxigenasas, en prostaglandinas, tromboxanos y prostaciclina, bloqueando, además, la ruta de los leucotrienos a través de la enzima lipoxigenasa (Atroschi *et al.*, 1989, 1987; Kuehl *et al.*, 1980).

Brozos *et al.* (2009) realizaron un trabajo en vacas lecheras, en periodo de secado, para estudiar el efecto de la administración de vitamina E y Se (60 g de clorhidrato de amonio + 1000 UI de DL- α - tocoferol + 0,05 ppm de Se). Los resultados de este estudio demostraron que la administración del suplemento de vitamina E y selenio redujo la incidencia de retención placentaria sin afectar a la producción de leche.

Sin embargo, Bouwstra *et al.* (2010 a, b) observaron que la administración de un suplemento con vitamina E a vacas lecheras en período seco aumentó la incidencia de mastitis clínica postparto. Los autores indican que es clave la determinación de los niveles séricos de vitamina E previos a la suplementación, puesto que no está claro como interactúa esta vitamina con otros antioxidantes tras reaccionar con los radicales libres en un proceso, aparentemente, reversible en el sistema de regeneración de la vitamina E (VERS, *vitamin E regeneration system*), propuesto por Nwose *et al.* (2008).

Politis *et al.* (2004) observaron que la administración de vitamina E a vacas redujo el valor del RCS (hasta un 25% menos que el grupo control) y la concentración de plasmina (hasta un 30% menos que el grupo control), lo que mejoró las propiedades de coagulación de la leche. Estos autores también señalaron efectos positivos sobre los neutrófilos de los animales, puesto que incrementaron la actividad del plasminógeno y la producción de superóxido de estas células. En este estudio, la administración de vitamina E no tuvo efecto alguno sobre el contenido de lactosa, grasa y proteína.

Juniper *et al.* (2006) tampoco observaron diferencias ni en la ingestión de materia seca ni en la producción y composición de la leche (concentración de grasa, proteína y de lactosa) en respuesta a la administración de Se (0,27-0,40 mg/kg MS) en la dieta de vacas.

Sin embargo, un estudio realizado en cabras de la raza jonica, Tufarelli *et al.* (2011) comprobaron que los animales que recibieron un suplemento de vitamina E y

selenio presentaron una mayor producción de leche y una mayor concentración de grasa y proteína en ésta, mejorando también su coagulación. Lacetera *et al.* (1999), en un trabajo realizado con ovejas de raza sarda, observaron también un aumento en la producción de leche (entre un 38-54%) en respuesta a un suplemento de Se. También se pudo comprobar un incremento en la actividad de la enzima glutatión peroxidasa (GPx) de los corderos nacidos de madres que recibieron dicho suplemento, mientras que el RCS en las ovejas lactantes no fue modificado.

Guyot *et al.* (2007), en un estudio con vacas gestantes, de raza Azul Belga, que tenían niveles sanguíneos de selenio inferiores a los recomendados, observaron que en los animales a los que se les administró una mayor dosis de selenio aumentó considerablemente la concentración de este mineral en el calostro y en la leche, lo que se tradujo en una mejora del crecimiento de sus crías y una menor presencia de enfermedad en éstas durante las primeras dos semanas de vida.

Como cabría esperar, la administración de suplementos es más efectiva cuando los animales presentan deficiencias de vitamina E y de Se, mejorando sustancialmente los parámetros productivos tanto de las madres (producción de leche) como de sus crías (peso al nacimiento y ganancia diaria de peso) (Segerson *et al.*, 1986). Además, reduce la incidencia de mastitis clínicas en el rebaño (Giadinis *et al.* 2011).

Las propiedades antioxidantes de la vitamina E y del Se se reflejan en la estabilidad oxidativa de la leche al actuar como protectores de los ácidos grasos insaturados de cadena larga presentes en ella (*e.g.* C 18:1, C 18:2, C 18:3), ya que éstos son muy susceptibles a la oxidación (Clausen *et al.*, 2010; Palmquist *et al.*, 1993). Así, la presencia de vitamina E y Se en la leche evitarían la formación de productos de la oxidación lipídica (Havemose *et al.*, 2006), que provocan el olor a rancidez (Aardt *et al.*, 2005). Charmley *et al.* (1993), en un trabajo en el que administraron diferentes dosis de vitamina E y de Se a vacas en lactación, observaron que mejoró la estabilidad a la oxidación de la grasa láctea. Este efecto, no obstante, puede resultar afectado por la composición de la dieta de los animales (Nicholson *et al.* 1991)

Por otra parte, Liu *et al.* (2008), en un trabajo en el que se administró, a vacas lecheras, un suplemento de vitamina E y Se para evaluar el efecto de este tratamiento sobre la capacidad antioxidante, comprobaron que el nivel de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en plasma fue más bajo en las vacas que recibieron el suplemento. Además, la actividad de la enzima glutatión peroxidasa (GSH-Px) fue mayor en dichos animales, concluyendo que la adición de este suplemento a la dieta mejora sustancialmente la capacidad antioxidante de los animales.

Diferentes trabajos señalan que la vitamina E puede influir también en el perfil de ácidos grasos de la leche. Así, por ejemplo, Liu *et al.* (2008) observaron que la administración de un suplemento de vitamina E, a vacas en lactación, aumentó el porcentaje de ácidos grasos insaturados y disminuyó el de ácidos grasos saturados.

Algunos estudios refieren que la vitamina E disminuye la formación de isómeros *trans*-10 en el rumen (Pottier *et al.*, 2006; Kay *et al.*, 2005; Gaynor *et al.*, 1995), atenuando el síndrome MFD. De esta manera, cuando se administran a la dieta de los animales aceites vegetales y vitamina E, esta última modularía la biohidrogenación ruminal y mantendría, simultáneamente, la cantidad de grasa en la leche (Liu *et al.*, 2008; Kay *et al.*, 2005; Focant *et al.*, 1998; Charmley *et al.*, 1994). Otros estudios no apoyan este efecto de la vitamina E (Zened *et al.*, 2012), aunque parece que el momento de administración de dicha vitamina en relación con el tiempo en el que se administra el suplemento lipídico sí que podría influir (Pottier *et al.*, 2006).

La vitamina E también puede influir en el desarrollo, la función y la remodelación de la glándula mamaria. En este sentido, Colitti *et al.* (2000) realizaron un trabajo en ovejas para estudiar el efecto de la suplementación con vitamina E sobre la involución de la glándula mamaria y comprobaron que la vitamina E puede regular la expresión de la proteína bcl-2 (inhibidor de apoptosis) pero no tiene efectos sobre la apoptosis una vez que ésta ha comenzado.

McIntyre *et al.* (2000), en un estudio realizado con células epiteliales mamarias, aisladas de ratones, observaron que la administración de tocoferoles y tocotrienoles desarrollan una actividad proliferativa y antiapoptótica. Otro trabajo realizado en conejos, demostró que el α -tocoferol incrementa los niveles mitocondriales de Bcl-2, disminuye los niveles de Bax y atenúa la activación de las caspasas -9 y -3; el efecto de la vitamina E sobre estos marcadores, son una fuerte evidencia que respalda el papel de esta vitamina en la prevención de la apoptosis por estrés oxidativo (Sylvester, 2007).

Chauhan *et al.* (2014), en un estudio realizado en ovejas, expuestas a estrés calórico y alimentadas con una mezcla adicionada con un suplemento de vitamina E y Se por encima de sus requerimientos, observaron que la alimentación con un suplemento antioxidante (Vit. E + Se, 100 UI y 1,20 mg/kg MS) puede modular la expresión génica, en músculo, de proteínas relacionadas con el choque térmico y algunas citoquinas proinflamatorias (TN- κ , TNF- α).

Este papel de la vitamina E, unido a su capacidad antioxidante, ha determinado la realización de estudios para evaluar su utilización en las terapias contra el cáncer (Lippman *et al.*, 2009; Kline *et al.*, 2007; Sylvester, 2007; Lonm *et al.*, 2005; Knekt *et al.*, 1991). Estas propiedades podrían también influir en los procesos que acontecen en la glándula mamaria como consecuencia de cambios en la frecuencia de ordeño, atenuando o potenciando su efecto.

3.11 Ordeño mecánico y fisiología del ordeño.

El ordeño mecánico es uno de los aspectos fundamentales de la producción de leche de oveja por su influencia en diversos factores que condicionan la viabilidad económica de la explotación. La implantación del ordeño mecánico ha resuelto, parcialmente, factores como la productividad laboral, permitiendo que la realización del trabajo se lleve a cabo en condiciones más favorables para los ganaderos (Buxadé, 1996). Además, promueve la modernización de la empresa y facilita la organización del trabajo en la explotación, permitiendo realizar el control de resultados, elementos, que en suma, provocan la mejora en la rentabilidad económica (Buxadé, 1996).

La implantación del ordeño mecánico exige un nivel productivo alto en las ovejas para que se pueda soportar la inversión económica que supone la adquisición del equipamiento necesario (Fernández *et al.*, 1995; Such, 1990).

Además, la mecanización del ordeño precisa de una buena configuración anatómica de la ubre de las ovejas, ya que, en general, una inadecuada morfología mamaria dificulta el ordeño y favorece la aparición de patologías en la glándula mamaria (Rovai *et al.*, 2008; Fernández *et al.*, 1995; Labussierè, 1988; Gallego *et al.*, 1983).

3.11.1 Aptitud al ordeño.

La aptitud al ordeño, según Buxadé (1996), Such (1990) y Fernández (1985), puede definirse como: “la capacidad de un animal para liberar la mayor parte de la leche contenida en la ubre, ante el estímulo del ordeño mecánico, en el menor tiempo posible y con el menor número de intervenciones manuales por parte del ordeñador”.

Labussierè, (1983) señala que es necesario considerar una serie de aspectos relacionados con la valoración de la *aptitud al ordeño*, entre los que destacan:

- a) la relación de los parámetros anatómicos y morfológicos de la ubre con la adaptación a la máquina de ordeño y

b) la eyección y fraccionamiento de la leche en la ubre durante el ordeño.

Estos aspectos fueron ampliamente discutidos en la memoria del ``Proyecto FAO-M4'', que consistió en la elaboración de un protocolo internacional para la evaluación de la aptitud al ordeño de las principales razas de ovejas lecheras del Mediterráneo (Labussière, 1983, 1988).

3.11.2 Relación entre los parámetros anatómicos y morfométricos de la ubre y su adaptación al ordeño.

Mikus (1979, 1969, 1968) indica que la ubre ideal (*udder machine*) sería aquella que posee pezones verticales y de tamaño medio, sin demasiada altura de las cisternas mamarias. En este sentido, Marnet y McKusick, (2001) destacan que la eficiencia del ordeño puede ser mejorada si existe una homogeneidad en la morfología de la ubre y de los pezones, puesto que los animales con grandes cisternas son capaces de almacenar una mayor cantidad de leche fuera de los alvéolos, condición que facilitaría una mejor eyección de la leche entre ordeños. Los mismos autores también señalan que los animales con pezones en posición más vertical presentan, durante el ordeño, menos interrupciones en el reflejo de eyección láctea.

En este sentido, Fernández (1985) comprobó que hay una peor aptitud para el ordeño en razas con mayor grado de especialización, como la lacaune y assaf, y que han sido sometidas a programas de selección genética orientados sólo al aumento de la producción, sin tener en cuenta los caracteres de la morfología mamaria de los animales. Por tanto, Fernández *et al.* (1995) recomendaron la inclusión de caracteres morfológicos (tales como medidas de la cisterna, posición, ángulo de inserción, longitud y anchura de los pezones) relacionados con la aptitud al ordeño en los programas de selección genética para la mejora de razas de ovino lechero.

Así, de la Fuente *et al.* (1996) propusieron un método de valoración lineal para la evaluación de la glándula mamaria de las ovejas de leche con parámetros similares a los que se emplean en el vacuno de la misma aptitud. Este método se basa en una escala ascendente de 1 a 9, donde 5 es la calificación media. Los principales caracteres considerados por estos autores con importancia para la *aptitud al ordeño* son: la profundidad e inserción de la ubre, el tamaño y la verticalidad de los pezones y la conformación global de la ubre.

No obstante, es necesario destacar que al relacionar los caracteres lineales de la ubre con los parámetros productivos (producción y composición de la leche) se obtuvieron

correlaciones negativas, lo que dificulta la selección simultánea de ambos caracteres (Fernández, 1995).

De hecho Legaz *et al.* (2011) comprobaron, en ovejas de raza assaf, que existe una diversidad de caracteres morfológicos de la ubre que está relacionada con la distribución geográfica de los animales y no con el estándar racial. Esta diversidad morfométrica podría ser debida, en gran parte, a la absorción de las razas autóctonas mediante el cruzamiento con animales de la raza assaf.

Finalmente, El-Zarei (2005) y Gutiérrez-Gil *et al.* (2008), mediante secuenciación de ADN, por la técnica de microsatélite para la detección de QTLS (quantitative traits loci) responsables de la morfología mamaria y la producción láctea, identificaron algunos caracteres en las siguientes regiones genómicas:

- Ángulo de pezones (cromosoma 7 y 8).
- Tamaño de pezones (cromosoma 8).
- Profundidad de la ubre (cromosoma 6).
- Conformación global de la ubre (cromosoma 4).

Gutiérrez-Gil *et al.* (2014) ha corroborado estos hallazgos en un estudio reciente realizado en diez razas de ovino diferentes, la mitad de ellas especializadas en la producción de leche y la otra mitad dedicadas a la producción de carne (chios, churra, comisana, east fresian brown, laucane lechera, australian poll merino, laucane de carne, ojalada, sakiz y finnsheep).

3.11.3 Eyección de la leche.

El mecanismo de eyección de la leche consiste en el vaciado del compartimento alveolar de la glándula mamaria. Este mecanismo se produce a través de un reflejo neuroendocrino mediante el que se liberan distintas hormonas: oxitocina, prolactina y adrenocorticotropina. Sin embargo, solamente la oxitocina posee un papel relevante en la eyección de la leche (Marnet *et al.*, 1998; Bruckmaier *et al.*, 1997; Labussière, 1988).

El estímulo nervioso que recibe la oveja, proviene del cordero, del operador o de la máquina de ordeño y alcanza la médula espinal, llegando, a través de ella, hasta el hipotálamo, que es responsable de la síntesis de la oxitocina (Crowley y Armstrong, 1992). Esta hormona se almacena en la hipófisis y se libera tras la llegada del estímulo correspondiente, pasando al torrente sanguíneo y a la glándula mamaria. La oxitocina provoca la contracción de las células mioepiteliales que rodean a los alveolos (Soloff *et al.*,

1982), los cuales se vacían pasando la leche hacia los conductos galactóforos, a través de los cuales llega hasta la cisterna de la glándula, donde queda almacenada para ser extraída por el amamantamiento del cordero o el ordeño (Bruckmaier *et al.*, 1998; Cross *et al.*, 1977; Folley *et al.*, 1965). Dependiendo de la especie, todo este proceso puede tener una duración de entre 16 y 29 segundos (Labussière, 1993).

La eyección de la leche alveolar causa un rápido incremento de la presión en la cisterna (Bruckmaier *et al.*, 1996), que aumenta su tamaño (Ramella, 2002; Bruckmaier *et al.*, 1992). Sin embargo, la cavidad cisternal tiene un espacio limitado y no toda la leche alveolar puede ser eyectada si no se hace un vaciado simultáneo de la ubre. Por lo tanto, una parte de la leche alveolar es eyectada durante el amamantamiento o el ordeño (Bruckmaier *et al.*, 1997, 1993).

La inhibición total o parcial del reflejo de eyección de la leche puede ser originada a dos niveles (Bruckmaier, 2005): el primero de ellos, es la ***inhibición central*** que consiste en un fallo en la liberación de oxitocina desde la pituitaria posterior y, la segunda, una ***inhibición periférica*** que se caracteriza por la ausencia de efecto de la oxitocina en la glándula mamaria. La inyección de oxitocina exógena permite diferenciar entre ambos mecanismos de inhibición. En condiciones normales de ordeño, la inhibición periférica es menos importante que la inhibición central del reflejo de la eyección (Wellnitz y Bruckmaier, 2001).

La inhibición del reflejo de eyección de la leche ha permitido perfeccionar la medida del fraccionamiento de la leche en la ubre (cisternal y alveolar) (Castillo, 2008; Ayadi, 2003; Rovai, 2001; Bruckmaier *et al.*, 1996). Existen diferentes métodos para causar esta inhibición de manera precisa, entre los que podemos destacar: el ordeño de los animales en ambientes desconocidos, que causan situaciones de estrés (Bruckmaier *et al.*, 1997), la inyección de catecolaminas o estimuladores de los receptores α -adrenérgicos, como adrenalina y fenilefrina (Inderwies *et al.*, 2003; Nudda *et al.*, 2000; Davis *et al.*, 1998; Cross, 1955) y el uso de Atosiban®, péptido sintético que actúa como un bloqueador de los receptores de la oxitocina (McAnulty *et al.*, 2004; Goodwin *et al.*, 1996, 1995, 1994). Éste último ha sido probado satisfactoriamente en ovejas (Rovai *et al.*, 2008; McKusick *et al.*, 2002), cabras (Lollivier *et al.*, 2005), vacas (Caja *et al.*, 2004; Ayadi *et al.*, 2003) y búfalas (Thomas *et al.*, 2004).

3.11.4 Fraccionamiento de la leche en la ubre.

El almacenamiento de la leche en la glándula mamaria se explica, como se ha mencionado anteriormente, mediante un modelo de dos compartimentos anatómicos: la leche alveolar y la leche cisternal (Marnet y Komara, 2008; Akers, 2002; Peaker, 1977, Labussière y Martinet, 1964; Turner, 1952).

En las ovejas lecheras el porcentaje de la leche cisternal oscila entre el 25 y el 70%, dependiendo de la raza (Castillo, 2008; Rovai, 2001; Caja *et al.*, 2000), siendo superior al 50% en la mayoría de las razas lecheras. Además, la proporción de leche *cisternal:alveolar* aumenta conforme avanza la lactación y el número de lactaciones, tanto en vacas (Wilde *et al.*, 1995) como en ovejas (Rovai *et al.*, 2002).

Rovai (2001) y Ramella (2000), en ovejas de leche, observaron que los animales con altos niveles de producción presentaron una elevada proporción de leche cisternal y una mejor capacidad para almacenar mayores volúmenes de leche que las ovejas con una menor producción láctea.

Gelasakis *et al.* (2012), Castillo (2008) y Rovai *et al.* (2002) en ovejas, Salama (2005) en cabras y Pfeilsticker *et al.* (1996) y Bruckmaier *et al.* (1994) en vacas, observaron que los animales multíparos tienen mayor capacidad cisternal que los primíparos; estos datos demuestran un crecimiento de la cisterna conforme avanza la edad de los animales. Además, cabe señalar, que se ha observado un aumento en la proporción cisternal de la leche conforme aumenta la lactación, debido al descenso de la producción y una menor cantidad de leche almacenada en el espacio alveolar (Stelwagen *et al.*, 1997; Knight *et al.*, 1994).

3.12 Frecuencia de ordeño.

El intervalo de tiempo entre cada ordeño (frecuencia) ha sido un tema de estudio científico durante muchos años. El resultado de los trabajos realizados, en este ámbito, ha proporcionado un amplio conocimiento en lo que respecta a la evolución del estado fisiológico de la glándula mamaria sometida a diferentes frecuencias de ordeño y su respuesta en la producción de leche, así como los cambios que ocurren tanto a nivel celular como molecular (Stelwagen *et al.*, 2013).

En la mayoría de los sistemas modernos de producción de leche de vaca y de oveja, los animales son ordeñados, generalmente, dos veces al día (TDM). Sin embargo, en los sistemas de vacuno los animales son ordeñados con una mayor frecuencia, que puede

oscilar desde 3 hasta 6 ordeños al día (Grala *et al.*, 2014; Stelwagen *et al.*, 2013; Soberon *et al.*, 2010; Hale *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2002). Estos sistemas de producción con altas frecuencias de ordeño se han generalizado debido al avance de los sistemas robotizados (Hovinen *et al.*, 2011).

La reducción de la frecuencia a un ordeño diario (ODM), por el contrario, es una práctica menos común en los sistemas de producción lechera intensiva. No obstante, en la última década, se ha planteado como una estrategia para realizar en las vacas de alta producción y durante los períodos críticos de estrés metabólico (balance energético negativo, NEB) (Grala *et al.*, 2014, Stelwagen *et al.*, 2013). Así, se ha observado, en este tipo de vacas, que un ordeño al día puede disminuir el estrés calórico y los casos de laminitis (Kendall *et al.*, 2008; Gleeson *et al.*, 2007).

Por otra parte, la reducción de la frecuencia de ordeño supone un ahorro considerable en los costes de mano de obra dedicada a esta tarea, que puede representar hasta el 55% del trabajo realizado en la explotación (Stockdale, 2006; Marnet y Mckusick, 2001; Culotta *et al.*, 1988). Existen otras razones que justifican la implantación de un sistema con un ordeño al día entre las que destacan: la autosuficiencia de la explotación, la flexibilidad laboral y la mejora en los parámetros reproductivos (Ripoll-Bosch *et al.*, 2014; Stelwagen *et al.*, 2013; Ripoll-Bosch *et al.*, 2012; Marnet y Mckusik, 2001; Haenlein, 2001).

En sistemas de producción de leche de ovino, la implantación de un régimen de ordeño de una vez al día también puede ser aprovechado para ahorrar alimento mediante el ajuste de la dieta, utilizando la capacidad biológica de los animales para optimizar la movilización de las reservas corporales durante el periodo de ordeño (González-García *et al.*, 2015). Además, en las explotaciones de leche extensivas, en las que el aprovechamiento de los pastos son la base fundamental para la alimentación, la implantación de un ordeño al día puede ser suficiente para satisfacer su objetivo productivo (Bernués *et al.*, 2011; Clark *et al.*, 2006; Rémond *et al.*, 2005), ya que se reducen los costes por animal en el concepto de alimentación (Ripoll-Bosch *et al.*, 2012), se reduce el tiempo empleado en el movimiento del ganado y el mayor tiempo disponible se puede emplear para aumentar la diversificación de la producción en este tipo de explotaciones, lo que mejora la rentabilidad de la empresa (Ripoll-Bosch *et al.*, 2014).

Los sistemas de explotación en los que se realiza un ordeño al día tienen como principal desventaja las pérdidas en la producción de leche. Éstas se estiman, como media,

en un 22% en vacas (Phyn *et al.*, 2010; Davis *et al.*, 1999), un 23% en cabras (Salama *et al.*, 2003; Wilde y Knight, 1990; Papachristoforou *et al.*, 1982) y un 32% en ovejas (Prieto *et al.*, 2013; Nudda *et al.*, 2002; Negrao *et al.*, 2001; Morag, 1968), si bien la respuesta puede variar dependiendo de múltiples factores como se analizará posteriormente. También se ha observado un efecto negativo sobre la duración y la persistencia de la lactación, dependiendo, entre otros factores, de la etapa de ésta, de la raza y del número de partos del animal (Stelwagen *et al.*, 2013).

3.12.1 Relación con la estructura anatómica y el estado sanitario de la ubre.

La capacidad cisternal es el elemento anatómico que más influye en la respuesta a la modificación de la frecuencia de ordeño (Castillo *et al.*, 2008; Marnet y Komara, 2008; McKusick *et al.*, 2002; Davis *et al.*, 1999, 1998; Knight *et al.*, 1994; Labussière, 1988; Casu *et al.*, 1972).

La ecografía, técnica de exploración no invasiva, ha sido utilizada para estudiar la estructura interna de la glándula mamaria, principalmente el área cisternal, en las distintas especies de mamíferos rumiantes: ovino (Castillo *et al.*, 2008; Nudda *et al.*, 2000; Ruberte *et al.*, 1994; Bruckmaier *et al.*, 1992), caprino (Salama *et al.*, 2004, Bruckmaier *et al.*, 1992) y bovino, tanto en vacas (Szencziová *et al.*, 2013; Strzetelski *et al.*, 2005; Ayadi *et al.*, 2003; Bruckmaier *et al.*, 1992) como en búfalas (Thomas *et al.*, 2004).

Así, y mediante la utilización de dicha técnica, se ha podido estudiar, a diferentes intervalos de ordeño, el almacenamiento de leche y los cambios que ocurren en la ubre tras la eyección de ésta en vacas (Caja *et al.*, 2004, Ayadi *et al.*, 2003), en cabras (Salama *et al.*, 2004) y en ovejas (Castillo *et al.*, 2008).

En la especie ovina se ha observado que la acumulación de leche, como consecuencia del aumento del intervalo entre ordeños, provoca un incremento lineal en las medidas del área cisternal (Castillo *et al.*, 2008; Ramella, 2002; Bruckmaier *et al.*, 1997) desde el último ordeño y hasta las 16 horas post-ordeño en ovejas de raza manchega y assaf (Castillo *et al.*, 2008; Ramella, 2002) y hasta las 20 horas en ovejas de raza lacaune (Castillo *et al.*, 2008). Transcurridos estos periodos de tiempo las medidas tienden a estabilizarse, lo que indica, la capacidad física de la ubre para almacenar la leche entre cada ordeño.

Como es lógico, el fraccionamiento de la leche entre el espacio cisternal y el alveolar también varía con el intervalo entre ordeños, aunque depende, en gran medida, de

la especie, raza, edad, el estado de la lactación y el nivel de producción. (Gelasakis *et al.*, 2012; Hervás *et al.*, 2006; Capote *et al.*, 2006; Salama *et al.*, 2004; Davis *et al.*, 1998; Bruckmaier *et al.*, 1997). Así, una mayor capacidad de almacenamiento de leche en la cisterna de la ubre podría reducir los efectos negativos que supone la supresión de un ordeño, puesto que tal reducción provoca un deficiente drenaje alveolar que, a su vez, origina un incremento en la presión intramamaria (Marnet y Komara, 2008; Davis *et al.*, 1998; Peaker, 1980). De hecho, las diferencias en el tamaño cisternal entre las razas awassi, merina y sarda se han argumentado para explicar su distinta respuesta a cambios en la frecuencia de ordeño (Nudda *et al.*, 2002).

En sistemas de producción lechera con altas frecuencias de ordeño (3-6 veces al día) se ha observado una relación positiva entre la frecuencia de ordeño y la reducción en el RCS (Smith *et al.*, 2002; Kelly *et al.*, 1998).

Dahl *et al.* (2004) realizaron un estudio, en vacas de leche, para evaluar el efecto de la frecuencia de ordeño sobre la salud de la ubre, estimado por el RCS durante los primeros 21 días de lactación, y comprobaron que las vacas ordeñadas 6 veces al día tuvieron una mayor resistencia a las infecciones de la glándula mamaria que las ordeñadas 3 veces al día. Incluso constataron que el bajo RCS se mantiene durante el resto de la lactación, al pasar a 3 ordeños diarios, aunque este efecto es más marcado durante los primeros 21 días de ordeño en los que las vacas fueron ordeñadas 6 veces al día. Estos resultados confirman las observaciones que ya habían sido realizadas por Henshaw *et al.* (2000) y Bar-Peled *et al.* (1995) y, además, demuestran que la persistencia del efecto a lo largo de la lactación puede lograrse con un periodo más corto de mayor frecuencia de ordeño (21 días) comparado con los 42 días que habían señalado estos últimos autores.

Sin embargo, Wall y Mc Fadden (2008), en una revisión sobre este tema, señalan que la bibliografía recoge también resultados contradictorios, que podrían deberse a las condiciones de manejo de los animales. En este sentido, Soberon *et al.* (2011), en condiciones habituales de manejo de las explotaciones, comprobaron que al incrementar la frecuencia de ordeño de 2 a 4 veces al día, durante 21 días y en la primera etapa de lactación, no se modificó el RCS entre los diferentes grupos de vacas, resultados que concuerdan con los obtenidos en otros trabajos (Soberon *et al.*, 2010; Loisellet *et al.*, 2009; Wall y McFadden, 2007; Hale *et al.*, 2003; Bar-Peled *et al.*, 1995).

La reducción de la frecuencia de ordeño, de 2 a un ordeño al día, por su parte, puede tener efectos negativos sobre la salud de la glándula mamaria. Este hecho podría

estar relacionado, entre otros factores, con la pérdida de leche a través de los pezones provocada por la distensión de la ubre, lo que favorece que los gérmenes patógenos atraviesen las barreras físicas de defensa que representa el esfínter del pezón (Gleeson *et al.*, 2007; Mavrogianni *et al.*, 2006; Rémond *et al.*, 2002).

Numerosos estudios en los que se redujo la frecuencia de ordeño a una vez al día han puesto de manifiesto que el recuento de células somáticas es mayor en los sistemas de un ordeño al día (ODM) comparados con los que realizan dos ordeños al día (TDM), incluso cuando se elimina el efecto de la concentración de la leche debido a la disminución en la producción (Stelwagen *et al.*, 2013; Clark *et al.*, 2006; O'Brien *et al.*, 2005; Kelly *et al.*, 1998; Stelwagen y Lacy-Hulbert *et al.*, 1996; Holmes *et al.*, 1996). Además, en un trabajo realizado en vacas se observó una respuesta tardía (30 días posteriores a la reducción de la frecuencia de ordeño) en el incremento del RCS, como consecuencia de la reducción de la frecuencia de ordeño, sin que se pudiera determinar cuál fue la causa que podría explicar este tipo de respuesta (Rémond *et al.*, 2004).

No obstante, en vacas de leche ordeñadas una vez al día, el RCS no parece estar relacionado ni con un incremento en los casos de mastitis clínica ni con la aparición de nuevas infecciones intramamarias (Lacy-Hulbert *et al.*, 2005; Rémond *et al.*, 2005). En este sentido, Holmes *et al.* (1996) tampoco observaron diferencias en la prevalencia de los principales patógenos causantes de mastitis.

Por lo tanto, el aumento en el RCS puede ser debido a una leve respuesta inflamatoria, que provocaría una elevación en el número de los polimorfonucleares presentes en leche (Kelly *et al.*, 1998; Stelwagen *et al.*, 1996) y la activación de la respuesta inmunitaria inespecífica (Wheeler *et al.*, 2012; Stelwagen *et al.*, 2011), que produciría, entre otros efectos, un incremento de la actividad de la plasmina y el plasminógeno en leche (Kelly *et al.*, 1998).

Kamote *et al.* (1994) comprobaron que el efecto de la reducción de la frecuencia de ordeño sobre el RCS es considerablemente mayor en las vacas que parten con un elevado RCS antes de comenzar el cambio de la frecuencia de ordeño. Este hecho, sugiere que el incremento del RCS, asociado a un ordeño al día, puede ser debido más a factores relacionados con el manejo que asociados con procesos infecciosos (Stelwagen *et al.*, 2013).

En relación con la especie ovina, Hervás *et al.* (2006), en ovejas de raza assaf, observaron que dos días después de la supresión semanal de uno o dos ordeños se produjo

un ligero incremento en el RCS (5%), aunque los valores obtenidos estuvieron por debajo de los niveles considerados indicativos de una posible patología mamaria. Resultados similares, en el RCS, fueron obtenidos por Castillo *et al.* (2008) al suprimir dos ordeños semanales en ovejas de raza manchega y lacaune.

McKusick *et al.* (2002) realizaron un trabajo con ovejas de raza east friesland y observaron que cuando se hicieron ordeños con intervalos de 4, 8 y 12 horas no existieron diferencias en el RCS entre las fracciones de leche cisternal y alveolar. Sin embargo, cuando el intervalo entre ordeños fue de 16, 20 y 24 horas el RCS se incrementó en la fracción de leche alveolar.

Prieto *et al.* (2013) en un estudio efectuado en ovejas de raza assaf, que fueron sometidas a tres períodos experimentales (P_1) con una duración de 21 días cada uno y diferentes frecuencias de ordeño (P_1 : TDM, P_2 :ODM, P_3 :TDM), siendo el segundo período en el que se suprimió un ordeño diario en la mitad de la ubre, no encontraron aumentos significativos en el RCS debidos a la frecuencia de ordeño.

Sin embargo, otros trabajos, llevados a cabo en ovejas de raza assaf, sarda y awassi, en los que se suprimió un ordeño diario de manera unilateral, encontraron un incremento en el RCS en la glándula que fue ordeñada una sola vez al día (Nudda *et al.*, 2002).

Torres *et al.* (2013), en un experimento con cabras de tres razas (majonera, tinerfeña y palmera), a las que se redujo la frecuencia de ordeño (de 2 a 1 ordeño diario a los 128 ± 8 días de lactación) unilateralmente y durante 5 semanas, no observaron ningún efecto de la frecuencia de ordeño sobre la morfología mamaria, pero en las cabras de raza tinerfeña los valores del RCS fueron más altos que en las cabras de las otras dos razas. En dicho trabajo, se destaca que no hubo casos de mastitis en ninguno de los animales durante el período experimental, concluyendo que en las razas estudiadas es posible establecer sistemas de un ordeño al día sin efectos negativos sobre la salud de la ubre. Resultados análogos fueron obtenidos por Salama *et al.* (2003) en cabras de raza murciano-granadina.

3.12.2 Relación con la producción y composición de la leche.

La producción de leche en vacas, que pasaron de 2 a 3 ordeños al día, aumenta de forma variable, pudiendo oscilar entre el 5 y el 20% dependiendo de si la intensificación de la frecuencia de ordeño se realiza desde el inicio de la lactación o a partir de la mitad de la misma (Phyn *et al.*, 2010). En este sentido, numerosos trabajos han comprobado que el

nivel de la respuesta es mayor cuando aumenta el período durante el cual se aplica una mayor frecuencia de ordeño (Wall y McFadden, 2008; Stockdale, 2006; Erdman y Varner, 1995).

Cuando el incremento de la frecuencia de ordeño se realiza durante toda la lactación el aumento en la producción oscila entre un 6 y un 26% (Phyn *et al.*, 2010; Wall y McFadden, 2008; Allen *et al.*, 1986; DePeters *et al.*, 1985; Amos *et al.*, 1985).

Según Bar-Peled *et al.* (1995) se puede obtener un incremento de un 21% en la producción de leche cuando se aumenta la frecuencia de ordeño de 3 a 6 veces al día durante la lactación temprana, aunque, aparentemente, no existe una relación positiva entre el aumento en la producción y el nivel previo de ésta en el momento del cambio de la frecuencia de ordeño, ya que el incremento absoluto en la producción láctea parece tener un comportamiento constante y se estima que es de 3,5 kg cuando se pasa de 2 a 3 ordeños diarios y de 4,9 kg al pasar de 2 a 4 ordeños al día (Erdman y Varner, 1995).

Es importante destacar que un incremento de la frecuencia de ordeño al inicio de la lactación y durante un corto período de tiempo también puede producir un aumento de la producción a lo largo de la lactación completa (Wall *et al.*, 2006; Dahl *et al.*, 2004; Hale *et al.*, 2003). Sin embargo, el tiempo exacto y la frecuencia de ordeño que hacen que este efecto sea duradero en el tiempo aún no están claramente establecidos (Phyn *et al.*, 2010).

Así, algunos estudios han observado que durante las tres primeras semanas de lactación la glándula mamaria tiene una mayor capacidad de respuesta al incremento de la frecuencia de ordeño. Algunos estudios sugieren que el aumento de 2 a 4 y de 3 a 6 ordeños al día, durante un período de tiempo no inferior a dos semanas, es suficiente para inducir un efecto a largo plazo en la producción de leche (Phyn *et al.*, 2010; Wall y McFadden, 2007; Wall *et al.*, 2006; Dahl *et al.*, 2004; Hale *et al.*, 2003).

Sin embargo, no todos los trabajos realizados han demostrado que el efecto en la producción de leche persista tras el aumento en la frecuencia de ordeño. De hecho, Soberon *et al.* (2010) observaron un aumento de la producción tras incrementar la frecuencia de 2 a 4 ordeños en vacas durante 3 semanas. Este incremento, sin embargo, no se mantuvo tras pasar, de nuevo, a dos ordeños diarios. Resultados similares fueron obtenidos por Nørgaard *et al.* (2005), quienes constataron un aumento en la producción de leche (alrededor del 11%) cuando las vacas fueron ordeñadas 3 veces al día durante las primeras 8 semanas después del parto; efecto que desapareció cuando se volvió, otra vez, a dos ordeños al día.

Phyn *et al.* (2010) indican que, en todo caso, el incremento de la producción de leche es mayor si la frecuencia de ordeño supera los 4 ordeños diarios durante la lactación temprana.

En lo que respecta a la especie ovina, existe poca información en relación con el efecto del aumento de la frecuencia de ordeño sobre la producción de leche, posiblemente, por las dificultades que representa su implantación en las explotaciones. No obstante, algunos trabajos en los que se evaluó el efecto de tres ordeños diarios sobre la producción, al inicio y a la mitad de la lactación, constataron un aumento de la misma de entre un 12 y un 35% (Negrao *et al.*, 2001; López *et al.*, 1995; Gargouri *et al.*, 1993; Labussière *et al.*, 1974). Negrao *et al.* (2001) observaron que cuando la frecuencia de ordeño fue aumentada a 4, 5 y 7 veces al día los incrementos fueron del 37, 26 y 38%, respectivamente, destacando que el aumento en la producción no es significativamente mayor que el que se obtiene con 3 ordeños diarios.

La reducción de la frecuencia de ordeño a una vez al día provoca, en general, una disminución en la producción de leche en vacas (Stelwagen *et al.*, 2013; Phyn *et al.*, 2010; Davis *et al.*, 1999), cabras (Torres *et al.*, 2013; Salama *et al.*, 2003; Wilde y Knight, 1990; Papachristoforou *et al.*, 1982) y ovejas (Prieto *et al.*, 2013; Castillo *et al.*, 2009; Nudda *et al.*, 2002; Negrao *et al.*, 2001; Morag, 1968).

En vacas explotadas bajo el sistema de ODM, durante períodos cortos, las pérdidas en la producción de leche varían considerablemente, pudiendo oscilar entre un 7% en la etapa final de lactación (Stelwagen *et al.*, 1994) hasta un 40% al inicio de la misma (Rémond *et al.*, 1999). En la especie ovina, las pérdidas en la producción son similares a las del vacuno, siendo también más marcadas en la primera etapa de lactación. Así, la reducción media al inicio de la lactación es del 22% (Negrao *et al.*, 2001; Papachristoforou *et al.*, 1982; Labussière *et al.*, 1974; Morag, 1968) mientras que a la mitad y hasta el final de la lactación es del 17% (Knight y Goslin, 1995; Papachristoforou *et al.*, 1982). En general, en ovejas con bajos niveles de producción, las pérdidas por el efecto de un ordeño al día son mayores (Papachristoforou *et al.*, 1982), aunque existen diferencias según la raza estudiada (Nudda *et al.*, 2002; Labussière, 1983).

Phyn *et al.* (2010) y Davis *et al.* (1999) en sendas revisiones bibliográficas, que incluyeron más de 30 trabajos en los que se estudió el efecto de un ordeño al día, durante períodos cortos de tiempo, sobre la producción de leche, afirman que las pérdidas en la producción de leche son, como media, de un 22%. Las vacas que formaron parte de dichos estudios pertenecían a diferentes razas, en distintas etapas de lactación y con un número

variable de partos. Las citadas revisiones también analizaron otros estudios realizados bajo condiciones más controladas y en los que se efectuó un ordeño al día durante toda la lactación. Tales trabajos comprobaron que las pérdidas en la producción tuvieron un rango que va del 22 al 50%, con una media del 34%. Así, el ordeño de una vez al día durante toda la lactación provoca que la disminución en la producción sean mucho mayor (Kendall *et al.*, 2008; Clark *et al.*, 2006; Rèmond *et al.*, 2004). Además, el ordeño una vez al día puede acortar la duración de la lactación, efecto que contribuiría a acentuar las pérdidas en la producción de leche (Clark *et al.*, 2006; Hickson *et al.*, 2006).

Kendall *et al.* (2008) y Clark *et al.* (2006) señalan que para paliar las pérdidas en la producción de leche a nivel individual, y poder mantener el sistema de ODM a lo largo de toda la lactación, es necesario aumentar el número de animales de la explotación. Sin embargo, este tipo de acciones sólo puede aplicarse en los sistemas de explotación donde no exista una limitación en la disponibilidad de alimentos (Armstrong y Ho, 2009), ya que una alimentación deficiente de los animales contribuiría a aumentar las pérdidas en la producción de leche (Kay *et al.*, 2011; Delamaire *et al.*, 2006). Además, hay que tener en consideración el espacio en la explotación para poder aumentar el número de animales (Stelwagen *et al.*, 2013).

Por otra parte, una alternativa para compensar las pérdidas individuales en la producción de leche asociadas con el ODM podría ser la administración de somatotropina bovina (bST), tratamiento no autorizado en los países de la UE (Stelwagen *et al.*, 1994; Carruthers *et al.*, 1991).

La composición de la leche obtenida con el empleo de altas frecuencias de ordeño no presenta, en general, cambios importantes respecto a la composición de la leche obtenida de dos ordeños diarios (Phyn *et al.*, 2010; Wall y McFadden, 2008). Sin embargo, algunos autores han obtenido resultados que indican una disminución en el porcentaje de grasa y de proteína (Patton *et al.*, 2006; Dahl *et al.*, 2004; Klei *et al.*, 1997). Wall y McFadden (2008) atribuyen estos resultados contradictorios al momento en el que se realiza el muestreo para la determinación de la composición química de la leche.

No obstante, un estudio reciente (Lindman, 2015), en vacas lecheras, ha puesto de manifiesto que el perfil de ácidos grasos puede ser afectado por la frecuencia de ordeño, aumentando el contenido de C4:0 y disminuyendo el de C12:0 y C18:3 (n-6) cuando las vacas pasan de 2 a 4 ordeños diarios. Además, la autora apunta que también podría haber modificaciones en el tamaño del glóbulo de grasa.

La reducción de la frecuencia de ordeño de 2 a 1 ordeño también altera la composición de la leche (Stelwagen *et al.*, 2013), originando un aumento en el porcentaje de proteína y una disminución en el porcentaje de lactosa en vacas, siendo más variable el efecto sobre el porcentaje de grasa (Stelwagen *et al.*, 2013; Phyn *et al.*, 2010; Davis *et al.*, 1999).

La composición de la leche de oveja obtenida de ODM presenta un comportamiento similar al que se ha observado en vacas. De hecho, los resultados obtenidos por Castillo *et al.* (2008), en ovejas de raza manchega y lacaune, y Hervás *et al.* (2006), en ovejas de raza assaf, demuestran un ligero incremento en el contenido de grasa y de proteína, así como un descenso en el contenido de lactosa en la leche de los días posteriores (2-3 días) a la supresión de uno o dos ordeños semanales, retornando todos los parámetros estudiados a los valores basales cuando se volvió a realizar dos ordeños diarios.

Prieto *et al.* (2013), en ovejas de raza assaf a las que se redujo la frecuencia de ordeño diarios de 2 a 1 durante 21 días, observaron un incremento en el contenido de proteína y una reducción en el contenido de lactosa. Dichos cambios en la composición de la leche desaparecieron cuando las ovejas fueron reintroducidas a un sistema de dos ordeños al día. En el mismo sentido, Nudda *et al.* (2002) comprobaron que, la disminución de la frecuencia de ordeño (ODM), durante un período corto en ovejas de razas sarda, awassi y merina, causó un aumento de la concentración de grasa de 6,86 a 7,48% en la raza awassi y de 7,67 a 8,31% en las ovejas de raza merina. Por su parte, el porcentaje de proteína de la leche aumentó en las tres razas de ovejas estudiadas.

El incremento del contenido de grasa en la leche cuando se emplea el régimen ODM se ha relacionado con variaciones en la actividad enzimática (Farr *et al.*, 2002) y la expresión de genes (Grala *et al.*, 2011) responsables de la síntesis de grasa en la glándula mamaria. Sin embargo, es más probable que el incremento en el contenido de grasa en la leche obtenida por ODM sea consecuencia de un efecto de concentración debido al bajo volumen de leche producido (Stelwagen *et al.*, 2013). De hecho, se ha comprobado que durante ODM la extracción, desde la sangre, de ciertos precursores séricos (ej. glucosa, acetato) para la síntesis lipídica está disminuida (Guinard-Flament *et al.*, 2007). Aún así, el aumento de la concentración de grasa no suele ser suficiente para compensar la disminución en el volumen de leche (Stelwagen *et al.*, 2013).

El aumento en el contenido de proteína en la leche, aunque existen trabajos en los que no se ha observado dicho efecto (Auldust *et al.*, 1998), podría considerarse un efecto

favorable, especialmente, por el incremento en el contenido total de caseína (Rémond *et al.*, 2004; Lacy-Hulbert *et al.*, 1999).

Sin embargo, un análisis más detallado, sobre la composición de la proteína láctea, indica que el efecto del régimen ODM tiene algunas consecuencias menos favorables, de lo que podría parecer en un principio, sobre las propiedades reológicas de la leche (Stelwagen *et al.*, 2013). Así, disminuye la expresión génica para la síntesis de proteínas lácteas (Grala *et al.*, 2011) y la actividad proteolítica en la leche aumenta debido a la activación del sistema plasmina-plasminógeno (Kelly *et al.*, 1998; Stelwagen *et al.*, 1994; Knutson *et al.*, 1993). Estos cambios provocan, a su vez, que la β -caseína se convierta en γ -caseína, la cual tiene un menor valor tecnológico (Koutsouli *et al.*, 2015; Lacy-Hulbert *et al.*, 1999; Prosser *et al.*, 1995). El contenido total de proteínas del lactosuero también aumenta durante el ODM (Rémond *et al.*, 2004; Lacy-Hulbert *et al.*, 1999). Igualmente, la proporción entre proteínas del suero y caseína se ve aumentado (Davis *et al.*, 1999), probablemente, como consecuencia del paso de proteínas séricas desde la sangre hacia la leche, como la seroalbúmina (Lacy-Hulbert *et al.*, 1999).

El descenso en el contenido de lactosa podría estar relacionado con tres factores: la baja expresión de los genes para las enzimas responsables de su síntesis (Grala *et al.*, 2011), la disminución de la absorción de glucosa desde la sangre (Guinard-Flament *et al.*, 2007) y el aumento en la permeabilidad de las *tigh junctions* entre las células epiteliales mamarias, lo que causaría un incremento en los niveles de lactosa en sangre (Stelwagen y Singh, 2014; Chedly *et al.*, 2012, 2011; Hernandez *et al.*, 2011; Chedly *et al.*, 2010; Castillo *et al.*, 2008; Stelwagen, 2001).

Como se mencionó anteriormente, los cambios en la composición de la leche por el efecto de un ordeño al día pueden modificar las propiedades de ésta, lo que, paralelamente, influiría en el procesamiento tecnológico de la leche (Stelwagen *et al.*, 2013).

En este sentido, Pomiès *et al.* (2007) comprobaron que la reducción de la frecuencia de ordeño, de 4 a 2 veces al día, disminuye el porcentaje de ácidos grasos libres, lo que favorece la estabilidad a la oxidación de las mantequillas y natas procedentes de esta leche. No obstante, la coagulación y la firmeza de la cuajada fueron afectados negativamente, hecho que perjudica al rendimiento quesero. Sin embargo, en otros estudios, como el realizado por O'Brien *et al.* (2002), no observaron efectos negativos en las propiedades tecnológicas de la leche al reducir de 2 a 1 el número de ordeños al día.

Martin *et al.* (2009) tampoco observaron alteraciones en las características organolépticas del queso producido a partir de leche que provenía de un ordeño al día.

Por otra parte, Stelwagen *et al.* (2013) señalan que, actualmente, no existe información sobre los posibles efectos adversos que un alto contenido de las proteínas séricas de la leche, procedente de animales ordeñados 1 vez al día, podría producir en la fabricación de leche en polvo, aunque si tales efectos existieran provocarían un oscurecimiento del producto durante su almacenamiento. Estos autores destacan, además, la importancia de profundizar en los estudios que permitan la comprensión de las interacciones entre la frecuencia de ordeño y la industrialización de la leche.

Finalmente, es importante destacar que el ordeño una vez al día incrementa el contenido de sustancias con actividad biológica, tales como la lactoferrina y otras moléculas relacionadas con la respuesta inmunitaria, entre las que destacan las proteínas de la fase aguda y algunas ribonucleasas (Stelwagen *et al.*, 2011; Farr *et al.*, 2002). El mecanismo que provoca dicho aumento en el contenido de estas moléculas, aparentemente, puede ser una respuesta inflamatoria intramamaria no patológica (Stelwagen *et al.*, 2009). Algunos autores sugieren que este tipo de modificaciones en la composición de la leche, producida en sistemas de un ordeño al día, deben de ser exploradas como una oportunidad de mercado basado en el valor añadido por el contenido de moléculas con actividad biológica y con efectos beneficiosos para la salud del consumidor (Stelwagen *et al.*, 2013, Roncada *et al.*, 2012; Stelwagen *et al.*, 2009).

3.12.3 Relación con la nutrición.

En los sistemas de producción lechera en los que se realiza un ordeño al día, tal como se ha señalado anteriormente, la producción de leche y sus componentes es, en general, menor que en los sistemas con dos o más ordeños al día. Por lo tanto, es lógico suponer que las necesidades nutritivas de los animales son menores y cabría esperar que la ingestión de alimento también sea menor (Stelwagen *et al.*, 2013).

Holmes *et al.* (1992) efectuaron un trabajo con vacas alimentadas *ad libitum* con una ración completa durante las primeras 14 semanas de lactación y no observaron, en las primeras 6 semanas de la prueba, diferencias en la ingestión de materia seca entre las vacas ordeñadas una o dos veces al día. Sin embargo, a partir de la semana 7 del experimento las vacas ordeñadas una vez al día consumieron entre 1,3 y 2 kg menos de MS/d (8,1 %), lo que estuvo asociado a una disminución de un 35% en la producción de leche. Resultados similares fueron señalados por McNamara *et al.* (2008), quienes observaron una menor

ingestión (1,4 kg MS/d de diferencia) en vacas ordeñadas una vez al día respecto a las dos ordeños diarios. Patton *et al.* (2006), por el contrario, no encontraron diferencias cuando compararon la ingestión de materia seca de vacas ordeñadas una y tres veces al día, siendo la producción de leche un 19,6 % menor en las vacas sometidas a un sólo ordeño diario.

En el caso de la especie ovina, es muy escasa la información que existe entre la interacción de la frecuencia de ordeño y la ingestión de materia seca. Así, Prieto *et al.* (2013), en ovejas de raza assaf con la reducción de dos a un ordeño diario durante 3 semanas, y Ramella (2002), con la supresión de un ordeño semanal, respectivamente, no observaron diferencias en la ingestión de materia seca de los animales. En el mismo sentido, González-García *et al.* (2015) tampoco encontraron diferencias en la ingestión de materia seca en ovejas de raza lacaune en las que se realizó uno o dos ordeños al día. Cabe señalar que en los 3 estudios mencionados se redujo la producción de leche al reducir la frecuencia de ordeño.

Diferentes estudios coinciden en señalar que en la interacción entre la nutrición y la frecuencia de ordeño existen complejas relaciones, ya que puede haber factores dependientes del animal, tales como la etapa de lactación (Dewhurst *et al.*, 1993) y la capacidad de almacenamiento de la ubre (Castillo *et al.*, 2008; Ramella, 2002; Stelwagen, 2001; Knight *et al.*, 1994) o dependientes de la alimentación (Lindman, 2015; Prieto *et al.*, 2013), que podrían modular la relación entre la nutrición y la frecuencia de ordeño, en lo que se refiere a la ingestión y a la producción y la composición de la leche (Stelwagen *et al.*, 2013).

Algunos autores (Kay *et al.*, 2013; O'Driscoll *et al.*, 2010; Auldist *et al.*, 1998; Holmes *et al.*, 1992) señalan que una reducción en la frecuencia de ordeño no siempre causa una disminución en la ingestión, puesto que, dependiendo de la fase de lactación en la que se encuentren los animales, la producción de leche no está afectada (Ferris *et al.*, 2008). Así por ejemplo, al final de la lactación cuando la capacidad cisternal no es un factor limitante para el almacenamiento de la leche, ni la ingestión ni la producción de leche están afectadas por una reducción en la frecuencia de ordeño (Lindman, 2015).

Por otra parte, con la alimentación no sólo se aportan los nutrientes necesarios para cubrir las necesidades de los animales, sino que también puede incluir compuestos con propiedades funcionales que podrían modular la respuesta a los cambios de la frecuencia de ordeño.

En este sentido, Prieto *et al.* (2013), en un trabajo con ovejas de raza assaf, alimentadas con una dieta sin aceite vegetal o incluyendo aceite de girasol (43 g/kg de MS) y en las que se redujo la frecuencia de 2 a 1 ordeño al día, observaron que la disminución en la producción de leche tendió a ser menor en las ovejas que fueron alimentadas con la dieta que contenía el suplemento lipídico. Sin embargo, Lindman (2015) no observó ningún efecto sobre la producción de leche con la suplementación lipídica (aceite de palma y canola) en vacas en las que se redujo la frecuencia de 4 a 2 ordeños diarios. No obstante, la suplementación si afectó a la producción de los componentes de la leche.

La diferente respuesta observada en los estudios citados podría ser debida, por una parte, a que la capacidad de almacenamiento de la ubre y, por extensión, el efecto negativo asociado con el incremento de la presión intramamaria varía entre especies y es más acusado cuando se reduce de 2 a 1 que de 4 a 2 ordeños al día (Castillo *et al.*, 2008; Salama *et al.*, 2004; Ramella, 2002; Bruckmaier *et al.*, 1997). En el caso del ovino y concretamente en la raza assaf, Ramella (2002), estudiando el efecto de intervalos de ordeño de 4, 8, 12, 16, 20 y 24 horas, observó que a las 12 horas la ubre llega a su máxima capacidad de almacenamiento.

Por otra parte, la diferencia en el perfil de ácidos grasos de los suplementos lipídicos utilizados en la alimentación de los animales también podría contribuir a explicar los resultados contradictorios antes mencionados (Chilliard *et al.*, 2014; Pires *et al.*, 2013; Bichi *et al.*, 2013; Conchillo *et al.*, 2006).

En este sentido, la administración de componentes con propiedades funcionales en la dieta, tales como, antioxidantes, ácidos grasos poliinsaturados (Omega -3), que tienen efectos antiinflamatorios (Bertoni *et al.*, 2014), pueden modular la respuesta a estímulos inductores de inflamación como podría ser el estrés oxidativo que causa, a nivel celular (Medzhitov, 2008), la reducción de la frecuencia de ordeño y que podría promover la síntesis de sustancias pro-inflamatorias como aminas y péptidos vasoactivos, fragmentos del sistema del complemento, prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos, citoquinas inflamatorias como TNF- α , IL-1, IL-6, etc. (Luster *et al.*, 2005). De hecho, se ha observado que un mayor aporte dietético de ácidos grasos polinsaturados así como de CLA y antioxidantes como la vitamina E, podrían influir favorablemente en animales sometidos a un estrés oxidativo (Lippman *et al.*, 2009; Sylvester, 2007; Knekt *et al.*, 1991).

3.12.4 Mecanismos de adaptación de la glándula mamaria frente a la modificación de la frecuencia de ordeño.

Los cambios en la frecuencia de ordeño pueden modificar el flujo de sangre hacia la glándula mamaria, el número y la actividad de las células epiteliales mamarias, tal y como se pudo comprobar, inicialmente, en algunos trabajos, realizados en roedores y cuyo objetivo fue estudiar los procesos biológicos que regulan la secreción de leche (Wall y McFadden, 2012; Rowson *et al.*, 2012; Loor y Cohick, 2009).

Trabajos posteriores en rumiantes confirmaron dichas observaciones y, además, constataron que la respuesta de la glándula mamaria a los cambios en la frecuencia de ordeño está regulada, fundamentalmente, a nivel local (Wall y McFadden, 2008; Marnet y Komara, 2008; Davis *et al.*, 1999).

Aunque los mecanismos locales que regulan esta respuesta no están completamente esclarecidos, se ha propuesto una compleja red de interrelaciones compuesta por varios mecanismos (Figura 5), entre los que se pueden destacar los siguientes: los cambios en el flujo sanguíneo hacia la glándula mamaria, las respuestas endocrina y celular, los factores locales de regulación de la síntesis láctea y la modulación de la expresión génica (Boutinaud *et al.*, 2013; Wall *et al.*, 2012; Littlejohn *et al.*, 2010; Loor y Cohick, 2009; Wall y McFadden, 2008; Marnet y Komara, 2008; Davis *et al.*, 1999).

Stelwagen (2001) indica que la descripción de todos los mecanismos implicados en la adaptación de la glándula mamaria, como respuesta a los cambios en la frecuencia de ordeño, es una tarea casi imposible debido a su complejidad. Sin embargo, Knight *et al.* (1988) propusieron tres fases en las que, de manera general, se pueden distinguir diversos mecanismos que ocurren, en la glándula mamaria, como una respuesta de adaptación de ésta a un aumento o reducción de la frecuencia de ordeño:

- a) Fase aguda (de uno a varios días). El inicio de esta fase, en general, no sobrepasa las 24 horas y se caracteriza por la interacción de varios mecanismos, entre los que destaca la participación de compuestos químicos, tales como el Factor Inhibidor de la Lactación (FIL), la serotonina y algunos ácidos grasos, que actúan ejerciendo una retroalimentación positiva o negativa, la cual regularía la síntesis de leche, la permeabilidad de las *tight junctions* y el inicio de la **fase reversible** de la involución mamaria.
- b) Fase de corto y medio plazo (de días a pocas semanas). Durante esta fase la glándula mamaria se adapta a un estado de actividad celular o enzimática que

puede incrementarse o ralentizarse, dependiendo de la frecuencia de ordeño que se aplique a la glándula.

- c) Fase crónica o a largo plazo (de semanas a meses). En esta fase, los cambios que ocurren son, fundamentalmente, a nivel de la arquitectura tisular y, concretamente en el número de células secretoras activas, como consecuencia de un cambio en el balance entre proliferación y la **fase irreversible** de la involución mamaria.

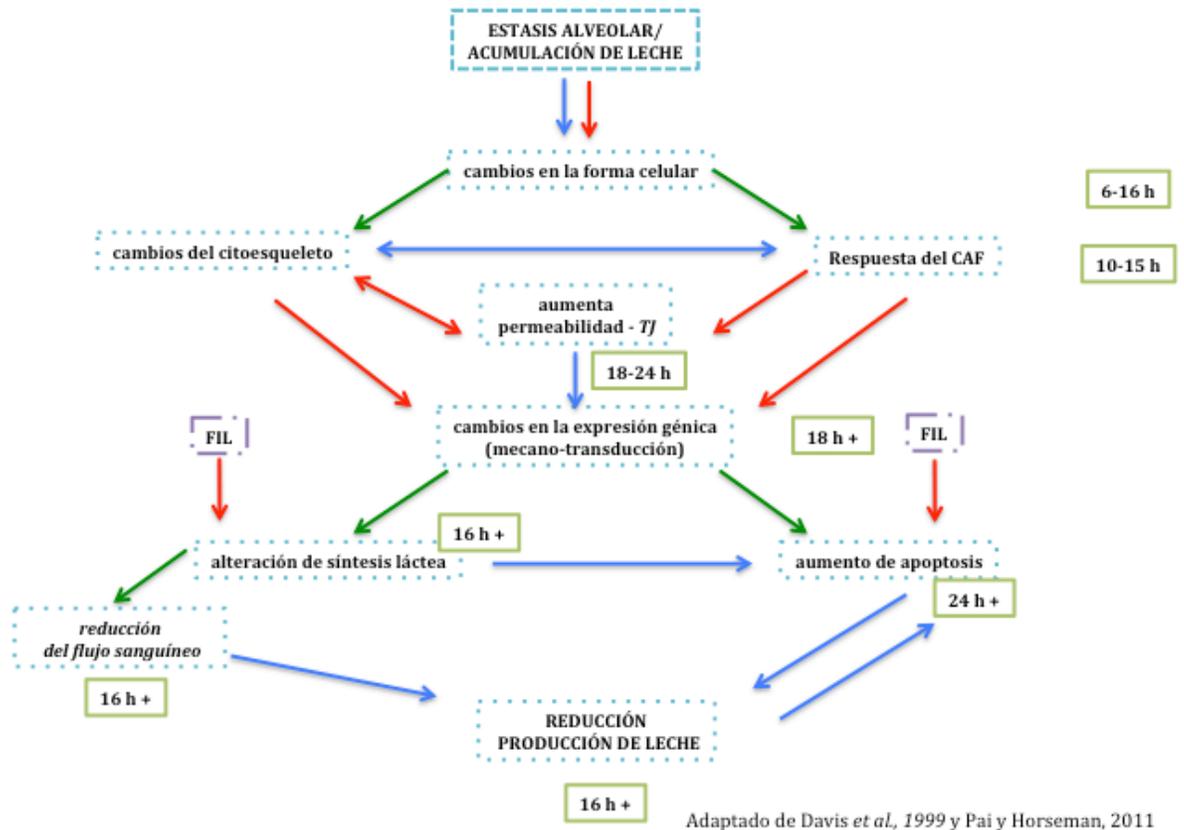


Figura 5 Mecanismos de adaptación que ocurren en la glándula mamaria como respuesta a los cambios en la frecuencia de ordeño.

CAF: complejo de adhesión focal (TGF- β , β -actina);
 TJ: tight junctions; FIL: feedback inhibitor of lactation

Por otra parte, cabe señalar que en la respuesta a la modificación en la frecuencia de ordeño también juegan un papel importante las características morfológicas de la ubre, tal y como se ha descrito, con mayor detalle, anteriormente (Marnet y Komara, 2008; Stelwagen, 2001; Davis *et al.*, 1999).

3.12.4.1 Flujo sanguíneo.

Numerosos estudios señalan que el flujo sanguíneo hacia la glándula mamaria es uno de los mecanismos que participan en el proceso de adaptación de esta glándula a los cambios en la frecuencia de ordeño (Wall y McFadden, 2012; Guinard-Flament *et al.*, 2011; Delamaire *et al.*, 2006).

Así, está perfectamente demostrado que una reducción de la frecuencia de ordeño provoca una estasis láctea, la cual, a su vez, reduce el flujo de sangre hacia la glándula mamaria, disminuyendo la secreción de leche probablemente debido a una limitación de la disponibilidad de nutrientes para la ubre (Prosser *et al.*, 1996; Gorewit *et al.*, 1989; Mao *et al.*, 1973, Linzell, 1960).

Stelwagen *et al.* (1994), en la especie caprina, observaron que la estasis de la leche provoca una reducción lineal del flujo sanguíneo hacia la glándula mamaria hasta las 36 horas después del último ordeño. En este sentido, Farr *et al.* (2000), en esa misma especie, comprobaron reducciones de entre un 50 y un 75 % del flujo sanguíneo y de la permeabilidad capilar en la ubre transcurridas 25 horas desde el último ordeño.

Por el contrario, el aumento de la producción de leche que se observa cuando se incrementa la frecuencia de ordeño podría ser explicado, parcialmente, por el aumento del flujo sanguíneo hacia la glándula mamaria (Bequette y Douglas, 2010; Farr *et al.*, 2000).

Finalmente, es necesario destacar que no en todos los casos se ha observado una relación entre el flujo sanguíneo y la producción de leche, lo que sugiere la intervención de otros mecanismos de adaptación de la glándula mamaria a los cambios en la frecuencia de ordeño (Wall y McFadden, 2012).

3.12.4.2 Respuesta endocrina.

El mecanismo endocrino, conocido hasta la fecha, más importante que puede estar implicado en la modulación de la respuesta a los cambios en la frecuencia de ordeño sobre la producción y la salud de la ubre es la secreción de prolactina (PRL). La PRL promueve la diferenciación celular de las células epiteliales mamarias. El aumento de la secreción de esta hormona produce un incremento en el número de células con capacidad secretora, lo que podría estar relacionado con la mayor producción de leche observada cuando se aumenta la frecuencia de ordeño (Capuco *et al.*, 2001; Akers *et al.*, 1981). De hecho, Tucker, (1971) constató un incremento de PRL circulante en sangre como respuesta al aumento en el número diario de ordeños.

En este sentido, Dahl *et al.* (2002) observaron, en vacas, que un incremento en la frecuencia de ordeño, durante 21 días después del parto, causó un aumento de los niveles sanguíneos de PRL y un incremento en la expresión de los receptores celulares para esta hormona. Este mismo autor comprobó que tales receptores tenían una mayor sensibilidad a la PRL cuando las vacas eran ordeñadas más de dos veces al día (Dahl *et al.*, 2004).

Por otra parte, en relación con la salud de la ubre, Auchtung *et al.* (2005, 2003) observaron, tanto en pruebas *in vivo* como *in vitro*, que el incremento en la expresión de los receptores celulares para la PRL también mejora la respuesta inmunitaria y, por consiguiente, la resistencia a las infecciones, puesto que favorece la actividad de las células NK debido al aumento de los niveles de IL-2 e IL-15 (Triggianese *et al.*, 2014).

3.12.4.3 Respuesta celular.

Algunos autores propusieron la hipótesis de que el incremento o la disminución en la producción de la leche, como respuesta a cambios en la frecuencia de ordeño, se debe, fundamentalmente, a un cambio en el número o la actividad de las células de la glándula mamaria (Hale *et al.*, 2003; Capuco *et al.*, 2003; Sanders *et al.*, 2001; Stelwagen y Knight, 1997; Bar-Peled *et al.*, 1995).

Esta hipótesis se basa en los resultados obtenidos por algunos autores, como Hillerton *et al.* (1990), quienes encontraron un incremento en la actividad enzimática de la glándula mamaria, así como un aumento en la síntesis de lactosa y proteína, cuando aumentaron la frecuencia de ordeño en vacas lecheras.

En el mismo sentido, Hale *et al.* (2003) constataron un aumento en la proliferación de las células epiteliales mamarias, durante los primeros 7 días después del parto, en vacas ordeñadas 4 veces al día, durante 3 semanas, comparadas con vacas que fueron ordeñadas 2 veces al día. Sin embargo, otros autores (Soberon *et al.*, 2010; Wall *et al.*, 2006; Nørgard *et al.* 2005) no encontraron ningún efecto, como consecuencia del incremento en la frecuencia de ordeño, ni sobre la proliferación celular, ni sobre la actividad enzimática de las células epiteliales mamarias, ni sobre la apoptosis, a pesar de haber obtenido incrementos en la producción de leche.

Por otra parte, cabría esperar que cuando se reduce la frecuencia de ordeño el efecto fuera el contrario y disminuyera la actividad enzimática de la glándula mamaria, concretamente la actividad de enzimas clave como la acetil-CoA carboxilasa, la galactosiltransferasa y la ácido graso sintasa (Davis *et al.*, 1999).

Chedly *et al.* (2013, 2011, 2010) observaron en células epiteliales mamarias, obtenidas a partir de leche de cabra, que los cambios en la expresión de genes relacionados con la apoptosis (mRNA para Bax) no guardaron relación con la tasa de ésta, determinada con técnicas de inmunohistoquímica. Dichos cambios, en la expresión génica, fueron importantes sólo en los 5 días posteriores a la reducción de 2 a 1 ordeño diario, periodo tras el cual se produjo una reducción en la actividad enzimática y en la producción de leche (23%), de lactosa (23%) y de caseína (16%). En estos mismos trabajos también se encontró una disminución en la abundancia de mRNA que codifica para la α -lactoalbúmina y la κ -caseína.

Sin embargo, Wall y McFadden (2012, 2008), en sendas revisiones, afirman que los resultados son controvertidos y ello, posiblemente, debido a la diferente sensibilidad de las distintas técnicas empleadas o por la variabilidad individual entre los animales o una combinación de ambos factores.

3.12.4.4 Factores locales que regulan la síntesis y secreción de la leche.

En la síntesis láctea, además de los efectos que provoca la extracción de la leche sobre el flujo sanguíneo y la disponibilidad de nutrientes, también hay que tener en cuenta la regulación que ejercen los cambios en la presión intramamaria y los componentes químicos presentes en la leche (Wall y McFadden, 2012; Henderson y Peaker, 1984; Peaker, 1980).

La relación entre la presión intramamaria, el flujo sanguíneo hacia la glándula mamaria y la extracción de la leche no ha sido completamente esclarecida (Wall y McFadden, 2012). No obstante, es posible que la presión intramamaria propiamente dicha pueda ser un mediador local en la función de la glándula mamaria, actuando como un elemento mecánico que provocaría la pérdida de la integridad de las TJ, lo que, a su vez, podría activar ciertas reacciones bioquímicas. Sin embargo, el efecto de la presión intramamaria puede cambiar con el estado fisiológico y metabólico del animal, así como con la etapa de la lactación (Wall y McFadden, 2012; Marnet y Komara, 2008; Stelwagen, 2001).

Por otra parte, el metabolismo de las células mamarias puede producir compuestos con efectos vasoactivos, los cuales inducirían la dilatación o la constricción de los vasos sanguíneos, regulando, así, el flujo sanguíneo de la glándula mamaria (Davis *et al.*, 1999; Martinet, 1999; Lacasse *et al.*, 1996). Entre estos compuestos, destacan el dióxido de

carbono (CO₂), óxido nítrico (NO), lactato, adenosina y prostaglandina F2- α (Martinet, 1999; Lacasse *et al.*, 1996; Prosser *et al.*, 1996).

Otro de los factores locales que se ha propuesto como posible modulador de la síntesis de leche es el Factor Inhibidor de la Lactación (FIL) (Wilde *et al.*, 1994, 1988, 1987). Heeson *et al.* (1992) apuntaron la posibilidad de que el FIL sea el responsable de regular la síntesis de lactosa y de caseína, mientras que la síntesis lipídica estaría regulada por mecanismos de retroalimentación relacionados con ácidos grasos específicos (Stoffel *et al.*, 2015; Pottier *et al.*, 2006; Griinari *et al.*, 1998; Gaynor *et al.*, 1995; Renmson *et al.*, 1993; Rennison *et al.*, 1993).

Por último, y teniendo en cuenta la complejidad que acontece en la regulación local de la síntesis y secreción de la leche, es probable que existan aún más mecanismos que no han sido descritos (Wall y McFadden, 2012). Así, recientemente, se ha relacionado a la serotonina (Horseman y Collier, 2014; Hernández *et al.*, 2011, 2009; Matsuda *et al.*, 2004) y a un fragmento peptídico de la β -caseína (Silanikove *et al.*, 2010; Shamay *et al.*, 2002) con el proceso de regulación local sobre la producción de leche.

3.12.4.5 Modulación de la expresión génica.

La diversidad de cambios que ocurren en la glándula mamaria por efecto de la modificación en la frecuencia de ordeño, y que permanecen más allá del período del tratamiento, podrían ser explicados por las variaciones en la expresión de genes que regulan el número de células epiteliales mamarias, su capacidad metabólica y su sensibilidad a los cambios endocrinos relacionados con la lactogénesis. (Grala *et al.*, 2014; Wall y McFadden, 2012; Wall *et al.*, 2012; Connor *et al.*, 2008; Davis *et al.*, 1999).

Connor *et al.* (2008) observaron, en un trabajo en el que estudiaron la expresión génica de vacas lecheras ordeñadas 2 y 4 veces al día, que el incremento de la producción de leche al aumentar la frecuencia de ordeño estaba relacionado con alteraciones en la expresión de genes responsables de la remodelación del tejido secretor.

Wall *et al.* (2012) encontraron, también en un trabajo realizado en la especie bovina, resultados similares y, además, sugirieron que la expresión de algunos genes implicados en la respuesta a los cambios en la frecuencia de ordeño podría variar dependiendo del momento en el que se aplica el cambio de la frecuencia de ordeño.

En relación con la reducción de la frecuencia de ordeño, Boutinanaud *et al.* (2013) realizaron un estudio en vacas lecheras en las que se redujo de 2 a 1 el número de ordeños

al día, de manera unilateral, para estudiar la expresión génica del tejido mamario. Además del tejido obtenido mediante biopsias se comparó la expresión génica en células epiteliales purificadas a partir de leche. La información aportada por el transcriptoma y el estudio inmunohistoquímico reveló que las pérdidas en la producción de leche causada por la reducción en la frecuencia de ordeño sería debida a los cambios en la remodelación celular, que se corresponden con estados tempranos de involución del tejido mamario. Estos efectos parecen estar asociados a la transcripción de genes relacionados con el metabolismo lipídico de la leche.

Resultados análogos fueron obtenidos en un estudio realizado por Littlejohn *et al.* (2009) en el tejido mamario de vacas a las que se redujo la frecuencia de ordeño de 2 a 1 al día. Estos autores explican que los efectos se deben a la transducción de señales mecánicas relacionadas con la distensión de la ubre, que es la responsable de afectar a la integridad de las *TJ*. Aunque las consecuencias moleculares de la afectación de las *TJ* no están, aún, completamente esclarecidas, parece ser que puede existir una interferencia en la expresión génica de algunas proteínas estructurales, tales como las claudinas, que forman parte de la estructura de las *TJ*. Este hecho, a su vez, podría afectar a las señales bioquímicas necesarias para la síntesis y secreción de la leche (Stelwagen y Singh, 2014; Kobayashi *et al.*, 2013).

Por último, cabe señalar que tras el descubrimiento de la existencia de pequeñas regiones de mRNA (conocidas como MicroRNA), que no se transcriben a proteínas y que son capaces de modular la expresión génica (Lee y Ambros, 2001; Lee *et al.*, 2003), se han realizado algunos estudios en la glándula mamaria tanto de ovejas (Galio *et al.*, 2013) como de vacas (Wang *et al.*, 2014; 2012) y se ha comprobado que el MicroRNA puede interferir en la regulación de la expresión génica a nivel post-transcripcional en procesos relacionados con la proliferación y la diferenciación celular, la respuesta inmunitaria y el metabolismo lipídico del tejido mamario. Este hecho abre una oportunidad para entender la relación entre la regulación de la expresión génica y algunos caracteres productivos (Fatima y Morris, 2013).

4 Material y métodos.

4.1 EXPERIMENTO I. EFECTO DE LA FRECUENCIA DE ORDEÑO Y DE LA ADMINISTRACIÓN DE UN SUPLEMENTO ANTIOXIDANTE (VITAMINA E Y SELENIO) SOBRE LA INGESTIÓN, LA EVOLUCIÓN DE PESO, LA CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE VITAMINA E Y MINERALES, LA PRODUCCIÓN Y COMPOSICIÓN DE LA LECHE Y EL ESTADO SANITARIO DE LA GLÁNDULA MAMARIA.

4.1.1 Animales y dietas.

Se utilizaron 16 ovejas de raza assaf, procedentes del rebaño experimental del Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-IGM), que se distribuyeron en 4 grupos de 4 ovejas cada uno, asignándose aleatoriamente 2 grupos a cada uno de los siguientes tratamientos:

- **tratamiento control:** los animales recibieron a voluntad una ración mixta cuya composición se presenta en la tabla 1.
- **tratamiento AOX:** los animales recibieron a voluntad la misma ración suministrada a los animales del tratamiento control y, además, recibieron diariamente, vía oral, 1 g de vitamina E (DL- α -tocoferol acetato, BASF, Burgbernheim, Alemania), equivalente a 1.000 UI, y 0,4 mg de Selenio (selenito de sodio anhidro, Panreac[®], Barcelona, España).

Los animales se seleccionaron de entre un total de 120 ovejas. Para ello, durante el mes previo al inicio del ensayo, todos los animales del rebaño se manejaron en un mismo lote y recibieron la dieta control a voluntad, registrándose la producción de leche de todos los animales dos veces por semana y la producción de cada glándula por separado los días -4 y -2 antes del inicio de la prueba experimental. Los días -3 y -1 se procedió a pesar los animales, después del ordeño de la mañana, utilizando una báscula con una precisión de \pm 100 g (Magriña[®], España).

El día -3 se determinó la proporción (fraccionamiento) de la leche cisternal y alveolar de cada glándula. Para ello se administró por vía endovenosa a cada animal y antes de entrar en la sala de ordeño (para evitar que se produjera el efecto de eyección) un antagonista de la oxitocina (1 mg/oveja, Atosiban[®], Hybio Pharmaceutical Co., Ltd., China) con el fin de inhibir el estímulo de eyección y poder obtener y medir la fracción de leche cisternal. A continuación, por vía endovenosa, se aplicó una dosis de 5 UI de oxitocina sintética (Oxitón[®], Laboratorios Ovejero, España) para extraer a continuación la fracción de leche alveolar.

Tabla 1 Proporción de ingredientes y composición química de la ración experimental.

INGREDIENTES	(g/kg)
Alfalfa deshidratada	300
Cebada	230
Maíz	120
Torta de Soja 44	80
Avena	70
Semilla de algodón	50
Pulpa de Remolacha	40
Torta de colza	30
Harina de girasol	30
Melaza de caña	25
Carbonato de calcio	13
Cloruro de sodio	5
Harinillas de trigo	3
Premezcla vitamínico-mineral	4
Vitamina A (UI/kg)	7000
Vitamina D3 (UI/kg)	1400
Vitamina E (mg/kg)	8
Zinc (mg/kg)	34
Selenio (mg/kg)	0,2
COMPOSICIÓN QUÍMICA	(g/kg)
Materia seca (MS)	895
Proteína bruta (PB)	160
Fibra neutro detergente (FND)	256
Grasa	44
Cenizas	69

El día -1 se procedió a seleccionar 16 ovejas de acuerdo a su peso, producción de leche, relación de la producción entre glándulas y el fraccionamiento de la producción (cisternal/alveolar), que se distribuyeron en 4 lotes de 4 ovejas. Los lotes fueron equilibrados de acuerdo con el peso corporal ($77 \pm 2,4$ kg), la producción de leche ($2\,548 \pm 119,7$ g/d), la relación entre la producción de la glándula izquierda y de la derecha ($1,00 \pm 0,023$) y proporción de la leche de la cisterna de la glándula ($64 \pm 2,6\%$) respecto al total de la producción. Para el conjunto de animales, los valores mínimos y máximos de la relación de producción entre las dos glándulas fueron 1,01 y 1,05, respectivamente.

Las ovejas de cada lote se alojaron en corrales de 16 m^2 de superficie, uno por lote, dentro de la misma nave, y en cada corral se dispuso un comedero de 2 metros de longitud y doble acceso de manera que los animales no tuvieran que competir durante el periodo de alimentación. Los animales dispusieron de agua limpia y fresca a voluntad.

Este trabajo experimental se desarrolló de acuerdo al Real Decreto 53/2013 para la protección de animales utilizados en experimentación y otros fines científicos.

4.1.2 Desarrollo experimental.

El periodo experimental tuvo una duración de 11 semanas distribuidas en dos períodos consecutivos en los cuales se modificó la frecuencia de ordeño:

- Período 1, de la semana 1 a la 3, durante el cual las ovejas se ordeñaron 2 veces al día (2x), aproximadamente a las 9:30 y 19:30 horas.
- Período 2, de la semana 4 a la 11, durante el cual una glándula (glándula A) fue ordeñada una vez al día (1x) y la otra (glándula B) dos veces al día (2x).

El ordeño se realizó en una sala de ordeño tipo Casse con 10 plazas (Alfa-Laval[®], DeLaval Equipos España), provista de pulsadores neumáticos, pezoneras de silicona y recipiente de recogida. La presión de vacío proporcionada por la bomba fue de 36 kPa, con 120 pulsaciones por minuto y relación de pulsación del 50%. La rutina de ordeño empleada fue la siguiente: 1) Colocación de las pezoneras y obtención de la “leche-máquina”; 2) Breve masaje de la ubre y obtención de la leche “apurado-máquina”; 3) Retirada de las pezoneras. Tras el ordeño se aplicó una solución antiséptica comercial (Alfadine[®], DeLaval[®] Equipos España), sobre los pezones, para reducir el riesgo de mastitis.

A lo largo del periodo experimental se efectuaron los siguientes controles y medidas:

4.1.2.1 Ingestión y peso vivo.

La ración se distribuyó diariamente *ad libitum* en un único momento, después del ordeño de la mañana, en un comedero de dos frentes que permitía, como se mencionó anteriormente, el acceso simultáneo de todos los animales del grupo.

Semanalmente se controló la ingestión de la ración ofertada para cada uno de los lotes, retirándose y pesándose los restos de alimento rehusado y tomándose una muestra para determinar su contenido de materia seca. La oferta de alimento se ajustó semanalmente para permitir unos restos de, aproximadamente, 150 g por kg de alimento ofrecido. A lo largo del ensayo, se recogió cada semana una muestra de aproximadamente 100 g de la ración ofertada. Las muestras fueron congeladas a -20^oC hasta su análisis.

Semanalmente se pesaron los animales, utilizando para ello una báscula con una precisión de ± 100 gramos (Magriña[®], España). Los animales fueron pesados siempre después del ordeño de la mañana y antes de la distribución del alimento.

4.1.2.2 Producción y composición de la leche.

Semanalmente se realizaron tres controles (lunes, miércoles, viernes) de la producción de leche individual para cada glándula, utilizando para ello medidores automáticos (DeLaval[®] MM 25 SG, Alemania). Se tomó una muestra de leche de cada glándula (40 ml aproximadamente), en el ordeño de los miércoles por la mañana o por la mañana y la tarde de acuerdo al diseño experimental (1x vs 2x), para determinar la composición de la leche (extracto seco, proteína, grasa, lactosa) y para el recuento de células somáticas (RCS). Las muestras recogidas fueron conservadas con Bronopol[®] (D and F Control Systems Inc., Estados Unidos) y mantenidas a 4^o C hasta su posterior análisis (aprox. 24 horas después).

Con la finalidad de determinar los contenidos de vitamina E y minerales, se recogieron dos muestras de aprox. 5 mililitros en las semanas 1 (día 1), 2 (día 14), 3 (día 21) y 11 (día 77). Los días 21 y 77 se recogió una muestra extra de 100 mL para la extracción de grasa y determinación de la estabilidad oxidativa y el perfil de ácidos grasos. Todas las muestras fueron congeladas a -30 °C hasta su análisis.

4.1.2.3 Perfil bioquímico sanguíneo.

En las semanas 1 (día 1), 2 (día 14), 3 (día 21), 5 (día 35), 7 (día 49), 9 (día 63), 11 (día 77), después del ordeño de la mañana y antes de la distribución de alimento, se obtuvo una muestra de sangre de cada animal, mediante punción en la vena yugular. Las muestras se recogieron en tubos de vacío (BD Vacutainer[®] BD-Plymouth, PL6 7BP, UK) de 10 ml de capacidad, con EDTA (ácido etilendiaminotetraacético). La sangre fue procesada dentro de los 30 minutos posteriores a la recogida para realizar el recuento celular.

En las semanas 1 (día 1), 2 (día 14), 3 (día 21), 7 (día 49) y 11 (día 77) se recogió una segunda muestra de sangre en tubos con heparina-litio. Las muestras fueron transportadas al laboratorio en agua con hielo y se centrifugaron inmediatamente a 1000 g durante 10 minutos a 40 °C. El plasma, así obtenido, fue distribuido en 3 alícuotas, que se almacenaron en tubos Eppendorff[®] (Eppendorf Ibérica, Madrid, España) a -30 °C para la posterior determinación del contenido de vitamina E, minerales y la capacidad antioxidante.

4.1.2.4 Histopatología de la glándula mamaria.

Al final del periodo experimental (día 78), se seleccionaron cuatro ovejas de cada tratamiento experimental, que fueran representativas del conjunto. A tal efecto se

seleccionaron ovejas con diferente nivel de producción de leche y porcentaje de reducción, establecido en función de la relación de producción entre las dos glándulas en la semana 11.

Los animales fueron sacrificados, inmediatamente tras el ordeño de la mañana, administrando por vía endovenosa un sedante (Xilagesic[®], Laboratorios Calier, España) y a continuación una solución eutanásica (T61[®], Intervet Internacional GMBH, Alemania). Con el objetivo de extraer la mayor cantidad posible de leche previamente al sacrificio, se administró a los animales, vía endovenosa, una dosis de 5 UI de oxitocina sintética.

De las ovejas sacrificadas se recogieron muestras de glándula mamaria a diferentes profundidades del parénquima glandular (superficial, medio y profundo), así como una muestra del canal del pezón y de la cisterna de la glándula para su estudio histológico. Inmediatamente las muestras fueron sumergidas en formol tamponado al 10%, para iniciar su preparación histológica posterior.

4.1.3 Análisis físico-químico e histológico.

4.1.3.1 Alimentos.

Sobre las muestras de alimento ofrecido se llevó a cabo la determinación de materia seca (MS), cenizas, proteína bruta (PB), fibra neutro detergente (FND) y grasa bruta (GB). En los restos de alimentos no consumido se determinó únicamente el contenido de materia seca.

Las determinaciones analíticas de los alimentos se llevaron a cabo siguiendo los métodos recomendados por la AOAC (2006). Los análisis se realizaron por duplicado sobre muestras molidas en un molino de martillos (Restch[®] WPB 90 LB-4P, Alemania), utilizando una malla con un tamaño de paso de 1 mm.

El contenido de materia seca se determinó por desecación de las muestras en una estufa de aire forzado (Heraeus[®] RTV-200, Alemania) a 103°C hasta peso constante. Posteriormente se calcinaron en un horno mufla (Hobersal[®] 12-PR/400, España) a 550°C durante 6 horas para determinar su contenido de cenizas.

Para calcular el contenido de proteína bruta de las muestras, se determinó el contenido de nitrógeno (N) siguiendo la técnica semimicro-Kjeldahl, utilizando un analizador Kjeltac[®] Autosampler System 1035 (Tecator, Suecia). Posteriormente, se multiplicó el contenido en N de cada muestra por el factor de conversión 6,25 ($PB = N \times 6,25$).

El contenido de grasa bruta se determinó con un equipo extractor ANKON® XT15 (ANKON® Technology Corporation, Estados Unidos) utilizando como solvente éter de petróleo 40-60 °C PRS (Panreac®, Barcelona, España) y previa hidrólisis con HCl 3N 37% (Panreac®, Barcelona, España) en ebullición suave durante 1 hora.

El contenido de fibra neutro detergente se determinó utilizando un analizador de fibra Ankon® 220 (Estados Unidos), mediante el método de Goering y Van Soest (1970) con las modificaciones propuestas por Van Soest *et al.* (1991).

4.1.3.2 Leche.

En todas las muestras de leche recogidas semanalmente se determinó su contenido de grasa bruta, proteína bruta y extracto seco, así como el recuento de células somáticas (RCS). En las muestras recogidas los días 1, 14, 21, 49 y 77 se determinó también el contenido de vitamina E y minerales (Se, Ca, P, Na, K, Cl y Mg). En la grasa extraída de las muestras correspondientes a los días 21 y 77 se determinó la estabilidad a la oxidación de la grasa y el perfil de ácidos grasos.

Determinación del contenido de extracto seco, proteína, grasa y lactosa y recuento de células somáticas.

Los contenidos de extracto seco, proteína y grasa se determinaron mediante infrarrojo automatizado, de acuerdo a la metodología de referencia descrita por la International Dairy Federation (IDF 14C:2000) y utilizando para ello un autoanalizador Milko-Scan® 255 (A/S N Foss Electric, Dinamarca). El contenido de lactosa se calculó aritméticamente restando al extracto seco el contenido de grasa y proteína.

El Recuento de Células Somáticas (RCS) de la leche se realizó mediante un autoanalizador Fossomatic® 90 (Foss Electric, Dinamarca), siguiendo el procedimiento de referencia IDF 148-2:2006 (International Dairy Federation, Bruselas, Bélgica).

Los análisis de composición química de la leche y RCS fueron realizados en el Centro de Selección y Reproducción Animal de la Junta de Castilla y León (CENSYRA, León). El análisis de estas muestras se realizó dentro de las 24 horas siguientes a su obtención.

Determinación del contenido de minerales.

Las muestras de leche se descongelaron antes de su análisis durante 24 h a 4°C. Una vez descongeladas, para la determinación del contenido de minerales, se pesaron 5 g

en un tubo de propileno y se mezclaron con 5 ml de ácido nítrico a una concentración de 65 % (v/v) y 3 ml de ácido clorhídrico al 37 % (v/v) para su digestión. Para ello, se utilizó un digestor modelo DigiPREP® MS (SCP Science Québec, Canadá), realizando la digestión a presión atmosférica y aplicando un programa con tres rampas de temperatura. En la primera rampa se incrementó la temperatura de 20 a 450 °C en un intervalo de 30 minutos, manteniéndose a 450 °C durante 1 minuto. Finalizada ésta, se realizó el segundo tratamiento térmico, incrementando la temperatura de 450 a 600 °C en un intervalo de 20 minutos y manteniendo las muestras a 600 °C durante 5 minutos. Por último, se incrementó la temperatura de 650 a 1000 °C en un intervalo de 10 minutos y se mantuvo a 1000 °C durante 180 minutos. Al término de este proceso, las muestras fueron aforadas a 50 ml con agua miliQ y diluidas para su análisis.

La determinación de la concentración de Se en leche se realizó mediante espectrofotometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento (ICP-MS PerkinElmer®, Inc.; Massachusetts, Estados Unidos). Para su análisis, el equipo fue calibrado mediante el método de ``adiciones estándar (10, 50 y 100 ppb)´´, utilizando el isótopo 82 del Se y como patrón el isótopo 89 del Iodo.

La determinación de la concentración de Ca, P, Na, K y Mg se realizó mediante espectrofotometría de emisión atómica (ICP-OES PerkinElmer®, Inc.; Massachusetts, Estados Unidos). Para su análisis, las muestras fueron diluidas con agua milliQ (diluciones 1:10 para el P y 1:100 para el resto de elementos). El equipo de ICP-OES fue calibrado con patrones de 30 ppm para el fósforo y de 10 ppm para Na, Ca, Mg y K, además de un patrón interno de 5 ppm de Se.

Para la determinación de cloruros en leche, las muestras fueron diluidas 1:100 en agua milliQ y, analizadas por la técnica de Electroforesis Capilar (CE). Utilizando un capilar de sílice fundida de 75 micras de diámetro y de 68 cms de longitud. El análisis se realizó a una temperatura de 27 °C y aplicando un voltaje de 14 kV. Como buffer se empleó una disolución en agua miliQ de Óxido de Cromo 5 mM y Bromuro de Tetradecil Trimetil Amonio 0,5 mM, con pH de 9,2. El equipo fue calibrado con patrones de 2,5; 12,5; 25, 37,5 y 50 ppm de cloruro.

Determinación de la estabilidad oxidativa de la grasa.

Una vez descongeladas las muestras de leche (durante 24 h a 4 °C), la grasa se extrajo por centrifugación conforme a la metodología descrita por Feng *et al.* (2004) y

validada por Luna *et al.* (2005). La grasa obtenida por esta técnica fue conservada a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ en tubos que, además, se gasearon con nitrógeno (N_2) para evitar la oxidación de la grasa.

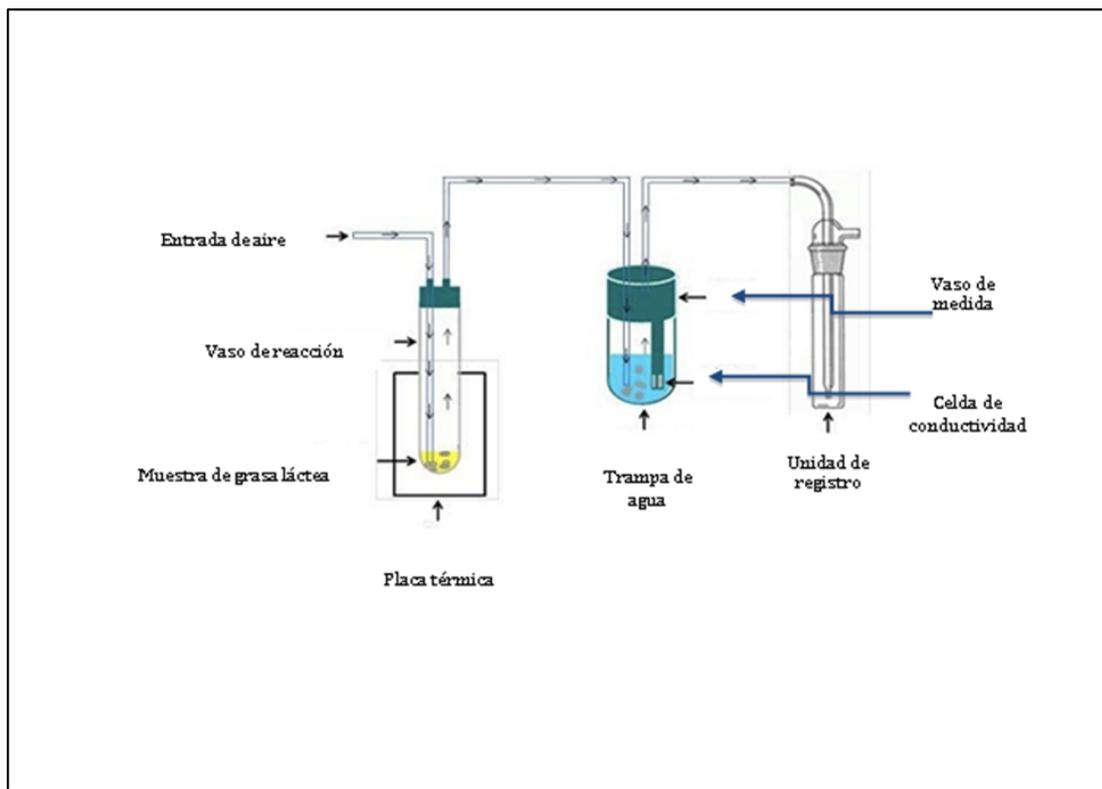


Figura 6 Rancimat®. Esquema de funcionamiento.

La estabilidad a la oxidación de las grasas se determinó por el Método Rancimat® (Metrohm, Herisau, Suiza), desarrollado por Hadorn y Zürcher (1974) y descrito por Gülüm y Sahin (2008). Este método se basa en la detección conductimétrica de los productos de descomposición de las grasas. El análisis de las muestras de grasa se realizó en un aparato (Rancimat®, Metrohm S.A., Herisau, Suiza) que recoge los gases generados durante este proceso y registra la conductividad de manera automática (Figura 6), permitiendo determinar el tiempo de inducción para la oxidación o el tiempo durante el cual la muestra permanece estable. De acuerdo a las instrucciones del fabricante, las muestras de grasa fueron procesadas a una temperatura de $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ y con un flujo de aire de 20 litros/hora durante 10 horas.

Determinación de vitamina E.

Las muestras de leche se descongelaron antes de su análisis durante 24 h a 4°C. Una vez descongeladas, para la extracción de la vitamina E, se añadió 1 ml de leche a un tubo de 10 ml de vidrio con tapón de rosca y a continuación se añadieron 0,5 ml de solución de ácido ascórbico, 10 µl de (±)- α -tocopherol (Sigma-Aldrich, Inc. Estados Unidos) - como estándar interno -, 1 ml de etanol - para precipitar las proteínas -, y 5 ml de n-Hexano. Los tubos se agitaron en posición horizontal durante 15 minutos en un agitador Minishaker® (IKA Works, Inc. Estados Unidos). Inmediatamente después estos tubos fueron centrifugados durante 10 minutos a 10000 rpm y se recogió el sobrenadante (fase superior orgánica). A la fase líquida restante se le añadieron 5 ml de n-hexano y se repitió un ciclo de extracción para recuperar la mayor cantidad posible de la fase orgánica. Las fases orgánicas obtenidas se mezclaron y se desecaron mediante evaporación bajo una corriente suave de nitrógeno en la campana de extracción. A continuación, la fase orgánica obtenida se disolvió nuevamente en 200 µl de fase móvil para su análisis cromatográfico.

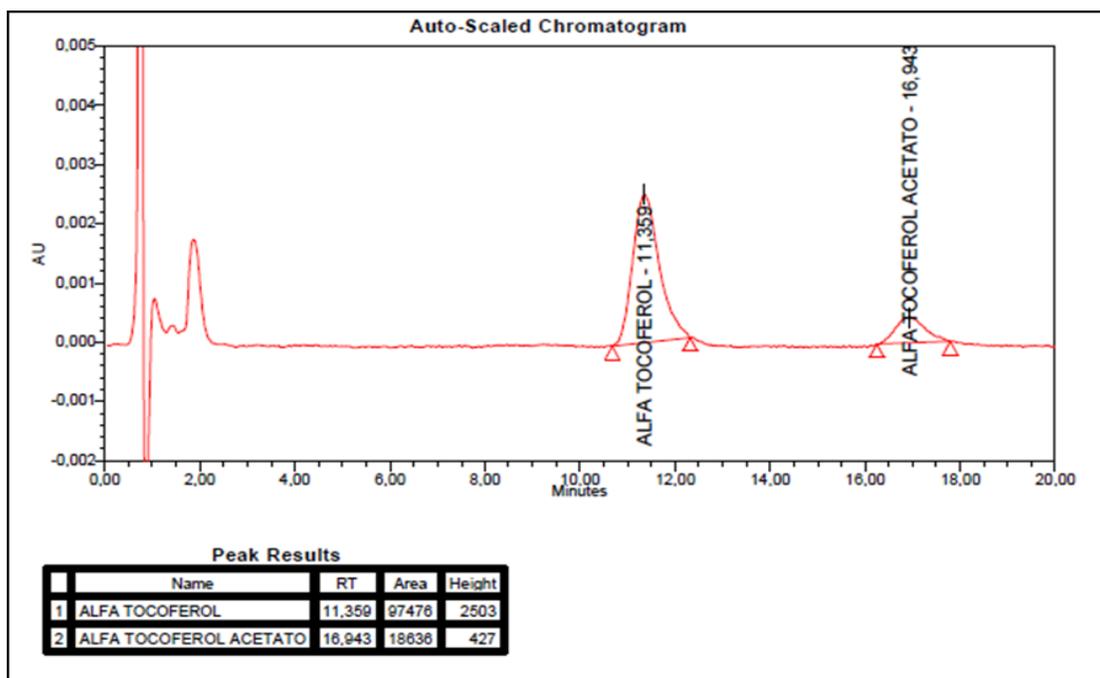


Figura 7 Cromatograma para la cuantificación de los niveles de vitamina E en leche.

El contenido de vitamina E se determinó utilizando un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC, Waters® modelo Productivity LCM-1S/s, Waters Corporation, Massachusetts, Estados Unidos), equipado con un detector automático de UV/Visible. Como fase estacionaria se utilizó una columna analítica Symmetry® C18, de 150 mm de

longitud, 3,9 mm de diámetro interno y 5 µm de tamaño de partícula (Waters Corporation, Massachusetts, Estados Unidos) y como fase móvil una solución de acetonitrilo, metanol y diclorometano en proporciones 70:20:5 en porcentaje del volumen total. Para la determinación se inyectaron 50 µl de la muestra, se estableció un flujo de 1 ml/min y se seleccionó una longitud de onda 292 nm en el detector. Los datos obtenidos fueron procesados con el software Millennium® 32, versión 4.0 (Scientific Equipment Source, Ontario, Canadá), que integra automáticamente los picos producidos en dicha cuantificación (Figura 7).

Determinación del perfil de ácidos grasos.

Para la extracción de la grasa, se añadió 1 ml de leche a un tubo de 10 ml de vidrio con tapón de rosca y a continuación se añadieron 2,5 ml de cloroformo, 5 ml de metanol y 1 ml de agua destilada (dH₂O). Esta mezcla se agitó en un equipo vortex durante dos minutos y a continuación se añadió 1 gota de una solución de agua miliQ y de HCl 6N y se agitó nuevamente durante 2 minutos. Posteriormente se dejó en reposo durante 30 minutos, con movimientos intercalados de agitación cada 5 minutos para maximizar la extracción lipídica. Transcurrido este tiempo, se añadieron 2,5 ml de cloroformo y 2 ml de dH₂O (miliQ) y se agitó durante 2 minutos. A continuación, se centrifugó a 1000 g durante 5 minutos para provocar una separación de las fases y, usando la técnica de doble pipeta, se retiró cuidadosamente la capa de cloroformo, evitando romper las diferentes fases contenidas en el tubo. La fase sobrenadante de cloroformo se transfirió a otro tubo limpio y se repitió la extracción con cloroformo (2 ml). La fase obtenida se desecó mediante evaporación bajo una corriente suave de nitrógeno. El contenido del tubo se agitó mediante un equipo vortex y se transfirió con una pipeta a los respectivos viales para cromatografía de gases (Supelco® 2ml, 9mm thread con septo y tapón Supelco®; Sigma-Aldrich Quimica SL Madrid, España) que se mantuvieron en refrigeración a 4 °C hasta la metilación, que se realizó al día siguiente de la extracción. El vial con la grasa extraída se sometió a una corriente suave de nitrógeno para evaporar el cloroformo y a continuación se añadieron 2 dos gotas de tolueno (Panreac®, pureza > 99.5%), 1,6 ml de hexano (Chromasolv® Plus, pureza > 95% Sigma-Aldrich Quimica SL Madrid, España) y 40 µl de metil acetato (Fluka®, > 95%; Sigma-Aldrich Quimica SL Madrid, España), se tapó el vial y se agitó utilizando un equipo vortex durante 30 segundos y se añadieron 100 µl de una solución 0,5 N de metóxido de sodio en metanol, se tapó el vial, y se agitó con el equipo vortex durante 5 segundos y se dejó en reposo durante 15 minutos con agitaciones ocasionales del mismo, durante 10 segundos. Trascurrido este tiempo, se enfrió a -20 °C durante 10 minutos y a continuación se añadieron 60 µl de ácido oxálico (0,5 g en 15 ml de dietiléter), se agitó

manualmente entre 5 y 10 segundos y se añadieron 100 µl de dH₂O. Posteriormente, se volvió a agitar manualmente y se centrifugó a 800 g durante 5 minutos para precipitar el oxalato de sodio. La fase sobrenadante se transfirió directamente a un vial de 2 ml para GC, en cuyo interior se había añadido sulfato sódico anhidro (Na₂SO₄, pureza > 99% ,Sigma-Aldrich St Louis, Estados Unidos).

La proporción de los diferentes ácidos grasos se determinó utilizando un equipo de cromatografía de gases (Agilent® Technologies GC System modelo 7890, California, Estados Unidos), siguiendo la metodología descrita por Aldai *et al.* (2012).

El contenido de los ácidos grasos metilados (FAME) se expresó como porcentaje (%) del total de ácidos grasos.

4.1.4 Sangre y plasma.

Las muestras de sangre fueron procesadas con un analizador automático (MEDONIC® Cellanalyzer CA530, Bromma, Sweden) que opera bajo el principio de impedancia electrónica para el recuento celular y la clasificación por tamaño de los elementos celulares y un método colorimétrico para medir la cantidad de hemoglobina. Para este trabajo se consideró un perfil de hematología con los parámetros que se enumeran en la tabla 2.

Tabla 2 Parámetros hemáticos analizados.

PARAMETRO	ABREVIATURA (Unidad de medida)
hematíes	RCB (mill./mm ³)
hematocrito	HTC (%)
leucocitos totales	WBC (miles/mm ³)
linfocitos	LYMF (miles/mm ³)
neutrófilos	GRAN (miles/mm ³)
monocitos	MID (miles/mm ³)
porcentaje de linfocitos sobre el total de WBC	% LYMF
porcentaje de granulocitos sobre el total de WBC	% GRAN
porcentaje de monocitos sobre el total de WBC	% MID

La capacidad antioxidante total en plasma fue medida de acuerdo al Equivalente-Trolox con el kit comercial ABTS® (Cayman Chemical, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante.

La determinación del contenido de vitamina E en plasma se realizó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detector UV/Visible, siguiendo la metodología descrita en el apartado 4.1.3.

La determinación de la concentración de Se en plasma se realizó mediante espectrofotometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento (ICP-MS PerkinElmer®, Inc.; Massachusetts, Estados Unidos). Para su análisis, las muestras fueron diluidas 1:10 en la solución NET (1% nítrico, 5% etanol, y 0,5% tritón X-100) y el equipo ICP-MS fue calibrado con estándares externos de 2, 10 y 50 ppb en NET, utilizando el isótopo 78 del Se y como patrón interno el isótopo 89 del I. Para la reducción de interferencias se utilizó una celda de reacción con gas NH₃.

La determinación de la concentración de Na, Ca, P, Mg y K se realizó mediante espectrofotometría de emisión atómica (ICP-OES PerkinElmer®, Inc.; Massachusetts, Estados Unidos). Para su análisis, las muestras fueron diluidas con agua milliQ (diluciones 1:10 para el P y 1:100 para el resto de elementos). El equipo de ICP-OES fue calibrado con patrones de 10 ppm para el análisis de las muestras.

Para la determinación de cloruros en plasma sanguíneo, las muestras fueron diluidas 1:100 en agua milliQ y analizadas por la técnica de Electroforesis Capilar (CE), siguiendo la metodología que se describe en el apartado 4.1.3.2.

En todos los análisis mencionados, las muestras de plasma se descongelaron antes de su análisis durante 24 h a 4 °C.

4.1.5 Glándula mamaria.

Las muestras de tejido mamario, inmediatamente después de su extracción, se fijaron mediante inmersión en una solución de formol tamponado, durante tres días. Posteriormente fueron incluidas en parafina, utilizando un procesador de tejidos circular automático (Myr® modelo STP-120), y deshidratadas y aclaradas en soluciones de alcohol, a concentraciones crecientes, y xilol. Los bloques obtenidos fueron cortados en secciones seriadas de 4 µm de espesor mediante un micrótomo (Finesse®, Termo Shandon, Estados Unidos), recogándose en portaobjetos tratados con albúmina de huevo. Los portaobjetos permanecieron en una estufa a 37 °C durante 24 horas.

Una sección de cada bloque se desparafinó con dos baños en xilol, de 15 minutos de duración cada uno. A continuación se hidrató mediante su paso en tres concentraciones decrecientes de alcohol (100, 96 y 60% v/v), durante 5 minutos cada una. Después, cada

sección se lavó con agua corriente, durante 5 minutos, y se tiñó con la técnica de hematoxilina-eosina (HE). Tras la tinción las secciones volvieron a ser lavadas con agua corriente, durante otros 5 minutos, y, nuevamente, introducidas en dos concentraciones crecientes de alcohol (96 y 100%) y xilol para su observación en el microscopio, una vez colocado el cubre objetos.

Las preparaciones histológicas fueron fotografiadas con una cámara fotográfica (Moticam® modelo 2 CMOS 2.0 MP) instalada en un microscopio compuesto (Motic® modelo BA 310 E). Se realizaron fotografías digitales, a 40 aumentos, de 20 campos al azar, siendo descargadas en el ordenador y procesadas mediante el software ImageJ® versión 1.43 (Rasband, W.S., ImageJ®, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, Estados Unidos).

En las fotografías se identificaron el mayor número posible de alvéolos mamarios, cuya visualización fuera completa, y se determinó el perímetro exterior y el área de éstos, ambos valores fueron expresados en micras (μm). Estas medidas fueron realizadas mediante las opciones del comando *Measure* de la función *Analyze* del software descrito. Una vez determinados los valores de perímetro exterior y del área de los alvéolos se realizó un recuento de núcleos en cada uno de los alvéolos identificados. El número de núcleos fue determinado mediante los comandos del menú *Pluggins*, la opción *Analyze* y las funciones *Cell Counter*. Para cada animal se analizaron 20 campos con una media de 2,4 alvéolos por campo.

4.1.6 Análisis estadístico.

Todos los análisis estadísticos que se describen a continuación se realizaron utilizando diferentes procedimientos del paquete estadístico SAS (SAS Inst. Inc, Cary, NC).

Los datos de ingestión, peso, producción y composición de leche (excepto el perfil de ácidos grasos) y de los parámetros plasmáticos fueron analizados como medidas repetidas utilizando el procedimiento MIXED.

En el caso de los datos de ingestión y peso, el modelo incluyó los efectos fijos del tratamiento antioxidante (control vs suplemento AOX), el periodo (periodo 1 vs periodo 2), la semana anidada al periodo (periodo 1: semanas 1 a 3; periodo 2: semanas 4 a 11) y sus interacciones. El efecto del tratamiento antioxidante se contrastó con el efecto del lote anidado al tratamiento [lote(tratamiento AOX)]. El efecto del periodo y de la interacción

entre tratamiento AOX y periodo se contrastó con el efecto del periodo x lote (tratamiento AOX). El efecto de la semana(periodo) y de la interacción tratamiento AOX x semana(periodo) se contrastó con el error residual. En el caso de la ganancia diaria de peso, el modelo no incluyó los efectos de la semana y sus interacciones.

Los datos de producción y composición de leche (extracto seco, grasa, proteína y lactosa) de cada día fueron promediados para la semana (11 semanas: 3 del periodo 1 y 8 del periodo 2). Dentro de cada periodo experimental (periodos 1 y 2), el modelo estadístico empleado incluyó los efectos fijos del tratamiento antioxidante (control vs AOX), glándula, semana y las diferentes interacciones. El efecto del tratamiento experimental fue contrastado con el efecto de la oveja anidada al tratamiento [oveja(tratamiento AOX)]. El efecto de la glándula (equivalente a la frecuencia de ordeño en el periodo 2) y la interacción entre los efectos del tratamiento AOX y la glándula se contrastaron con el efecto de la glándula x oveja (tratamiento AOX). El efecto de la semana y las diferentes interacciones se contrastaron con el error residual. Para analizar, en cada periodo, los datos de contenido de vitamina E y de los minerales en la leche se utilizó el mismo modelo descrito anteriormente, pero considerando únicamente dos días en el periodo 1 (días 14 y 21) y otros dos en el periodo 2 (días 49 y 77). Los datos relativos al día 1 (inicio del experimento) se utilizaron como covariable, eliminando la misma del modelo cuando no resultó significativa ($P > 0,05$).

En lo que respecta a los datos de componentes hemáticos y de los diferentes parámetros plasmáticos, el modelo incluyó los efectos fijos del tratamiento AOX, periodo y semana. No obstante, en el caso de los parámetros hemáticos el periodo 1 incluyó los datos de los días 14 y 21 y los del periodo 2 los correspondientes a los días 35, 49, 63 y 77. En los parámetros plasmáticos, el periodo 1 incluyó los datos de los días 14 y 21 y los del periodo 2 los de los días 49 y 77. El efecto del tratamiento AOX se contrastó con el efecto de la oveja anidada al tratamiento. El efecto del periodo y su interacción con el tratamiento AOX se contrastó con el efecto periodo x oveja (tratamiento AOX). Los restantes efectos se contrastaron con el error residual. Este modelo se evaluó incluyendo o no los datos de la semana 1 (día 1) como covariable.

En cada análisis de medidas repetidas se probaron las estructuras de covarianza simétrica compuesta, no estructurada y autoregresiva de primer orden, seleccionando la más adecuada para cada caso de acuerdo con los criterios de información bayesiano de Schwarz (BIC) y de Akaike sin (AIC) y con corrección (AICC).

El perfil de ácidos grasos y la capacidad antioxidante (RANCIMAT), en cada periodo (pdo 1: día 21; pdo 2: día 77) se analizó utilizando el procedimiento GLM, incluyendo en el modelo los efectos fijos del tratamiento antioxidante (Control vs AOX), de la glándula (equivalente a la frecuencia de ordeño en el periodo 2) y de su interacción. El efecto del suplemento se contrastó con el efecto de la oveja anidada al tratamiento. Los restantes efectos se contrastaron con el error residual [glándula x oveja (tratamiento AOX)].

Los análisis de correlación lineal entre los diferentes parámetros se llevaron a cabo utilizando el procedimiento COR.

En el caso de los datos histológicos, se utilizó la prueba exacta de Fisher para estudiar, en cada una de las glándulas, la asociación entre la presencia y grado de inflamación en la glándula y la dieta consumida por los animales (Control vs AOX). La asociación entre la frecuencia de ordeño [Glándula A (1x) vs Glándula B (2x)] y la presencia de inflamación se determinó utilizando el test de McNamer para datos pareados. Ambas pruebas no paramétricas se realizaron empleando el procedimiento FREQ del paquete SAS.

El número de células epiteliales por micras de perímetro del acini se analizó utilizando el mismo procedimiento y modelo estadístico empleado en el análisis del perfil de ácidos grasos.

4.2 EXPERIMENTO II. EFECTO A CORTO Y MEDIO PLAZO DE LA FRECUENCIA DE ORDEÑO EN OVEJAS CON DIFERENTE POTENCIAL PRODUCTIVO Y CAPACIDAD CISTERNAL SOBRE LA PRODUCCIÓN Y COMPOSICIÓN DE LA LECHE, EL PERFIL METABÓLICO Y EL ESTADO SANITARIO DE LA UBRE.

4.2.1 Animales y dietas.

Para esta prueba se utilizaron 21 ovejas de raza assaf, procedentes del rebaño experimental del Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-IGM), que se distribuyeron en 3 grupos de 7 animales cada uno, de acuerdo con su producción de leche:

- Grupo BP (producción baja): en este grupo se integraron animales cuya producción de leche osciló entre 1 093 y 1 790 g/día, al inicio del ensayo experimental.
- Grupo MP (producción media): en este grupo se integraron animales cuya producción de leche osciló entre 1 990 y 2 528 g/día, al inicio del ensayo experimental.
- Grupo AP (producción alta): en este grupo se integraron animales cuya producción de leche osciló entre 2 663 y 3 013 g/día, al inicio del ensayo experimental.

Los animales experimentales se seleccionaron entre un total de 100 ovejas, de manera que los grupos fueran equilibrados en la edad y peso de los animales, así como en el número de lactación y en la fase de lactación (ver tabla 3). La selección se realizó después de un mínimo de 50 días tras el parto, con la finalidad de que todos los animales hubiesen superado el pico de lactación.

Para seleccionar los animales de acuerdo con su producción láctea, se registró la misma para cada animal en dos días (-7 y -5), la semana previa al inicio del ensayo. Con el objeto de reducir la variación debida a las diferencias entre glándulas dentro de cada animal, se seleccionaron aquellos animales con menor variación entre glándulas en la producción de leche.

Para cada uno de los grupos se seleccionaron animales con diferente producción de leche cisternal, con el objetivo de disponer de un rango similar de variación en todos los

grupos. Para ello, tres días antes de iniciarse el ensayo experimental, se administró por vía endovenosa a cada animal y antes de entrar en La sala de ordeño un antagonista de la oxitocina (Atosiban[®], Hybio Pharmaceutical Co., Ltd., China), de acuerdo con el protocolo descrito en el apartado 4.1.1. El fraccionamiento del ordeño se realizó tanto en el ordeño de la mañana como de la tarde, registrándose la producción de leche de cada glándula.

El peso de los animales se registró los días -2 y -1, después del ordeño de la mañana, utilizando una báscula con una precisión de ± 100 g (Magriña[®], España).

Tabla 3 Características (valor medio \pm esm1) de las ovejas de cada grupo experimental al inicio del experimento: edad, peso, días de lactación, producción media de leche, cociente entre las producciones de leche de cada glándula, proporción de leche cisternal y cociente entre las proporciones de cada glándula.

	Grupos experimentales		
	BP	MP	AP
Edad (meses)	29 \pm 2,4	28 \pm 2,5	32 \pm 2,2
Peso (kg/animal)	73 \pm 1,8	61 \pm 2,5	75 \pm 2,0
Nº lactación	1,4 \pm 0,20	1,4 \pm 0,20	1,7 \pm 0,18
Días tras el parto	62 \pm 2,0	58 \pm 2,1	59 \pm 2,3
Producción de leche (PL; g/oveja y día)	1 474 \pm 104,9	2 175 \pm 74,7	2 805 \pm 42,5
PL glándula A/PL glándula B	1,06 \pm 0,032	1,02 \pm 0,036	0,97 \pm 0,026
Leche cisternal (% LC/Leche total)	0,66 \pm 0,032	0,71 \pm 0,034	0,68 \pm 0,042
LC glándula A/LC glándula B	1,05 \pm 0,044	1,01 \pm 0,029	0,94 \pm 0,054

¹ error estándar de la media

Previamente al inicio del experimento, todos los animales del rebaño se manejaron en un mismo lote y recibieron la misma dieta utilizada durante el experimento, administrada a voluntad. Una vez seleccionadas las ovejas para la prueba experimental, éstas se manejaron como un único lote. Se alojaron en un corral de 60 m² de superficie, con cama de paja. Los animales dispusieron de agua fresca a voluntad, suministrada mediante bebederos automáticos. Los animales recibieron *ad libitum* la misma ración que consumían antes del inicio de la prueba experimental, cuya composición figura en la tabla 4. Para evitar la competencia entre animales, la ración diaria se distribuyó en tres comederos, de 2 m de longitud y doble entrada, que permitía el acceso a la comida de todos los animales al mismo tiempo (8 animales/comedero).

Tabla 4 Ingredientes y composición química de la ración consumida por los animales durante el periodo experimental.

INGREDIENTES	(g/kg)
Alfalfa deshidratada	300
Cebada	230
Maíz	120
Torta de Soja 44	80
Avena	70
Semilla de algodón	50
Pulpa de Remolacha	40
Torta de colza	30
Harina de girasol	30
Melaza de caña	25
Carbonato de calcio	13
Cloruro de sodio	5
Harinillas de trigo	3
Premezcla vitamínico-mineral	4
Vitamina A (UI/kg)	7000
Vitamina D3 (UI/kg)	1400
Vitamina E (mg/kg)	8
Zinc (mg/kg)	34
Selenio (mg/kg)	0,2
COMPOSICIÓN QUÍMICA	(g/kg)
Materia seca (MS)	897
Proteína bruta (PB)	167
Fibra neutro detergente (FND)	247
Grasa	46
Cenizas	65

Este trabajo experimental fue desarrollado de acuerdo al Real Decreto Español 53/2013 para la protección de los animales usados en la experimentación y otros fines científicos.

4.2.2 Desarrollo experimental.

La prueba experimental tuvo una duración de 10 semanas y se dividió en dos periodos, durante los cuales se modificó la frecuencia de ordeño de 2 (TDM) a 1 (ODM) ordeño:

- Período 1, de 4 semanas de duración (días 1 a 28), durante el cual las ovejas se ordeñaron dos veces al día (2x). Aproximadamente a las 8:30 y 17:00 horas.
- Período 2, de 6 semanas de duración (días 29 a 70) y durante el cual las ovejas se ordeñaron una vez al día (1x).

Las características de la sala y de la rutina de ordeño son las mismas descritas en el experimento I. A lo largo del periodo experimental se efectuaron los controles y medidas descritas a continuación.

4.2.2.1 Producción y composición de la leche.

Los días 1, 7, 14, 28, 29, 30, 32, 35, 42, 49, 56, 63 y 70 se realizó un control de la producción de leche individual para cada glándula, utilizando para ello medidores automáticos (DeLaval® MM 25 SG, Alemania). Se tomó una muestra de leche de cada glándula (40 ml aproximadamente), por la mañana o por la mañana y la tarde en correspondencia con el diseño experimental (1x vs. 2x), para determinar la composición de la leche (extracto seco, proteína, grasa, lactosa) y para el recuento de células somáticas (RCS). Las muestras recogidas fueron conservadas con Bronopol® (D and F Control Systems Inc., Estados Unidos) y mantenidas a 4 °C hasta su posterior análisis (aprox. 24 horas después). La producción de leche de cada animal se calculó sumando las producciones de cada glándula. La composición se calculó a partir de la composición de la leche de cada glándula ponderando para su producción.

4.2.2.2 Perfil metabólico plasmático.

Los días 28, 30, 32, 35, 49 y 70 del periodo experimental se tomaron muestras de sangre de cada uno de los animales para la determinación de lactosa [(como indicador de daño en las uniones intercelulares estrechas del epitelio mamario (*tigh junctions*))] y de diferentes metabolitos que han sido utilizados como marcadores de la respuesta inflamatoria aguda (APP positivas: Haptoglobina, Ceruloplasmina; APP negativas: Albúmina, Paraoxonasa, Colesterol total), del estado antioxidante y funcionamiento hepático [Peróxido de hidrógeno, FRAP (*ferric reducing ability of plasma*) y GOT(aspartato amino-transferasa)] y del metabolismo energético y proteico [Glucosa, ácidos grasos no esterificados (NEFA), β -hidroxi-butirato y Urea] (Bertoni *et al.*, 2008; Grossi *et al.*, 2012; Trevisi *et al.*, 2013).

La extracción de sangre se realizó, después del ordeño de la mañana y antes de la distribución de alimento, mediante punción en la vena yugular. La sangre extraída se recogió en tubos de vacío (BD Vacutainer® BD-Plymouth, PL6 7BP, UK), de 10 ml de capacidad con heparina-litio como anticoagulante.

Las extracciones de sangre se llevaron a cabo del modo más breve posible y las muestras obtenidas fueron almacenadas en agua con hielo hasta su traslado al laboratorio, siendo el tiempo máximo empleado desde la primera extracción hasta el traslado inferior a los 40 minutos. Una vez en el laboratorio, las muestras se centrifugaron inmediatamente a

1000 g durante 10 minutos a 4 °C y el plasma obtenido fue almacenado en varios tubos Ependorff® de 2 ml cada uno (Eppendorf Ibérica, Madrid, España), que se congelaron a -30 °C para su posterior análisis.

4.2.3 Análisis físico-químico.

4.2.3.1 Leche.

En las muestras de leche se determinó su contenido de grasa, proteína, extracto seco y lactosa y el número de células somáticas, utilizando los mismos métodos descritos en el experimento I. Los análisis se llevaron a cabo en el Centro de Selección y Reproducción Animal de la Junta de Castilla y León (CENSYRA), dentro de las 24 horas siguientes a su obtención.

4.2.3.2 Plasma.

La determinación de los parámetros plasmáticos anteriormente mencionados se llevó a cabo con un equipo autoanalizador ILAB 650® (ILAB 600, Instrumentation Laboratory, Massachusetts, Estados Unidos). Los análisis fueron realizados en el laboratorio de bioquímica sanguínea del *Istituto de Zootechnica (Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza; Italia)*.

4.2.4 Cálculos matemáticos y análisis estadístico.

Todos los análisis estadísticos que se describen a continuación se realizaron utilizando diferentes procedimientos del paquete estadístico SAS (SAS Inst. Inc, Cary, NC).

Para describir la curva de lactación tras el cambio de frecuencia de ordeño se ajustaron los datos de producción de leche (desde el día 32 al día 70 de ensayo experimental) al siguiente modelo descrito por Wood (1967): $y_t = a \cdot t^b \cdot e^{-c \cdot t}$, donde y_t es la producción de leche (g/día) en el tiempo t (día) y a , b y c son parámetros positivos.

El ajuste se llevó a cabo mediante un proceso iterativo, de acuerdo con el procedimiento NLIN y utilizando el método modificado de Gauss-Newton.

A partir de los parámetros del modelo se calculó el tiempo necesario (T max) para alcanzar la máxima producción de leche (PL max) utilizando la siguiente ecuación:

$$T_{\max}(\text{días}) = \frac{-b}{c}$$

Sustituyendo la T_{\max} en la ecuación original, se calculó el nuevo pico de producción, es decir, la producción de leche máxima (PL max).

La persistencia en el periodo pre y en post2 se calculó, sobre una base temporal de 30 días, utilizando las siguientes ecuaciones:

$$Persistencia_{pre}(\%) = 1 - \frac{(PL_{\text{día}1} - PL_{\text{día}28}) \times \left(\frac{30}{28}\right)}{PL_{\text{día}1}}$$

$$Persistencia_{post}(\%) = 1 - \frac{(PL_{\text{día}35} - PL_{\text{día}70}) \times \left(\frac{30}{35}\right)}{PL_{\text{día}1}}$$

Los datos de producción y composición de leche y de los parámetros plasmáticos fueron analizados como medidas repetidas utilizando el procedimiento MIXED.

En el caso de los datos de producción y composición de leche, el modelo estadístico incluyó el efecto fijo del grupo (con 3 niveles: BP, MP y AP), el periodo [pre (2 ordeños al día), periodo post1 (efecto a corto plazo de 1 ordeño al día) y post2 (efecto a medio plazo de 1 ordeño al día)], el día anidado al periodo (Periodo pre: días 1, 7, 14, 28; Periodo post1: días 29, 30; Periodo post2: días 32, 35, 42, 49, 56, 63 y 70) y sus interacciones. El efecto del grupo se contrastó con el efecto de la oveja anidada al tratamiento [oveja (grupo)]. El efecto del periodo y de la interacción entre grupo y periodo se contrastó con el efecto del periodo x oveja (grupo). El efecto del día (periodo) y de la interacción grupo x día (periodo) se contrastó con el error residual [(oveja(grupo) x día (periodo))].

En lo que respecta a los parámetros plasmáticos, el modelo estadístico incluyó el efecto fijo del grupo (con 3 niveles: BP, MP y AP) y el día (28, 30, 32, 35, 49 y 70) y sus interacciones. El efecto del grupo se contrastó con el efecto de la oveja anidada al

tratamiento [oveja(grupo)]. El efecto del día y de la interacción entre grupo y día se contrastó con el error residual [día x (oveja(grupo))].

En cada análisis de medidas repetidas se probaron las estructuras de covarianza simétrica compuesta, no estructurada y autoregresiva de primer orden, seleccionando la más adecuada para cada caso de acuerdo con los criterios de información bayesiano de Schwarz (BIC) y de Akaike sin (AIC) y con corrección (AICC).

Para estudiar el efecto del nivel de producción (grupos experimentales) sobre la reducción en la producción de leche y la producción máxima tras el cambio de frecuencia de ordeño, así como sobre el tiempo necesario para alcanzar el nuevo pico de producción y la persistencia de la lactación (antes y después del cambio de frecuencia de ordeño) se realizó un análisis de varianza de una vía, utilizando como error el efecto de la oveja anidada al grupo experimental. Los análisis se llevaron a cabo utilizando el procedimiento GLM.

Dentro de cada grupo experimental, la comparación de la producción de leche entre glándulas para cada día de muestreo y de la persistencia antes y después del cambio de frecuencia de ordeño, se realizó utilizando una t de student para datos pareados, usando el procedimiento MEANS.

Los análisis de regresión lineal simple o múltiple (cuadrática) se llevaron a cabo utilizando el procedimiento REG, con el método stepwise y un nivel de probabilidad para la entrada de variables en el modelo inferior a 0,10.

5 Resultados.

5.1 EXPERIMENTO I. EFECTO DE LA FRECUENCIA DE ORDEÑO Y DE LA ADMINISTRACIÓN DE UN SUPLEMENTO ANTIOXIDANTE (VITAMINA E Y SELENIO) SOBRE LA INGESTIÓN, LA EVOLUCIÓN DE PESO, LA CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE VITAMINA E Y MINERALES, LA PRODUCCIÓN Y COMPOSICIÓN DE LA LECHE Y EL ESTADO SANITARIO DE LA GLÁNDULA MAMARIA.

5.1.1 Ingestión y evolución del peso vivo.

En la tabla 5 figuran los valores medios de la ingestión de materia seca (g MS/animal y día), la ganancia diaria de peso vivo (g/día) y el peso vivo final (kg) para cada grupo y período experimental.

Tabla 5 Valores medios de la ingestión diaria de materia seca(MSI), de peso vivo final (PVF) y de la ganancia diaria de peso (GDP) para cada grupo Control vs AOX(recibió el suplemento antioxidante) y periodo experimental (Pdo1: semanas 1 a 3 con dos ordeños diarios en cada glándula; Pdo2: semana 4 a 11 con dos ordeños diarios en una glándula y un ordeño diario en la otra glándula).

	Control		AOX		ESD ¹	ESD ²	Probabilidad		
	Pdo 1	Pdo 2	Pdo 1	Pdo2			S	Pdo	S•Pdo
MSI(gMS/animal•día)	3288	3443	3230	3349	0,07	0,03	ns	*	ns
GDP(g/animal•día)	221	95	183	71	8,8	31,9	‡	‡	ns
PVF(kg)	79,7	85,8	80,6	84,3	1,65	0,86	ns	*	ns

¹Error estándar de la diferencia para el efecto del suplemento AOX (Vit E + Se)

²Error estándar de la diferencia para el efecto del período.

Probabilidad para el efecto del suplemento AOX (S), período (Pdo) y su interacción (S•Pdo).

ns: P> 0,10; ‡: P<0,10; *: P<0,05.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas (P>0,10) en la ingestión de MS debidas al suplemento antioxidante administrado a los animales.

El periodo de experimento sí influyó en el consumo (P<0,05), siendo mayor en el segundo periodo (Figura 8). Así, la ingestión de MS fue alrededor de un 4,5 % y un 3,5% mayor, durante dicho período, para el grupo control y para el grupo AOX, respectivamente.

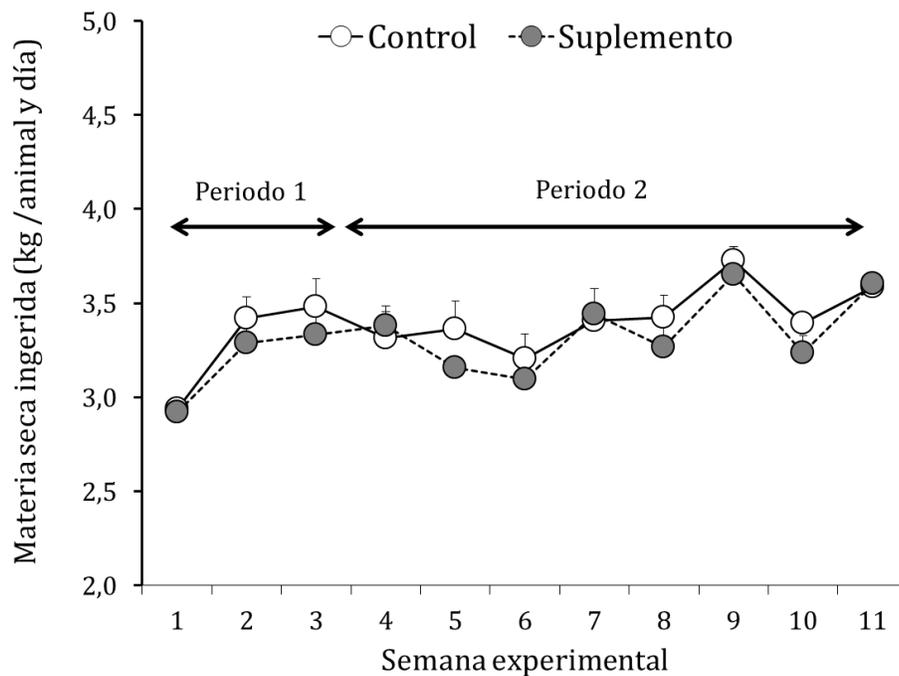


Figura 8 Evolución semanal de la ingestión de MS para cada grupo experimental [Control vs AOX(recibió el suplemento antioxidante)].

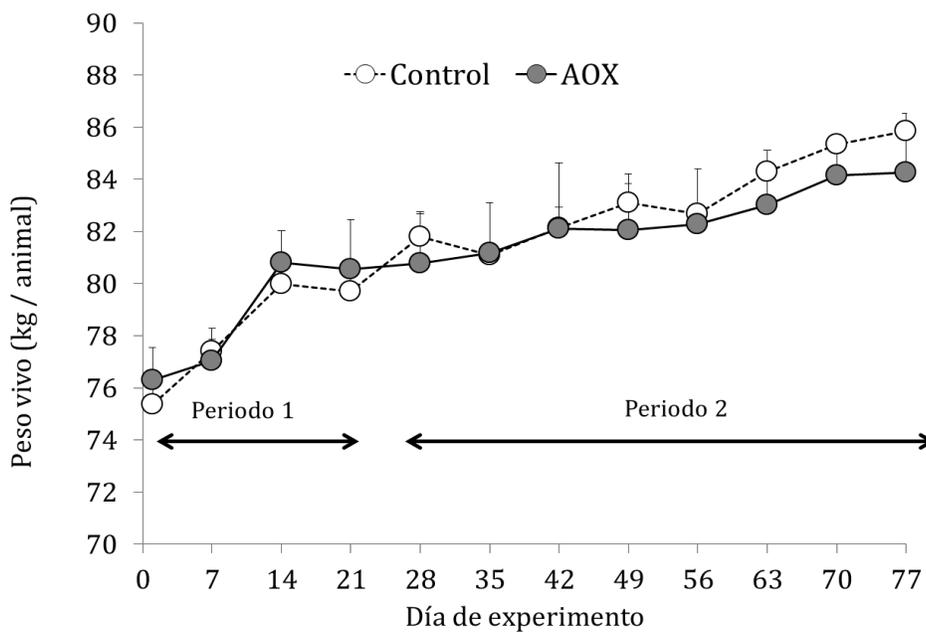


Figura 9 Evolución del peso vivo a lo largo del experimento para cada grupo experimental [Control vs AOX(recibió el suplemento antioxidante)].

Las diferencias observadas entre tratamientos experimentales y entre periodos en la ganancia diaria de peso mostraron una tendencia a la significación ($P < 0,10$), siendo ésta mayor en el grupo control. En relación con el periodo, la GDP fue mayor en el primer período para ambos grupos experimentales.

Como cabría esperar, se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) atribuibles al periodo en el peso vivo final de los animales, correspondiendo los mayores valores al segundo periodo experimental, tal y como aparece reflejado en la figura 9.

5.1.2 Perfil hemático.

En la tabla 6 se recogen los valores medios de los principales componentes hemáticos para cada grupo y período experimental. Cabe indicar que la inclusión de los valores correspondientes al día 1 como covariable en el modelo empleado para el análisis de varianza no fue significativa ($P > 0,05$).

Tabla 6 Valores medios de los principales componentes hemáticos [HCT= Hematocrito (%), RCB = Hematíes (millones/mm³), WBC=Leucocitos totales (miles/mm³), LYMF= Linfocitos (miles/mm³), GRAN= Granulocitos (miles/mm³), MID= Monocitos (miles/mm³), %LYMF= Porcentaje de linfocitos, %GRAN= Porcentaje de granulocitos, %MID= Porcentaje de monocitos] para cada grupo Control vs AOX(recibió el suplemento antioxidante).y en cada período experimental (periodo 1: días 14 y21; periodo 2: días 35, 49, 63 y 77).

	Control		AOX		ESD ¹	ESD ²	Probabilidad ³		
	Pdo 1	Pdo 2	Pdo 1	Pdo 2			S	Pdo	S•Pdo
HCT	39,16	33,38	37,86	33,22	1,018	0,670	ns	***	ns
RCB	10,44	8,97	9,79	8,74	0,268	0,234	ns	***	ns
WBC	14,15	11,62	13,12	9,88	0,668	0,642	*	***	ns
LYMF	6,92	5,35	6,54	4,18	0,520	0,438	ns	***	ns
GRAN	6,34	5,39	5,68	4,94	0,231	0,287	*	*	ns
MID	0,89	0,87	0,88	0,75	0,043	0,038	ns	ns	ns
%LYMF	48,87	44,01	49,79	41,06	2,138	1,504	ns	***	‡ (0,08)
%GRAN	44,79	48,06	43,18	51,06	1,845	1,440	ns	***	‡ (0,09)
%MID	6,32	7,89	6,93	7,87	0,670	0,372	ns	***	ns

¹Error estándar de la diferencia para el efecto del suplemento AOX (Vit. E + Se).

²Error estándar de la diferencia para el efecto del período.

³Probabilidad para el efecto del suplemento AOX (S), período (Pdo) y su interacción (S•Pdo).

ns: $P > 0,10$; ‡: $P < 0,10$; *: $P < 0,05$; ***: $P < 0,001$.

El suplemento AOX consumido por los animales influyó significativamente ($P < 0,05$) en el recuento total de células blancas y de granulocitos, correspondiendo los mayores valores a los animales del grupo control (figura 10).

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P > 0,10$) atribuibles a la administración del suplemento AOX, en el resto de los parámetros hemáticos estudiados.

El periodo experimental afectó significativamente ($P < 0,05$) a la mayoría de los parámetros hemáticos determinados excepto ($P > 0,10$) al recuento total de monocitos. En ambos grupos experimentales el hematocrito, el recuento de células rojas, de células blancas, de linfocitos y granulocitos fue menor ($P < 0,05$) en el segundo periodo.

En relación con la fórmula leucocitaria, el porcentaje de linfocitos fue menor ($P < 0,001$) en el segundo periodo. Sin embargo, este efecto no fue independiente del suplemento administrado, observándose una menor reducción en los animales del grupo AOX.

El porcentaje de granulocitos y de monocitos fue mayor ($P < 0,001$) en el segundo periodo. No obstante, en el caso de los granulocitos el efecto del periodo dependió del suplemento administrado a los animales, encontrándose los mayores valores en el grupo AOX.

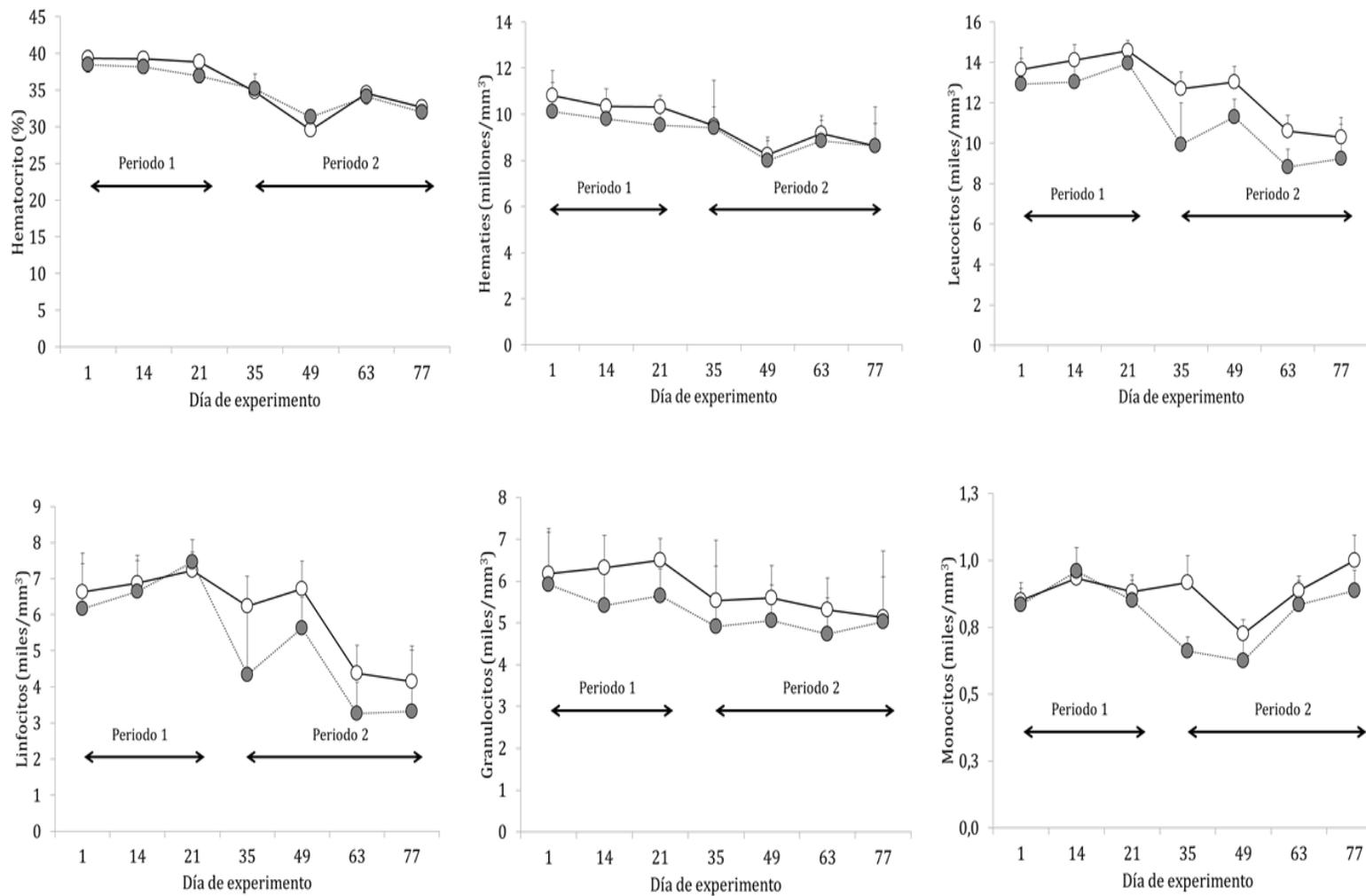


Figura 10 Evolución del perfil hemático de las ovejas a lo largo del experimento para cada tratamiento (Control ○ y AOX ●) y período [(Pdo1-2x vs 2x) y (Pdo2-1x vs 2x)].

5.1.3 Contenido de minerales, vitamina E y capacidad antioxidante del plasma.

En la tabla 7 se pueden observar los valores medios del contenido de vitamina E y de diferentes minerales en el plasma, así como la capacidad antioxidante del mismo, expresada en equivalentes Trolox (mM ET), correspondientes a los diferentes grupos y periodos experimentales.

Tabla 7 Valores medios del contenido plasmático de vitamina E (Vit. E) y de diferentes minerales así como de la capacidad antioxidante del plasma (Antiox), para cada grupo [Control vs AOX(recibió el suplemento antioxidante)] y en cada período experimental (período 1: día 21; período 2: día 77).

	Control		AOX		ESD ¹	ESD ²	Probabilidad		
	Pdo1	Pdo2	Pdo1	Pdo2			S	Pdo	S•Pdo
Vit E (UI/ml)	1,04	0,80	1,64	1,49	0,116	0,078	***	*	ns
Se (µg/L)	151	139	157	138	8,85	3,81	ns	**	ns
Ca (mg/L)	97	98	100	100	2,37	1,64	ns	ns	ns
P (mg/L)	121	119	114	114	7,28	4,18	ns	ns	ns
Na (mg/L)	2 733	2 724	2 830	2 710	26,31	19,53	ns	**	*
K (mg/L)	177	172	192	156	5,87	3,91	ns	***	**
Cl (mg/L)	2 835	2 865	2 970	2 892	151,4	91,1	ns	ns	ns
Mg (mg/L)	32	31	32	27	1,93	0,90	ns	**	ns
Antiox ³	1,40	1,21	1,73	1,46	0,11	0,06	*	*	ns

¹Error estándar de la diferencia para el efecto del suplemento AOX (Vit. E + Se).

²Error estándar de la diferencia para el efecto del período.

³Trolox= Capacidad antioxidante del plasma en mM equivalentes Trolox (mmol/L).

Probabilidad para el efecto del suplemento AOX (S), período (Pdo) y su interacción (S•Pdo).

ns: P>0,10; †: P<0,10; *: P<0,05; ***: P<0,001.

Como refleja la figura 11, no hubo diferencias entre grupos experimentales en ninguno de los parámetros en las muestras recogidas el día 1. Cuando se incluyó este día de muestreo como covariable en el modelo de análisis de varianza su efecto no fue significativo (P>0,05), por lo que se eliminó del mismo.

La administración del suplemento vitamínico-mineral afectó significativamente a la concentración plasmática de vitamina E (P<0,001) y a la capacidad antioxidante del plasma (P<0,05), registrándose los mayores valores en el grupo AOX.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas (P>0,10) en la concentración plasmática de los minerales determinados debidas al suplemento vitamínico-mineral administrado a los animales.

El periodo experimental influyó sobre los contenidos plasmáticos de vitamina E, selenio, sodio, potasio y magnesio, no afectando (P>0,10) a los de calcio, fósforo y cloro.

La mayor concentración plasmática ($P < 0,05$) de Vitamina E se observó en el primer periodo, siendo el comportamiento similar en ambos grupos experimentales.

Las concentraciones plasmáticas de Se ($P < 0,001$), Na ($P < 0,01$), K ($P < 0,001$) y Mg ($P < 0,05$) fueron mayores en el primer periodo experimental. Sin embargo, en el caso del Na y del K este efecto dependió del suplemento administrado a los animales. En ambos casos, las mayores diferencias fueron observadas en el grupo AOX. Asimismo, la capacidad antioxidante del plasma también fue significativamente mayor ($P < 0,05$) en el primer período experimental.

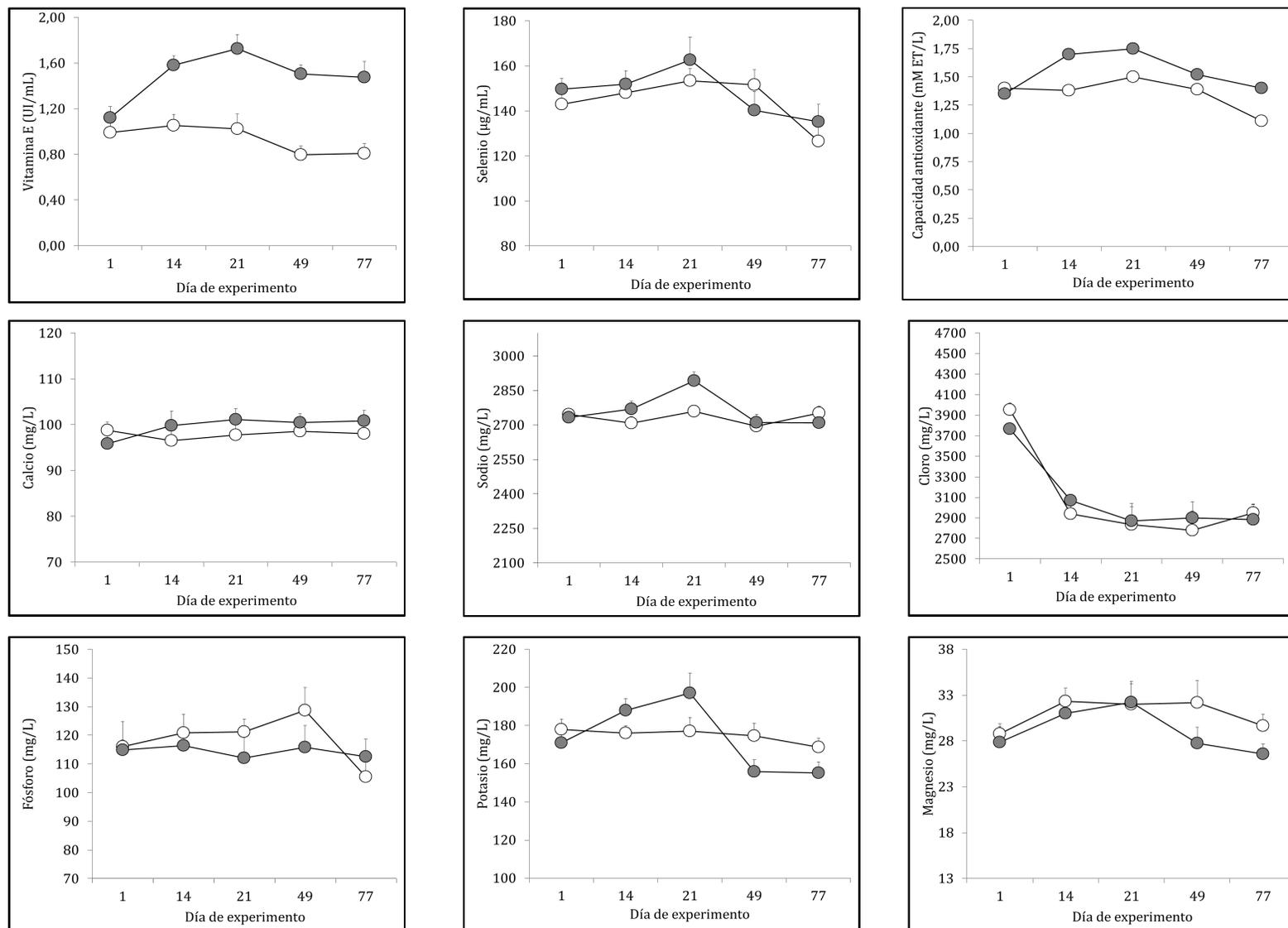


Figura 11 Evolución de la concentración plasmática de vitamina E, Se, Ca, P, Na, K, Cl y Mg y de la capacidad antioxidante a lo largo del experimento para cada tratamiento (Control ○ y AOX ●) y período [(Pdo 1: días 14 y 21; 2x vs 2x) y (Pdo2: días 49 y 77)].

5.1.4 Producción y composición de la leche.

En la figura 12 se recoge la evolución de la producción de leche a lo largo del experimento para cada grupo experimental y glándula.

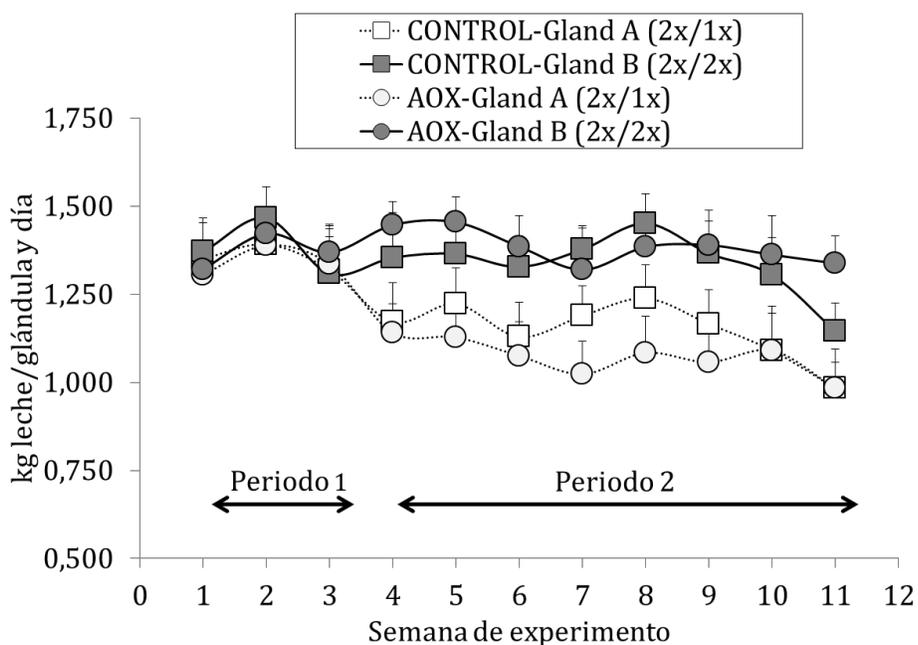


Figura 12 Evolución de la producción de leche para cada grupo experimental y glándula a lo largo del experimento.

En la tabla 8 se presentan los valores medios de la producción diaria de leche y su composición (contenido de grasa, proteína, lactosa y extracto seco) para cada glándula y grupo experimental, en cada uno de los dos periodos experimentales.

En el primer periodo experimental no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P>0,10$) debidas a la administración del suplemento vitamínico-mineral ni sobre la producción diaria de leche ni sobre su composición.

La glándula mamaria tampoco afectó ($P>0,10$), en este mismo periodo, ni a la producción diaria de leche ni a su composición.

La administración del suplemento vitamínico-mineral tampoco influyó significativamente ($P>0,10$) ni sobre la producción de leche ni sobre su composición en el segundo periodo experimental.

Sin embargo, en el segundo periodo experimental se observaron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) tanto en la producción como en la composición de la leche, debidas a la glándula mamaria, que, en este periodo, se ordeñaron con diferente frecuencia de ordeño (2x vs 1x). Así, la reducción de la frecuencia de ordeño de dos (2x) a un ordeño al día (1x) provocó una disminución ($P < 0,001$) de la producción de leche.

En lo que respecta a la composición de la leche, se encontró una disminución ($P < 0,01$) del contenido de lactosa (5,08 vs 4,97%) y un aumento ($P < 0,001$) en el contenido de proteína (5,11 vs 5,20 %) en la glándula sometida a un ordeño al día

El contenido de grasa (5,57 vs 5,72 %,.) no fue afectado ($P > 0,10$) por la reducción de la frecuencia de ordeño, mientras que el contenido de extracto seco mostró una tendencia ($P < 0,07$) a ser mayor en la leche producida por la glándula ordeñada una vez al día (16,83 vs 16,66 %).

En la tabla 9 figuran los valores medios de la producción de los componentes mayoritarios de la leche (grasa, proteína y lactosa) y de extracto seco.

En el primer periodo experimental, al igual que cuando estos componentes fueron expresados en porcentaje, no hubo efecto ($P > 0,10$) sobre la producción de ninguno de ellos que pudiera ser atribuido ni a la administración del suplemento vitamínico-mineral ni a la glándula.

Sin embargo, en el segundo periodo la producción de todos los componentes mayoritarios disminuyó ($P < 0,001$) al reducirse la frecuencia de ordeño.

Tabla 8 Valores medios de la producción y composición (componentes mayoritarios) de leche para cada grupo (Control y AOX) y glándula, correspondiente a cada periodo experimental (período 1 : ambas glándulas se ordeñaron dos veces al día; período 2 : glándula A se ordeñó una vez al día y glándula B dos veces al día).

Ítem ¹	Control		AOX		ESD ²	ESD ³	Probabilidad (P) ⁴		
	Glándula A	Glándula B	Glándula A	Glándula B			S	G	S•G
Período 1	2x	2x	2x	2x					
Producción de leche (g• oveja/ día)	1 354	1 382	1 344	1 371	131,7	30,1	ns	ns	ns
Grasa (%)	5,57	5,40	5,43	5,23	0,220	0,085	ns	ns	ns
Proteína (%)	5,11	5,15	5,06	5,08	0,184	0,033	ns	ns	ns
Lactosa (%)	5,08	5,12	5,17	5,19	0,088	0,021	ns	ns	ns
Sólidos Totales (%)	16,66	16,57	16,57	16,40	0,314	0,099	ns	ns	ns
Período 2	1x	2x	1x	2x					
Producción de leche (g• oveja y día)	1 146	1 336	1 038	1 356	117,3	40,8	ns	***	ns
Grasa (%)	5,72	5,65	5,60	5,49	0,161	0,101	ns	ns	ns
Proteína (%)	5,20	5,00	5,08	4,83	0,143	0,037	ns	***	ns
Lactosa (%)	4,97	5,03	4,98	5,13	0,091	0,033	ns	**	ns
Sólidos Totales (%)	16,83	16,62	16,59	16,38	0,212	0,104	ns	†	ns

²Error estándar de la diferencia para el efecto del suplemento AOX.

³Error estándar de la diferencia para el efecto de la glándula.

⁴Probabilidad para el efecto del suplemento AOX (S), glándula (G) y su interacción (S•G).

ns: P>0,10; †: P<0,10; *: P<0,05; ** P<0,01; ***: P<0,001.

Tabla 9 Valores medios de la producción de los componentes mayoritarios de la leche (grasa, proteína, lactosa y extracto seco) expresados en g por oveja y día para cada grupo (Control y AOX) y glándula, correspondiente a cada periodo experimental (período 1 : a ambas glándulas se ordeñaron dos veces al día; período 2 : glándula A se ordeñó una vez al día y glándula B dos veces al día).

Ítem ¹	Control		AOX		S ESD ²	G ESD ³	Probabilidad (P) ⁴		
	Glándula A	Glándula B	Glándula A	Glándula B			S	G	S•G
Período 1	(2x)	(2x)	(2x)	(2x)					
Grasa	75,8	74,8	72,7	71,4	7,76	1,87	ns	ns	ns
Proteína	69,0	70,9	68,0	69,6	6,93	1,55	ns	ns	ns
Lactosa	68,9	70,9	69,3	70,9	6,56	1,55	ns	ns	ns
Sólidos Totales	225,8	229,0	222,1	224,3	21,76	2,67	ns	ns	ns
Período 2	(1x)	(2x)	(1x)	(2x)					
Grasa	65,5	75,4	58,5	75,2	6,60	2,66	ns	***	ns
Proteína	59,5	66,8	53,4	65,5	6,69	1,88	ns	***	ns
Lactosa	57,1	67,4	51,9	69,3	6,05	2,22	ns	***	ns
Sólidos Totales	192,9	222,2	173,5	222,7	20,04	6,99	ns	***	ns

²Error estándar de la diferencia para el efecto del suplemento AOX.

³Error estándar de la diferencia para el efecto de la glándula.

⁴Probabilidad para el efecto del suplemento AOX (S), glándula (G) y, su interacción (S•G).

ns: P>0,10; ***: P<0,001.

5.1.5 Contenido mineral, vitamínico y estabilidad a la oxidación de la leche.

En la tabla 10 se recogen los valores medios del contenido mineral y de vitamina E de la leche y del tiempo necesario para provocar la oxidación de la grasa láctea, que constituye una medida de la estabilidad oxidativa.

Tabla 10 Valores medios del contenido de selenio (Se), calcio (Ca), fósforo (P), sodio (Na), potasio (K), cloro (Cl), magnesio (Mg) y de vitamina E (Vit. E) de la leche y de la estabilidad a la oxidación de la grasa láctea (RANCIMAT) para cada grupo (Control y AOX) y glándula, correspondientes a cada periodo experimental (período 1: día 21, ambas glándulas se ordeñaron dos veces al día; período 2 : día 77, glándula A se ordeñó una vez al día y glándula B dos veces al día).

Item ¹	Tratamientos experimentales				ESD ¹	ESD ²	Probabilidad (P)		
	Control		AOX				S	G	S•G
	Glándula A	Glándula B	Glándula A	Glándula B					
Período 1	(2x)	(2x)	(2x)	(2x)					
Vit. E (UI)	0,126	0,140	0,197	0,221	0,035	0,016	*	ns	ns
Se(µg/Kg)	27	26	28	27	1,65	0,53	ns	ns	*
Ca (mg/Kg)	2 021	2 032	2 001	2 025	64,6	25,5	ns	ns	ns
P (mg/Kg)	2 067	2 132	1 952	2 120	73,2	96,9	ns	*	ns
Na (mg/Kg)	239	223	227	215	12,9	4,20	ns	**	ns
K (mg/Kg)	949	941	969	995	49,3	19,1	ns	ns	ns
Cl (mg/Kg)	695	843	700	823	54,4	50,5	ns	*	ns
Mg (mg/Kg)	151	140	140	137	9,48	2,02	ns	*	ns
RANCIMAT(h)	2,55	3,24	4,79	4,83	0,43	0,37	***	ns	ns
Período 2	(1x)	(2x)	(1x)	(2x)					
Vit. E (UI)	0,184	0,216	0,360	0,328	0,046	0,037	**	ns	ns
Se(µg/Kg)	22	21	22	23	1,43	0,67	ns	ns	ns
Ca (mg/Kg)	2 087	2 036	2 186	2 078	106,2	33,1	ns	*	ns
P (mg/Kg)	2 128	1 998	2 299	2 094	102,9	48,3	ns	**	ns
Na (mg/Kg)	210	287	208	274	30,0	20,41	ns	**	ns
K (mg/Kg)	807	884	897	982	59,2	24,3	ns	**	ns
Cl (mg/Kg)	963	899	1 009	927	82,8	65,6	ns	ns	ns
Mg (mg/Kg)	148	154	142	149	6,28	3,85	ns	ns	ns
RANCIMAT(h)	5,30	5,41	6,87	7,58	1,87	0,39	**	ns	ns

¹Error estándar de la diferencia para el efecto del suplemento AOX.

²Error estándar de la diferencia para el efecto de la glándula.

Probabilidad para el efecto del suplemento AOX (S), glándula (G) y su interacción (S•G).

ns: P>0,10; t: P<0,10; *: P<0,05; ** P<0,01; ***: P<0,001.

En el primer periodo experimental se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el contenido de vitamina E de la leche (P<0,05) y en la estabilidad a la oxidación de la grasa láctea (P<0,001), debidas a la administración del suplemento vitamínico-mineral. Tanto el contenido de vitamina E de la leche como la estabilidad a la oxidación de la grasa láctea fueron mayores en el grupo al que se le administró el suplemento vitamínico-mineral, siendo el comportamiento similar en ambas glándulas.

En este mismo periodo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($P > 0,10$) atribuibles a la administración del suplemento vitamínico-mineral en la concentración de ninguno de los elementos minerales determinados. Sin embargo, los contenidos de P, Na, Cl y Mg en la leche variaron entre glándulas.

En el segundo período experimental, se observaron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,01$) en el contenido de vitamina E de la leche y en la estabilidad a la oxidación de la grasa láctea, atribuibles a la administración del suplemento vitamínico-mineral. Ambos parámetros, tal y como sucedió en el primer periodo experimental, fueron mayores en el grupo AOX.

En este segundo período también se encontraron diferencias estadísticamente significativas, entre glándulas, en el contenido de Ca, P, Na y K de la leche. En ambos grupos experimentales el contenido de Ca y P fue mayor ($P < 0,001$) cuando la frecuencia de ordeño fue de una vez al día. Sin embargo, los contenidos de Na y K fueron mayores ($P < 0,01$) cuando la frecuencia de ordeño fue de dos veces al día.

5.1.6 Perfil de ácidos grasos de la leche.

El perfil de ácidos grasos de la leche correspondiente al día 21 (último día antes del cambio de frecuencia de ordeño) y 77 (último día del experimento) se recoge en las Tablas 11 a 14. En las citadas tablas se compara el perfil lipídico de la leche obtenida de los animales en los dos tratamientos experimentales (Control y AOX), así como en las dos glándulas (2x/2x en el día 21 y 1x/2x en el día 77).

Como cabría esperar, en el día 21 no se observaron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre glándulas para los principales grupos de ácidos grasos (SFA, MUFA y PUFA) ni para la mayoría de los ácidos grasos, ni en los índices de desaturación evaluados. En algunos ácidos grasos (C16:1, cis 9; C18:0, iso; C18:2, cis 9, cis 15; C19:0 y C24:0) sí se observaron diferencias significativas ($P < 0,05$) entre glándulas, pero todas ellas fueron de escasa magnitud.

Tabla 11 Valores medios para el porcentaje de los principales ácidos grasos de la leche para cada glándula y grupo experimental (Control y AOX), correspondientes al último día (21) del primer periodo experimental.

AG	Control		AOX		ESD ¹	ESD ²	Probabilidad (P)		
	Glánd. A (2x)	Glánd. B (2x)	Glánd. A (2x)	Glánd. B (2x)			S	G	S•G
4:0	3,15	3,14	3,22	3,22	0,0264	0,0225	ns	ns	ns
5:0	0,028	0,028	0,033	0,034	0,0071	0,0005	ns	ns	ns
6:0	3,10	3,11	3,07	3,05	0,2223	0,0145	ns	ns	ns
7:0	0,055	0,056	0,063	0,063	0,0141	0,0009	ns	ns	ns

8:0	3,31	3,38	3,18	3,14	0,2349	0,0152	ns	ns	ns
9:0	0,103	0,104	0,117	0,115	0,0276	0,0011	ns	ns	ns
10:0	10,35	10,42	9,92	9,80	0,4954	0,0506	ns	ns	ns
11:0	0,353	0,360	0,389	0,388	0,1435	0,0240	ns	ns	ns
12:0	5,77	5,82	5,40	5,33	0,4254	0,0300	ns	ns	ns
12:1, <i>cis</i> -9	0,198	0,200	0,219	0,215	0,0424	0,0017	ns	ns	ns
14:0, <i>iso</i>	0,088	0,084	0,078	0,077	0,0190	0,0012	ns	‡	ns
14:0	10,58	10,72	10,56	10,56	0,5018	0,0462	ns	ns	ns
14:1, <i>cis</i> -9	0,109	0,109	0,121	0,121	0,0155	0,0010	ns	ns	ns
15:0, <i>iso</i>	0,138	0,137	0,140	0,140	0,0300	0,0016	ns	ns	ns
15:0, <i>anteiso</i>	0,392	0,393	0,393	0,391	0,0531	0,0017	ns	ns	ns
15:0	0,989	0,996	1,084	1,073	0,1364	0,0044	ns	ns	ns
16:0, <i>iso</i>	0,083	0,082	0,077	0,077	0,0105	0,0009	ns	ns	ns
16:0	23,94	24,16	24,76	24,83	0,8573	0,0930	ns	ns	ns
16:1, <i>trans</i> -9	0,102	0,099	0,083	0,111	0,0648	0,0117	ns	ns	ns
16:1, <i>cis</i> -7	0,231	0,232	0,246	0,243	0,0155	0,017	ns	ns	ns
16:1, <i>cis</i> -9	0,561	0,569	0,663	0,667	0,0894	0,0028	ns	*	ns
17:0, <i>iso</i>	0,335	0,336	0,386	0,353	0,0494	0,0120	ns	ns	ns
17:0, <i>anteiso</i>	0,426	0,427	0,438	0,435	0,0583	0,0020	ns	ns	ns
17:0	0,648	0,652	0,683	0,685	0,0748	0,0023	ns	ns	ns
17:1, <i>cis</i> -5, • <i>cis</i> -7	0,044	0,043	0,047	0,046	0,0037	0,0007	ns	ns	ns
17:1, <i>cis</i> -9	0,142	0,174	0,204	0,205	0,0508	0,0015	ns	ns	ns
17:0, <i>cycle</i>	0,116	0,110	0,121	0,123	0,0237	0,0032	ns	ns	ns

Glánd. A (1x): glándula ordeñada una vez al día; Glánd. B (2x): glándula ordeñada dos veces al día. ¹Error estándar de la diferencia para el efecto del suplemento AOX.

²Error estándar de la diferencia para el efecto de la glándula.

Probabilidad para el efecto del suplemento AOX (S), glándula (G) y su interacción (S•G). ns: $P > 0.10$; ‡: ns: $P < 0,10$; *: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$; ***: $P < 0,001$.

Tabla 11. (continuación)

AG	Control		AOX		ESD ¹	ESD ²	Probabilidad (P)		
	Glánd. A (2x)	Glánd. B (2x)	Glánd. A (2x)	Glánd. B (2x)			S	G	S•G
18:0, <i>iso</i>	0,051	0,054	0,056	0,058	0,0129	0,0010	ns	*	ns
18:0	9,95	9,85	9,22	9,14	1,2120	0,0550	ns	ns	ns
18:1, <i>trans</i> -6, • <i>trans</i> -7, <i>trans</i> -8	0,385	0,412	0,413	0,425	0,0825	0,0117	ns	ns	ns
18:1, <i>trans</i> -9	0,442	0,413	0,427	0,437	0,1311	0,0326	ns	ns	ns
18:1, <i>trans</i> -10	0,985	1,00	1,21	1,17	0,4893	0,0506	ns	ns	ns
18:1, <i>trans</i> -11	2,16	1,60	1,37	1,81	0,7182	0,2969	ns	ns	ns
18:1, <i>trans</i> -12	0,485	0,494	0,505	0,502	0,0707	0,0070	ns	ns	ns
18:1, <i>cis</i> -9	13,37	13,34	14,30	14,27	0,8671	0,0521	ns	ns	ns
18:1, <i>cis</i> -11	0,566	0,603	0,635	0,638	0,1243	0,0193	ns	ns	ns
18:1, <i>cis</i> -12	0,401	0,406	0,416	0,414	0,0883	0,0021	ns	ns	ns
18:1, <i>trans</i> -16, • <i>cis</i> -14	0,394	0,395	0,413	0,417	0,0571	0,0029	ns	ns	ns
18:2, <i>trans</i> -9, <i>trans</i> -12	0,015	0,016	0,016	0,017	0,0026	0,0101	ns	ns	ns
18:2, <i>cis</i> -9, <i>cis</i> -15, • <i>trans</i> -8, <i>cis</i> -13	0,242	0,243	0,264	0,264	0,0237	0,0016	ns	ns	ns
18:2, <i>trans</i> -8, <i>cis</i> -13, • <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -12	0,122	0,118	0,140	0,140	0,0117	0,0057	*	ns	ns
18:2, <i>trans</i> -11, <i>cis</i> -15	0,032	0,026	0,036	0,036	0,0105	0,0031	ns	ns	ns
18:2, <i>cis</i> -9, <i>cis</i> -15	0,021	0,024	0,022	0,024	0,0058	0,0010	ns	*	ns
18:2, <i>trans</i> -7, <i>cis</i> -9	0,021	0,019	0,020	0,020	0,0058	0,0007	ns	ns	ns
18:2, <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11	0,810	0,818	0,813	0,790	0,3317	0,0101	ns	ns	ns
18:2, <i>cis</i> -11, <i>cis</i> -13	0,050	0,041	0,045	0,049	0,0062	0,0038	ns	ns	ns
Otros <i>trans-trans</i> , CLA	0,015	0,014	0,016	0,016	0,0037	0,0009	ns	ns	ns
18:2, <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -12	2,93	2,91	2,81	2,74	0,1871	0,0297	ns	ns	ns
18:3, <i>cis</i> -6, <i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12	0,428	0,421	0,423	0,409	0,0616	0,0060	ns	ns	ns
18:3, <i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12, <i>cis</i> -15	0,074	0,072	0,082	0,077	0,0366	0,0020	ns	‡	ns
19:0	0,166	0,173	0,179	0,187	0,0199	0,0036	ns	*	ns
20:0	0,032	0,068	0,019	0,019	0,0272	0,0114	ns	ns	ns
20:2, n-6	0,030	0,031	0,034	0,028	0,0075	0,0022	ns	ns	ns
22:0	0,081	0,080	0,051	0,051	0,0128	0,0054	*	ns	‡
20:3, n-6	0,027	0,026	0,028	0,027	0,0037	0,0010	ns	ns	ns
20:4, n-6	0,154	0,153	0,163	0,154	0,0214	0,0027	ns	‡	ns
22:2, n-6	0,020	0,010	0,009	0,009	0,0049	0,0032	‡	ns	ns
20:5, n-3	0,028	0,030	0,028	0,030	0,0043	0,0012	ns	ns	ns
24:0	0,041	0,040	0,046	0,040	0,0087	0,0016	ns	*	ns
22:5, n-3	0,095	0,097	0,091	0,088	0,0158	0,0015	ns	ns	ns

Glánd. A (1x): glándula ordeñada una vez al día; Glánd. B (2x): glándula ordeñada dos veces al día. ¹Error estándar de la diferencia para el efecto del suplemento AOX.

²Error estándar de la diferencia para el efecto de la glándula.

Probabilidad para el efecto del suplemento AOX (S), glándula (G) y su interacción (S•G). ns: $P > 0.10$; ‡: ns: $P < 0,10$; *: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$; ***: $P < 0,001$.

Tabla 12 Principales grupos de ácidos grasos de la leche y relaciones entre ellos e índices de desaturación para cada glándula y grupo experimental (Control y AOX), correspondientes al último día (21) del primer periodo experimental.

AG	Control		Vit. E		ESD ¹	ESD ²	Probabilidad (P)		
	Glánd. A (2x)	Glánd. B (2x)	Glánd. A (2x)	Glánd. B (2x)			S	G	S•G
SFA	75,65	73,11	72,00	71,74	1,3840	0,231	ns	ns	ns
MUFA	20,61	20,20	21,27	21,69	1,0510	0,246	ns	ns	ns
PUFA	3,78	3,74	3,67	3,56	0,2371	0,0441	ns	‡	ns
n3	0,198	0,195	0,199	0,195	0,0180	0,0030	ns	ns	ns
n6	3,59	3,55	3,47	3,37	0,2276	0,0395	ns	‡	ns
LA (no/conj.)	0,434	0,430	0,479	0,479	0,0387	0,0073	ns	ns	ns
CLA iso	0,895	0,891	0,896	0,877	0,3353	0,0101	ns	ns	ns
PUFA/SFA	0,053	0,051	0,051	0,052	0,0041	0,0011	ns	ns	ns
MUFA/SFA	0,284	0,278	0,296	0,302	0,0199	0,0044	ns	ns	ns
n6/n3	18,43	18,53	17,54	17,60	1,4925	0,1464	ns	ns	ns
<16 C	38,72	39,02	37,98	37,70	1,289	0,1562	ns	ns	‡
16 C	24,91	25,14	25,83	25,93	0,8906	0,0952	ns	ns	ns
> 16 C	36,36	35,84	36,18	36,36	1,436	0,2334	ns	ns	ns
ID 1	0,010	0,0102	0,011	0,011	0,0013	0,0001	ns	ns	ns
ID 2	0,023	0,023	0,026	0,026	0,0035	0,0002	ns	ns	ns
ID 3	0,578	0,581	0,608	0,609	0,0313	0,0011	ns	ns	ns
ID 4	0,286	0,330	0,397	0,340	0,0518	0,0310	ns	ns	ns

Glánd. A: glándula ordeñada una vez al día; Glánd. B: glándula ordeñada dos veces al día.

¹Error estándar de la diferencia para el efecto del suplemento AOX.

²Error estándar de la diferencia para el efecto de la glándula.

Probabilidad para el efecto del suplemento AOX(S), glándula (G) y su interacción (S•G).

ns: P>0,10; ‡: P<0,10; *: P<0,05; **: P<0,01; ***: P<0,001.

Id1= cis 9 C 14:1/(C 14:0+cis 9 C 14:1)

Id2= cis 9 C 16:1/(C 16:0+cis 9 C 16:1)

Id3= cis 9 C 18:1/(C 18:0+cis 9 C 18:1)

Id4= cis 9 trans 11 C 18:2/(trans 11 C 18:1+ cis 9 trans 11 C 18:2)

En el día 21 tampoco se observó un efecto significativo (P>0,05) del suplemento antioxidante sobre la proporción de los principales grupos de ácidos grasos ni de los ácidos grasos mayoritarios. Como consecuencia, tampoco se observaron diferencias en las relaciones entre los principales grupos (PUFA/SFA; MUFA/SFA; n-3/n-6) ni en los índices de desaturación evaluados.

En el día 77, la administración del suplemento antioxidante tampoco influyó significativamente (P>0,05) en las proporciones de SFA, MUFA y PUFA ni en las relaciones entre ellos. Sin embargo, la administración del suplemento AOX redujo de forma estadísticamente significativa (P<0,01) el porcentaje de AG de <16 carbonos y aumentó (P<0,05) el porcentaje de AG de 16 C o más átomos de carbono.

La proporción de los ácidos C6:0, C8:0, C10:0 y C12:0 fue menor ($P<0,05$) en el grupo AOX. En contraposición, la proporción del ácido C18:1 cis-9 aumentó significativamente ($P<0,05$) en los animales de este grupo respecto al control.

La frecuencia de ordeño influyó ($P<0,01$) en la proporción de MUFA, aumentando ésta al reducirse la frecuencia de ordeño. Este incremento fue consecuencia del aumento en las proporciones de diferentes isómeros de los ácidos C17:1 y C18:1.

La frecuencia de ordeño no afectó a la proporción total de SFA, pero las proporciones de C11:0, C14:0, C16:0, C17:0 ante iso y C22:0 disminuyeron ($P<0,05$) y las de los ácidos C15:0, C15:0 iso y C18:0 aumentaron al reducirse la frecuencia de 2 a 1 ordeño al día.

La frecuencia de ordeño tampoco afectó ($P>0,05$) a la proporción total de PUFA ni de isómeros de CLA, pero disminuyó la proporción de ácidos grasos n-3 C18:3 y C20:5. La proporción total de ácidos grasos omega-6 no varió significativamente ($P>0,05$) con la frecuencia de ordeño, si bien algunos ácidos de este grupo aumentaron (C18:2, trans-11, cis-15; C18:2 cis-9, trans-1) y otros disminuyeron (C20:4, C22:2) sus proporciones al reducirse la frecuencia de ordeño.

Los cambios señalados se tradujeron en diferencias significativas ($P<0,05$) en los diferentes índices de desaturación evaluados, disminuyendo al reducirse la frecuencia de ordeño en lo que respecta a los ácidos C14:0, C18:0 y C18:1 y aumentando en lo que se refiere al C16:0.

Tabla 13 Valores medios para el porcentaje de los principales ácidos grasos de la leche para cada glándula y grupo experimental (Control y AOX), correspondientes al último día (77) del segundo periodo experimental.

AG	Control		AOX		ESD ¹	ESD ²	Probabilidad (P)		
	Glánd. A (1x)	Glánd. B (2x)	Glánd. A (1x)	Glánd. B (2x)			S	G	S•G
4:0	3,24	3,19	3,39	3,36	0,184	0,033	ns	ns	ns
5:0	0,024	0,019	0,022	0,0024	0,0040	0,0022	ns	ns	ns
6:0	3,02	2,99	2,76	2,76	0,148	0,0139	*	ns	ns
7:0	0,032	0,033	0,027	0,029	0,0066	0,0017	ns	ns	ns
8:0	3,05	3,02	2,51	2,50	0,168	0,0218	***	ns	ns
9:0	0,059	0,062	0,048	0,052	0,0103	0,0019	ns	ns	ns
10:0	9,38	9,50	7,51	7,67	0,642	0,1015	***	ns	ns
11:0	0,068	0,073	0,050	0,055	0,0148	0,0016	ns	**	ns
12:0	4,63	4,68	3,58	3,62	0,4106	0,0617	**	ns	ns
12:1, <i>cis</i> -9	0,061	0,072	0,051	0,042	0,0124	0,0041	*	ns	*
14:0, <i>iso</i>	0,116	0,114	0,110	0,117	0,0167	0,0054	ns	ns	ns
14:0	10,20	10,46	9,65	9,91	0,551	0,1072	ns	*	ns
14:1, <i>cis</i> -9	0,147	0,168	0,134	0,159	0,0279	0,0065	ns	*	ns
15:0, <i>iso</i>	0,243	0,230	0,243	0,235	0,0374	0,0038	ns	*	ns
15:0, <i>anteiso</i>	0,477	0,464	0,485	0,484	0,0548	0,0082	ns	ns	ns
15:0	0,842	0,791	0,868	0,830	0,0616	0,0073	ns	***	ns
16:0, <i>iso</i>	0,302	0,283	0,251	0,251	0,0051	0,0054	ns	‡	‡
16:0	23,43	23,99	25,01	25,50	0,947	0,1262	*	**	ns
16:1, <i>trans</i> -9	0,129	0,136	0,107	0,114	0,0329	0,0022	ns	**	ns
16:1, <i>cis</i> -7	0,253	0,256	0,265	0,265	0,0283	0,0025	ns	ns	ns
16:1, <i>cis</i> -9	0,778	0,627	0,860	0,725	0,0787	0,0294	ns	***	ns
17:0, <i>iso</i>	0,342	0,341	0,342	0,343	0,0529	0,0060	ns	ns	ns
17:0, <i>anteiso</i>	0,287	0,476	0,272	0,466	0,049	0,0262	ns	***	ns
17:0	0,480	0,475	0,505	0,503	0,0293	0,0066	ns	ns	ns
17:1, <i>cis</i> -5, • <i>cis</i> -7	0,37	0,053	0,033	0,056	0,0053	0,0047	ns	**	ns
17:1, <i>cis</i> -9	0,147	0,148	0,164	0,166	0,0155	0,0032	ns	ns	ns
17:0, <i>cycle</i>	0,114	0,106	0,110	0,103	0,0249	0,0038	ns	‡	ns

Glánd. A (1x): glándula ordeñada una vez al día; Glánd. B (2x): glándula ordeñada dos veces al día.

¹Error estándar de la diferencia para el efecto del suplemento AOX.

²Error estándar de la diferencia para el efecto de la glándula.

Probabilidad para el efecto del suplemento AOX (S), glándula (G) y su interacción

ns: P>0,10; ‡: P<0,10; *: P<0,05; **: P<0,01; ***: P<0,001.

Tabla 13. (continuación).

AG	Control		AOX		ESD ¹	ESD ²	Probabilidad (P)		
	Glánd. A (1x)	Glánd. B (2x)	Glánd. A (1x)	Glánd. B (2x)			S	G	S•G
18:0, <i>iso</i>	0,042	0,037	0,042	0,036	0,0073	0,0044	ns	ns	ns
18:0	10,85	10,23	11,82	11,47	0,8177	0,1679	ns	**	ns
18:1, <i>trans</i> -6, • <i>trans</i> -7, <i>trans</i> -8	0,353	0,343	0,347	0,336	0,0438	0,0054	ns	ns	ns
18:1, <i>trans</i> -9	0,329	0,299	0,316	0,288	0,0371	0,0059	ns	***	ns
18:1, <i>trans</i> -10	0,588	0,602	0,582	0,600	0,4404	0,0225	ns	ns	ns
18:1, <i>trans</i> -11	1,98	1,87	1,53	1,43	0,4695	0,0313	ns	**	ns
18:1, <i>trans</i> -12	0,557	0,553	0,552	0,541	0,0653	0,0076	ns	ns	ns
18:1, <i>cis</i> -9	15,62	15,41	17,78	17,57	1,0248	1,1078	*	†	ns
18:1, <i>cis</i> -11	0,321	0,316	0,337	0,329	0,0329	0,0057	ns	ns	ns
18:1, <i>cis</i> -12	0,393	0,383	0,413	0,388	0,0648	0,047	ns	**	ns
18:1, <i>trans</i> -16, • <i>cis</i> -14	0,437	0,412	0,435	0,403	0,0678	0,0060	ns	***	ns
18:2, <i>trans</i> -9, <i>trans</i> -12	0,072	0,066	0,074	0,062	0,0069	0,0031	ns	*	ns
18:2, <i>cis</i> -9, <i>cis</i> -15, • <i>trans</i> -8, <i>cis</i> -13	0,302	0,298	0,323	0,316	0,0272	0,0056	ns	ns	ns
18:2, <i>trans</i> -8, <i>cis</i> -13, • <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -12	0,211	0,201	0,227	0,218	0,0198	0,0070	ns	ns	ns
18:2, <i>trans</i> -11, <i>cis</i> -15	0,104	0,092	0,108	0,097	0,0089	0,0038	ns	*	ns
18:2, <i>cis</i> -9, <i>cis</i> -15	0,054	0,056	0,060	0,055	0,0093	0,0054	ns	ns	ns
18:2, <i>trans</i> -7, <i>cis</i> -9	0,077	0,076	0,066	0,059	0,0091	0,0038	*	ns	ns
18:2, <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11	0,798	0,785	0,639	0,645	0,1794	0,0148	ns	ns	ns
18:2, <i>cis</i> -11, <i>cis</i> -13	0,040	0,029	0,039	0,027	0,0099	0,0050	ns	†	ns
Otros <i>trans-trans</i> , CLA	0,063	0,120	0,065	0,089	0,0134	0,0138	ns	**	ns
18:2, <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -12	3,14	3,05	3,13	3,01	0,2821	0,0221	ns	**	ns
18:3, <i>cis</i> -6, <i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12	0,449	0,445	0,442	0,425	0,054	0,0073	ns	ns	ns
18:3, <i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12, <i>cis</i> -15	0,224	0,275	0,221	0,287	0,0117	0,0057	ns	***	ns
19:0	0,490	0,509	0,525	0,538	0,0355	0,0082	ns	†	ns
20:0	0,037	0,030	0,033	0,031	0,0041	0,0043	ns	ns	ns
20:2, n-6	0,036	0,069	0,031	0,043	0,0184	0,0123	ns	†	ns
22:0	0,049	0,088	0,039	0,059	0,0157	0,0085	†	**	ns
20:3, n-6	0,093	0,088	0,100	0,119	0,0110	0,0066	*	ns	ns
20:4, n-6	0,165	0,185	0,169	0,203	0,0232	0,0060	ns	**	ns
22:2, n-6	0,045	0,076	0,053	0,082	0,0179	0,0117	ns	*	ns
20:5, n-3	0,056	0,088	0,041	0,068	0,0184	0,0076	ns	**	ns
24:0	0,050	0,071	0,048	0,0122	0,0094	0,0108	ns	ns	ns
22:5, n-3	0,077	0,082	0,082	0,088	0,0416	0,0051	ns	ns	ns

Glánd. A (1x): glándula ordeñada una vez al día; Glánd. B (2x): glándula ordeñada dos veces al día.

¹Error estándar de la diferencia para el efecto del suplemento AOX.

²Error estándar de la diferencia para el efecto de la glándula.

Probabilidad para el efecto del suplemento AOX (S), glándula (G) y su interacción

ns: P>0,10; †: P<0,10; *: P<0,05; **: P<0,01; ***: P<0,001.

Tabla 14 Principales grupos de ácidos grasos de la leche y relaciones entre ellos e índices de desaturación para cada glándula y grupo experimental (Control y AOX), correspondientes al último día (77) del segundo periodo experimental.

AG	Control		Vit. E		ESD ¹	ESD ²	Probabilidad (P)		
	Glánd. A (1x)	Glánd. B (2x)	Glánd. A (1x)	Glánd. B (2x)			S	G	S•G
SFA	69,94	70,22	68,38	68,66	1,601	0,1951	ns	ns	ns
MUFA	22,13	21,61	23,90	23,40	1,212	0,141	‡	**	ns
PUFA	4,28	4,36	4,27	4,32	0,3359	0,0531	ns	ns	ns
n3	0,358	0,443	0,343	0,443	0,0272	0,0136	ns	***	ns
n6	3,93	3,91	3,92	3,88	0,3292	0,0459	ns	ns	ns
LA(no/conj.)	0,744	0,714	0,794	0,749	0,0592	0,0193	ns	‡	ns
CLA iso	0,979	1,01	0,807	0,822	0,1817	0,0199	ns	ns	ns
PUFA/SFA	0,062	0,063	0,063	0,064	0,0066	0,0007	ns	ns	ns
MUFA/SFA	0,318	0,310	0,351	0,342	0,0249	0,0030	‡	*	ns
n6/n3	11,14	8,99	11,59	8,77	1,0075	0,3219	ns	***	ns
<16 C	35,58	35,88	31,42	31,85	1,4526	0,2511	***	ns	ns
16 C	24,90	25,30	26,49	26,86	0,9261	0,1316	*	**	ns
> 16 C	39,52	38,83	42,09	41,30	1,6563	0,3282	*	*	ns
ID 1	0,014	0,016	0,014	0,016	0,0020	0,0005	ns	**	ns
ID 2	0,032	0,026	0,033	0,028	0,0031	0,0011	ns	**	ns
ID 3	0,591	0,601	0,601	0,611	0,0219	0,0018	ns	**	ns
ID 4	0,290	0,296	0,302	0,319	0,0214	0,0038	ns	**	ns

Glánd. A: glándula ordeñada una vez al día; Glánd. B: glándula ordeñada dos veces al día.

¹Error estándar de la diferencia para el efecto del suplemento AOX.

²Error estándar de la diferencia para el efecto de la glándula.

Probabilidad para el efecto del suplemento AOX(S), glándula (G) y su interacción (S•G).

ns: P>0,10; ‡: P<0,10; *: P<0,05; **: P<0,01; ***: P<0,001.

Id1= cis 9 C 14:1/(C 14:0+cis 9 C 14:1)

Id2= cis 9 C 16:1/(C 16:0+cis 9 C 16:1)

Id3= cis 9 C 18:1/(C 18:0+cis 9 C 18:1)

Id4= cis 9 trans 11 C 18:2/(trans 11 C 18:1+ cis 9 trans 11 C 18:2)

5.1.7 Estado sanitario y estudio histopatológico de la glándula mamaria.

5.1.7.1 Recuento de células somáticas.

En la tabla 15 se presenta el valor medio del recuento de células somáticas (RCS) para cada grupo (Control y AOX), glándula y período experimental.

En el período 1 del experimento, cuando ambas glándulas se ordeñaron dos veces al día, no se observó diferencia en el RCS entre las glándulas (P>0,10). Sin embargo, en el segundo período experimental, se encontraron diferencias estadísticamente significativas (P>0,05) entre glándulas, siendo mayor el RCS en aquellas glándulas que se ordeñaron una vez al día (Glándula A).

Tabla 15 Valores medios del Recuento de células somáticas (RCS, log₁₀ células/mL) para cada grupo (Control y AOX) y glándula, correspondiente a cada periodo experimental (período 1: ambas glándulas se ordeñaron dos veces al día; período 2: glándula A se ordeñó una vez al día y glándula B dos veces al día).

Control	Vit. E	Probabilidad
---------	--------	--------------

Ítem ¹	Glándula	Glándula	Glándula	Glándula	ESD ²	ESD ³	(P) ⁴		
	A	B	A	B			S	G	S•G
Período 1	(2x)	(2x)	(2x)	(2x)					
RSC	4,89	4,88	5,01	4,89	0,115	0,049	ns	ns	ns
Período 2	(1x)	(2x)	(1x)	(2x)					
RSC	5,06	4,97	5,23	4,72	0,112	0,108	ns	*	†

Probabilidad para el efecto del suplemento AOX(S), glándula (G) y su interacción (S•G).

ns: P>0,10; †: P<0,10; *: P<0,05; **: P<0,01; ***: P<0,001.

La administración del suplemento AOX no influyó significativamente (P>0,10) en el RCS en ninguno de los dos periodos experimentales. Sin embargo, el efecto de la interacción entre la glándula y la administración del suplemento AOX mostró una tendencia a la significación (P<0,08), siendo el RCS mayor en la glándula ordeñada una vez al día en los animales que recibieron dicho suplemento.

5.1.7.2. Histopatología de la glándula mamaria.

En la figura 13 se presentan los valores medios del número de células epiteliales, expresados por alvéolo, en las glándulas sometidas a 1 o 2 ordeños al día en los animales sacrificados correspondientes a cada grupo experimental (Control vs AOX). No se observaron diferencias estadísticamente significativas (P>0,05) debidas a la administración del suplemento antioxidante ni a la frecuencia de ordeño. Como refleja la figura 14, el diámetro de los alveolos tampoco varió entre glándulas (P>0,05). Sin embargo, la diferencia entre los valores medios de los dos grupos experimentales mostró una tendencia a la significación (P<0,089).

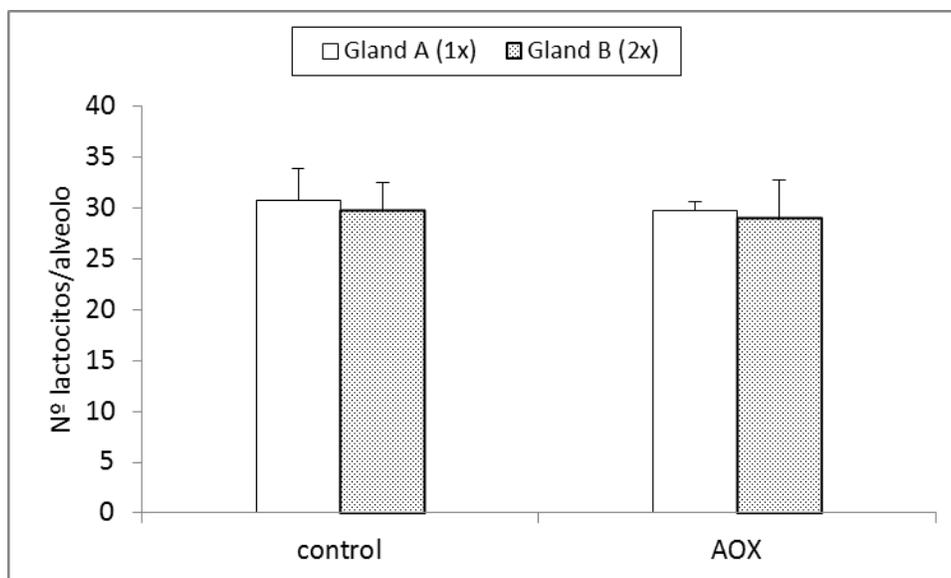


Figura 13 Número de células epiteliales/alveolo, en las glándulas sometidas a 1 [Gland A (1x)] o 2 [Gland B (2x)] ordeños al día en los animales sacrificados del grupo Control y del grupo que recibió el suplemento antioxidante (AOX).

En la figura 15 se presentan la distribución de los animales de acuerdo con la ausencia o presencia de infiltrado celular inflamatorio detectado en el análisis histológico de las muestras de glándula para cada grupo experimental. La proporción de casos con signos de inflamación no varió significativamente ($P > 0,10$) con el grupo experimental (75% para la glándula A y 25% para la glándula B en ambos grupos experimentales) ni tampoco con la frecuencia de ordeño, si bien en este último caso la proporción de casos con inflamación fue numéricamente mayor en las glándulas sometidas a 1 ordeño al día que en aquellas ordeñadas 2 veces al día, en ambos grupos experimentales. Cabe indicar que no se observaron infiltrados inflamatorios en las muestras del canal del pezón en ninguna de las glándulas analizadas.

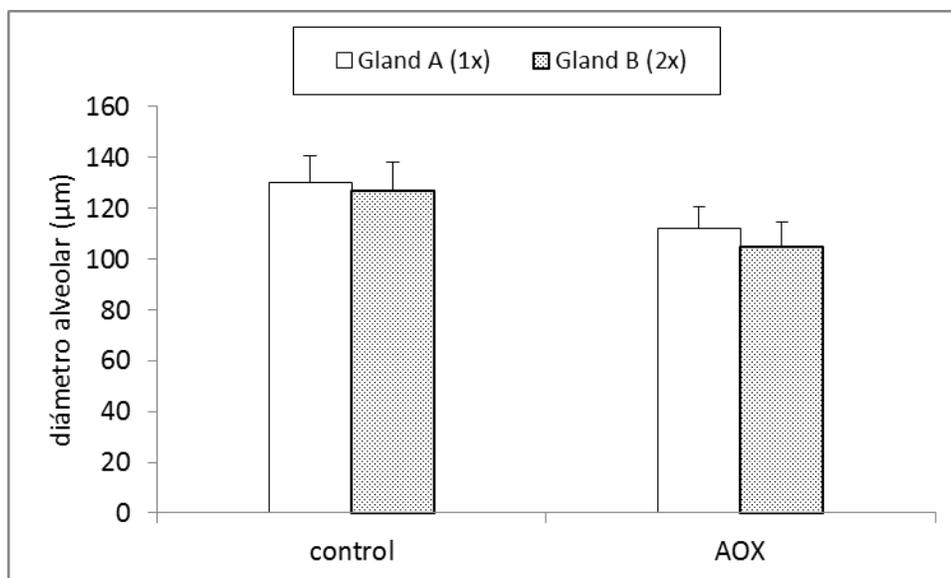


Figura 14 Diámetro de los alveolos en las glándulas sometidas a 1 [Gland A (1x)] o 2 [Gland B (2x)] ordeños al día en los animales sacrificados del grupo Control y del grupo que recibió el suplemento antioxidante (AOX).

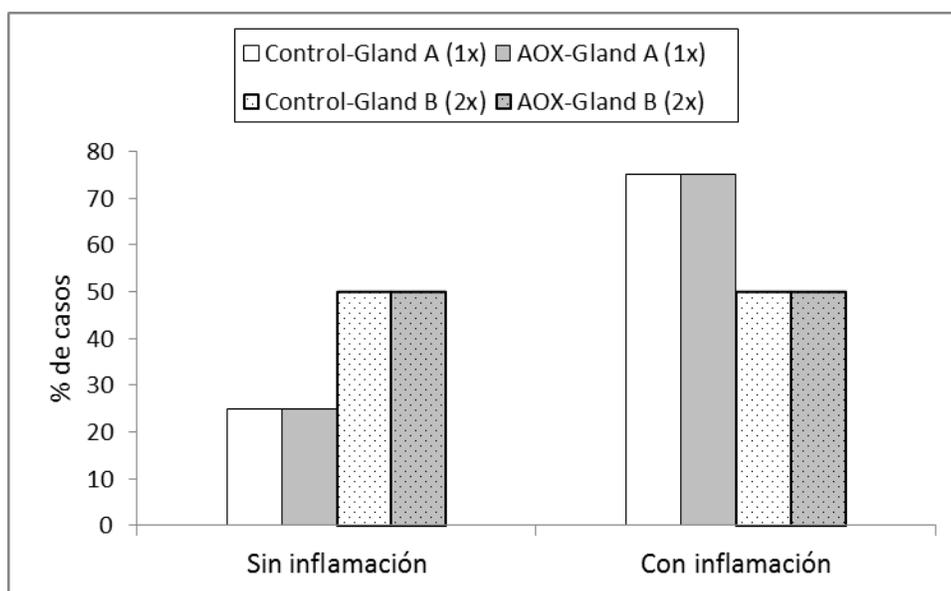


Figura 15 Distribución (%) de casos según la presencia o ausencia de infiltrado celular inflamatorio en la cisterna o parénquima de las glándulas sometidas a 1 [Gland A (1x)] o 2 [Gland B (2x)] ordeños al día en los animales sacrificados del grupo Control y del grupo que recibió el suplemento antioxidante (AOX).

Cuando se analizó la distribución de casos en función de la intensidad del infiltrado inflamatorio (figura 16), se observó una asociación entre ésta y la frecuencia de ordeño, de manera que la mayor intensidad se encontró exclusivamente en las glándulas ordeñadas una vez al día, tanto en el grupo control como en el que había recibido el suplemento antioxidante. En ninguna de las glándulas sometidas a dos ordeños que se analizaron se

observó infiltrado inflamatorio de mayor intensidad. En la figura 17 se recogen las imágenes histológicas que ilustran las diferencias en la intensidad del infiltrado inflamatorio.

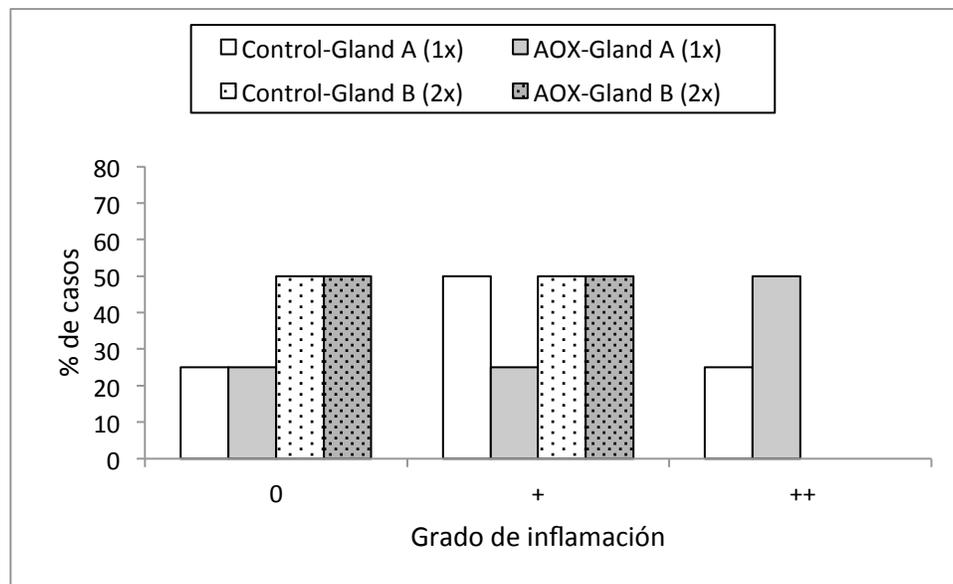


Figura 16 Distribución (%) de casos según la presencia e intensidad de inflamación en la cisterna o en el parénquima de las glándulas sometidas a 1 [Gland A (1x)] o 2 [Gland B (2x)] ordeños al día en los animales sacrificados del grupo Control y del grupo que recibió el suplemento antioxidante (AOX).

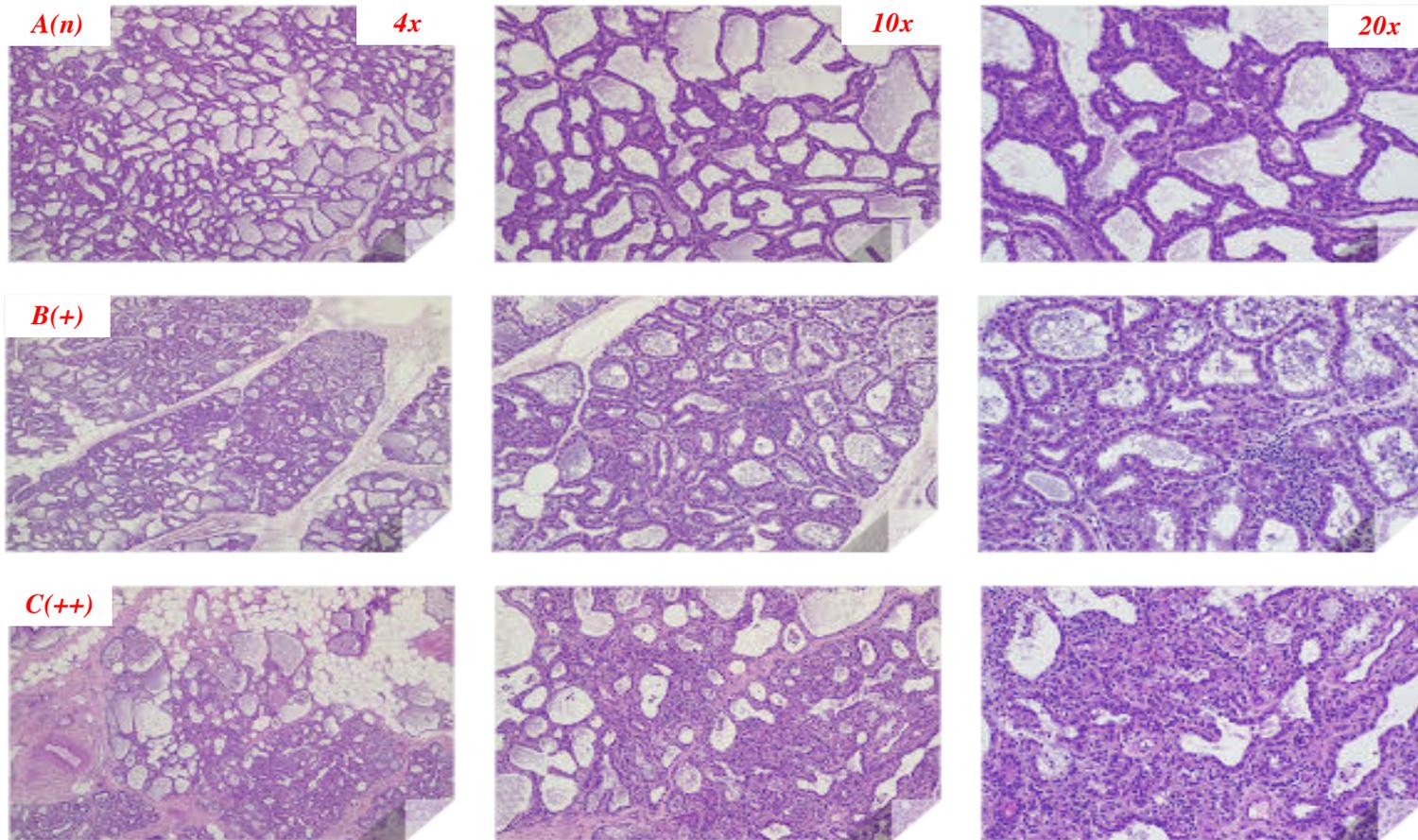


Figura 17 Comparación de las características histológicas de una glándula sin inflamación A(n) versus los diferentes grados de infiltración inflamatoria [B(+), C(++)] observado a diferentes aumentos ópticos (4X, 10X y 20X). El grado (+) se caracteriza por la presencia células mononucleares inflamatorias de forma aislada o formando pequeños agregados sin ocasionar una variación evidente en el diámetro de los alveolos afectados. El infiltrado de células inflamatorias de similares características pero en mayor número y distribución difusa se observa en el infiltrado inflamatorio de grado (++), donde un número evidente de alveolos mamarios muestra reducción de la luz y alteración de la forma.

5.2 EXPERIMENTO II. EFECTO A CORTO Y MEDIO PLAZO DE LA FRECUENCIA DE ORDEÑO EN OVEJAS CON DIFERENTE POTENCIAL PRODUCTIVO Y CAPACIDAD CISTERNAL SOBRE LA PRODUCCIÓN Y COMPOSICIÓN DE LA LECHE, EL PERFIL METABÓLICO Y EL ESTADO SANITARIO DE LA UBRE.

5.2.1 Producción de leche a lo largo del periodo experimental.

En la figura 18 se presentan los valores medios de producción de leche, expresados en g/glándula y día, para cada grupo experimental durante todo el periodo experimental.

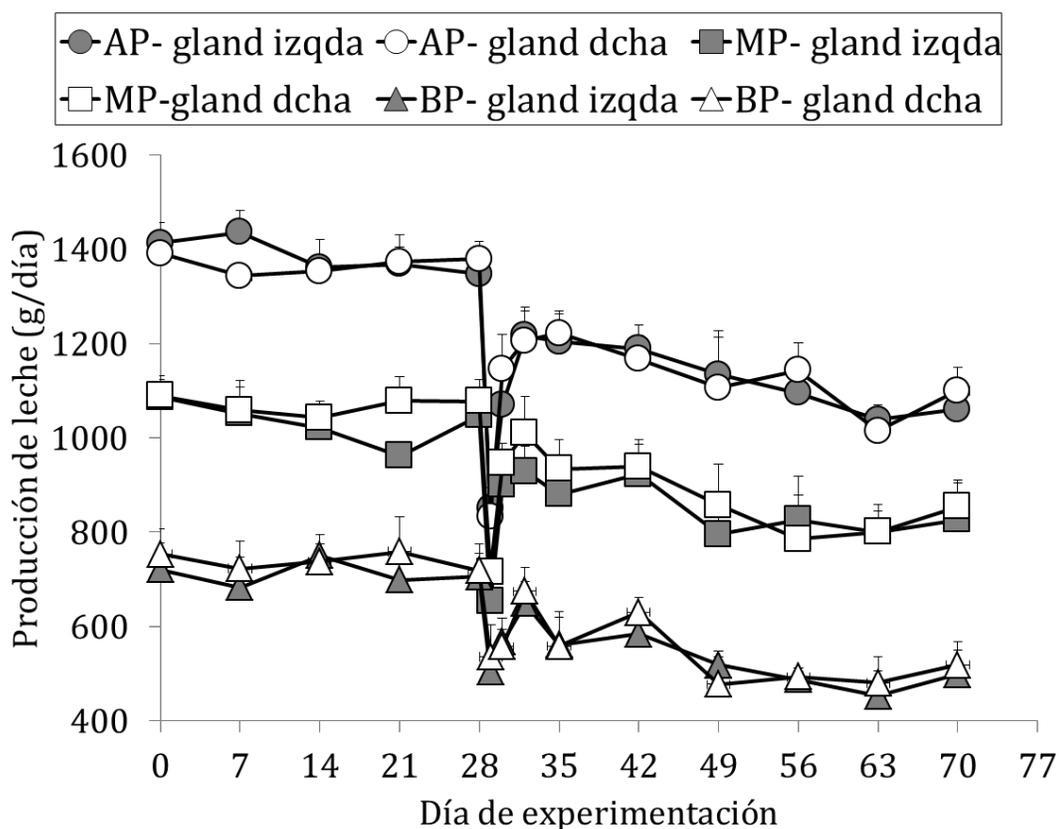


Figura 18 Valores medios de la producción de leche a lo largo del periodo experimental para cada glándula (izquierda vs derecha) en cada uno de los grupos experimentales (AP: producción alta; MP: producción media; BP: producción baja).

Como se mencionó en material y métodos, entre los criterios utilizados para seleccionar los animales se consideró que la producción de leche de las dos glándulas fuera lo más similar posible. A este respecto cabe señalar que, dentro de cada nivel de producción, las diferencias entre las dos glándulas en la producción de leche en cada uno de los días de registro no fueron significativas ($P > 0,05$) (Tabla 16), respondiendo de forma

análoga, ambas glándulas, en el cambio de frecuencia de ordeño. Esta semejante evolución avala la consideración del animal como unidad experimental, considerando la producción conjunta de ambas glándulas.

En la figura 19 se presentan los valores medios de producción de leche, expresados en g /oveja y día, para cada grupo experimental durante todo el periodo experimental. En la tabla 17 se recogen los valores medios, correspondientes a los tres periodos experimentales considerados (periodo preliminar, durante el cual las ovejas eran ordeñadas 2 veces al día; periodo post1, que abarca las 48 horas posteriores al cambio de frecuencia de ordeño de 2x a 1x; periodo post2, que abarca desde el 4º días tras el cambio hasta el final del periodo experimental) para cada grupo experimental y el resultado del análisis de varianza realizado.

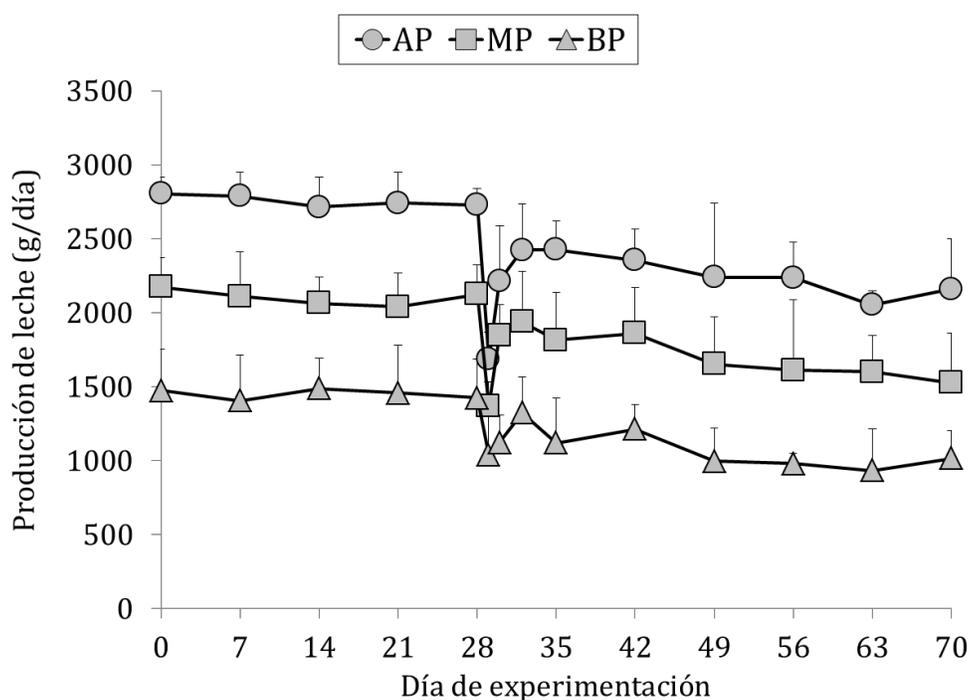


Figura 19 Valores medios de la producción de leche a lo largo del periodo experimental para cada uno de los grupos experimentales (AP: producción alta; MP: producción media; BP: producción baja).

El nivel de producción de los animales influyó en la producción de leche ($P < 0,001$), correspondiendo los mayores valores de producción, en todos los periodos experimentales, al grupo AP y los menores valores al grupo BP, situándose los valores de producción del grupo MP en una posición intermedia.

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,001$) entre periodos experimentales en la producción de leche. En todos los grupos experimentales el mayor valor se observó en el periodo pre. Sin embargo, este efecto dependió del nivel de producción de leche de los animales. Así, en el grupo AP la producción de leche fue diferente en los tres periodos experimentales, correspondiendo los mayores valores por orden decreciente: al periodo pre, periodo post2 y periodo post1. En los grupos BP y MP, los mayores valores correspondieron también al periodo pre, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) entre los otros dos periodos experimentales.

Tabla 16 Diferencia (g/día) entre glándulas en la producción leche para cada grupo experimental (AP: producción alta; MP: producción media; BP: producción baja) y día de muestreo (días 0, 7, 14, 21 y 28 con frecuencia a de ordeño 2x; 29, 30, 32, 35, 42, 49, 56, 63 y 70, con frecuencia de ordeño 1x).

		Frecuencia de ordeño 2x					Frecuencia de ordeño 1x								
		0	7	14	21	28	29	30	32	35	42	49	56	63	70
BP	Diferencia	-32,3	-40,0	12,9	-60,0	-12,9	-32,9	10,0	-25,7	2,8	-45,7	41,4	-5,7	-27,1	-20,0
	RSD	48,8	98,7	82,4	166,3	92,1	82,2	137,4	83,0	174,8	79,8	96,0	67,8	81,8	185,7
	P-value	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
MP	Diferencia	-3,3	-7,1	-21,0	-11,6	-30,4	-62,8	-47,1	-81,4	-54,3	-15,7	-61,4	40,0	0,0	-28,6
	RSD	78,5	87,1	151,8	105,7	72,9	122,6	103,2	93,9	117,3	86,2	157,9	122,1	120,3	139,6
	P-value	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
AP	Diferencia	21,3	92,6	78,6	4,3	-35,7	18,6	-75,7	11,4	-17,1	21,4	28,6	-47,1	24,3	-40,0
	RSD	153,1	168,0	134,6	151,0	171,7	139,0	234,3	105,1	213,3	169,9	171,7	116,6	186,6	18,6
	P-value	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

ns = P>0,10; * P<0,05; ** P<0,01; *** P<0,001

Tabla 17 Valores medios de producción de leche (g/ oveja y día) para cada uno de los grupos (AP: producción alta; MP: producción media; BP: producción baja) y períodos experimentales (período pre: días 0, 7, 14, 21 y 28, con frecuencia de ordeño 2x; período pos t1: días 29 y 30 con frecuencia de ordeño 1x; período post2: días 32, 35, 42, 49, 56, 63 y 70, con frecuencia de ordeño 1x).

Período	Grupos experimentales			RSD ¹	RSD ²	Probabilidad ³				
	BP	MP	AP			NP	Pdo	NP*Pdo	Día(Pdo)	NP*Día(Pdo)
Período pre (2x)	1 450 ^b	2 103 ^d	2 756 ^f							
Período post1 (1x, corto plazo)	1 083 ^a	1 608 ^{bc}	1 950 ^d	598,1	267,4	***	***	*	***	ns
Período post2 (1x, medio plazo)	1 081 ^a	1 715 ^c	2 271 ^e							

¹Desviación estándar residual para comparar el efecto del Nivel de producción.

²Desviación estándar residual para comparar el efecto del Período y de la interacción Nivel de producción x período.

³ Probabilidad de los efectos del Nivel de producción de leche (NP), Período (Pdo), Día y sus interacciones.

ns: P>0,10; * P<0,05; ** P<0,01; *** P<0,001

5.2.2 Efecto a corto plazo (48 h) de la reducción de la frecuencia de ordeño (2x a 1x) sobre la producción de leche y relación con el potencial productivo del animal y la capacidad de la cisterna de la glándula.

En la tabla 18 se recogen los valores medios, para cada grupo, de la reducción máxima registrada en la producción de leche en las 48 horas siguientes al cambio de frecuencia de ordeño, expresada en g/oveja y día (producción de leche del día anterior menos la producción de leche mínima registrada en el intervalo de 48 h posteriores al cambio) o como porcentaje de la producción de leche previa al cambio de frecuencia.

Se observaron diferencias estadísticamente significativas en la reducción máxima registrada en la producción de leche cuando ésta fue expresada en g/oveja y día ($P < 0,001$) y, también, cuando fue expresada como porcentaje ($P < 0,05$). Bajo ambas formas de expresión los mayores valores de reducción máxima corresponden al grupo AP y los menores valores al grupo BP, situándose el valor del grupo MP en una posición intermedia cuando dicha reducción se expresó en g/oveja y día. Sin embargo, cuando la reducción máxima en la producción de leche se expresó como porcentaje, los valores de reducción del grupo MP no difirieron ($P > 0,05$) ni de los valores del grupo BP ni de los valores del grupo AP.

Tabla 18 Valores medios de la reducción máxima registrada en la producción de leche en las 48 horas siguientes al cambio de frecuencia de ordeño, expresada en g/oveja y día o como porcentaje de la producción de leche previa al cambio de frecuencia, para cada uno de los grupos experimentales.

	Grupos experimentales			RSD ¹	Probabilidad ²
	BP	MP	AP		
Reducción producción (g/oveja y día)	386 ^a	756 ^b	1045 ^c	152.1	***
Reducción producción (%)	27,9 ^a	35,5 ^{ab}	38,3 ^b	7.46	*

¹Desviación estándar residual.

² Probabilidad del efecto del Nivel de producción de leche: * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$

5.2.3 Efecto a medio plazo (6 semanas) de la reducción de la frecuencia de ordeño (2x a 1x) sobre la producción de leche y relación con el potencial productivo del animal y la capacidad de la cisterna de la glándula.

La producción de leche tras el cambio de frecuencia de ordeño, en términos generales, describió una curva que, como puede apreciarse en la figura 20, se ajustó al modelo propuesto por Wood (1967).

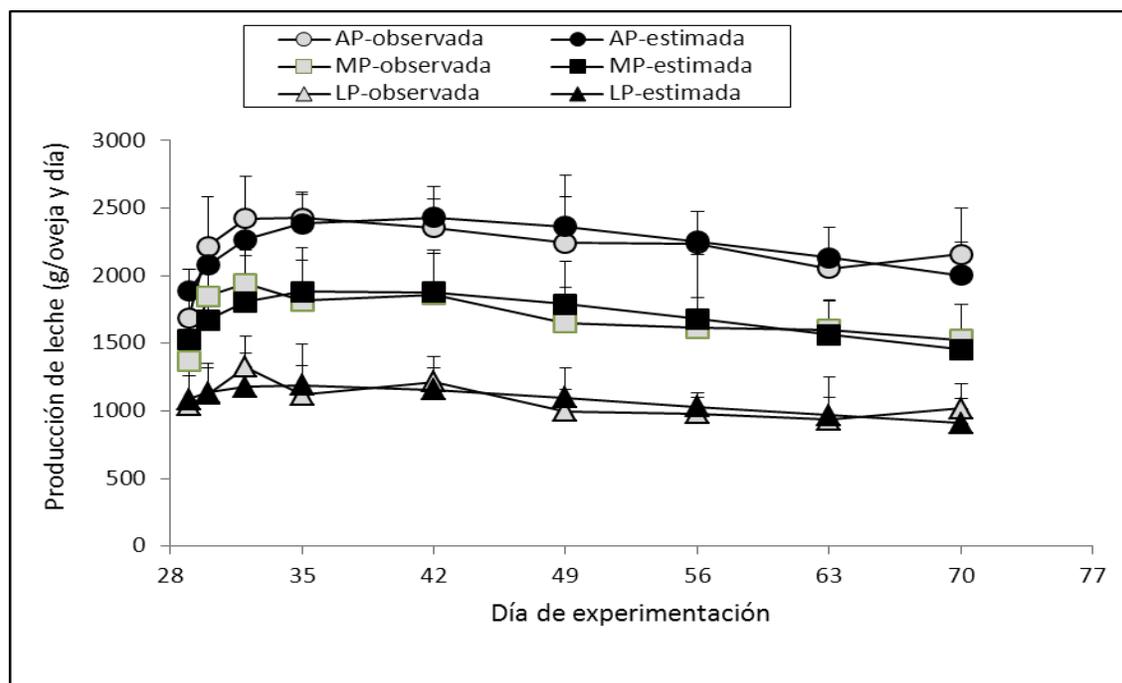


Figura 20 Valores medios observados y estimados a partir del modelo de Wood (1967) de producción de leche tras el cambio de frecuencia de ordeño para cada grupo experimental (BP: producción baja; MP: producción media; AP: producción alta).

En la tabla 19 figuran los valores medios de los parámetros del modelo de Wood para cada grupo experimental y de los parámetros indicativos de la bondad del ajuste (desviación estándar residual y coeficiente de determinación ajustado).

En la tabla 20 se recogen los valores medios del tiempo que se tardó en alcanzar un nuevo pico de producción tras el cambio de frecuencia de ordeño, y la producción de leche máxima, expresada en g/oveja y día o como proporción de la producción de leche registrada el día anterior al cambio de frecuencia de ordeño para cada grupo experimental. En la misma tabla se pueden observar los valores medios de persistencia en el periodo previo al cambio de frecuencia (días 1 a 28) y en el periodo posterior al cambio de frecuencia, después de alcanzar el nuevo pico de producción (días 42 a 70).

Tabla 19 Valores medios de los parámetros estimados del modelo de Wood, de la desviación estándar residual y del coeficiente de determinación ajustado para cada grupo experimental.

	Grupos experimentales		
	BP	MP	AP
a			
Valor medio	1098	1553	1912
Valor mínimo	869	1353	1790
Valor máximo	1418	1863	2121
b			
Valor medio	0,098	0,175	0,160
Valor mínimo	0,023	0,110	0,063
Valor máximo	0,128	0354	0,237
c			
Valor medio	0,014	0,018	0,013
Valor mínimo	0,007	0,006	0,005
Valor máximo	0,028	0,032	0,023
RSD			
Valor medio	535	478	604
Valor mínimo	245	144	300
Valor máximo	887	679	1065
% Varianza explicada por el modelo			
Valor medio	98,87	98,61	98,48
Valor mínimo	97,55	96,31	97,58
Valor máximo	99,80	99,44	99,73

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P > 0,05$) debidas al nivel de producción de leche en el tiempo que se tardó en alcanzar el nuevo pico de producción tras el cambio de frecuencia de ordeño.

Tabla 20 Valores medios del tiempo (T max) que se tardó en alcanzar un nuevo pico de producción tras el cambio de frecuencia de ordeño, de la producción de leche máxima (PLmax), expresada en g/oveja y día o como proporción de la producción de leche registrada el día anterior al cambio de frecuencia de ordeño para cada grupo experimental.

	Grupos experimentales			RSD¹	Probabilidad²
	BP	MP	AP		
T max (días)	8,7	10,7	12,5	4,69	ns

PL max (g/oveja y día)	1347 ^a	2091 ^b	2570 ^c	234,4	***
PL max (g x 100/g PL día 28)	86,6	93,1	89,3	6,62	ns

¹ Desviación estándar residual.

² Probabilidad del efecto del Nivel de producción de leche: ns: P>0,10; *** P<0,001

Sin embargo, el nivel de producción de los animales sí influyó (P<0,001) en la producción de leche máxima, expresada en g/día pero no (P>0,10) cuando se expresó como la proporción de la producción de leche registrada el día anterior al cambio de la frecuencia de ordeño, presentando en este último casi un valor medio del 90 ± 1,6 %.

Tabla 21 Valores medios de la persistencia de la producción de leche en el periodo previo ((PERS pre) al cambio de frecuencia (días 1 a 28) y en periodo posterior al cambio de frecuencia (PERS pos), después de alcanzar el nuevo pico de producción para cada grupo experimental.

	Grupos experimentales			RSD ¹	Probabilidad ³
	BP	MP	AP		
PERS pre (%)	96,7	97,6	97,3	6,27	ns
PERS pos (%)	82,5	77,3	86,6	15,84	ns
Diferencia ±sem²	14,2±6,05	20,3±8,41	10,7±3,43		
Probabilidad⁴	t (P<0,06)	t (P<0,06)	*		

¹ Desviación estándar residual.

² Error estándar de la media

³ Probabilidad del efecto del Nivel de producción de leche: ns: P>0,10; *: P<0,05; *** P<0,01

⁴ Probabilidad de que la diferencia entre los valores medios de persistencia dentro de cada grupo sea diferente de cero

En la tabla 21 se muestran los valores medios de persistencia de la producción de leche en el periodo previo (PERS pre) al cambio de frecuencia (días 1 a 28) y en el periodo posterior al cambio de frecuencia (PERS pos), después de alcanzar el nuevo pico de producción (días 42 a 70) para cada grupo experimental.

El nivel de producción de leche no afectó (P>0,05) a los valores medios de persistencia en ninguno de los dos periodos experimentales (previo y posterior al cambio de la frecuencia de ordeño). Sin embargo, la persistencia disminuyó significativamente (P<0,05) o tendió a disminuir (P<0,10) al reducirse la frecuencia de ordeño en los tres grupos experimentales.

En los grupos BP y MP la diferencia en la persistencia tendió (P<0,06) a ser diferente de cero. Mientras que en el grupo AP tal diferencia fue (P<0,05) distinta de cero.

5.2.4 Composición de la leche y producción de componentes.

En la tabla 22 se presentan los valores medios de contenido de extracto seco, grasa, proteína y lactosa de la leche para cada grupo y período experimental, así como el resultado del análisis de varianza realizado.

El nivel de producción no afectó ($P>0,05$) al contenido de ninguno de los componentes de la leche que fueron determinados.

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P<0,001$) debidas al efecto tanto del periodo como del día, en todos los componentes de la leche que fueron estudiados.

El contenido de extracto seco fue mayor en periodo post 2, en los tres grupos experimentales, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas ($P>0,05$) entre los otros dos periodos.

En todos los grupos experimentales, el mayor y el menor contenido de grasa correspondieron a los periodos post2 y post1, respectivamente. Situándose el contenido de dicho compuesto en el periodo pre en una posición intermedia.

El contenido de proteína bruta de la leche, en todos los grupos experimentales, fue mayor en el periodo post1 y menor en el periodo pre, situándose los valores del periodo post2 en una posición intermedia.

El contenido de lactosa también fue diferente en los tres periodos y en todos los grupos experimentales. Los mayores valores se observaron en el periodo post1 y los menores valores en periodo post2. Los valores del periodo pre ocuparon una posición intermedia.

En la tabla 23 se recogen los valores medios de producción de extracto seco, grasa, proteína y lactosa para los tres períodos experimentales considerados y el resultado del análisis de varianza. La evolución de los valores medios de producción de los principales componentes de la leche, antes mencionados, a lo largo de todo el experimento para cada uno de los grupos experimentales se representa en la figura 21.

Tal y como cabría esperar, considerando la evolución de la producción de leche y de la composición química, el nivel de producción de los animales afectó ($P<0,001$) a la producción de los componentes principales de la leche. La producción de extracto seco,

grasa, proteína bruta y lactosa fue mayor en el grupo AP en todos los periodos experimentales.

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,001$, para el extracto seco, proteína bruta y lactosa; $P < 0,10$, para la grasa) entre periodos en la producción de los componentes principales de la leche, pero este efecto dependió del nivel de producción.

En el grupo BP, la producción de extracto seco fue mayor en el periodo pre, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas ($P > 0,05$) entre los otros dos periodos. Sin embargo, en los grupos MP y AP, la producción de extracto seco fue diferente entre los tres periodos experimentales, correspondiendo los mayores valores al periodo pre y los menores valores al periodo post1, situándose los valores del periodo post2 en una posición intermedia.

En relación con la producción de grasa, ésta fue distinta entre los tres periodos experimentales, siendo el comportamiento igual en todos los grupos experimentales. Así, los mayores valores correspondieron al periodo pre y los menores al periodo post1. La producción de grasa en el periodo post2 ocupó una posición intermedia.

La producción de proteína bruta y de lactosa, en los grupos BP y MP, fue mayor en el periodo pre, no observándose diferencias estadísticamente significativas ($P > 0,10$) entre los otros dos periodos experimentales. En el grupo AP, la producción de proteína bruta y de lactosa fue distinta entre los tres periodos experimentales, encontrándose los mayores valores en el periodo pre y los menores en el periodo post1. La producción de ambos componentes en el periodo post2 ocupó una posición intermedia.

Tabla 22 Valores medios del contenido de extracto seco, grasa, proteína y lactosa de la leche para cada uno de los grupos (AP: producción alta; MP: producción media; BP: producción baja) y períodos experimentales (período pre: días 1, 7, 14, 21 y 28, con frecuencia de ordeño 2x; período post1: días 29 y 30 con frecuencia de ordeño 1x; período post2: días 32, 35, 42, 49, 56, 63 y 70, con frecuencia de ordeño 1x).

	Grupos experimentales				Probabilidad ³						
	BP	MP	AP	Global	RSD ¹	RSD ²	NP	Pdo	NP*Pdo	Día(Pdo)	NP*Día(Pdo)
Extracto seco (%)											
Periodo pre (2x)	16,02	15,76	16,03	15,94 ^a							
Periodo post1 (1x, corto plazo)	16,17	15,33	16,28	15,93 ^a	4,340	1,185	ns	***	ns	***	ns
Período post2 (1x, medio plazo)	16,80	16,21	16,34	16,45 ^b							
Grasa (%)											
Periodo pre (2x)	5,45	5,17	5,52	5,38 ^b							
Periodo post1 (1x, corto plazo)	4,75	4,27	4,99	4,67 ^a	2,764	1,303	ns	***	ns	***	ns
Período post2 (1x, medio plazo)	6,01	5,44	5,76	5,74 ^c							
Proteína bruta (%)											
Periodo pre (2x)	4,99	4,89	4,94	4,94 ^a							
Periodo post1 (1x, corto plazo)	5,64	5,22	5,34	5,40 ^c	1,853	0,425	ns	***	ns	***	ns
Período post2 (1x, medio plazo)	5,31	5,10	5,11	5,17 ^b							
Lactosa (%)											
Periodo pre (2x)	4,78	4,90	4,87	4,85 ^b							
Periodo post1 (1x, corto plazo)	4,95	5,01	4,94	4,97 ^c	0,509	0,210	ns	***	ns	***	ns
Período post2 (1x, medio plazo)	4,68	4,85	4,75	4,76 ^a							

¹ Desviación estándar residual para comparar el efecto del Nivel de producción.

² Desviación estándar residual para comparar el efecto del Período y de la interacción Nivel de producción x período.

³ Probabilidad de los efectos del Nivel de producción de leche (NP), Período (Pdo), Día y sus interacciones.

ns: P>0,10; * P<0,05; ** P<0,01; *** P<0,001

Tabla 23 Valores medios de la producción de extracto seco, grasa, proteína y lactosa de la leche para cada uno de los grupos (AP: producción alta; MP: producción media; BP: producción baja) y períodos experimentales (período pre: días 1, 7, 14, 21 y 28, con frecuencia de ordeño 2x; período post1: días 29 y 30 con frecuencia de ordeño 1x; período post2: días 32, 35, 42, 49, 56, 63 y 70, con frecuencia de ordeño 1x).

	Grupos experimentales			Global	RSD ¹	RSD ₂	Probabilidad ³				
	BP	MP	AP				N	Pdo	NP*Pdo	Día(Pdo)	NP*Día(Pdo)
Extracto seco (g/oveja y día)											
Periodo pre (2x)	232 _b	332 ^d	441 ^f	335 ^c							
Periodo post1 (1x, corto plazo)	175 _a	249 ^b	318 ^d	247 ^a	105,9	44,6	** *	***	*	***	ns
Período post2 (1x, medio plazo)	181 _a	279 ^c	369 ^e	276 ^b							
Grasa (g/oveja y día)											
Periodo pre (2x)	79 ^c	109 ^e	152 ^g	113 ^c							
Periodo post1 (1x, corto plazo)	52 ^a	71 ^{bc}	99 ^{de}	74 ^a	47,8	19,4	** *	t	*	***	ns
Período post2 (1x, medio plazo)	65 ^b	93 ^d	130 ^f	96 ^b							
Proteína bruta (g/oveja y día)											
Periodo pre (2x)	73 ^b	103 ^d	136 ^f	104 ^b							
Periodo post1 (1x, corto plazo)	61 ^a	84 ^c	104 ^d	83 ^a	42,6	14,7	** *	***	*	***	ns
Período post2 (1x, medio plazo)	58 ^a	88 ^c	115 ^e	87 ^a							
Lactosa (g/oveja y día)											
Periodo pre (2x)	69 ^b	103 ^{de}	134 ^f	102 ^b							
Periodo post1 (1x, corto plazo)	53 ^a	80 ^c	96 ^d	77 ^a	29,6	16,1	** *	***	*	***	ns
Período post2 (1x, medio plazo)	50 ^a	83 ^c	108 ^e	81 ^a							

¹ Desviación estándar residual para comparar el efecto del Nivel de producción.

² Desviación estándar residual para comparar el efecto del Período y de la interacción Nivel de producción x período.

³ Probabilidad de los efectos del Nivel de producción de leche (NP), Período (Pdo), Día y sus interacciones.

ns: P > 0,10; t: P < 0,10; * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001

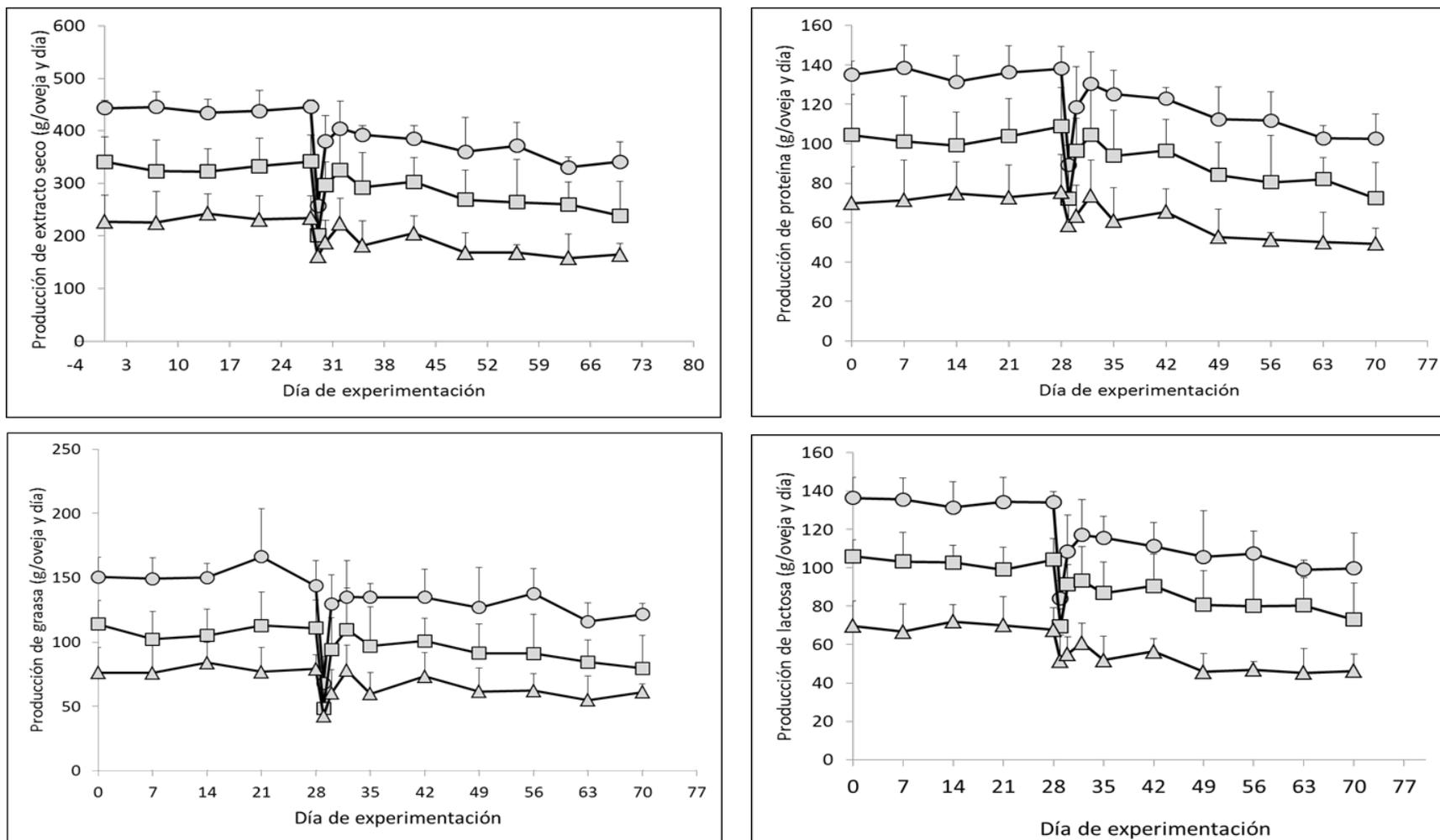


Figura 21 Evolución de los valores medios de la producción de extracto seco, grasa, proteína y lactosa a lo largo del periodo experimental para cada uno de los grupos experimentales (AP: producción alta ; ●P: producción media ; ■P: producción baja). ▲

5.2.5 Estado sanitario de la ubre y del metabolismo de las ovejas.

5.2.5.1 Estado sanitario de la ubre: recuento de células somáticas en leche y concentración plasmática de lactosa.

En la figura 22 se recogen los valores medios del recuento de células somáticas para cada día de muestreo y grupo experimental. En la tabla 24 se presentan los valores medios agrupados por periodo y el efecto de los diferentes factores incluidos en el modelo.

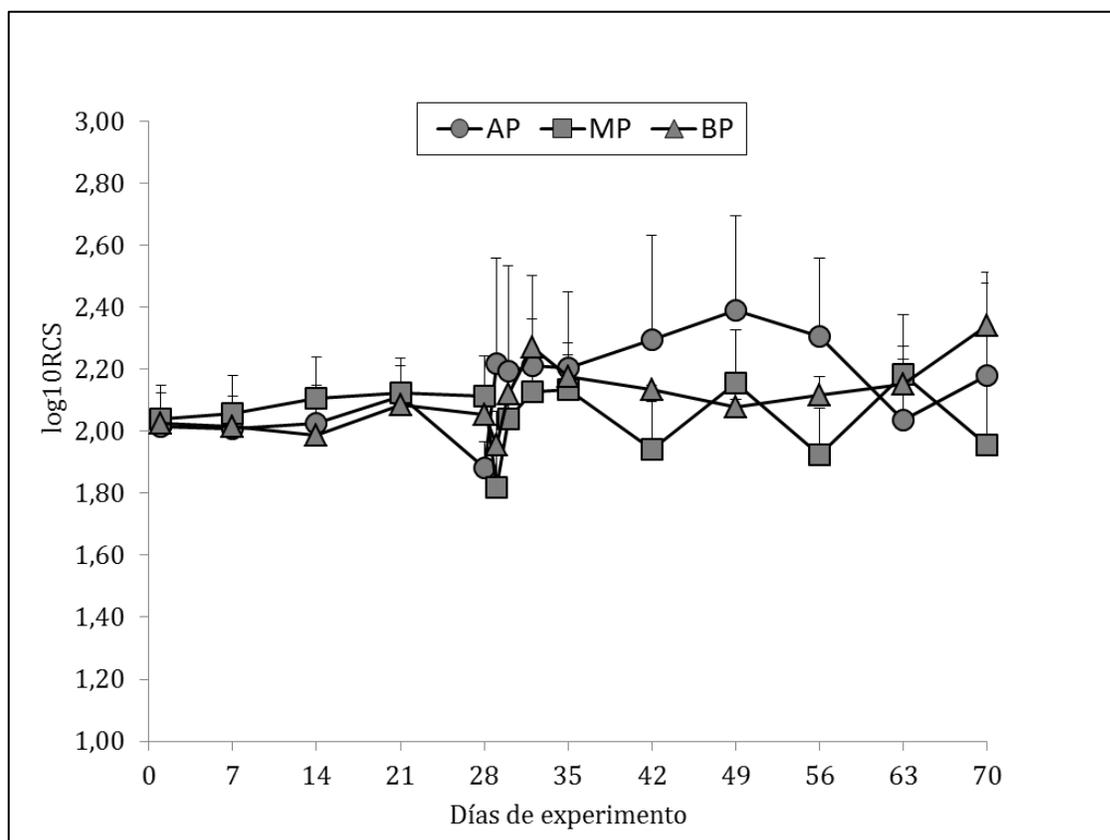


Figura 22 Valores medios del recuento de células somáticas ($\log_{10}RCS$) en la leche a lo largo del periodo experimental para cada grupo experimental.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas ($P > 0,05$) en el periodo previo al cambio de frecuencia de ordeño entre grupos experimentales. Sin embargo, el efecto del periodo y de la interacción nivel de producción por periodo fueron estadísticamente significativos ($P < 0,05$). Así, en el grupo MP no hubo diferencias entre periodos, pero sí en los grupos AP y BP, que presentaron mayores valores en el periodo post 2 que en el periodo previo al cambio de frecuencia de ordeño. Es interesante resaltar que en el día 28, inmediatamente tras el cambio de frecuencia, se redujo el RCS en los 3 grupos experimentales, incrementándose posteriormente su valor.

En la tabla 25, se presentan los valores medios del contenido plasmático de lactosa para cada día de muestreo y grupo experimental. No hubo diferencias estadísticamente significativas ($P > 0,10$) debidas ni al grupo experimental (nivel de producción) ni al día, ni a su interacción. No obstante, cabe destacar que en el día 30, transcurridas 24 horas tras la reducción de la frecuencia de ordeño (2x-1x), se observó un incremento numérico, aunque estadísticamente no significativo ($P > 0,10$), en el contenido plasmático de lactosa (g/L) en los grupos MP (27,21 vs 29,15) y AP (28,90 vs 32,22), ocurriendo lo contrario para el grupo BP (31,71 vs 27,81).

Tabla 24 Valores medios del recuento de células somáticas (log10 RCS) para cada uno de los grupos (AP: producción alta; MP: producción media; BP: producción baja) y períodos experimentales (período pre: días 1, 7, 14, 21 y 28, con frecuencia de ordeño 2x; período o pre: días 1, 7, 14, 21 y 28, con frecuencia de ordeño 2x; período post1: días 29 y 30 con frecuencia de ordeño 1x; período post2: días 32, 35, 42, 49, 56, 63 y 70, con frecuencia de ordeño 1x).

	Grupos experimentales				Probabilidad ³						
	BP	MP	AP	Global	RSD ¹	RSD ²	NP	Pdo	NP*Pdo	Día(Pdo)	NP*Día(Pdo)
Periodo pre (2x)	2,03	2,09	2,01	2,04 ^a							
Periodo post1 (1x, corto plazo)	2,04	1,93	2,21	2,06 ^{ab}	0,337	0,126	ns	**	*	***	ns
Período post2 (1x, medio plazo)	2,18	2,06	2,23	2,16 ^b							

¹ Desviación estándar residual para comparar el efecto del nivel de producción.

² Desviación estándar residual para comparar el efecto del día y de la interacción nivel de producción x día.

³ Probabilidad de los efectos del nivel de producción de leche (NP), día y su interacción (NP*día).

ns: P>0,10; * P<0,05; ** P<0,01; *** P<0,001

Tabla 25 Valores medios de la concentración plasmática de lactosa (mg/L) correspondientes a los días 28 (día del cambio de frecuencia de ordeño), 30, 32, 35, 49 y 70 del periodo experimental, para cada uno de los grupos experimentales lactosa (AP: producción alta; MP: producción media; BP: producción baja).

	Grupos experimentales				Probabilidad ³				
	BP	MP	AP	Global	RSD ¹	RSD ²	NP	Día	NP*Día
Día 28 (2x)	31,71	27,21	28,90	29,27					
Día 30 (1x)	27,81	29,15	35,29	30,75					
Día 32 (1x)	33,10	29,20	33,21	31,84					
Día 35 (1x)	29,06	27,87	31,09	29,34	19,416	8,224	ns	ns	ns
Día 49 (1x)	36,34	33,76	32,87	34,42					
Día 70 (1x)	33,72	30,00	33,45	32,39					

¹ Desviación estándar residual para comparar el efecto del nivel de producción.

² Desviación estándar residual para comparar el efecto del día y de la interacción nivel de producción x día.

³ Probabilidad de los efectos del nivel de producción de leche (NP), día y su interacción (NP*día).

ns: P>0,10

5.2.5.2 Evaluación de la respuesta inflamatoria de fase aguda.

En la tabla 26 se recogen los valores medios de la concentración plasmática de haptoglobina, ceruloplasmina, albúmina y colesterol total, sustancias indicativas de la respuesta inflamatoria de fase aguda, correspondientes a los días 28 (día del cambio de frecuencia de ordeño), 30, 32, 35, 49 y 70 del periodo experimental, para cada uno de los grupos experimentales (AP: producción alta; MP: producción media; BP: producción baja).

El grupo experimental no influyó significativamente ($P > 0,10$) en ninguno de los parámetros determinados. El día de muestreo influyó ($P < 0,05$) en las concentraciones plasmáticas de haptoglobina, albúmina y paraoxonasa.

En el caso de la haptoglobina su concentración fue menor en los días 30 y 35, no encontrándose diferencias entre los otros días de muestreo.

En relación con la concentración plasmática de albúmina, en general, ésta incrementó después de la reducción de la frecuencia de ordeño, manteniéndose el incremento durante todo el período experimental.

La concentración plasmática de paraoxonasa estuvo influida ($P < 0,05$) tanto por el grupo experimental como por el día de muestreo. Los mayores valores fueron observados en el grupo MP y los menores en el grupo AP, situándose los del grupo BP en una posición intermedia. Por otra parte, el último día de muestreo (día 70) fue cuando se encontraron los mayores niveles plasmáticos de paraoxonasa, no existiendo diferencias ($P > 0,10$) entre los niveles de los demás días de muestreo.

La concentración plasmática de colesterol no se vio afectada ($P > 0,10$) ni por el grupo experimental ni por el día de muestreo, ni por la interacción entre estos dos factores de variación. Sin embargo, si se observaron diferencias numéricas entre los distintos grupos de animales, correspondiendo los valores más altos a las ovejas del grupo BP durante todo el período experimental.

Tabla 26 Valores medios de la concentración plasmática de parámetros indicativos de la respuesta inflamatoria de fase aguda correspondientes a los días 28 (día del cambio de frecuencia de ordeño), 30, 32, 35, 49 y 70 del periodo experimental, para cada uno de los grupos experimentales (AP: producción alta; MP: producción media; BP: producción baja).

	Grupos experimentales				RSD ¹	RSD ²	Probabilidad ³		
	BP	MP	AP	Global			NP	Día	NP*Día
Haptoglobina (g/L)									
Día 28 (2x)	0,310	0,434	0,297	0,347 ^b					
Día 30 (1x)	0,206	0,271	0,213	0,230 ^a					
Día 32 (1x)	0,341	0,306	0,381	0,343 ^b	0,4109	0,2600	ns	*	ns
Día 35 (1x)	0,188	0,267	0,286	0,248 ^a					
Día 49 (1x)	0,257	0,298	0,485	0,344 ^b					
Día 70 (1x)	0,359	0,259	0,481	0,366 ^b					
Ceruloplasmina (µmol/L)									
Día 28 (2x)	2,18		2,12	2,16					
Día 30 (1x)	2,22	1,91	1,93	2,01					
Día 32 (1x)	2,33	1,97	1,80	2,07	1,856	0,836	ns	ns	*
Día 35 (1x)	2,41	2,11	1,61	2,08					
Día 49 (1x)	2,32	2,02	2,21	2,04					
Día 70 (1x)	2,12	1,60	2,34	2,05					
Albúmina (g/L)									
Día 28 (2x)	37,83	38,75	39,11	38,57 ^{ab}					
Día 30 (1x)	38,23	39,20	39,60	39,01 ^{bc}					
Día 32 (1x)	37,75	37,96	39,38	38,37 ^a	3,755	0,993	ns	**	*
Día 35 (1x)	38,22	39,83	38,86	38,97 ^{bc}					
Día 49 (1x)	38,90	39,96	32,87	39,39 ^c					
Día 70 (1x)	38,56	40,35	39,41	39,44 ^c					
Paraosonaxa (U/L)									
Día 28 (2x)	167,4	170,7	148,5	162,2 ^a					
Día 30 (1x)	173,2	177,0	152,1	167,4 ^a					
Día 32 (1x)	173,7	169,5	154,2	165,8 ^a	75,12	13,11	ns	*	*
Día 35 (1x)	176,1	179,9	151,4	169,1 ^a					
Día 49 (1x)	174,5	177,5	158,2	170,1 ^a					
Día 70 (1x)	176,2	191,0	174,0	180,4 ^b					
Colesterol total (mmol/L)									
Día 28 (2x)	1,74	1,48	1,58	1,60					
Día 30 (1x)	1,76	1,54	1,63	1,64					
Día 32 (1x)	1,75	1,52	1,63	1,63	0,551	0,268	ns	ns	ns
Día 35 (1x)	1,72	1,54	1,52	1,59					
Día 49 (1x)	1,76	1,69	1,61	1,69					
Día 70 (1x)	1,65	1,63	1,64	1,64					

¹ Desviación estándar residual para comparar el efecto del nivel de producción.

² Desviación estándar residual para comparar el efecto del día y de la interacción nivel de producción por día.

³ Probabilidad de los efectos del nivel de producción de leche (NP), día y su interacción (NP*día).

ns: P>0,10; * P<0,05; ** P<0,01; *** P<0,001

5.2.5.3 Estrés oxidativo y actividad hepática.

En la tabla 27 se muestran los valores medios de la concentración plasmática de parámetros relacionados con el estatus antioxidante [ROM(*reactive oxygen metabolites*)],

FRAP(*ferric reducing ability of plasma*) y la función hepática [AST-GOT(*aspartato aminotransferasa*)] correspondientes a los días 28 (día del cambio de frecuencia de ordeño), 30, 32, 35, 49 y 70 del periodo experimental, para cada uno de los grupos experimentales (AP: producción alta; MP: producción media; BP: producción baja).

Tabla 27 Valores medios de la concentración plasmática de parámetros relacionados con el estatus antioxidante [ROM(*reactive oxygen metabolites*), FRAP(*ferric reducing ability of plasma*) y AST-GOT(*aspartato aminotransferasa*)] correspondientes a los días 28 (día de l cambio de frecuencia de ordeño), 30, 32, 35, 49 y 70 del periodo experimental, para cada uno de los grupos experimentales (AP: producción alta; MP: producción media; BP: producción baja).

	Grupos experimentales			Global	RSD ¹	RSD ²	Nivel de significación ³		
	BP	MP	AP				NP	Día	NP*Día
ROM (mg H₂O₂/100 ml)									
Día 28 (2x)	9,16	8,92	8,84	8,97 ^b					
Día 30 (1x)	8,30	7,70	8,15	8,05 ^a					
Día 32 (1x)	8,99	8,44	9,17	8,87 ^b	5,013	1,830	ns	***	*
Día 35 (1x)	9,31	8,77	8,28	8,78 ^b					
Día 49 (1x)	9,62	8,56	7,80	8,72 ^{ab}					
Día 70 (1x)	9,48	7,47	9,62	8,86 ^b					
FRAP (μmol/L)									
Día 28 (2x)	137,0	144,9	133,0	138,3 ^{bc}					
Día 30 (1x)	114,4	117,9	107,1	113,1 ^a					
Día 32 (1x)	149,6	151,5	185,1	162,0 ^c	72,76	24,67	ns	***	*
Día 35 (1x)	124,7	137,8	126,1	129,6 ^b					
Día 49 (1x)	136,0	149,7	133,5	139,0 ^{bc}					
Día 70 (1x)	134,5	136,5	125,7	132,2 ^b					
AST-GOT (U/L)									
Día 28 (2x)	158,0	141,3	112,8	137,4					
Día 30 (1x)	150,6	132,3	123,6	136,1					
Día 32 (1x)	142,1	128,1	180,0	150,0	98,69	58,34	ns	ns	ns
Día 35 (1x)	136,8	140,2	142,2	139,8					
Día 49 (1x)	126,6	108,5	121,1	119,7					
Día 70 (1x)	110,8	126,3	151,1	129,4					

¹ Desviación estándar residual para comparar el efecto del nivel de producción.

² Desviación estándar residual para comparar el efecto del día y de la interacción nivel de producción x día.

³ Probabilidad de los efectos del nivel de producción de leche (NP), día y su interacción (NP*día).

ns: P>0,10; * P<0,05; *** P<0,001

La concentración plasmática de ROM se vio afectada (P<0,001) por el día de muestreo, siendo también estadísticamente significativa la interacción entre el día y el nivel de producción (P<0,05). Los menores valores de los niveles plasmáticos de ROM se observaron en el día 30 (24 horas posteriores al cambio de la frecuencia de ordeño). Los valores de ROM no fueron diferentes (P>0,10) entre los otros días de muestreo.

La capacidad antioxidante total determinada por el método FRAP estuvo influida (P<0,001) por el día y por la interacción entre éste y el nivel de producción (P<0,05). El menor valor de FRAP se encontró en el día 30 (24 horas posteriores al cambio de la frecuencia de ordeño) y el mayor valor de FRAP se observó en el día 32 (48 horas

posteriores al cambio de la frecuencia de ordeño). La evolución de este parámetro fue similar en todos los grupos, sin embargo, es necesario destacar que los valores más altos se encontraron en el grupo BP y los más bajos en el grupo AP.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P>0,10$) en la concentración plasmática de la enzima aspartato aminotransferasa (AST-GOT) atribuibles al día de muestreo ni al nivel de producción, ni a la interacción entre ambos.

5.2.5.4 Metabolismo energético y proteico.

En la tabla 28 se muestran los valores medios de la concentración plasmática de parámetros relacionados con el metabolismo energético y proteico [glucosa, ácidos grasos no esterificados (NEFA), β -hidroxi-butilato (β -HB), urea] correspondientes a los días 28 (día del cambio de frecuencia de ordeño), 30, 32, 35, 49 y 70 del periodo experimental, para cada uno de los grupos experimentales (AP: producción alta; MP: producción media; BP: producción baja).

La concentración plasmática de glucosa se vio afectada tanto por el grupo experimental ($P<0,10$) como por el día ($P<0,05$). Los valores más altos en la concentración plasmática de glucosa se encontraron en el grupo MP y los más bajos en el grupo AP, situándose en una posición intermedia los valores para el grupo MP.

Por otra parte, los menores niveles plasmáticos de glucosa se registraron el último día de muestreo (día 70), no existiendo diferencias ($P>0,10$) entre los otros días de muestreo.

En relación con la concentración plasmática de NEFA, el día de muestreo afectó ($P < 0,001$) a dicha concentración, correspondiendo los mayores valores al día 30 (24 horas posteriores al cambio de la frecuencia de ordeño) y los menores a los días de muestreo 32, 35, 49 y 70. El grupo experimental no afectó ($P > 0,10$) a la concentración plasmática de este parámetro.

La concentración plasmática de β -HB tendió ($P < 0,10$) a ser mayor en el grupo AP y menor en el grupo BP, situándose el grupo MP en una posición intermedia.

El día de muestreo también influyó ($P < 0,01$) sobre el nivel plasmático de β -HB. Los menores valores se encontraron el día 28 de muestreo, no existiendo diferencias ($P > 0,010$) entre el resto de los días de muestreo.

Tabla 28 Valores medios de la concentración plasmática de parámetros relacionados con el metabolismo energético y proteico correspondientes a los días 28 (día del cambio de frecuencia de ordeño), 30, 32, 35, 49 y 70 del periodo experimental, para cada uno de los grupos experimentales (AP: producción alta; MP: producción media; BP: producción baja).

	Grupos experimentales			Global	RSD ¹	RSD ²	Nivel de significación ³		
	BP	MP	AP				NP	Día	NP*Día
Glucosa (mmol/l)									
Día 28 (2x)	4,31	4,81	4,16	4,43 ^b					
Día 30 (1x)	4,39	4,41	4,17	4,34 ^{ab}					
Día 32 (1x)	4,74	4,53	4,39	4,55 ^b	0,706	0,485	‡	*	ns
Día 35 (1x)	4,52	4,64	4,26	4,48 ^b					
Día 49 (1x)	4,35	4,94	4,36	4,52 ^b					
Día 70 (1x)	4,04	4,26	3,91	4,07 ^a					
Ácidos grasos no esterificados (NEFA, mmol/l)									
Día 28 (2x)	0,17	0,17	0,33	0,23 ^b					
Día 30 (1x)	0,26	0,23	0,38	0,29 ^c					
Día 32 (1x)	0,10	0,12	0,16	0,13 ^a	0,181	0,123	ns	***	ns
Día 35 (1x)	0,10	0,15	0,13	0,12 ^a					
Día 49 (1x)	0,19	0,19	0,13	0,17 ^{ab}					
Día 70 (1x)	0,22	0,14	0,18	0,18 ^{ab}					
β-hidroxi-butirato (mmol/l)									
Día 28 (2x)	0,43	0,46	0,52	0,47 ^a					
Día 30 (1x)	0,46	0,46	0,63	0,52 ^b					
Día 32 (1x)	0,45	0,53	0,65	0,55 ^b	0,224	0,091	‡	**	‡
Día 35 (1x)	0,44	0,53	0,60	0,52 ^b					
Día 49 (1x)	0,54	0,59	0,56	0,56 ^b					
Día 70 (1x)	0,53	0,60	0,58	0,57 ^b					
Urea (mmol/l)									
Día 28 (2x)	10,48	10,17	11,38	10,68 ^a					
Día 30 (1x)	13,16	13,33	13,68	13,39 ^c					
Día 32 (1x)	10,72	10,22	11,00	10,64 ^a	3,793	1,233	ns	***	ns
Día 35 (1x)	11,92	11,33	12,24	11,83 ^b					
Día 49 (1x)	12,44	12,34	12,61	12,47 ^b					
Día 70 (1x)	9,92	9,97	11,16	10,35 ^a					

¹ Desviación estándar residual para comparar el efecto del nivel de producción. ² Desviación estándar residual para comparar el efecto del día y de la interacción nivel de producción x día. ³ Probabilidad de los efectos del nivel de producción de leche (NP), día y su interacción (NP*día). ns: P > 0,10; ‡: P < 0,10; * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001

El grupo experimental (nivel de producción) no influyó (P > 0,10) en la concentración plasmática de urea. Sin embargo, esta concentración sí estuvo afectada (P < 0,001) por el día de muestreo. Los mayores valores en la concentración plasmática de urea se observaron en el día 30 de muestreo y los menores en los días 28, 32 y 70.

6 Discusión.

6.1 EXPERIMENTO I. EFECTO DE LA FRECUENCIA DE ORDEÑO Y DE LA ADMINISTRACIÓN DE UN SUPLEMENTO ANTIOXIDANTE (VITAMINA E Y SELENIO) SOBRE LA INGESTIÓN, LA EVOLUCIÓN DE PESO, LA CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE VITAMINA E Y MINERALES, LA PRODUCCIÓN Y COMPOSICIÓN DE LA LECHE Y EL ESTADO SANITARIO DE LA GLÁNDULA MAMARIA.

6.1.1 Ingestión y evolución del peso corporal.

La ingestión de materia seca (MSI) registrada en el presente ensayo se encuentra dentro del rango de valores recogidos en la literatura para animales de la misma raza, en condiciones fisiológicas similares y consumiendo raciones con una composición química de características semejantes (Castañares, 2008; López, 2007; Bodas, 2004; Ramella, 2002).

La ingestión durante la lactación está condicionada por factores dependientes del animal (*e.g.* peso vivo, estado fisiológico, nivel de producción y composición de la leche, el estado de la lactación, etc.), de la dieta (*e.g.* composición química, fuente y calidad de la fibra, el tamaño de la partícula, etc.) y del entorno (*e.g.* condiciones de alojamiento, sistema de manejo, etc.) (Sanz *et al.*, 2007; Pulina *et al.*, 2006, 2004; Rossi *et al.*, 1991).

En ovejas lecheras se ha observado que la ingestión de materia seca puede reducirse en el periodo periparto, como una respuesta a los procesos fisiológicos y metabólicos que ocurren durante este período (Charismiadou *et al.*, 2000; Dunn y Kaltenbach, 1979). Progresivamente, la capacidad de ingestión se incrementa, alcanzándose la máxima capacidad, generalmente, unas semanas después de haber superado el pico de producción de leche (Cannas, 2004). Esta evolución de la capacidad de ingestión afecta al balance energético de los animales que, en ovejas de alta producción, suele ser negativo en las primeras semanas de lactación, obligando a los animales a recurrir a la movilización de las reservas corporales para satisfacer las necesidades nutritivas (Pulina *et al.*, 2004).

El presente estudio comenzó cuando las ovejas habían alcanzado el día 50 de lactación. En ese momento, los animales ya habían superado el pico de producción de leche, pero, posiblemente, no habían alcanzado la máxima capacidad de ingestión de materia seca. De hecho, la ingestión fue ligeramente superior (5%) en el periodo 2, a pesar de la reducción en la producción de leche que se observó en el citado periodo, básicamente, como consecuencia del cambio de frecuencia de ordeño.

Numerosos autores indican que la relación entre la nutrición y la frecuencia de ordeño es compleja, interviniendo diferentes factores tanto dependientes del animal como de la alimentación, que podrían modular dicha relación (Dewhurst *et al.*, 1993; Knight *et al.*, 1994; Stelwagen, 2001; Ramella, 2002; Castillo *et al.*, 2008; Prieto *et al.*, 2013; Stelwagen *et al.*, 2013; Lindman, 2015).

Así, por ejemplo, Prieto *et al.* (2013), en ovejas de raza assaf a las que se suprimió un ordeño diario durante 3 semanas, y Ramella, (2002) en la misma raza, pero con la supresión de un ordeño semanal, no observaron diferencias en la ingestión de materia seca. González-García *et al.* (2015) tampoco encontraron diferencias en la MSI en ovejas de raza lacaune en las que se realizó uno o dos ordeños diarios. Sin embargo, en los 3 estudios mencionados la producción de leche se redujo significativamente al reducir la frecuencia de ordeño.

Otros autores, sin embargo, sí observaron una reducción en la ingestión tras reducirse la frecuencia de ordeño. En este sentido, Patton *et al.* (2006), en vacas lecheras a las que se redujo la frecuencia de ordeño de 3 a 1 al día, encontraron una reducción (13,2 vs 12,6 kg/día), que fue asociada a una disminución en las necesidades nutritivas como consecuencia de la menor producción de leche. Resultados similares fueron observados por Pearson *et al.* (1979).

Otros autores (Kay *et al.*, 2013; O'Driscoll *et al.*, 2010; Auldirst *et al.*, 1998; Holmes *et al.*, 1992) señalan que una reducción en la frecuencia de ordeño no siempre causa una disminución en la ingestión, puesto que, dependiendo de la fase de lactación en la que se encuentren los animales, la producción de leche no siempre está afectada (Ferris *et al.*, 2008). De hecho, es bien conocido que al final de la lactación, cuando la capacidad cisternal no es un factor limitante para el almacenamiento de la leche, ni la ingestión ni la producción de leche están afectadas por una reducción en la frecuencia de ordeño (Lindman, 2015).

En el presente trabajo únicamente se redujo la frecuencia de ordeño en una de las glándulas, de manera que dicha reducción, por término medio, no fue excesivamente acusada (alrededor de un 10%). Por tanto, no cabría esperar que la evolución fisiológica en la capacidad de ingestión se viese modificada de forma sustancial.

Sin embargo, la mayor ingestión y la menor producción de leche durante el segundo periodo no se tradujo en una mayor ganancia de peso vivo, sino en el efecto opuesto. Este hecho quizá fuera debido a la confluencia de dos factores. Por una parte, a un

aumento de peso del tracto digestivo y de su contenido al incrementarse la capacidad de ingestión al inicio del ensayo, que diera lugar a un mayor incremento de peso (Cannas, 2004; McCgraham, 1964). Y, por otra, a que en el segundo periodo, una vez alcanzada la mayor capacidad de ingestión, ya no se incrementaría el contenido digestivo y, además, como consecuencia de un mayor aporte energético se podría producir una mayor deposición de grasa corporal, disminuyendo la eficiencia de conversión (Annison, 1993; Rattray *et al.*, 1974; Blaxter, 1962).

En cualquier caso, la evolución del peso vivo sugiere que los animales se mantuvieron, durante todo el periodo experimental, en un balance energético positivo. Por otra parte, la ausencia de diferencias en el peso vivo entre los animales del grupo Control y AOX es completamente coherente con la ausencia de diferencias tanto en la ingestión como en la producción y composición de la leche.

Algunos autores han postulado que el control de la ingestión podría estar regulado, entre otros factores, por la eficiencia en la obtención de energía en relación con el oxígeno consumido, de tal manera que los animales tienden a situar la ingestión en aquel nivel que permite obtener la máxima energía por unidad de oxígeno consumido (Ketelaars y Tolkamp, 1996). Esta teoría se apoya en el hecho de que cuanto mayor sea el oxígeno consumido mayor es la producción de radicales libres de oxígeno (e.g. peróxido de hidrógeno, superóxido), proceso que el organismo trataría de minimizar. Asumiendo esta teoría, una hipótesis plausible sería que al aumentar la capacidad antioxidante del organismo se podría incrementar también la ingestión de los animales. Los resultados obtenidos en este trabajo no parecen apoyar dicha hipótesis puesto que la MSI fue igual en ambos grupos experimentales, a pesar de las diferencias observadas en la capacidad antioxidante. No obstante, también es posible que la capacidad antioxidante del grupo Control fuera suficiente, de manera que el incremento hallado en el grupo AOX no constituya ningún beneficio desde la perspectiva de la ingestión. De hecho, algunos estudios sugieren que en condiciones de estrés oxidativo, como consecuencia de la inhibición de la enzima aconitasa en las mitocondrias, se puede reducir la β -oxidación e incrementarse la deposición de grasa y la ingestión (Mao *et al.*, 2010). En consecuencia, la administración de suplementos antioxidantes podrían reducir la ingestión de materia seca en los animales, al contrario de la hipótesis planteada.

6.1.2 Perfil hemático: recuento celular.

El perfil hemático es una herramienta importante que permite no sólo ratificar o rectificar el diagnóstico clínico presuntivo, sino también descubrir procesos subclínicos o

asintomáticos no tenidos en cuenta, habitualmente, y que pueden ser la causa de bajas producciones o factores que aumenten los índices de conversión en animales aparentemente sanos (Antón y Mayayo, 2007). Así, la evaluación hematológica a través del hemograma (*e.g.* recuento de células rojas, recuento de células blancas, etc.), y el perfil bioquímico (*e.g.* glucosa, urea, creatinina, aminotransferasa, fosfatasa alcalina, etc.), se ha convertido, gradualmente, en un instrumento para monitorizar el estatus metabólico y sanitario de los animales (Klinkon *et al.*, 1999; Nozad *et al.*, 2014).

Los parámetros determinados en el presente estudio para los componentes mayoritarios de la sangre (HCT, RCB, WBC) y la fórmula leucocitaria, absoluta y proporcional (LYMF, GRAN y MID), se mantuvieron dentro de los rangos considerados como normales para animales adultos sanos (Couto, 2011; Antón y Mayayo, 2007).

La comparación de estos parámetros, entre los diferentes tratamientos (Control y AOX) y períodos experimentales (Pdo1 y Pdo2), reveló la existencia de diferencias debidas al período para los valores de HCT, RCB y WBC. En el segundo periodo, cuando se redujo la frecuencia de 2 a 1 ordeño al día, en ambos grupos experimentales se observó una disminución de éstos parámetros. La fórmula leucocitaria, por su parte, resultó también afectada por efecto del período, ya que hubo una disminución del número de LYMF y GRAN y una modificación en sus proporciones, disminuyendo el porcentaje de linfocitos y aumentando el de los otros dos componentes (monocitos y granulocitos).

Nozad *et al.* (2013) y Couto (2011) señalan que para relacionar el hemograma con los posibles desordenes productivos y reproductivos de los animales lecheros es necesario conocer la evolución de éstos parámetros durante las distintas etapas fisiológicas (*e.g.* gestación, lactación y parto), ya que cambios en algunos de estos parámetros metabólicos pueden ser debidos a adaptaciones fisiológicas y no, necesariamente, indicativos de enfermedad.

En este sentido, Nozad *et al.* (2014), en vacas lecheras que fueron ordeñadas 4 veces al día y en las que se determinó mensualmente los parámetros antes mencionados, constataron un descenso de los mismos conforme avanzó la lactación, si bien se mantuvieron siempre dentro de los rangos normales. En otros trabajos, también se ha observado que el hematocrito se incrementa en la fase final de la gestación y permanece elevado durante las primeras semanas de lactación, reduciéndose posteriormente (Rodríguez *et al.*, 2011; Ullrey *et al.*, 1965).

Los resultados hallados en el presente estudio muestran una evolución similar a la observada en los trabajos anteriormente citados y, por tanto, es probable que la disminución de los parámetros hemáticos a medida que avanza la lactación, también en ovejas, esté más relacionada con la etapa de lactación que con el cambio en la frecuencia de ordeño.

No obstante, la migración de células de la serie blanca hacia la ubre (Paape *et al.*, 2002), como respuesta a la reducción de la frecuencia de ordeño, también podría explicar, en cierta medida, esta reducción periférica del recuento de células de dicha serie en la sangre.

La administración de vitamina E y selenio influyó sobre el recuento de glóbulos blancos y de granulocitos independientemente del periodo, observándose menores valores en el grupo AOX. Una evolución similar mostró el recuento de linfocitos aunque, como consecuencia de una mayor variación individual, la diferencia entre los valores medios no alcanzó significación estadística.

Los resultados obtenidos en los estudios publicados en relación con el efecto de la vitamina E y el selenio sobre los parámetros hematológicos son contradictorios. Algunos autores señalan la ausencia de efecto sobre el recuento de WBC, linfocitos, neutrófilos y monocitos (Morán *et al.*, 2017; Shokrollahi *et al.*, 2013; Mohri *et al.*, 2011), pero en la bibliografía se recogen también respuestas tanto negativas (Moeini *et al.*, 2011; Faixova *et al.*, 2007; Tras *et al.*, 2000), como positivas (Mohri *et al.* 2005; Cay *et al.*, 1999; Aksakal *et al.*, 1996; Bednarek *et al.*, 1996)

En el presente estudio no podemos descartar la existencia de un efecto sistémico de la vitamina E, pero es importante señalar que, aunque no se observaron diferencias en el RCS entre grupos experimentales, el estudio histopatológico de las glándulas mamarias reveló mayor grado de infiltrado inflamatorio en la glándula del grupo AOX sometida a un ordeño en comparación con el grupo Control (figura 19).

6.1.3 Perfil hemático: concentración de vitamina E y minerales.

El contenido estimado de vitamina E en la dieta consumida fue de 47 mg/kg de materia seca. Por tanto, los animales que recibieron el suplemento AOX consumieron alrededor de 6 veces más vitamina E que los del grupo control. Por consiguiente, y como cabría esperar, la concentración plasmática de vitamina E fue mayor en el grupo AOX (un 40,6% superior en el periodo 1 y un 45,3% mayor en el periodo 2) en comparación con el grupo control. Estos resultados coinciden con los encontrados en numerosos estudios y son

una consecuencia de la administración del suplemento a los animales pertenecientes al grupo AOX (Debier *et al.*, 2005; McDowell *et al.*, 1996; Hidiroglou, 1989).

Por otra parte, el consumo estimado de selenio en el grupo AOX fue de aproximadamente el doble del correspondiente al grupo control (810 vs 420 $\mu\text{g}/\text{día}$). Sin embargo, estas diferencias no se reflejaron en la concentración plasmática de selenio. Estos resultados son contrarios a los recogidos en otros estudios, en los que se ha comprobado que el contenido de selenio en plasma está directamente relacionado con la cantidad ingerida (Davis *et al.*, 2006). En el presente ensayo, la ausencia de diferencias entre grupos podría ser debida a una menor eficiencia en la absorción de selenio, ya que ésta depende de la fuente de selenio administrada. Cuando la fuente es orgánica (*e.g.* enriquecida con cultivo de levadura) la absorción es más eficiente que cuando la fuente de selenio es inorgánica, como ocurrió en el presente trabajo (selenito de sodio) (Calamari *et al.*, 2010; Pechova *et al.*, 2008; Underwood, 1999). Estos resultados, además, concuerdan con la ausencia de diferencias en la concentración de este mineral en la leche.

Sin embargo, la concentración plasmática de vitamina E y de Se se redujo en el periodo 2 en ambos tratamientos experimentales. Esta reducción no obedece a diferencias en el aporte y, *a priori*, tampoco cabría esperar variaciones en la absorción.

En el caso particular de la vitamina E se encontró simultáneamente un aumento de su concentración en la leche independientemente del tratamiento dietético y de la frecuencia de ordeño a la que fue sometida la glándula. La mayor eliminación de dicha vitamina en la leche, podría explicar, parcialmente, el porqué de la menor concentración de vitamina E en el plasma. Sin embargo, como el comportamiento del Se no siguió la misma evolución es lógico pensar que deben de estar involucradas otras causas. En este sentido, la reducción en el hematocrito que fue observada en el segundo periodo podría ir asociada con un mayor volumen plasmático y cierta dilución de los componentes plasmáticos.

De hecho, también se encontraron variaciones en el contenido plasmático de Na, K y Mg, siendo menores sus valores en el segundo periodo. No obstante, el hecho de que los niveles plasmáticos de Ca, P y Cl no varíen entre periodos y que su concentración en la leche (así como la del Na, K y Mg) varíe con la frecuencia de ordeño sugiere la participación de otros procesos.

En este sentido, es preciso señalar que el intercambio de iones entre la sangre y el lumen alveolar podría estar modificado debido al incremento de la permeabilidad de las uniones estrechas entre células (*tight junctions*), las cuales estarían debilitadas (Stelwagen

et al., 2001) por el efecto disruptivo que ocasionaría la acumulación de leche y el consiguiente aumento de la presión intramamaria al incrementarse el intervalo entre ordeños. Este último aspecto, no obstante, se discutirá posteriormente en el apartado de composición química de la leche.

La capacidad antioxidante del plasma, como cabría esperar, expresada en equivalentes Trolox, tuvo un comportamiento similar al de la concentración plasmática de Vitamina E. Este comportamiento, para los valores de Trolox, coincide con el descrito en otros trabajos en los que se ha administrado suplementos de vitamina E y selenio, juntos o separados (Huerta *et al.*, 2005; Bordoni *et al.*, 2003; Miller *et al.*, 1993).

6.1.4 Producción y composición de leche.

La administración del suplemento AOX no tuvo efecto ni sobre la producción ni sobre el porcentaje de los componentes mayoritarios (extracto seco, grasa bruta, proteína bruta y lactosa) de leche, en ninguno de los dos períodos experimentales.

En relación con la especie ovina, es importante destacar que existen muy pocos trabajos que estudien el efecto de la administración de suplementos antioxidantes, compuestos por vitamina E y Se, por encima de las necesidades nutritivas, sobre la producción y composición de la leche. En concordancia con nuestro estudio, Capper *et al.* (2005) no observaron ningún efecto en la producción de leche con la administración de 500 mg/día de vitamina E. Sin embargo, debemos especificar que estos autores no utilizaron ovejas de ordeño y que la producción de leche se midió únicamente en el día 21 post-parto, tras separar a los corderos durante un periodo de 4 horas.

En ovino no se han encontrado estudios similares al nuestro, es decir, con empleo de mayores dosis de vitamina E y Se. No obstante, en vacuno lechero existen algunos trabajos en los que se administró, por encima de los requerimientos nutritivos, un suplemento de vitamina E y selenio, aunque los resultados obtenidos no son concluyentes. En este sentido, Chawla y Kaur (2004) observaron un incremento en la producción de leche de vacas a las que se les administró vitamina E, si bien este efecto fue atribuido a un menor número de infecciones de la ubre. Smith *et al.* (1997) sugieren que, como pauta general, los beneficios de la administración de vitamina E y selenio, sobre la producción y la composición de la leche, es indirecta puesto que mejoraría la respuesta inmune y, por lo tanto, se reducirían las infecciones intramamarias. Sin embargo, Brozos *et al.* (2009), Bourne *et al.* (2008) y Politis *et al.* (2004) no encontraron ningún efecto debido a la

administración de vitamina E (sola o combinada con selenio) sobre la producción y composición de la leche.

Yang *et al.* (2011) postularon que los efectos de la vitamina E y selenio, recogidos en la literatura científica, sobre la producción y composición de la leche, no son uniformes debido a la disparidad de las dosis y vías de administración empleadas, no estando claro, tampoco, cual es el momento óptimo para la administración de dicho suplemento.

Tufarelli y Laudadio (2011) en un estudio reciente, realizado en cabras lecheras, observaron un incremento de un 7,5% en la producción de leche, así como un aumento en el contenido de grasa (+4,2%) y proteína (+1,3%) en los animales a los que se les administró vitamina E y selenio. Los autores atribuyeron este efecto a una mejor utilización de los nutrientes.

Es oportuno señalar que diferentes estudios sugieren que, a nivel ruminal, la vitamina E reduce la formación de *trans*-10 C18:1 e incrementa la de *trans*-11 C 18:1, modulando el efecto negativo del primero sobre la síntesis de grasa en la glándula mamaria (Pottier *et al.*, 2006; Looor *et al.*, 2003). Cabe indicar que en el presente estudio, ni en la semana 3 (antes del cambio de frecuencia de ordeño), ni en la semana 11 se observaron diferencias en las proporciones de ambos ácidos grasos en la leche de los dos grupos experimentales, lo que estaría en concordancia con la ausencia de respuesta en el porcentaje de grasa en la leche.

En el periodo 1, como cabría esperar, no se encontraron diferencias en la producción y composición de la leche entre glándulas. Sin embargo, cuando la frecuencia de ordeño se redujo de dos a una vez al día (período 2) se observaron diferencias en la producción de leche entre glándulas. La supresión de un ordeño diario en una de las glándulas provocó una reducción en la producción de leche en comparación con la glándula que se ordeñaba dos veces diarias.

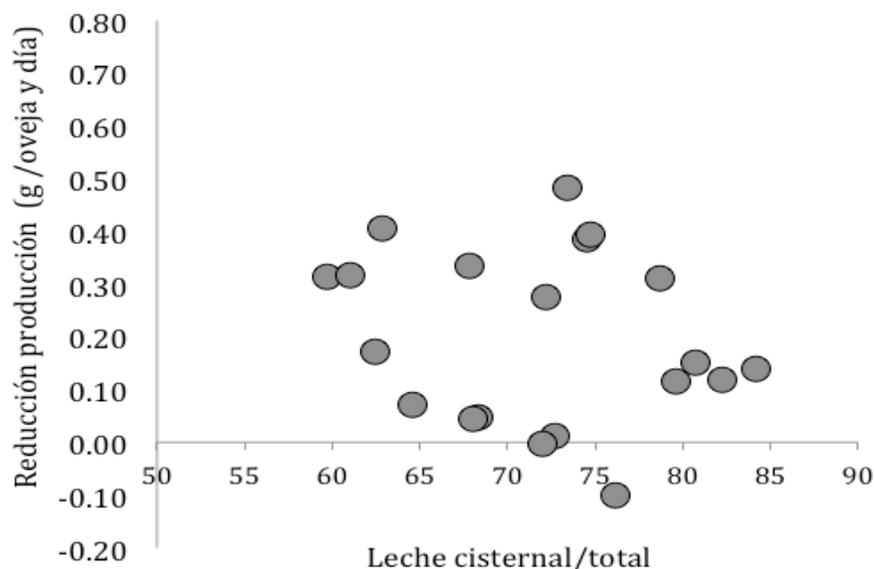
El porcentaje medio de reducción en la producción de leche en la glándula sometida a un ordeño al día (19%) coincide con los resultados encontrados, en ovejas lecheras, por otros autores en estudios en los que se modificó la frecuencia de ordeño, los cuales señalan que la reducción puede oscilar entre el 5 y el 50% (Marnet y Komara, 2008; Knight *et al.*, 1993; Papachristoforou *et al.*, 1982).

La reducción en la frecuencia de ordeño provoca una acumulación de leche en la glándula mamaria, la cual ejerce una presión mecánica sobre las *tight junctions* de las

células epiteliales mamarias que forman los alvéolos, debilitando aquellas. Este proceso es capaz de desencadenar mecanismos de adaptación propios de la glándula mamaria, para sobreponerse a las nuevas condiciones (Wall y McFadden, 2012; Pai y Horseman, 2011; Davis *et al.*, 1999).

El volumen cisternal de la glándula mamaria se ha considerado un factor clave para explicar las variaciones, individuales o entre razas, de la respuesta a la reducción en la frecuencia de ordeño (McKusick *et al.*, 2002; Davis *et al.*, 1999). En general, un tamaño grande de la cisterna se traduciría en una mayor proporción de leche cisternal respecto al total de leche producida. Esta elevada capacidad de almacenamiento de leche en la cisterna evitaría, en gran medida, que la leche acumulada en la ubre ejerza presión mecánica sobre las células de los alveolos mamarios cuando se alarga el período entre ordeños.

En este trabajo, la proporción de leche cisternal fue determinada antes de la supresión de un ordeño al día y no se encontró una relación positiva entre la reducción en la producción de la leche y el porcentaje de la leche cisternal respecto al total de la producida por cada glándula (Figura 23).



Reducción estimada como diferencia entre la producción de la semana 3 (2x) menos la producción en la semana 4 (1x) en la glándula correspondiente.

Figura 23 Relación entre la capacidad cisternal de la glándula y la reducción en la producción de leche cuando se reduce la frecuencia de dos (2x) a 1 (1x) ordeño al día.

La ausencia de relación entre la proporción de leche cisternal (indicador de la capacidad de almacenamiento de leche) y la reducción en la producción de leche coincide

con los resultados encontrados por Marnet y Komara (2008) en la especie caprina. Estos autores concluyen que la proporción que representa el volumen cisternal, respecto al volumen total de la ubre, no explica completamente la variabilidad individual en las pérdidas de la producción de leche durante largos intervalos de ordeño y sugieren la existencia de otro mecanismo, que no describieron pero que definieron como elasticidad de la glándula para soportar la distensión y evitar un incremento de la presión intramamaria. Así, una mayor elasticidad de la ubre permitiría una reducción de la presión intramamaria.

El porcentaje de leche cisternal encontrado en la raza assaf, utilizada en este trabajo, osciló entre 50 y 75%, con una media de 64%, que es similar al observado para ovejas de la raza lacaune (68%; Rovai, 2001), menor que en ovejas de la raza sarda (75%; Marnet y McKusick, 2001) y mayor que en ovejas de raza manchega (53%; Rovai, 2001).

En lo que respecta a las diferencias halladas en la composición de la leche durante el período 2, se observó un incremento en el porcentaje de proteína (4,92 vs 5,14%) y un descenso en el porcentaje de lactosa (5,08 vs 4,98%) en la leche de la glándula ordeñada una vez al día en comparación con la leche procedente de la glándula que se ordeñó dos veces diarias. El contenido de grasa no presentó cambios significativos y el contenido en sólidos totales tendió a ser mayor en la leche procedente de un ordeño al día (16,71 vs 16,50%).

En la misma línea de los resultados obtenidos en esta prueba, Nudda *et al.* (2002) encontraron, con la supresión de un ordeño diario, un incremento del porcentaje de proteína en la leche de ovejas de raza sarda y merina (de 5,41 a 5,99% y de 5,66 a 6,32%, respectivamente), sin que hubiera diferencias en el contenido de grasa de la leche en ninguna de las dos razas. Resultados similares fueron observados por Prieto *et al.* (2011) en ovejas de raza assaf.

En contraposición, Castillo *et al.* (2008), Delamaire y Guinard-Flament (2006) y Salama *et al.* (2003) no evidenciaron variaciones significativas en el contenido de proteína cuando se aumentó el intervalo entre ordeños en ovejas, vacas y cabras. En algunos de estos trabajos sí se encontró que la reducción en la frecuencia de ordeño estuvo acompañada de un aumento en el contenido de grasa, tanto en vacas (3,7 a 4,3%; Delamaire y Guinard-Flament, 2006) como en cabras (4,62 a 5,10%; Salama *et al.*, 2003). Por el contrario, Castillo *et al.* (2008) constataron que el aumento del intervalo de ordeño de 12 a 24 horas, en ovejas de raza manchega y lacaune, produjo un marcado descenso en el contenido de grasa en la leche (de 8,01 a 6,97% y de 6,61 a 5,86%, respectivamente).

Castillo *et al.* (2008) y Nudda *et al.* (2002) también encontraron un descenso en el contenido de lactosa cuando se aumentó el intervalo de ordeño de 12 a 24 horas en ovejas de raza manchega y lacaune (de 4,77 a 4,68% y de 4,76 a 4,68%, respectivamente) y en ovejas de raza merina (de 4,86 a 4,61%). Sin embargo, Delamaire y Guinard-Flament (2006) y Nudda *et al.* (2002), no encontraron diferencias significativas en el contenido de lactosa en la leche de vaca y oveja, respectivamente, con la reducción de la frecuencia de ordeño.

En relación con el contenido de sólidos totales, los resultados obtenidos en el presente estudio concuerdan con los obtenidos por Salama *et al.* (2003), quienes observaron un incremento en el contenido de sólidos totales en la leche de las cabras cuando se redujo la frecuencia de ordeño de 2 a 1 ordeño al día (de 12,9 a 13,6%).

El incremento en el contenido de proteína y de sólidos totales de la leche procedente de la glándula en la que se suprimió un ordeño al día podría ser debido, en parte, a una menor dilución (menor producción). No obstante, la ausencia de diferencias en la concentración de grasa entre ambas glándulas y las diferencias observadas en el contenido de los distintos elementos minerales, sugiere la intervención de otros mecanismos.

Stelwagen (2001) señala que la adaptación de la glándula mamaria a modificaciones en la frecuencia de ordeño es regulada por la activación de mecanismos de respuesta aguda tales como el FIL (*feedback inhibitor of lactation*). Así, el cambio en el contenido de proteína podría estar relacionado con la modificación del metabolismo proteico. Adicionalmente, el aumento en la permeabilidad de las *tight junctions* (*TJ*), por efecto de la presión que ejerce la acumulación de leche en los alvéolos, puede ayudar a explicar el incremento en el contenido proteico de la leche. Según McKusick *et al.* (2002) el efecto disruptivo sobre las *TJ* provocaría la entrada de proteínas séricas hacia el lumen alveolar, aumentando el contenido proteico de la leche. De hecho, la concentración de lactosa tuvo un comportamiento opuesto al del contenido de proteína, que podría ser debido al trasvase de lactosa hacia la sangre por la ruptura de las uniones intercelulares y el gradiente de concentración, disminuyendo su contenido en la leche y aumentando en sangre (Stelwagen y Singh, 2014; Chedly *et al.*, 2012; Hernandez *et al.*, 2011; Castillo *et al.*, 2008; Stelwagen, 2001).

Por otra parte, el aumento en la leche, de cabras y ovejas, de la concentración de caseína (principal proteína de la leche) en los sistemas de un ordeño al día (Salama *et al.*,

2003; Lacy-Hulbert *et al.*, 1999) se ha asociado con el tamaño molecular de la micela de esta proteína que, a pesar del debilitamiento de las TJ, dificultaría su paso al lumen alveolar, favoreciendo su concentración en la leche (Stelwagen *et al.*, 1997).

En lo que respecta a la grasa, aunque no se observaron diferencias en el contenido total, como se discutirá posteriormente, la frecuencia de ordeño sí que parece influir en la síntesis *de novo*.

El contenido de los minerales (Ca, P, Na, K, Cl y Mg) determinados en la leche presentó concentraciones similares, en ambos grupos y periodos experimentales, a las observadas por López (2007) para ovejas de raza assaf y a las señaladas por Park *et al.* (2007) para la leche producida por el ganado ovino, en general.

Al contrario de lo que cabría esperar, se encontraron diferencias en el contenido de P, Na, Cl y Mg entre las glándulas (A, B) durante el período 1, en ambos grupos (Control y AOX), para las cuales no se ha encontrado una explicación.

Considerando el conjunto del periodo 1, se puede afirmar que estas diferencias no guardaron relación con las diferencias en la producción de leche. Es necesario indicar que los días que se recogieron las muestras de leche para determinar su composición mineral no hubo diferencias estadísticamente significativas entre glándulas en la producción de leche (1359 vs 1391 g/animal y día).

En el segundo periodo experimental se observó un aumento en la concentración de Ca y P de la leche producida por las glándulas que fueron ordeñadas una vez al día. Este aumento podría estar relacionado con el incremento que se produjo en el porcentaje de proteína en la leche de dichas glándulas. Tal y como se discutió anteriormente, una de las principales proteínas que aumenta durante la reducción de la frecuencia de ordeño es la caseína (Salama *et al.*, 2003; Lacy-Hulbert *et al.*, 1999), que contiene en su estructura química calcio formando diferentes sales y en las que también participa el fósforo (*e.g.* citrato de calcio, fosfato de calcio, fosfato de magnesio, etc.). Este hecho podría explicar el aumento de la concentración de estos minerales en la leche (Gaucheron, 2005; Holt, 1985).

Por otra parte, en la leche producida por las glándulas que fueron ordeñadas una vez al día, el contenido de Na fue menor, tendiendo el contenido de K a ser también menor y hubo un aumento numérico, aunque sin llegar a ser estadísticamente significativo, en el contenido de cloro. No obstante, en el caso concreto del Cl es necesario señalar que en el primer periodo su concentración fue menor en la glándula que posteriormente se sometería

a 1 ordeño diario (Glándula A), de manera que cuando se utilizó este valor como covariable para analizar los datos del segundo periodo, las diferencias fueron estadísticamente significativas ($P < 0.05$). Estos cambios, en el contenido mineral de la leche, confirman el efecto disruptivo que provoca la reducción de la frecuencia de ordeño sobre las *TJ*, lo que demuestra que existe un intercambio de iones entre el plasma y la leche. Nuestros resultados están en concordancia con lo descrito por Castillo *et al.* (2008) en ovejas y Stelwagen *et al.* (2001, 1999) en vacas y cabras.

En lo que respecta a la vitamina E y selenio, que constituyen el suplemento AOX, la concentración en la leche de ambos durante el Periodo 1 estuvo dentro de los rangos señalados por otros autores (Davis *et al.*, 2006; Capper *et al.*, 2005; Njeru *et al.*, 1994).

El contenido de vitamina E en la leche, como cabría esperar, fue mayor en los animales pertenecientes al grupo AOX tanto en el Pdo1 como en el Pdo 2, siendo este efecto independiente de la frecuencia de ordeño. Estos datos coinciden con el mayor nivel plasmático de vitamina E en el grupo AOX y están en concordancia con los indicados por otros autores (Debier *et al.*, 2006; McDowell *et al.*, 1996 e Hidiroglou, 1989), en cuyos trabajos se observó un incremento del contenido de vitamina E en la leche de los animales a los que se les administró un suplemento de dicha vitamina.

Por el contrario, en la concentración de Se no se observaron diferencias en ninguno de los dos periodos experimentales, a pesar de que los animales del grupo AOX también recibieron un suplemento de dicho mineral. Estos resultados son contrarios a los indicados por Davis *et al.* (2006), quienes pusieron de manifiesto que la administración de un suplemento de este mineral provocó un aumento en el contenido de Se en la leche. La falta de efecto, observada en nuestro trabajo, podría ser debida a la fuente de selenio que se administró (selenito de sodio). Según diversos autores una fuente inorgánica de Se provocaría una menor absorción y retención del mismo (Calamari *et al.*, 2010; Petrerá *et al.*, 2009; Pechova *et al.*, 2008; Juniper *et al.*, 2006; Koenig *et al.*, 1997). De hecho, tal y como se discutió previamente, tampoco se encontraron diferencias en el plasma.

Finalmente, la estabilidad a la oxidación de la grasa láctea fue determinada mediante la técnica de RANCIMAT. En ambos periodos se encontraron diferencias entre tratamientos, siendo mayor el tiempo necesario para oxidar la grasa láctea de la leche producida por el grupo AOX (4,81 vs 2,89 horas en el periodo 1 y 7,22 vs 5,35 horas en el periodo 2, para el grupo AOX y el grupo Control, respectivamente). Estos resultados coinciden con los obtenidos por Clausen *et al.* (2010) y Palmquist *et al.* (1993) y podrían

ser explicados porque la vitamina E ejerce un efecto protector de los ácidos grasos de cadena larga presentes en la leche, aumentando, así, la estabilidad a la oxidación de la grasa láctea (Havemose *et al.*, 2006; Aardt *et al.*, 2005).

Es interesante destacar, por una parte, la ausencia de diferencias en la estabilidad oxidativa atribuibles a la frecuencia de ordeño y, por otra, el incremento de la estabilidad en el segundo periodo respecto del primero.

En lo que se refiere al primer aspecto, la falta de efecto de la frecuencia de ordeño podría explicarse por la ausencia de diferencias en la concentración de vitamina E, así como en la proporción de PUFA. En sentido contrario, se ha observado que el incremento en la frecuencia de ordeño y los intervalos irregulares de éste que suelen presentarse en los sistemas automatizados (Svennersten y Pettersson, 2007), habitualmente, aumentan la concentración de ácidos grasos libres que son altamente susceptibles de oxidación, encontrando concentraciones más altas de ácidos grasos libres en la leche de glándulas ordeñadas con mayor frecuencia (4x:1,49 meq/100 g de grasa vs. 2x:1,14 meq/100 g; Wiking, 2005).

En lo que respecta al incremento en la estabilidad oxidativa de la grasa observada en el segundo periodo respecto al primero, este incremento concuerda con el aumento en la concentración de vitamina E.

En el presente trabajo se ha estudiado el efecto del cambio en la frecuencia de ordeño y del uso de un suplemento vitamínico-mineral sobre el perfil de ácidos grasos de la leche.

En la semana 3 (día 21), no se observaron diferencias atribuibles al aporte del suplemento antioxidante en el perfil de ácidos grasos, a excepción de una disminución en las proporciones de C22:0 y C22:2 n-6 y un aumento en la de C18:2 trans 8, cis, 13.

Sin embargo, en la semana 11, independientemente de la frecuencia de ordeño, sí se encontró una disminución en la proporción de los ácidos grasos de menos de 16 átomos de carbono y un aumento en la proporción de los ácidos grasos de 16 o más átomos de carbono, en la leche de los animales que recibieron el suplemento AOX.

La misma tendencia se observó en la semana 3, pero la ausencia de diferencias significativas en esa semana sugiere que este tiempo podría haber sido insuficiente para

lograr el máximo efecto. De hecho, la concentración de vitamina E y la capacidad antioxidante de la leche también fueron mayores en el periodo 2.

El descenso señalado en los ácidos grasos de menos de 16 átomos de carbono observado en la semana 11 fue consecuencia de la reducción en las proporciones de los ácidos C6:0, C8:0, C10:0 y C12:0.

La disminución de estos ácidos no se tradujo en una bajada en el porcentaje del total de ácidos grasos saturados porque simultáneamente aumentó la proporción de ácido palmítico y de forma numérica, aunque no estadísticamente significativa, de ácido esteárico.

La administración del suplemento antioxidante no influyó en la proporción de PUFA, aunque aumentó la proporción de MUFA, debido fundamentalmente a un incremento en la proporción de ácido oleico.

Los ácidos grasos de más de 16 átomos de carbono excretados en la leche son, principalmente, de origen dietético, aunque cuando los animales están en balance energético negativo pueden proceder también de las reservas corporales de grasa (Loften *et al.*, 2014). En el presente estudio, los animales estuvieron siempre en balance positivo de energía, por lo tanto las diferencias observadas en la proporción de ácido oleico podrían reflejar una mayor concentración plasmática y, por ende, una mayor disponibilidad de éste para su captación por la glándula mamaria.

De hecho, la síntesis *de novo* puede estar condicionada por la deposición de ácido oleico en los triglicéridos de la leche, ya que la incorporación de ácidos grasos de cadena corta en los triglicéridos para mantener la fluidez de leche puede ser más o menos necesaria dependiendo del tipo de ácido graso que se sitúe en las diferentes posiciones (Smoczyński, 2017; Loftén *et al.*, 2014). Así, el incremento en la proporción de ácido oleico podría reducir la necesidad de ácidos grasos saturados de cadena corta (<12 C). Además, se ha observado que el ácido oleico inhibe la síntesis *de novo* en las células mamarias (Hansen y Knudsen, 1987). Este fenómeno explicaría la reducción observada en los porcentajes de los ácidos grasos saturados de menos de 16 átomos de carbono.

Una mayor concentración plasmática de C18:1, *a priori*, podría ser consecuencia de un mayor aporte dietético de C18:1, de una mayor movilización de este ácido graso desde las reservas lipídicas o de una mayor aporte de C18:0 asociado a una mayor tasa de desaturación en la glándula mamaria.

Ambos grupos experimentales recibieron la misma alimentación y no hubo diferencias significativas en la ingestión. Por tanto, de haberse producido diferencias en la absorción de ácido oleico o esteárico, únicamente cabría esperar que fueran consecuencia de modificaciones en la fermentación ruminal y en la tasa de biohidrogenación.

Es conocido que la vitamina E puede modificar las rutas de biohidrogenación en el rumen (Juárez *et al.*, 2011; Pottier *et al.*, 2006; Chikunya *et al.*, 2004). No obstante, una mayor biohidrogenación de los ácidos grasos poliinsaturados en el rumen del grupo AOX debería traducirse en un menor contenido de éstos en la leche producida. Sin embargo, no se observaron diferencias en las proporciones del total de C18:2 (4,8 vs 4,7% para el grupo Control y AOX, respectivamente) ni de C18:3 (0,70 vs 0,69 % para el grupo Control y AOX, respectivamente) en la leche, lo que en principio no sugiere una mayor biohidrogenación.

Por otra parte, el índice de desaturación de C18:0 a C18:1 cis 9 no varió entre tratamientos. Además, la proporción de C18:0 también fue numéricamente mayor en la leche del grupo AOX, lo que sugiere que hubo un mayor flujo tanto de C18:0 como de C18:1 hacia la glándula mamaria.

Los cambios observados, por tanto, no podrían ser explicados por diferencias en la tasa de biohidrogenación y otros mecanismos deberían de estar implicados.

Cuando los animales se encuentran en balance energético negativo movilizan las reservas corporales de grasa y, en general, aumentan en leche las proporciones de los ácidos de más de 16 C, en especial C18:0 y C18:1 cis 9, y disminuye la proporción de ácido palmítico y la de los ácidos de más de 16 átomos de C (Gross *et al.*, 2011).

En el presente experimento, los animales de ambos grupos estuvieron en balance positivo de energía, pero la GDP fue siempre mayor en el grupo Control que en el grupo AOX, sobre todo en el segundo periodo.

En ratones se ha comprobado que con ingestiones similares de energía la administración de vitamina E, modificada para favorecer su incorporación en las mitocondrias, atenuó el estrés oxidativo hepático y redujo la deposición de grasa corporal (Mao *et al.*, 2010). Este efecto estuvo asociado a un aumento de la β -oxidación y en la proteína desacoplante 2 (UCP-2), lo que podría haber incrementado la producción de calor y la disipación del gradiente de protones y el potencial a través de la membrana interna mitocondrial.

En consecuencia, con una ingestión y una producción de leche similar, el metabolismo lipídico podría ser diferente en los animales del grupo Control y AOX, con una mayor actividad lipogénica en el primero. Este efecto, por tanto, podría explicar la mayor GDP del grupo Control y también podría influir en el perfil de ácidos grasos de la leche.

Por otra parte, tampoco se pueden descartar diferencias en la digestibilidad de la grasa entre los grupos experimentales. De hecho, diferentes autores han observado un incremento en la digestibilidad de la grasa y del contenido de grasa corporal en pollos como consecuencia de la administración de suplementos de vitamina E (Li *et al.*, 2017; Brenes *et al.*, 2008).

En lo que respecta a la frecuencia de ordeño cabe indicar que aunque las diferencias observadas no fueron de gran magnitud, sí influyó en las proporciones de numerosos ácidos grasos, cuyas variaciones deben ser interpretadas.

Algunos autores han sugerido que el efecto de la frecuencia de ordeño sobre la composición de la grasa está asociado al balance energético del animal, de manera que la reducción de 2 a 1 ordeño al día modificaría la composición de la grasa únicamente en animales que están con un balance energético negativo (Groos *et al.*, 2011). En esta situación nutritiva se sabe que la reducción de la frecuencia de ordeño mejora el balance energético al disminuir la producción de leche y, como consecuencia, se reduce la movilización de grasa corporal para la síntesis de leche. Esto, a su vez, se traduce en un aumento en la proporción de ácidos grasos de cadena media (C10-C14) y una disminución de ácido esteárico y oleico. Por este motivo, algunos autores (Guinard-Flament *et al.*, 2007) han concluido que la reducción de 2 a 1 ordeño al día no afecta al perfil de ácidos grasos en los animales que se encuentran en balance energético positivo.

Como se mencionó anteriormente, en el presente trabajo se utilizaron animales que ya habían superado el pico de lactación y que estaban en balance positivo de energía durante todo el ensayo experimental (Pulido *et al.*, 2012). Por lo tanto, no cabría esperar un efecto asociado con la movilización de grasa corporal.

En ganado caprino se ha observado que al aumentar la frecuencia de ordeño de dos a tres ordeños al día, se incrementa la actividad de las enzimas relacionadas con la síntesis *de novo* en la glándula mamaria (Travers y Barber, 1993). Si este mecanismo actuara también en sentido contrario, podría explicar la disminución hallada en la proporción de ácido palmítico y de otros ácidos grasos de cadena corta.

Dada la naturaleza del ensayo, no debería haber habido diferencias en la concentración de nutrientes plasmáticos disponibles para ser captados por las glándulas. Por tanto, en la glándula sometida a un solo ordeño cabría esperar una mayor disponibilidad de ácidos grasos de cadena larga, aportados por la dieta. Este hecho, podría explicar las diferencias encontradas en la proporción de C18:0, de C18:1 y de varios de sus isómeros. Es necesario tener presente que el ácido esteárico suele ser el ácido graso con mayor concentración en la digesta duodenal en los rumiantes (Loften *et al.*, 2014; Chilliard *et al.*, 2007). No obstante, la diferente acumulación de leche en las dos glándulas podría determinar diferencias en el flujo sanguíneo y en la captación de nutrientes y, por tanto, en el aporte de nutrientes a la glándula (Guinard-Flament *et al.*, 2007).

Algunos estudios sugieren que hay una relación paralela entre la producción de leche y el flujo sanguíneo, que actuaría como un mecanismo que regula a nivel local la síntesis de leche y el mantenimiento de ésta durante la lactación (Connor *et al.*, 2008). En este sentido, Bequette y Douglass (2010) apuntan la posible existencia de un factor local que estimularía o inhibiría el flujo sanguíneo hacia la glándula mamaria, ajustando el aporte de nutrientes utilizados en el anabolismo de la ubre. Los resultados del presente trabajo contribuyen a confirmar las hipótesis planteadas por estos autores, aunque la reducción en el flujo sanguíneo, de haberla habido, pudo no haber sido tan marcada como la observada en los estudios anteriormente citados.

Por otra parte, como se analiza en la segunda prueba que se realizó para este trabajo de investigación, el cambio de frecuencia de ordeño parece determinar cambios en el metabolismo lipídico y energético, que podrían ser la causa de los cambios observados en el perfil de ácidos grasos.

6.1.5 Salud de la ubre.

En primer lugar es necesario destacar que en todo el periodo experimental no hubo ningún caso de mastitis clínica en los animales.

En el periodo 1, en el que ambas glándulas fueron ordeñadas dos veces al día, no se observaron diferencias en el recuento de células somáticas ni entre los dos grupos experimentales ni entre glándulas.

Sin embargo, en el período 2 cuando se aplicó una reducción en la frecuencia de ordeño a una de las glándulas, se encontró un incremento en el RCS de la leche procedente de las glándulas sometidas a un ordeño diario.

Nuestros resultados coinciden con los de numerosos trabajos en los que se redujo la frecuencia de ordeño durante toda la lactación o en diferentes momentos de la misma (Nudda *et al.*, 2002; Kelly *et al.*, 1998; Stelwagen y Lacy-Hulbert, 1996; Holmes *et al.*, 1992). Sin embargo, otros autores no han observado efecto alguno de la reducción de la frecuencia de ordeño de 2 a 1 al día sobre el RCS en ovejas (Prieto *et al.*, 2013; Castillo *et al.*, 2008; McKusick *et al.*, 2002).

Las células somáticas están constituidas mayoritariamente por leucocitos, representando las células de descamación procedentes del epitelio glandular una proporción muy pequeña (Burvenich, Guidry y Paape, 1995).

En el presente estudio, los resultados del análisis histopatológico no revelaron diferencias atribuibles a la frecuencia de ordeño ni en el diámetro de los alveolos ni en el número de células epiteliales.

Esta ausencia de efecto en ambos parámetros sugiere que las diferencias encontradas en el recuento de células somáticas no serían atribuibles a diferencias en la descamación del epitelio glandular, consecuencia de una mayor tasa de apoptosis. No obstante, Bernier-dodier *et al.* (2010) observaron que la reducción de 2 a 1 ordeño produce tanto un aumento de la tasa de apoptosis como de la tasa de proliferación. En consecuencia podría no modificarse el número de lactocitos, pero sí haber un mayor tasa de renovación (*turnover*) y, por tanto, una mayor eliminación en la leche.

El estímulo provocado por el ordeño o el amamantamiento induce la migración de neutrófilos hacia la glándula mamaria, potenciando su capacidad defensiva frente a agentes patógenos (Paape *et al.*, 1992). Sin embargo, los neutrófilos pierden su actividad fagocítica y bactericida al interactuar con algunos compuestos químicos de la leche, siendo necesaria su renovación constante para mantener la capacidad defensiva (Paape and Capuco, 1997; Paape and Wergin, 1977). Frecuencias altas de ordeño favorecen esta renovación, reduciendo la incidencia de mamitis y el recuento de células somáticas (Hillerton, 1999).

Los estudios histopatológicos pusieron de manifiesto que el 75% de las glándulas sometidas a un ordeño diario presentaban infiltrados inflamatorios, reduciéndose este porcentaje en las glándulas que siempre se ordeñaron 2 veces al día. Así mismo, los resultados de ese mismo estudio histopatológico revelaron un mayor grado de infiltración inflamatoria en las glándulas en las que se redujo la frecuencia de ordeño.

En definitiva, el mayor recuento de células somáticas observado en las glándulas ordeñadas una vez al día está en concordancia con una mayor prevalencia e intensidad de procesos inflamatorios.

Los procesos inflamatorios no obedecen necesariamente a causas infecciosas. De hecho, es importante destacar que el RCS hallado durante todo el ensayo experimental fue muy bajo y similar al encontrado por Salama *et al.* (2003) en cabras y Gonzalo *et al.* (2002, 1993), Hervas *et al.* (2006), Castillo *et al.* (2008), Prieto *et al.* (2013) en ovejas, cuyos RCS siempre estuvieron lejos de ser considerados como indicativos de posibles patologías mamarias como la mastitis subclínica.

No obstante, cuando se reduce la frecuencia de ordeño en animales de alta producción se produce un incremento en la presión intramamaria, provocando un estrés mecánico, que, a su vez, causaría un debilitamiento de las “*tight junctions*”, lo cual aumentaría la permeabilidad y facilitaría el paso de células somáticas hacia el lumen alveolar (Stelwagen y Lacy-Hulbert, 1996).

De hecho, la reducción del contenido de lactosa y Na y K y el aumento de Cl, observado en el presente trabajo también fue descrito en estudios previos, asociándose este efecto a un debilitamiento de las “*tight junctions*”. No obstante, algunos estudios señalan que la alteración de las “*tight junctions*” es transitoria, ya que se producen modificaciones en el metabolismo de la glándula y se reduce la producción de leche (Chedly *et al.*, 2013)

Sin embargo, cuando se estudió el tejido procedente de las glándulas mamarias ordeñadas dos veces al día, independientemente del grupo experimental al que pertenecían, también se observaron infiltrados inflamatorios en el 50% de ellas. Este hecho podría ser explicado por la etapa de la lactación (alrededor de 19 semanas post-parto) en la que se tomaron las muestras de tejido mamario. En este momento las glándulas ya habrían iniciado el proceso de involución fisiológica, en el cual aparecen fenómenos inflamatorios a causa de los procesos de apoptosis.

En cualquier caso, independientemente del papel que puedan ejercer los procesos inflamatorios hallados, asociada a la reducción de la frecuencia de ordeño se produjo una reducción en la producción de leche, lo que podría contribuir también a aumentar la concentración de células somáticas (Kamote *et al.*, 1994).

La administración del suplemento antioxidante no influyó en el RCS y tampoco redujo la prevalencia de infiltración inflamatoria. Diferentes estudios han puesto de

manifiesto que durante el periodo de transición, la elevada demanda de oxígeno para la síntesis de leche incrementa la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), incrementando la susceptibilidad a las infecciones intramamarias. Se ha comprobado que la administración de antioxidantes en esta etapa reduce la prevalencia de procesos infecciosos y el recuento de células somáticas (Brozos *et al.*, 2009; Politis *et al.*, 2004).

En el presente trabajo los animales se encontraban en la mitad de la lactación, etapa en la cual se reduce el estrés metabólico en la glándula mamaria, estando, por tanto, menos comprometida la capacidad antioxidante. Esto podría explicar la ausencia de diferencias en el RCS durante el primer periodo entre los dos grupos experimentales, a pesar del aumento observado en la capacidad antioxidante tanto del plasma como de la leche.

En el segundo periodo, sin embargo, tal y como se discutió previamente, se incrementó el RCS en la leche que procedía de las glándulas sometidas a un ordeño diario y este efecto no fue atenuado por la administración del suplemento antioxidante.

Es oportuno señalar que el estudio histopatológico reveló la existencia de infiltrados inflamatorios en las glándulas de los dos grupos experimentales, si bien el porcentaje de casos fue menor en el grupo que recibió el suplemento antioxidante (75% vs 50%). A pesar de ello, el RCS no varió entre grupos experimentales.

Cabe indicar, en primer lugar, que los resultados del estudio histopatológico deben ser interpretados con precaución, ya que únicamente se sacrificaron 4 animales de cada grupo experimental (25%) y podrían no ser representativos.

Por otra parte, como se discutió previamente, el incremento en el RCS podría ser una consecuencia de una menor dilución puesto que se redujo la producción de leche en los animales sometidos a un ordeño diario. Esa diferente dilución podría explicar también la interacción observada entre el suplemento y la frecuencia de ordeño, puesto que, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas, la producción de leche disminuyó un poco más en el grupo AOX que en el grupo Control.

No obstante, tampoco se debe olvidar que la frecuencia de ordeño puede modificar tanto las tasas de proliferación como de apoptosis (Sylvester, 2007; Colitti *et al.*, 2000; McIntyre *et al.*, 2000) y estudios previos han puesto de manifiesto que la Vitamina E puede modular la respuesta de las células mamarias a diferentes factores, modificando la proliferación y diferenciación celular en la glándula mamaria (Turley *et al.*, 1992). Otros

autores, aunque en tejidos diferentes al mamario, han observado que la vitamina E también puede modificar las tasas de proliferación y de muerte celular, ya sea por necrosis o por apoptosis (Weber *et al.*, 2002; Rimbach *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2000).

En este sentido, Bouwstra *et al.*, (2010 a,b) observaron un efecto adverso de la vitamina E sobre la salud de la glándula mamaria en vacas lecheras, de explotaciones comerciales, a las que se les administró diariamente una dosis de 3000 UI durante el período seco, las cuales mostraron una mayor incidencia de mastitis. De acuerdo con estos autores la vitamina E tendría efectos beneficiosos en condiciones fisiológicas normales; sin embargo, en estados de estrés oxidativo esta vitamina puede contribuir a la exaltación de los mismos. En este sentido, se hace necesario mencionar que en nuestro trabajo la intensidad de la inflamación fue mayor en las glándulas ordeñadas una vez al día, especialmente en aquellas del grupo AOX.

Por otra parte, en algunos estudios se ha comprobado que la administración de vitamina E por encima de las necesidades puede incrementar la muerte celular por necrosis, pero disminuir la tasa de apoptosis (Malafa y Neitzel, 2000; Reddy y Fernandes, 2000). De haberse producido este fenómeno en nuestros animales, tal vez podría explicar el mayor grado de infiltrados inflamatorios registrados en las glándulas sometidas a un ordeño diario en el grupo AOX. En cualquier caso, el hecho de que el número de células epiteliales y el diámetro de los alveolos no se modificara con la frecuencia de ordeño sugiere que la administración del AOX no cambió el balance entre las tasas de proliferación y muerte celular, confirmando que la reducción en la producción de leche obedecería a cambios en la actividad más que en la arquitectura celular de la glándula mamaria.

6.2 EXPERIMENTO II. EFECTO A CORTO Y MEDIO PLAZO DE LA FRECUENCIA DE ORDEÑO EN OVEJAS CON DIFERENTE POTENCIAL PRODUCTIVO Y CAPACIDAD CISTERNAL SOBRE LA PRODUCCIÓN Y COMPOSICIÓN DE LA LECHE, EL PERFIL METABÓLICO Y EL ESTADO SANITARIO DE LA UBRE.

6.2.1 Producción y composición de leche: efecto de la frecuencia de ordeño a corto plazo.

En la mayor parte de los estudios efectuados sobre frecuencia de ordeño, en los que se realiza un diseño experimental de reducción unilateral, no se tiene en cuenta las diferencias que pueden existir entre glándulas y que, por tanto, pueden modificar la respuesta cuando se considera la ubre y no la glándula como unidad experimental.

En el presente estudio, para evitar esta situación, se seleccionaron animales que tuvieran las dos glándulas muy similares, tanto en lo que respecta a la producción como a la proporción de leche cisternal. Esta selección permitió que la evolución de la producción de leche fuera similar en ambas glándulas a lo largo del ensayo (ver figura 20), corroborando que el animal podía ser considerado como unidad experimental.

Como cabría esperar, y dado el diseño experimental, la producción de leche en el primer periodo experimental varió entre grupos, manteniéndose las diferencias existentes desde el inicio de la prueba. Además, dentro de cada grupo la producción osciló muy poco, registrándose un índice de persistencia del 97%.

La persistencia determinada en un periodo corto de tiempo debe interpretarse con suma precaución. No obstante, los valores obtenidos concuerdan con los de otros estudios realizados, con ovejas de raza lacaune y assaf, en los que se utilizaron ovejas con lactancias, en general, largas y elevadas persistencias (Castillo et al., 2009; Ramella, 2002).

En cualquier caso, la reducida variación en la producción de leche en este primer periodo pone de manifiesto que no hubo cambios ambientales que pudieran afectar a dicha producción (Pulina et al., 2007; Cannas et al., 2002; Portolano et al., 1997; Carta et al., 1995; Snowden y Glimp, 1991; Folman et al., 1966)

Tras el cambio de frecuencia de ordeño se produjo una reducción (en las 24 horas siguientes) en la producción de leche, la cual fue directamente proporcional al nivel de producción previo (28, 35 y 38% para los grupos BP, MP y AP, respectivamente).

El porcentaje de reducción registrado en el grupo BP fue similar al observado por Ramella (2002) en ovejas de raza assaf de producción similar y al señalado por Castillo et al. (2009) para ovejas de raza manchega, si bien estos animales tenían una menor producción de leche. Estos últimos autores en ovejas de raza lacaune, con una producción media de 1,750 litros/día, observaron una reducción del 18%, muy inferior a la encontrada en el presente trabajo en cualquiera de los grupos experimentales. Los autores atribuyeron la menor reducción en la raza lacaune, respecto a la raza manchega (18 vs 24 %), a la mayor capacidad cisternal de los animales de esta raza ($73,8 \% \pm 3,0$ para la raza lacaune vs $64,1 \% \pm 2,3$ para la raza manchega). Las diferencias observadas en el presente estudio, respecto de las señaladas por Castillo et al. (2009), podrían ser consecuencia de una mayor producción de leche unida a una menor capacidad cisternal media ($68 \pm 2,1 \%$).

La relación entre la producción de leche el día anterior al cambio de frecuencia y la máxima reducción observada tras el cambio de frecuencia de ordeño para todos los animales experimentales se presenta en la Figura 24.

Como puede observarse en la figura 24, cuando se consideraron los datos de todos los animales en conjunto, independientemente del grupo experimental al que pertenecieron, aquellos se ajustaron de forma aceptable a un modelo lineal, siendo el coeficiente de determinación superior al 75%, lo que indica que el nivel de producción explicaría una parte importante de la reducción máxima observada en la producción de leche tras el cambio de frecuencia de ordeño.

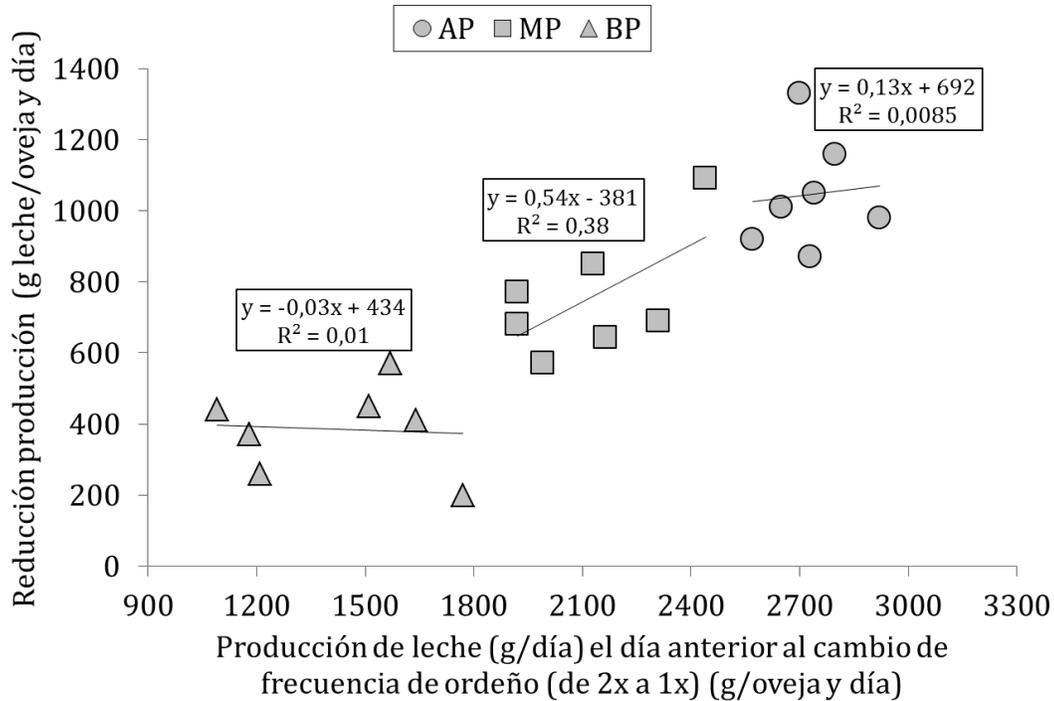


Figura 24 Relación entre la producción de leche registrada el día anterior al cambio de frecuencia de ordeño (g/oveja y día) y la reducción máxima registrada en la misma en las 48 horas siguientes al cambio de frecuencia para el conjunto de animales experimentales (BP: baja producción; MP: media producción; AP: alta producción).

Sin embargo, cuando se consideró cada grupo de forma independiente los datos mostraron una gran dispersión, señal de una elevada variabilidad entre animales del mismo grupo, y no siguieron una relación lineal. De hecho, los coeficientes de determinación (0.01; 0.38 y 0.008, para los grupos AP, MP y BP, respectivamente), excepto para el grupo MP, fueron muy próximos a cero.

Los animales almacenan inicialmente la leche secretada en el espacio alveolar, pasando progresivamente la misma hacia la cisterna (McKusick et al., 2002; Marnet y McKusick, 2001). En la especie ovina se ha comprobado que la proporción de leche cisternal se incrementa a medida que se extiende el intervalo entre ordeños (Salama et al., 2004; Nudda et al., 2000). A partir de intervalos superiores a 16 horas, la capacidad cisternal se considera especialmente relevante, ya que una mayor capacidad contribuye a reducir la presión intraalveolar y el tiempo de contacto entre el epitelio glandular y diferentes inhibidores presentes en la leche, disminuyendo, así, el impacto negativo de la reducción del número de ordeños sobre la producción de leche (Davis y Stelwagen, 1999).

En nuestro experimento se seleccionaron animales en los que la proporción de leche cisternal variase dentro de cada nivel de producción, dentro de un rango amplio (aproximadamente entre el 50 y 80%) y que no hubiera correlación entre ambas variables, es decir, entre producción y porcentaje de leche cisternal.

En la figura 25 se puede observar la relación entre la capacidad cisternal de la ubre (promedio de la capacidad de las dos glándulas) antes del cambio de frecuencia de ordeño y la reducción máxima registrada en la producción de leche en las 48 horas siguientes tras el cambio de frecuencia para todos los animales experimentales, dentro de cada grupo de producción.

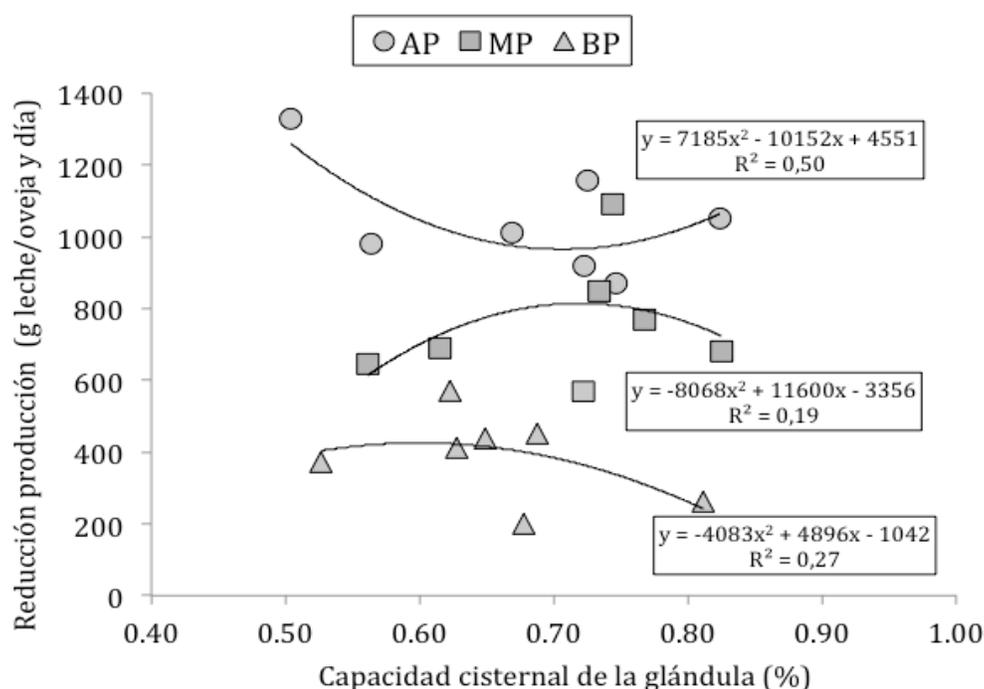


Figura 25 Relación entre la capacidad cisternal de la ubre (promedio de la capacidad de las dos glándulas) antes del cambio de frecuencia de ordeño y la reducción máxima registrada en la producción de leche en las 48 horas siguientes tras el cambio de frecuencia para el conjunto de animales experimentales (BP: baja producción; MP: media producción; AP: alta producción).

La proporción de la variación observada en la producción de leche explicada por las variaciones en el porcentaje de leche cisternal entre animales, dentro de cada grupo de producción, fue del 49, 19 y 27% para los grupos de alta, media y baja producción, respectivamente. La proporción explicada por el modelo fue únicamente significativa en el caso del grupo AP, donde la relación observada sugiere que la capacidad cisternal fue

limitante cuando presentó valores inferiores al 55%. A partir de ese valor, no parece existir relación entre la capacidad cisternal y la reducción en la producción de leche, tras el cambio de frecuencia de ordeño.

En este sentido, Marnet y Komara (2008) comprobaron, en cabras, que las variaciones en el porcentaje de volumen cisternal no explican las diferencias observadas entre animales en la adaptación a un ordeño al día y concluyeron que debían estar implicados otros mecanismos. Estos autores sugieren que la elasticidad de la glándula mamaria puede variar entre animales, modulando la relación entre el volumen alveolar y la presión intramamaria. En nuestro estudio no se midió la relación entre el volumen y la presión intramamaria y, por tanto, esta hipótesis no pudo ser comprobada.

En relación con la composición química de la leche, se asume, en general, que al aumentar la producción de ésta disminuye el contenido de extracto seco, proteína y grasa, siendo menos variable el contenido de lactosa (Oravcová *et al.*, 2007; Ochoa-Cordero *et al.*, 2002). Los resultados encontrados en nuestro estudio, sin embargo, ponen de manifiesto que no hubo una relación entre el nivel de producción de leche y su composición (ver Figura 26), encontrándose los valores dentro del rango señalado por otros autores para ovejas de raza assaf de similares características (Prieto *et al.*, 2013; Ramella, 2002).

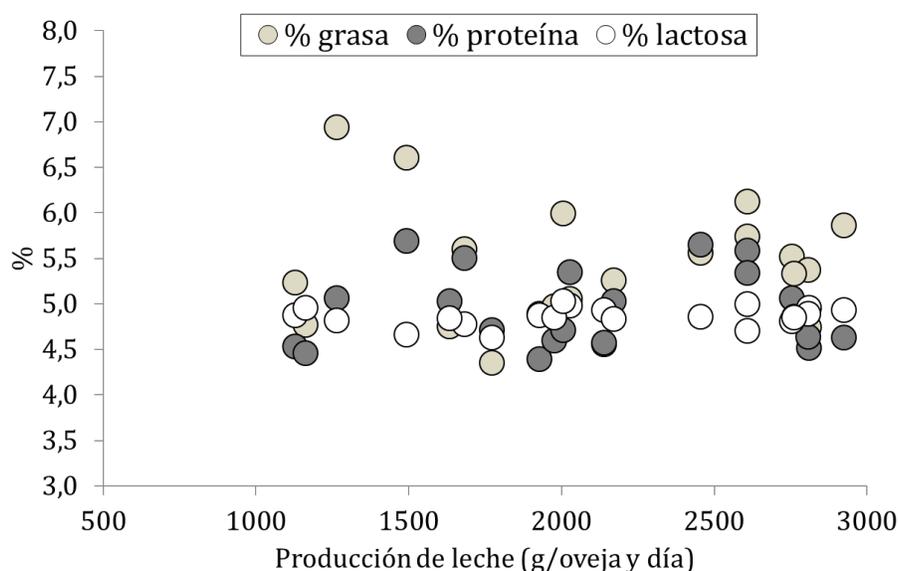


Figura 26 Relación entre la producción de leche (g/oveja y día; valor medio para las semanas 1,2,3 y 4) y su composición (% , valor medio ponderado para la producción de cada día) .

A corto plazo, el alargamiento del intervalo entre ordeños debilita las uniones estrechas (*tigh junctions, TJ*) entre los lactocitos, favoreciendo el intercambio entre leche y sangre (Ayadi *et al.*, 2009). En estas circunstancias, la concentración de lactosa suele disminuir en leche y aumentar en el plasma (Castillo *et al.*, 2008). Asimismo, la concentración de albúmina sérica suele incrementarse en la leche y de lactoalbúmina en el plasma (Castillo *et al.*, 2008; Stelwagen *et al.*, 2008).

Contrariamente a lo que cabría esperar, la concentración de lactosa en la leche no disminuyó, sino que aumentó en el periodo inmediatamente posterior (24 horas) al cambio de frecuencia de ordeño, si bien posteriormente disminuyó.

No existen muchos estudios publicados que recojan la variación en la composición de la leche en días sucesivos tras el cambio de la frecuencia de ordeño. La mayoría de los estudios realizados presentan valores medios semanales que, como se describirá posteriormente, coinciden con el efecto observado a medio plazo en el presente trabajo.

La reducción hallada en la producción de leche pone de manifiesto que la prolongación del intervalo entre ordeños desencadenó mecanismos a corto plazo. No podemos descartar que la acumulación de leche alterara las uniones celulares, pero la propia evolución en la producción en los días siguientes al cambio en la frecuencia de ordeño sugiere que en el día 29 la producción fue menor de lo que parece soportar la glándula. El hecho de que la producción de leche se incrementase en los sucesivos días hasta alcanzar un nuevo pico, concuerda con la hipótesis propuesta por Komara y Marnet (2009) en cuyo trabajo concluyen que los mecanismos fisiológicos que regulan la síntesis y secreción láctea durante el régimen de un ordeño al día podrían iniciarse antes de que la cisterna de la glándula mamaria esté a su capacidad máxima de llenado, aunque caben otras hipótesis, como se discutirá posteriormente.

En cualquier caso, esta reducción en la producción tan acusada podría haber determinado el incremento en la concentración de lactosa y de proteína. Aunque en el caso de la proteína debería estar asociada a un equilibrio entre el flujo de proteínas entre la sangre y la leche, ya que se pueden producir trasvases en ambas direcciones (Stelwagen y Singh, 2014; Stelwagen *et al.*, 2008)

Esta hipótesis de concentración de componentes, sin embargo, no podría aplicarse al contenido de grasa, ya que éste disminuyó en la leche. No obstante, otros estudios han

revelado que a corto plazo el contenido de grasa es el compuesto más afectado, reduciéndose de forma muy acusada el primer día tras la reducción del número de ordeños (Castillo *et al.*, 2009).

En este sentido, McKusick *et al.* (2002) observaron que la prolongación del intervalo entre ordeños de 12 a 24 horas disminuía el porcentaje de grasa en la leche cisternal y aumentaba en la leche residual. En el caso de la proteína, por el contrario, comprobaron un incremento de su porcentaje en la leche cisternal, permaneciendo relativamente constante en la leche alveolar.

Este distinto comportamiento de la grasa y de la proteína refleja una diferente capacidad de flujo desde el alveolo a la cisterna, de forma que la extracción de proteína podría ser menos dependiente de la eficiencia del proceso de eyección (McKusick *et al.*, 2002). Sobre este aspecto se volverá a incidir en el siguiente apartado.

6.2.2 Producción y composición de leche: efecto de la frecuencia de ordeño a medio plazo.

Tras la reducción de la frecuencia de ordeño se produjo una caída brusca en la producción de leche. Sin embargo, el nivel de producción se fue recuperando rápidamente, alcanzándose un nuevo pico de producción entre 8 y 13 días después. El incremento en la producción de leche tras la caída inicial, podría guardar relación con la capacidad de eyección, pues la oxitocina presenta un período de acción corto y es posible que al reducirse la frecuencia de ordeño y aumentar el porcentaje de leche acumulada en los alveolos, se requiera una mayor concentración de oxitocina que permita un vaciado completo del tejido alveolar. En lo que se tiene conocimiento de nuestra parte, no existen estudios que hayan evaluado este aspecto y que permitan descartar ésta hipótesis, si bien Negrão *et al.* (2001) observaron que al incrementarse la frecuencia de 1 a 2 ordeños al día disminuía la concentración máxima de oxitocina en plasma durante el reflejo de eyección. Estos resultados sugieren que existe una adaptación de la secreción de oxitocina asociada a la cantidad de leche existente en la glándula mamaria. Es posible que esta adaptación requiera un tiempo y, ello, explicaría la evolución de la producción de leche observada en nuestro estudio y, también, parte de los cambios encontrados en su composición química.

El nuevo pico de producción representó por término medio un $89\pm 1,4\%$ de la producción de leche respecto al día anterior al cambio de frecuencia de ordeño. Los cambios tan rápidos observados en la producción de leche sugieren que inicialmente estarían implicados cambios en la actividad celular.

Como puede apreciarse en la figura 27, el nuevo pico de producción alcanzado tras el cambio de frecuencia pudo ser estimado con una elevada exactitud ($R^2=0,94$) utilizando como variable independiente la producción de leche de los animales registrada el día anterior al cambio de frecuencia. Esta predicción no mejoró ($R^2=0,94$) cuando se añadió al modelo de predicción la proporción de leche cisternal, medida al inicio del ensayo, lo que concuerda con la ausencia de efecto de la capacidad cisternal sobre el efecto de la frecuencia de ordeño, observada también en la primera prueba experimental.

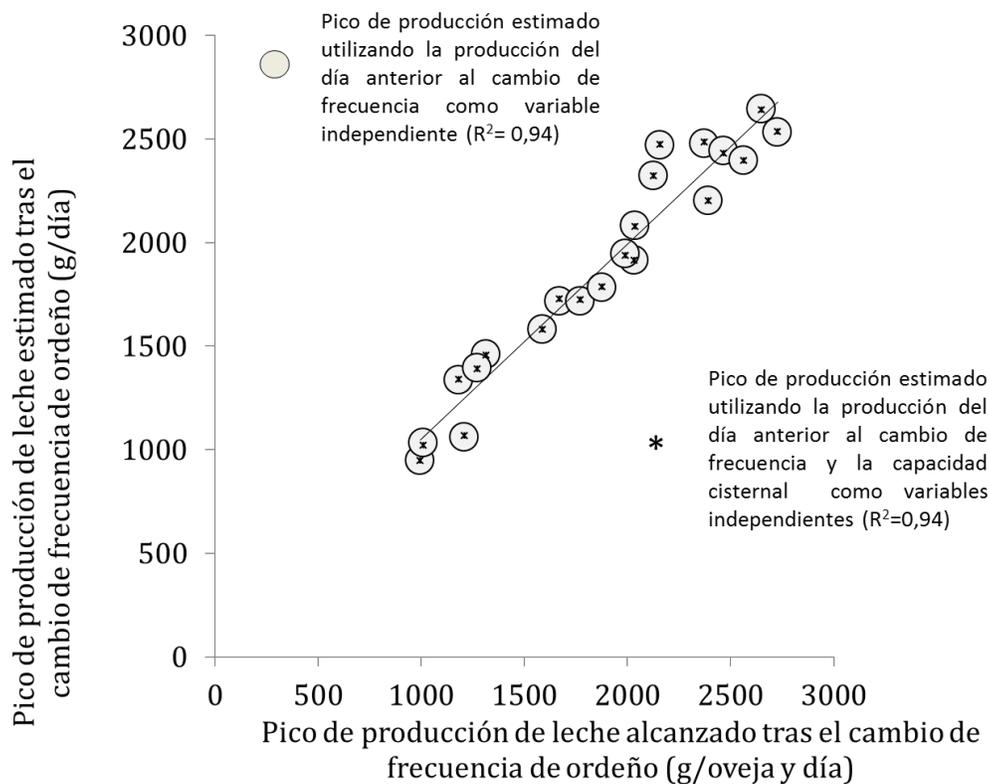


Figura 27 Relación entre los valores observados y los estimados con diferentes modelos predictivos (○ empleado la producción del día anterior al cambio de frecuencia como variable independiente; * empleando la producción del día anterior al cambio de frecuencia y la capacidad cisternal como variables independientes) del nuevo pico de producción alcanzado tras el cambio de frecuencia de ordeño.

No obstante, tras alcanzarse un nuevo pico en la producción, la persistencia también disminuyó en todos los grupos experimentales.

La reducción en la persistencia, como consecuencia de reducir el número de ordeños de 2 a 1 al día, ha sido observada por otros autores, tanto en ovejas (Stefanon et al., 2002), como en cabras (Li et al., 1999) y vacas (Phyn et al., 2014; Stelwagen et al., 2001).

Algunos trabajos postulan que, tras la reducción del número de ordeños, se produce un aumento de las tasas de proliferación y apoptosis, si bien el balance final es una reducción del número de células epiteliales, que podrían explicar la reducción en el índice de la persistencia (Bernier-Doddier et al., 2010; Phyn, 2006). No obstante, la disminución de la persistencia también podría ser consecuencia de una reducción en la actividad de los lactocitos. En este sentido, Chedly *et al.* (2013) concluyeron que la disminución de la producción de leche en cabras sometidas a un ordeño al día, se debe más a una disminución en la síntesis láctea. Esta conclusión se apoya en el hecho de que no encontraron diferencias en la abundancia de ARNm para proteínas proapoptóticas, como la Bax, en biopsias realizadas a las glándulas mamarias sometidas a las distintas frecuencias de ordeño. Por otra parte, en el otro estudio que compone la presente tesis doctoral, cabe mencionar que se observaron diferencias en la producción de leche entre glándulas, pero no en el número de células epiteliales por alveolo.

Es interesante resaltar que la variación individual en la persistencia de la lactación fue mayor tras el cambio de frecuencia de ordeño, de manera que la reducción en la producción de leche para el conjunto del período 2 respecto al período 1 osciló también ampliamente (ver figura 28), si bien fue mayor cuanto menor fue el nivel de producción del grupo experimental.

Esta mayor variabilidad no guardó relación con el tamaño cisternal, que presentó similar rango en los 3 grupos experimentales.

En cualquier caso, esta variabilidad está en concordancia con lo observado en las razas sarda (Nudda *et al.*, 2002; Flamant, 1981; Casu y Labussiere, 1972), lacaune (Labussière *et al.*, 1981; Partearroyo y Flamant, 1978), manchega (Rovai, 2001) y assaf (Prieto *et al.*, 2013; Ramella, 2002).

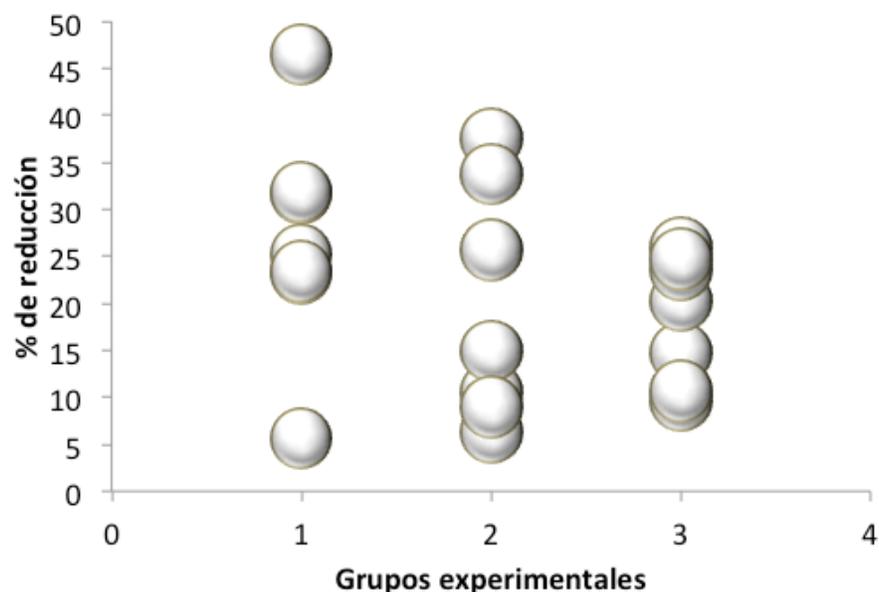


Figura 28 Porcentaje de reducción en la producción de leche tras el cambio de frecuencia de ordeño para cada uno de los animales en los diferentes grupos experimentales y para el conjunto del periodo (semanas 4 a 10).

Respecto a la composición de la leche, en concordancia con lo observado en la prueba experimental anterior, se observó una disminución en el porcentaje de lactosa y un aumento en el porcentaje de proteína. Similares resultados fueron obtenidos en ovejas de la raza assaf por Prieto *et al.* (2013).

El descenso en el contenido de lactosa, como se discutió anteriormente, se atribuye a su trasvase paracelular hacia la sangre, consecuencia del debilitamiento de las uniones estrechas entre lactocitos (*TJ*) (Stelwagen *et al.*, 1997; Coulon *et al.*, 2002; Bruckmaier *et al.*, 2004). Sin embargo, en el presente experimento no se observaron diferencias en el contenido de lactosa en el plasma.

Cabe indicar, no obstante, que otros autores únicamente observaron un incremento en la concentración plasmática de lactosa el primer día tras el cambio de la frecuencia de ordeño, desapareciendo éstas posteriormente (Chedly *et al.*, 2013; Lakic, 2011). En el presente estudio, la concentración plasmática de lactosa se determinó los días 28 (un día antes del cambio), 30, 32, 35, 49 y 70, lo que podría justificar la ausencia de diferencias. No obstante, es oportuno mencionar que en la primera prueba se observó una reducción del hematocrito tras el cambio de la frecuencia de ordeño. De haberse presentado esta situación en la segunda prueba, un incremento del contenido de lactosa podría haber sido compensado por un aumento en el volumen sanguíneo.

En lo que respecta al contenido de proteína, aunque algunas proteínas lácteas pueden pasar a la sangre (e.g. lactoalbúminas), el flujo es inferior a la reducción en la producción de leche y además se incrementa la concentración en leche de proteínas séricas, como la albúmina. En el presente estudio no se determinó el contenido de esta última en leche, pero cabe indicar que su contenido en plasma, aunque ligeramente, aumentó a lo largo de la lactación. Este efecto, no obstante, podría estar relacionado con una mayor síntesis que por un trasvase paracelular, como sugiere la menor concentración de urea en plasma al final de la prueba experimental.

El efecto a medio plazo de la reducción de la frecuencia de ordeño sobre el contenido de grasa es más controvertido. Así, en la literatura, se pueden encontrar estudios que señalan descensos (Castillo *et al.*, 2008; Negrão *et al.*, 2001; Morag, 1968), aumentos (Nudda *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2002; Lacy-Hulbert *et al.*, 1999) o ausencia de efecto (Prieto *et al.*, 2013; Papachristoforou *et al.*, 1982) al reducir la frecuencia de 2 a 1 ordeño al día. Incluso se han observado resultados distintos en las dos pruebas que se incluyen en este trabajo de investigación, no existiendo efectos en la primera prueba y aumentando el porcentaje de grasa en la leche tras reducirse la frecuencia de ordeño en la presente prueba.

6.2.3 Salud de la ubre, concentración plasmática de lactosa y perfil metabólico de las ovejas.

6.2.3.1 Recuento de células somáticas y concentración plasmática de lactosa.

En concordancia con lo observado por otros autores en vacas (Stelwagen *et al.*, 2013; Clark *et al.*, 2006; O'Brien *et al.*, 2005; Kelly *et al.*, 1998) y en ovejas (Castillo *et al.*, 2008; Hervás *et al.*, 2006; McKusick *et al.*, 2002; Nudda *et al.*, 2002), la reducción en la frecuencia de ordeño incrementó el recuento de células somáticas.

Este aumento fue más rápido en los animales de mayor producción, pero en el conjunto del período tras el cambio de la frecuencia de ordeño, el RCS no estuvo asociado con el nivel de producción, ya que no hubo diferencia entre el nivel más alto y el más bajo de producción.

Llama la atención la disminución en el RCS el día 29, tras el cambio de frecuencia de ordeño. La mayor parte de las células somáticas son células de la serie blanca, fundamentalmente polimorfonucleares, que emigran hacia la glándula mamaria cuando es detectado un proceso inflamatorio (Stelwagen y Lacy-Hulbert, 1996). Estas células migran a través de los espacios intercelulares, que además es conocido que se debilitan como consecuencia de la estasis láctea. Estas células de defensa se acumulan en mayor medida en el lumen alveolar (Kelly *et al.*, 1998; Sordillo *et al.*, 1997) y la evolución del RCS en el

corto plazo, por tanto, parece corroborar la hipótesis de la necesidad de un período de adaptación del proceso de eyección para lograr un vaciado eficaz de la leche alveolar.

La concentración plasmática de lactosa se utiliza como parámetro indicativo del debilitamiento de las uniones intercelulares estrechas (*TJ*), que se traduce en un aumento de la permeabilidad y de la concentración plasmática y una disminución del contenido de lactosa en leche (Stelwagen y Singh, 2014; Chedly *et al.*, 2012, 2011; Hernandez *et al.*, 2011; Chedly *et al.*, 2010; Castillo *et al.*, 2008; Stelwagen, 2001). En el presente estudio se observó una reducción en el contenido de lactosa en leche tanto a corto como a medio plazo. Sin embargo, no se encontraron diferencias en la concentración plasmática de lactosa. Como se mencionó en apartados anteriores, otros autores han observado un incremento en la concentración plasmática a las 24 horas, volviendo posteriormente a valores similares a los registrados antes de la reducción del número de ordeños (Chedly *et al.*, 2013; Lakic, 2011). Este fenómeno podría haberse producido en el presente estudio, ya que no se registró la concentración del día posterior al cambio de la frecuencia de ordeño y similares resultados fueron encontrados por Koutsouli *et al.* (2017).

Algunos autores han señalado que el efecto de la frecuencia de ordeño sobre el RCS depende en cierta medida de los valores de este parámetro en el momento de cambiar la frecuencia de ordeño, puesto que el incremento es mayor en las glándulas con un elevado RCS previo a la reducción de la frecuencia de ordeño (Stelwagen *et al.*, 2013; Kamote *et al.*, 1994).

En nuestro trabajo, sin embargo, no se observaron coeficientes de correlación elevados entre el RCS medido en el día 28 y el correspondiente a los días posteriores al cambio de la frecuencia de ordeño (ver Figura 29). El RCS previo al cambio de frecuencia explica muy un poco de la variación observada, menos del 4% en los días 29 (3,6%), 30 (2,6%) y 32 (1,2%) y menos del 35% en los días posteriores.

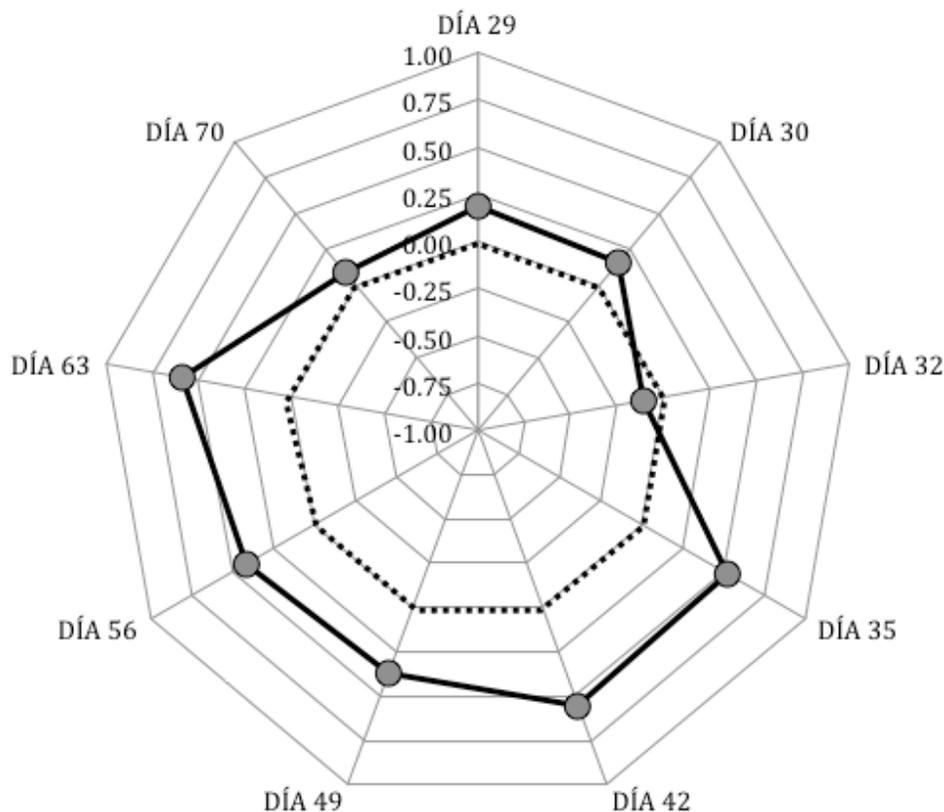


Figura 29 Coeficientes de correlación entre el recuento de células somáticas registrado en las muestras de leche recogidas antes del cambio de frecuencia de ordeño (día 28) y el registrado posteriormente (días 29, 30, 32, 35, 42, 49, 56, 63 y 70).

En cualquier caso, los valores del RCS a lo largo de todo el experimento se encontraron dentro del rango de valores de referencia para ubres sanas o ausencia de mamitis en la especie ovina (Gonzalo *et al.*, 2004, 2002, 1993).

6.2.3.2 Perfil metabólico.

El estudio del metabolismo mediante la identificación de metabolitos producidos en los diferentes procesos del organismo ha sido utilizado en la práctica veterinaria de los rumiantes lecheros, principalmente, para predecir y prevenir problemas metabólicos en el período periparto y para diagnosticar enfermedades relacionadas con el estado nutricional de los animales (Osorio *et al.*, 2014; Bertoni *et al.*, 2013; Trevisi *et al.*, 2010; Loiselle *et al.*, 2009; Bionaz *et al.*, 2007; Balikci *et al.*, 2007; Andersen *et al.*, 2004).

El desarrollo de la capacidad analítica ha vuelto a despertar el interés de estudiar los cambios que ocurren durante las distintas etapas productivas de los animales e intentar

describir los mecanismos metabólicos que ocurren durante la adaptación de los animales frente a nuevas estrategias de manejo con diferentes objetivos (Grala *et al.*, 2014; Kay *et al.*, 2014; Patton *et al.*, 2006).

La reducción de la frecuencia de ordeño se ha convertido en una estrategia versátil, aplicada con diferentes objetivos. Así, por ejemplo, en animales con un nivel productivo muy elevado se ha evaluado con la finalidad de mitigar los efectos sobre la salud en períodos de balance energético negativo (Grala *et al.*, 2014); esta mejoría en la salud metabólica, incluso, puede optimizar los parámetros reproductivos de éstas vacas, como observaron Patton *et al.* (2006).

La reducción de la frecuencia de ordeño, especialmente en las especies ovina y caprina, se ha estudiado también con el objetivo de reducir la carga de trabajo y mejorar las condiciones de vida de los ganaderos. La realización de 1 ordeño al día es también una estrategia de aplicación en sistemas de pastoreo, en la que resulta muy laborioso conducir a los animales al ordeño.

En el caso de la especie ovina, existen numerosos estudios sobre el impacto de la reducción de la frecuencia de ordeño, pero casi todos ellos se han centrado en evaluar los efectos de este manejo en la producción y composición de la leche, la sanidad de la glándula mamaria, así como la dinámica celular de la ubre (Prieto *et al.*, 2013; Castillo *et al.*, 2008; Negrão *et al.*, 2001; Nudda *et al.*, 2002; Ramella, 2002; McKusick *et al.*, 2002; Labussière *et al.*, 1974). Solo recientemente ha sido publicado un trabajo que estudia marcadores metabólicos, como la concentración de ácidos grasos no esterificados (NEFA), β -hidroxibutirato (β -HB), glucosa (GLU), glicerol (GLY), triglicéridos (TGL), insulina (INS), leptina (LEP) y triyodotironina (T3) para evaluar el estatus nutricional de las ovejas sometidas a un ordeño al día (González-García *et al.*, 2015).

En el presente trabajo experimental se decidió estudiar con mayor detalle el efecto de la reducción de la frecuencia de ordeño sobre el perfil metabólico, midiendo no solo parámetros relacionados con el metabolismo energético y protéico, sino también marcadores de la respuesta inflamatoria, la capacidad antioxidante y el funcionamiento hepático.

6.2.3.2.1 Evaluación de la respuesta inflamatoria.

Se acepta, en general, que el contenido plasmático de las proteínas de fase aguda son útiles para evaluar procesos inflamatorios sistémicos inespecíficos (Subiela *et al.*,

2001). Entre las proteínas de fase aguda positiva (+APP), es decir, aquellas cuya concentración plasmática aumenta durante un corto período de tiempo cuando existe una respuesta inflamatoria sistémica, se encuentran la haptoglobina y la ceruloplasmina (Loor *et al.*, 2013; Bertoni y Trevisi, 2013; Bionaz *et al.*, 2007). Entre las proteínas de fase aguda negativa (-APP) se encuentran la albúmina, las lipoproteínas y la paraoxonasa, entre otras (Bertoni y Trevisi, 2013).

En el presente estudio no se observó a corto plazo (48 horas) un incremento en las (+)APP medidas (haptoglobina y ceruloplasmina), ni descensos en las (-)APP (albúmina, colesterol, paraoxonasa).

A medio plazo, sin embargo, se observó un incremento en la albúmina y en la paraoxonasa, cuyos valores en las muestras recogidas el día 70 fueron ligeramente superiores a los registrados el día 28, antes del cambio de la frecuencia de ordeño.

La respuesta de la fase aguda se produce como consecuencia de una alteración de la hemostasia causada por diferentes factores (*e.g.* infecciones, traumatismos, etc.)

El incremento en el RCS y la disminución de lactosa en la leche posiblemente son indicadores de un proceso de respuesta inflamatoria local. De hecho, en la primera prueba de este trabajo de investigación, se observó que la extensión del intervalo de ordeño de 12 a 24 horas aumentaba el RCS y la prevalencia de infiltrados inflamatorios en la glándula mamaria.

La ausencia de respuesta en las (+)APP observada en el presente estudio es reflejo de la ausencia de procesos infecciosos o de traumatismos severos asociados al cambio de la frecuencia de ordeño y ello explicaría el incremento moderado encontrado en el RCS.

Algunos autores señalan que la concentración plasmática de haptoglobina y de ceruloplasmina disminuye, con mayor intensidad en la primera, a lo largo de la lactación (Bertoni y Trevisi, 2013). En el caso de la haptoglobina, en animales sanos el rango puede oscilar desde 0,3-0,45 g/L al inicio de la lactación a valores menores a 0,2 g/L el día 70 de la lactación. El rango de variación de la ceruloplasmina es menor, oscilando entre 4 mmol/L y 3 mmol/L (Bertoni y Trevisi, 2013).

En el presente estudio los valores registrados se encontraron dentro del rango de valores señalados anteriormente. Sin embargo, sus concentraciones no disminuyeron a lo largo de la lactación, en ninguno de los grupos experimentales. Este diferente

comportamiento, tal vez pudiera ser debido a que, en el presente trabajo, los animales al inicio de la prueba experimental habían ya superado el pico de lactación.

La concentración plasmática de colesterol se considera un indicador de lipoproteínas, de origen intestinal y hepático, y su concentración, al contrario de lo señalado para las (+)APP, suele aumentar de manera aguda tras el inicio de la lactación, permaneciendo posteriormente relativamente constante, al menos, hasta el 4° mes de lactación (Bertoni *et al.*, 2010), lo que estaría en concordancia con los resultados hallados en nuestro estudio.

La albúmina es la principal (-)APP de la inflamación. La síntesis de (+)APP incrementa las necesidades de proteína y se produce una disminución de la síntesis de otras proteínas, como la albúmina (Bertoni y Trevisi, 2013). Por tanto, la ausencia de respuesta en las (-)APP estaría en concordancia con la falta de respuesta en la concentración de las (+)APP.

En el caso de la frecuencia de ordeño, además, el descenso en la concentración plasmática de albúmina podría exacerbarse como consecuencia de un trasvase paracelular hacia la leche (Stelwagen *et al.*, 2013). El hecho de que la concentración plasmática de esta proteína no haya disminuido sugiere, por un lado, que la magnitud del trasvase, de existir, sería pequeño y por otro, que el daño en las uniones entre las células epiteliales de la glándula mamaria sería limitado.

6.2.3.2.2 Capacidad antioxidante y función hepática.

En animales sanos los mecanismos antioxidantes regulan la concentración de compuestos pro-oxidantes, generados en las reacciones metabólicas del organismo. Estos compuestos tienen un papel importante dentro del sistema inmunológico, pero en concentraciones excesivas (estrés oxidativo) causan daño celular y tisular, favoreciendo el desarrollo de diferentes patologías (Holmström y Finkel, 2014).

Los animales con elevadas producciones están sometidos a un importante estrés metabólico, estando comprometido su balance antioxidante (Celi, 2011; Miller *et al.*, 1993). Un estrés oxidativo continuo puede provocar un estado de inflamación crónica, sobre cuya base se pueden asentar distintas patologías, pero también, problemas de eficiencia productiva y de infertilidad (Sordillo *et al.*, 2009; Lykkesfeldt *et al.*, 2007).

En animales de ordeño, al estrés oxidativo asociado a la propia producción láctea, se puede sumar una respuesta inflamatoria en la glándula mamaria consecuencia de la

extensión del intervalo entre ordeños, si se superan las 16 horas, como sucede en el presente experimento.

La ausencia de respuesta en la concentración plasmática de proteínas de la fase aguda sugiere que la reducción del número de ordeños de 2 a 1 no desencadenó cambios sistémicos. Sin embargo, en el día 30 (dos días tras la reducción de la frecuencia de ordeño) se observó una reducción tanto de los metabolitos reactivos de oxígeno (ROM) como de la capacidad antioxidante del plasma (FRAP). Posteriormente, se recuperaron las concentraciones de ambos parámetros, presentando valores similares a los registrados antes de la reducción del número de ordeños diarios.

Esta reducción fue independiente del nivel de producción de los animales y tal vez guarde relación con el descenso observado en la producción de leche en todos los grupos, que reduciría la actividad metabólica y, por ende, la producción de radicales (Sohal, 1996).

La ausencia de diferencias entre grupos experimentales en la concentración de especies reactivas al oxígeno sugiere que los animales mantuvieron cierto equilibrio en el estado oxidativo, a pesar de las diferencias en el metabolismo que tendrían los grupos experimentales.

La paraoxonasa se incluye entre las (-)APP, pero también forma parte del sistema antioxidante del organismo, ya que se liga a las lipoproteínas y parece que las protege de la oxidación (Bertoni y Trevisi, 2013). Por tanto, en los primeros días tras el cambio de la frecuencia de ordeño, la ausencia de variación en su contenido estaría, en concordancia con la evolución de la concentración plasmática de colesterol.

La menor concentración de esta enzima en las muestras recogidas el último día de la prueba experimental no guarda relación con la evolución observada ni con las otras proteínas relacionadas con la fase aguda de la respuesta inflamatoria, ni con los parámetros relacionados con el estado antioxidante. Por otra parte, la paraoxonasa es sintetizada fundamentalmente en el hígado y cabe indicar que la concentración plasmática de AST-GOT, no varió entre grupos ni entre días, encontrándose los valores dentro del campo señalado en la literatura para animales sanos (Minuti *et al.*, 2014).

6.2.3.2.3 Metabolismo energético y proteico.

Diferentes estudios señalan que la concentración plasmática de ácidos grasos no esterificados guarda estrecha relación con el balance energético y la producción de leche (Leroy *et al.*, 2008; Butler *et al.*, 2003; Beam y Butler, 1999; Hart *et al.*, 1985). En

situaciones de balance energético negativo, los animales movilizan sus reservas corporales de grasa para cubrir las necesidades que requiere la producción de leche y como consecuencia incrementan los niveles plasmáticos de NEFA (Leroy *et al.*, 2008; Butler *et al.*, 2003; Hart 1985).

En nuestro estudio, contrariamente a lo esperado, se observó un incremento en la concentración de NEFA el día 30, y posteriormente un descenso muy acusado, recuperándose la concentración posteriormente.

El incremento observado en el día 30 a pesar de la brusca caída en la producción de leche, podría ser debido a que disminuyó la captación de NEFA por la glándula mamaria, al ser menor la síntesis de grasa (Delamaire y Guinard-Flament, 2006).

El descenso posterior, en los días 32 y 35, en la concentración podría ser reflejo de un descenso en la movilización de grasa unido a un incremento en la captación por la glándula mamaria, como consecuencia de la recuperación parcial de la producción de leche y de la síntesis de grasa.

No obstante, una vez alcanzado un nuevo pico de producción, que se ha estimado entre los días 36 y 41, la producción de leche comenzó a descender y ello podría explicar el incremento ligero en el contenido plasmático de NEFA. Cabe señalar que en este experimento se estima que los animales estuvieron en balance positivo de energía, por ello, no cabría esperar variaciones cuantitativamente elevadas en la concentración de NEFA (Caldeira *et al.*, 2007).

La concentración de urea y de β -hidroxibutirato también aumentaron tras el cambio. En el caso de la urea posteriormente presentó fluctuaciones irregulares, con valores superiores o semejantes a los registrados antes del cambio de la frecuencia de ordeño, excepto para el último día. Sin embargo, en el caso del β -hidroxibutirato, el incremento en la concentración de éste, se mantuvo en el resto del período experimental.

El incremento en la concentración de urea en el día 30 (2 días después del cambio de frecuencia de ordeño) probablemente obedezca a la misma causa señalada para los NEFA, ya que la producción de proteína láctea también disminuyó y, por tanto, se podría haber producido una reducción en la captación de aminoácidos por la glándula mamaria (Kim y Wu, 2009), que serían desaminados en el hígado, incrementándose la concentración de urea.

Las fluctuaciones posteriores son difíciles de interpretar, ya que la urea puede proceder tanto de degradación microbiana de la proteína en el rumen, como del metabolismo de los aminoácidos en los tejidos (Nolan *et al.*, 1972), variando las necesidades fundamentalmente en función de la producción de leche. Por tanto, pequeñas oscilaciones en cualquiera de estas variables podrían determinar las fluctuaciones observadas. No obstante, la reducción observada el día 70 podría reflejar un incremento en la síntesis de proteína, que estaría en concordancia con el incremento observado en la concentración de albúmina.

Diferentes estudios señalan que la captación de glucosa por la glándula mamaria disminuye al extenderse el intervalo entre ordeños de 12 a 24 horas (Delamaire y Guinard-Flament, 2006; Davis *et al.*, 1978; Hartmann *et al.*, 1973, Linzell, 1960), lo que explicaría el incremento en la concentración plasmática al reducirse la frecuencia de ordeño señalada en diferentes trabajos (González-García *et al.*, 2015; Andersen *et al.*, 2004).

En el presente trabajo, sin embargo, la concentración plasmática de glucosa no se incrementó tras el cambio de frecuencia de ordeño, en ninguno de los grupos experimentales, a pesar de que se redujo la producción de leche y de lactosa.

La ausencia de respuesta en la concentración de glucosa sugiere una rápida reducción en la producción, fundamentalmente, en el hígado. Una hipótesis plausible que podría explicar estos resultados es que el incremento observado en los NEFA, en el momento del cambio de frecuencia de ordeño, fuese asociado a un incremento en la β -oxidación. Esto podría ir asociado a una reducción de la disponibilidad de oxalacetato para la gluconeogénesis (Overton *et al.*, 1999; Brockman *et al.*, 1975, Katz *et al.*, 1969), incrementándose la formación de cuerpos cetónicos, como el β -hidroxibutirato. Por otra parte, la menor captación de glucosa para la síntesis de lactosa sería compensada por una menor gluconeogénesis, lo que evitaría cambios en la concentración plasmática de glucosa.

De hecho, el día 30, además de incrementar la concentración plasmática de NEFA, también lo hizo la de β -hidroxibutirato. Posteriormente, aunque disminuyó la concentración de NEFA, la concentración de β -hidroxibutirato se mantuvo elevada, lo que podría ser debido a una disminución en la captación por la glándula mamaria, asociado a una menor síntesis de ácidos grasos de cadena media y corta, tal y como se observó en la primera prueba experimental. Por otra parte, algunos estudios también señalan que al reducirse la frecuencia de ordeño se incrementa la concentración de insulina (González-García *et al.*, 2015; Andersen *et al.*, 2002; Prosser y Davis, 1992), y la insulina podría reducir también la

gluconeogénesis hepática (Aschenbach *et al.*, 2010; Brockman *et al.*, 1990; Brockman, 1978).

Estos resultados sugieren que la reducción de la frecuencia de ordeño podría modificar el metabolismo energético y lipídico, reduciendo la gluconeogénesis y favoreciendo la formación de cuerpos cetónicos.

7 Conclusiones.

Conclusiones.

Primera. La administración de un suplemento de vitamina E (1000 UI/día) y selenio (400 mg/día) a ovejas en lactación incrementa la concentración plasmática de vitamina E y la capacidad antioxidante del plasma y reduce el recuento de glóbulos blancos y de granulocitos, pero no influye en la concentración plasmática de selenio.

Segunda. La administración a ovejas en lactación de un suplemento de vitamina E y selenio, en las condiciones del presente estudio, no influye ni en la ingestión ni en la producción de leche ni en su contenido de extracto seco, proteína, grasa y lactosa, pero incrementa la estabilidad oxidativa de la grasa y modifica el perfil de ácidos grasos, incrementando la proporción de ácido oleico y disminuyendo la proporción de diferentes ácidos grasos saturados de menos de 16 átomos de carbono. Los efectos mencionados son independientes de la frecuencia de ordeño aplicada (2 vs 1 ordeño al día).

Tercera. La reducción del número de ordeños diarios (de 2 a 1 al día), disminuye la producción diaria de leche, aunque existen diferencias en el efecto a corto y medio plazo. Tras una intensa reducción a corto plazo, se produce una recuperación de la producción, alcanzándose un nuevo pico de producción cuyo valor es menor pero proporcional a la producción de leche que presentan los animales previamente al cambio de frecuencia. La reducción en la producción de leche no parece guardar relación con la capacidad cisternal de la glándula y tampoco es modulada por la administración de un suplemento de vitamina E y de selenio.

Cuarta. La reducción de la frecuencia de ordeño (de 2 a 1 ordeño al día) disminuye la persistencia de la producción, siendo este efecto independiente del nivel de producción de los animales.

Quinta. A corto plazo (primeras 48 horas), la reducción de la frecuencia de ordeño (de 2 a 1 ordeño al día) disminuye el contenido de grasa de la leche pero aumenta los contenidos de lactosa y de proteína. A medio plazo, disminuye el contenido de lactosa y aumenta el de proteína, siendo variable el efecto sobre el contenido de grasa. Los efectos señalados a corto y medio plazo son independientes del nivel de producción de los animales previamente al cambio de frecuencia. En las condiciones del presente estudio, la administración de un suplemento de vitamina E y selenio tampoco parece modular el efecto a medio plazo de la frecuencia de ordeño sobre la composición de la leche.

Sexta. Aunque el efecto no es cuantitativamente importante, la reducción de la frecuencia de ordeño (de 2 a 1 ordeño al día) modifica el perfil de ácidos grasos de la leche, aumentando la proporción del total de ácidos grasos monoinsaturados y disminuyendo la de ácidos grasos omega 3. Las proporciones representadas por el conjunto de ácidos grasos saturados y poliinsaturados no son modificadas por la frecuencia de ordeño, pero en ambos grupos se producen variaciones opuestas en ácidos grasos específicos. Estos cambios en el perfil de ácidos grasos parecen guardar relación con cambios a nivel sistémico en el metabolismo lipídico y energético.

Séptima. La reducción de la frecuencia de ordeño (de 2 a 1 ordeño al día) causa un aumento en el recuento de células somáticas en la leche, compatible tanto con una mayor prevalencia de infiltrados inflamatorios en la glándula como con una mayor intensidad de los mismos.

Octava. El efecto de la frecuencia de ordeño sobre el recuento de células somáticas varía con el nivel de producción de los animales, produciéndose de forma más rápida en los animales de elevada producción de leche. Sin embargo, a medio plazo no se observa una relación lineal entre recuento de células somáticas en la leche y el nivel de producción de los animales.

Novena. La administración diaria de un suplemento vitamina E y selenio, a ovejas en lactación, no modifica el efecto de la reducción de la frecuencia de ordeño (de 2 a 1 ordeño al día) ni sobre el recuento de células somáticas en la leche ni sobre la prevalencia de infiltrados inflamatorios en la glándula.

Décima. El perfil metabólico de los animales, que fue evaluado mediante la determinación de marcadores plasmáticos de la respuesta inflamatoria de fase aguda, del estrés oxidativo, de la función hepática y del metabolismo energético y proteico, indica que la reducción de la frecuencia de ordeño podría modificar el metabolismo energético y lipídico, reduciendo la gluconeogénesis y favoreciendo la formación transitoria de cuerpos cetónicos, evidenciando que la modificación de la frecuencia de ordeño puede provocar la activación de mecanismos de adaptación a nivel sistémico.

Conclusioni.

Prima. La somministrazione di un supplemento di vitamina E (1000 UI/giorno) e selenio (400 mg/giorno) a pecore in lattazione aumenta la concentrazione plasmatica di vitamina E e la capacità antiossidante del plasma e diminuisce il numero di globuli bianchi e granulociti, senza influire sulla concentrazione plasmatica di selenio.

Seconda. La somministrazione a pecore in lattazione di un supplemento di vitamina E e selenio, alle condizioni del presente studio, non influisce sulla capacità di ingestione, né sulla produzione di latte o nel suo contenuto di estratto secco, proteine, grasso, lattosio, ma aumenta la stabilità ossidativa del grasso e modifica il profilo degli acidi grassi, aumentando la proporzione di acido oleico e diminuendo la proporzione di alcuni acidi grassi saturi con meno di 16 atomi di carbonio. Tali effetti risultano indipendenti dalla frequenza di mungitura applicata (2 vs 1 mungitura al giorno).

Terza. La riduzione del numero di mungiture giornaliere (da 2 a 1) diminuisce la produzione giornaliera di latte, sebbene esistano differenze sull'effetto a breve e medio termine. Dopo una intensa riduzione a breve termine, si produce un recupero della produzione, raggiungendo un nuovo picco di produzione il cui valore è minore, seppur proporzionale, alla produzione di latte che si registra negli animali prima del cambio di frequenza. Non sembra esserci relazione fra la riduzione della produzione di latte e la capacità cisternale della ghiandola, né la stessa produzione risulta influenzata dalla somministrazione di un supplemento di vitamina E e selenio.

Quarta. La riduzione della frequenza di mungitura (da 2 a 1 mungitura al giorno) diminuisce la persistenza della produzione, indipendentemente dal livello di produzione dei singoli animali.

Quinta. A breve termine (prime 48 ore), la riduzione della frequenza di mungitura (da 2 a 1 mungitura al giorno) diminuisce il contenuto di grasso del latte, ma aumenta il contenuto di lattosio e proteine. A medio termine, diminuisce il contenuto di lattosio e aumenta quello delle proteine, con effetti variabili sul contenuto di grasso. Gli effetti descritti a breve e medio termine sono indipendenti dal livello di produzione degli animali antecedente al cambio di frequenza. Nelle condizioni del presente studio, inoltre, la somministrazione di un supplemento di vitamina E e selenio non sembra influenzare l'effetto nel medio periodo della frequenza di mungitura sulla composizione del latte.

Sesta. Sebbene l'effetto non risulti particolarmente importante, la riduzione della frequenza di mungitura (da 2 a 1 mungitura al giorno) modifica il profilo degli acidi grassi del latte, aumentando la proporzione totale di acidi grassi monoinsaturi e diminuendo quella degli acidi grassi omega 3. Le proporzioni rappresentate dall'insieme di acidi grassi saturi e poliinsaturi non vengono modificate dalla frequenza di mungitura, sebbene in entrambi i gruppi si osservino variazioni opposte in specifici acidi grassi. Questi cambi nel profilo degli acidi grassi sembrerebbero collegati ai cambi a livelli sistemico nel metabolismo lipidico ed energetico.

Settima. La riduzione della frequenza di mungitura (da 2 a 1 mungitura al giorno) provoca un aumento nel numero di cellule somatiche nel latte, compatibile sia con una maggiore prevalenza di infiltrati infiammatori nella ghiandola, sia con una maggiore intensità degli stessi.

Ottava. L'effetto della frequenza di mungitura sul numero di cellule somatiche varia con il livello di produzione degli animali e si produce più rapidamente nei soggetti ad alta produzione di latte. Ciò nonostante, a medio termine non si osserva una relazione lineare fra il numero di cellule somatiche del latte e il livello di produzione degli animali.

Nona. La somministrazione giornaliera di un supplemento di vitamina E e selenio a pecore in lattazione non modifica l'effetto della riduzione di frequenza della mungitura (da 2 a 1 mungitura al giorno) né sul numero di cellule somatiche nel latte, né sulla prevalenza di infiltrati infiammatori nella ghiandola.

Decima. Il profilo metabolico degli animali, valutato attraverso la determinazione di marcatori plasmatici della risposta infiammatoria di fase acuta, dello stress ossidativo, della funzione epatica e del metabolismo energetico e proteico, indica che la riduzione della frequenza di mungitura potrebbe modificare il metabolismo energetico e lipidico, riducendo la gluconeogenesi e favorendo la formazione transitoria di corpi chetonici. Ciò evidenzia come la modifica della frequenza di mungitura può provocare l'attivazione di meccanismi di adattamento a livello sistemico.

Conclusions.

First. Vitamin E supplementation (1000UI/day) and selenium (400mg/day) to lactating ewes increases vitamin E plasma concentration and plasma antioxidant capacity and reduces white cell count and granulocytes, however doesn't affect selenium plasma concentration.

Second. Vitamin E and selenium supplementation to lactating ewes, in this study conditions, doesn't affect ingestion, milk production or even milk solids, like protein, fat and lactose, however increases fat oxidative stability and modifies fatty acids profile, increasing oleic acid proportion and decreasing the proportion of different saturated fatty acid with less than 16 carbon atoms. These properties mentioned above are independent to how often milking is done (2 vs 1 milking per day).

Third. Milking frequency reduction (from 2 to 1 per day), decreases diary milk production, although there are some short to medium term effects differences. After an intense short-term reduction, there is a production recovery, reaching a new production peak whose value is smaller however proportional to the milk production that animals had before the milking frequency modification. Milk production reduction doesn't seem to have a relation to the cisternal gland capacity and neither is modulated by vitamin E and selenium supplementation.

Forth. Reducing milking frequency (from 2 to 1 per day) decreases production persistency, being this effect independent to animal production level.

Fifth. In the short term (first 48hours) milking frequency reduction (from 2 to 1 milking per day) decreases milk's fat content although increases lactose and protein. In the medium term, it decreases lactose content and increases protein and variable milk fat content effect. The short and medium term effects mentioned above are independent to the animals' milk production previously to the milking frequency change. In this study conditions, vitamin E and selenium supplementation does not seem to modulate the medium term effects of milking frequency upon milks composition.

Sixth. While the effect it's not quantitatively important, milking frequency reduction (from 2 to 1 milking per day) modifies milk fatty acid profile, increasing monounsaturated fatty acid proportion and decreasing omega-3 fatty acid. Milking frequency does not modify the proportion represented by grouping saturated and polyunsaturated fatty acids, however both

groups produce opposite variations in specific fatty acids. These changes in the fatty acid profile seem to have a relation to systemic changes to the lipid and energy metabolism.

Seventh. Milking frequency reduction (from 2 to 1 per day) induces an increase in the milk somatic cell count, compatible with a higher prevalence and intensity of inflammatory infiltrates in the mammary gland.

Eighth. Milking frequency effects upon somatic cell count varies with the animal milk production level, occurring quicker in higher yielding animals. However, in the medium term it doesn't seem to have a linear relation between milk somatic cell count and animals' production.

Ninth. Dairy supplementation of vitamin E and selenium to milking ewes, doesn't modify the effect of milking frequency reduction (from 2 to 1 milking per day) neither on milk somatic cell count nor on the prevalence of inflammatory infiltrates in the mammary gland.

Tenth. Metabolic profiles, which have been evaluated through analysis of acute phase protein plasmatic markers, oxidative stress, hepatic function and protein and energy metabolism, reveals that reducing milking frequency could modify lipid and energy metabolism, decreasing gluconeogenesis and favouring transient ketone bodies formation, highlighting that modifying milking frequency could lead to the activation of an adaptation mechanism at a systemic level.

8 Resumen.

Resumen.

Establecer una estrategia basada en realizar un solo ordeño al día permite reducir el tiempo dedicado a esta actividad, contribuyendo a mejorar la calidad de vida del ganadero y su familia. Por otra parte, disponer de tiempo para otras actividades podría también contribuir a incrementar la rentabilidad de la explotación, a través de la diversificación de la actividad. Sin embargo, la reducción subsiguiente en la producción de leche al realizar un ordeño al día debe ser cuidadosamente cuantificada, ya que incremento del intervalo de tiempo entre ordeños induce cambios morfológicos y fisiológicos que pueden causar el inicio de la involución de la glándula mamaria.

Los estudios disponibles en la actualidad relativos al efecto de la reducción de la frecuencia de ordeño sobre la producción de leche y su composición han dado lugar a resultados muy variables, a veces incluso contradictorios, posiblemente debido a que son muchos los factores que parecen modular la respuesta. Esta variabilidad en la respuesta, lejos de ser un inconveniente, debe tomarse como una oportunidad, ya que permite plantear la hipótesis de que si se identifican estos factores y se puede intervenir sobre ellos sería posible establecer sistemas de producción basados en un ordeño al día, con rendimientos productivos aceptables. Por tanto, para avanzar en este objetivo es necesario identificar el mecanismo biológico que regula el efecto de la frecuencia de ordeño sobre la producción y composición de la leche y los factores que pueden modular la respuesta obtenida.

El objetivo general que se persiguió en este trabajo de investigación fue estudiar, en la especie ovina, el efecto a corto y medio plazo de la reducción del número de ordeños diarios (de 2 a 1) sobre la producción y composición de la leche y la salud de la glándula mamaria e identificar los factores que modulan la respuesta y los mecanismos implicados. Este objetivo general se desglosó en dos objetivos concretos, abordados en dos pruebas experimentales independientes.

La **primera prueba experimental** se diseñó con el objetivo de determinar si el efecto de la frecuencia de ordeño sobre la producción y composición de la leche y la salud de la glándula mamaria podría ser modulado por el estado antioxidante de los animales. Para ello, se utilizaron 16 ovejas de raza assaf, que se distribuyeron en 4 grupos de 4 ovejas cada uno, asignándose aleatoriamente 2 grupos a cada uno de los siguientes tratamientos experimentales: tratamiento control (los animales recibieron a voluntad una ración mixta) y el tratamiento AOX [recibieron a voluntad la misma ración y, además, recibieron diariamente, vía oral, 1 g de vitamina E (DL- α -tocoferol acetato), equivalente a 1 000 UI, y

0,4 mg de Selenio (selenito de sodio anhidro]. El periodo experimental tuvo una duración de 11 semanas distribuidas en dos períodos consecutivos en los cuales se modificó la frecuencia de ordeño de forma unilateral: período 1, de la semana 1 a la 3, durante el cual las ovejas se ordeñaron 2 veces al día (2x), y período 2, de la semana 4 a la 11, durante el cual una glándula (glándula A) fue ordeñada una vez al día (1x) y la otra (glándula B) dos veces al día (2x). Semanalmente se midió la ingestión de alimento y se registró el peso de los animales. Tres veces por semana se controló la producción de leche de cada glándula, recogiendo muestras de leche para realizar el recuento de células somáticas y determinar su contenido de extracto seco, proteína, grasa y lactosa. Los días 1, 14, 21 y 77 se recogieron muestras adicionales para determinar el contenido de vitamina E y de minerales (Ca, P, Na, K, Cl, Mg, Se), determinándose también el perfil de ácidos grasos y la estabilidad oxidativa de la grasa en las muestras recogidas los días 21 y 77. Los días 1, 14, 21, 35, 49, 63 y 77 se recogieron muestras de sangre para determinar el hemograma. Los días 1, 14, 21, 49 y 77 se determinó, además, los contenidos de vitamina E, minerales y capacidad antioxidante del plasma. Al final del periodo experimental (día 78), se seleccionaron cuatro ovejas de cada tratamiento experimental, que fueron sacrificadas, recogiendo muestras de diferentes zonas de la glándula mamaria para su estudio histológico.

La administración del suplemento AOX no influyó ($P > 0,10$) en la ingestión de MS. Sin embargo, el período experimental sí afectó ($P < 0,05$) a la ingestión de MS, siendo mayor para ambos grupos en el segundo período experimental (+3,5% grupo AOX y +4,5% para el grupo Control). Las diferencias entre tratamientos y entre períodos para la ganancia de peso mostraron una tendencia a la significación estadística ($P < 0,10$), siendo ésta mayor en el grupo Control y en el primer período experimental.

El suplemento AOX consumido por los animales influyó ($P < 0,05$) en el recuento total de células blancas y de granulocitos, correspondiendo los mayores valores a los animales del grupo control. No se encontraron diferencias ($P > 0,10$) atribuibles a la administración del suplemento AOX en el resto de los parámetros hemáticos estudiados. El periodo experimental afectó ($P < 0,05$) a la mayoría de los parámetros hemáticos determinados excepto ($P > 0,10$) al recuento total de monocitos. En ambos grupos experimentales el hematocrito, el recuento de células rojas, de células blancas, de linfocitos y granulocitos fue menor ($P < 0,05$) en el segundo periodo.

La administración del suplemento AOX influyó ($P < 0,05$) sobre la concentración plasmática de vitamina E y la capacidad antioxidante del plasma, registrándose los mayores valores en el grupo AOX. No se encontraron diferencias ($P > 0,10$) en la concentración

plasmática de los minerales determinados debidas a la administración del suplemento AOX. La mayor concentración plasmática de vitamina E ($P < 0,05$) se observó en el primer período, siendo el comportamiento similar en ambos grupos experimentales. Las concentraciones plasmáticas de Se, Na, K y Mg ($P < 0,05$) fueron mayores en el primer periodo experimental. Sin embargo, en el caso del Na y del K este efecto dependió del suplemento administrado a los animales. En ambos minerales, las mayores diferencias fueron observadas en el grupo AOX. La capacidad antioxidante del plasma también fue mayor ($P < 0,05$) en el primer período experimental.

La administración del suplemento AOX no influyó ($P > 0,10$) ni en la producción ni en la composición de la leche, en ninguno de los dos períodos experimentales. Sin embargo, en el segundo periodo experimental se observaron diferencias ($P < 0,05$), tanto en la producción como en la composición de la leche (% de ES, GB, PB y lactosa), debidas a la diferente frecuencia de ordeño (2x vs 1x). Así, la reducción de la frecuencia de ordeño de dos (2x) a un ordeño al día (1x) provocó una disminución ($P < 0,001$) de la producción de leche. En lo que respecta a la composición de la leche, se encontró una disminución del contenido de lactosa (5,08 vs 4,97%, $P < 0,05$) y un aumento en el contenido de proteína (5,11 vs 5,20 %, $P < 0,05$) en la glándula sometida a un ordeño al día. El contenido de grasa (5,57 vs 5,72 %,.) no se vio afectado ($P > 0,10$) por la reducción de la frecuencia de ordeño, mientras que el contenido de extracto seco mostró una tendencia ($P < 0,07$) a ser mayor en la leche producida por la glándula ordeñada una vez al día (16,83 vs 16,66 %).

En el primer período experimental tanto el contenido de vitamina E de la leche como la estabilidad a la oxidación de la grasa láctea fue mayor ($P < 0,05$) en el grupo al que se le administró el suplemento AOX, siendo el comportamiento similar en ambas glándulas. Para este mismo período, no se observaron diferencias ($P > 0,10$) atribuibles a la administración del suplemento AOX en la concentración de ninguno de los elementos minerales determinados. Sin embargo, los contenidos de P, Na, Cl y Mg en la leche variaron entre glándulas. En el segundo período experimental, se observaron diferencias ($P < 0,01$) en el contenido de vitamina E de la leche y en la estabilidad a la oxidación de la grasa láctea, atribuibles al suplemento AOX (ambos parámetros fueron mayores en el grupo AOX). En ambos grupos experimentales el contenido de Ca y P fue mayor ($P < 0,001$) cuando la frecuencia de ordeño fue de una vez al día. Sin embargo, los contenidos de Na y K fueron mayores ($P < 0,01$) cuando la frecuencia de ordeño fue de dos veces al día.

En el primer período experimental no se evidenciaron diferencias ($P > 0,10$) ni entre glándulas ni entre tratamientos experimentales en los principales grupos de ácidos grasos (SFA, MUFA y PUFA). En el segundo período, la administración del suplemento AOX tampoco influyó ($P > 0,10$) en las proporciones de SFA, MUFA y PUFA, pero redujo ($P < 0,01$) el porcentaje de ácidos grasos de menos de 16 carbonos y aumentó ($P < 0,05$) el porcentaje de ácidos grasos de 16 o más átomos de carbono. La frecuencia de ordeño influyó ($P < 0,01$) en la proporción de MUFA, aumentando ésta al reducirse la frecuencia de ordeño.

En el período 1 del experimento, cuando ambas glándulas se ordeñaron dos veces al día, no se encontraron diferencias en el RCS entre las glándulas ($P > 0,10$). Sin embargo, en el segundo período experimental, el RCS fue mayor ($P < 0,05$) en aquellas glándulas que se ordeñaron una vez al día. La administración del suplemento AOX no influyó ($P > 0,10$) en el RCS en ninguno de los dos periodos experimentales.

La frecuencia de ordeño no influyó ($P > 0,10$) en el diámetro de los alveolos, en el n° de células epiteliales ni en la proporción de casos con infiltrados inflamatorios, pero la intensidad del infiltrado fue mayor en las glándulas sometidas a un ordeño. La administración del suplemento AOX no modificó la asociación entre la intensidad de infiltración inflamatoria y la frecuencia de ordeño.

Los resultados obtenidos indican que la administración de vitamina E y Se incrementó la capacidad antioxidante del organismo, pero no modificó el efecto de la reducción de la frecuencia de ordeño ni sobre la producción ni sobre la composición de la leche. La intensidad de la infiltración inflamatoria de las glándulas sometidas a un ordeño al día tampoco resultó modulada por el estado antioxidante de los animales.

La **segunda prueba experimental** se planteó con el objetivo de estudiar la relación entre el potencial de producción de leche de los animales, la capacidad cisternal de la glándula mamaria y el efecto a corto y medio plazo de la reducción de la frecuencia de ordeño sobre la producción y composición de la leche, la salud de la glándula mamaria y el perfil metabólico. Para ello, se utilizaron 21 ovejas de raza assaf, que se distribuyeron en 3 grupos de 7 animales cada uno, de acuerdo con su producción de leche [**Grupo BP (producción baja:** entre 1093 y 1790 g/día); **Grupo MP (producción media:** entre 1990 y 2528 g/día); **Grupo AP (producción alta:** entre 2663 y 3013 g/día)], edad, peso, número de lactación, días post-parto, producción media de leche, cociente entre las producciones de leche para cada glándula, proporción de leche cisternal y cociente entre las proporciones de

cada glándula. La prueba experimental tuvo una duración de 10 semanas y se dividió en dos periodos, durante los cuales se modificó la frecuencia de ordeño de 2 (TDM) a 1 (ODM) ordeño: período 1, de 4 semanas de duración (días 1 a 28), durante el cual las ovejas se ordeñaron dos veces al día (2x), y período 2, de 6 semanas de duración (días 29 a 70) y durante el cual las ovejas se ordeñaron una vez al día (1x). A efectos del análisis de datos el periodo 2 se subdividió en dos subperiodos para estudiar el efecto a corto plazo (periodo post1, días 29 y 30) y medio plazo (periodo post2, días 32 a 70) del cambio de frecuencia de ordeño. Los días 1, 7, 14, 28, 29, 30, 32, 35, 42, 49, 56, 63 y 70 se realizó un control de la producción de leche individual para cada glándula, recogiéndose una muestra de leche de cada glándula para determinar la composición de la leche (extracto seco, proteína, grasa, lactosa) y realizar el recuento de células somáticas (RCS). Los días 28, 30, 32, 35, 49 y 70 del periodo experimental se tomaron muestras de sangre de cada uno de los animales para la determinación de lactosa (como indicador de daño en las uniones intercelulares estrechas del epitelio mamario (*tigh junctions*)) y de diferentes metabolitos que han sido utilizados como marcadores de la respuesta inflamatoria aguda (APP positivas: Haptoglobina, Ceruloplasmina; APP negativas: Albúmina, Paraoxonasa, Colesterol total), del estado antioxidante y funcionamiento hepático [Peróxido de hidrógeno, FRAP (*ferric reducing ability of plasma*) y GOT(aspartato amino-transferasa)] y del metabolismo energético y proteico [Glucosa, ácidos grasos no esterificados (NEFA), β -hidroxi-butilato y Urea].

En las primeras 48 h tras el cambio de frecuencia de ordeño, disminuyó ($P < 0,05$) la producción de leche en los 3 grupos experimentales, correspondiendo los mayores valores de reducción al grupo AP y los menores valores al grupo BP, situándose el valor del grupo MP en una posición intermedia, cuando dicha reducción se expresó en g/oveja y día. Sin embargo, cuando la reducción máxima en la producción de leche se expresó como porcentaje, los valores de reducción del grupo MP no difirieron ($P > 0,05$) ni de los valores del grupo BP ni de los valores del grupo AP. La reducción en la producción de leche inmediatamente tras el cambio de frecuencia no guardó relación con la capacidad cisternal de la glándula en ninguno de los grupos experimentales.

Tras alcanzarse un valor mínimo de producción, la producción de leche se incrementó, describiendo una curva que se ajustó al modelo propuesto por Wood. No se encontraron diferencias ($P > 0,10$) entre grupos experimentales en el tiempo que se tardó en alcanzar el nuevo pico de producción tras el cambio de frecuencia de ordeño ($10 \pm 1,1$ días) ni en la producción de leche máxima, expresada como proporción de la producción de leche registrada el día anterior al cambio de la frecuencia de ordeño ($90 \pm 1,6\%$). El nivel de producción de leche no afectó ($P > 0,05$) a los valores medios de persistencia en ninguno de

los dos periodos experimentales (previo y posterior al cambio de la frecuencia de ordeño). Sin embargo la persistencia disminuyó ($P < 0,05$) al reducirse la frecuencia de ordeño en los tres grupos experimentales.

El nivel de producción no afectó ($P > 0,10$) al contenido de ninguno de los componentes de la leche que fueron determinados. Se encontraron diferencias ($P < 0,001$) debidas al efecto tanto del periodo como del día en todos los componentes de la leche que fueron estudiados. El contenido de extracto seco fue mayor en EL periodo post 2, en los tres grupos experimentales, no encontrándose diferencias ($P > 0,10$) entre los otros dos periodos. En todos los grupos experimentales, el mayor y el menor contenido de grasa correspondieron a los periodos post2 y post1, respectivamente. El contenido de proteína bruta de la leche, en todos los grupos experimentales, fue mayor en el periodo post1 y menor en el periodo pre, situándose los valores del periodo post2 en una posición intermedia. El contenido de lactosa también fue diferente ($P < 0,05$) en los tres periodos y en todos los grupos experimentales, correspondiendo los mayores y menores valores a los periodos post1 y post2, respectivamente.

En lo que se refiere al estado sanitario de la ubre, no se observaron diferencias ($P > 0,10$) entre grupos experimentales en el RCS determinado en el periodo previo al cambio de frecuencia de ordeño. Sin embargo, el efecto del periodo y de la interacción del nivel productivo x periodo fueron estadísticamente significativos ($P < 0,05$). Así, en el grupo MP no hubo diferencias entre periodos, pero sí en los grupos AP y BP, que presentaron mayores valores en el periodo post 2 que en el periodo previo al cambio de frecuencia de ordeño. La concentración plasmática de lactosa no varió ($P > 0,10$) con ninguna de las fuentes de variación estudiadas.

Al evaluar la respuesta inflamatoria aguda se observó que la concentración plasmática de colesterol no se vio afectada ($P > 0,10$) ni por el grupo experimental ni por el día de muestreo, ni por la interacción de entre estos dos factores de variación. Sin embargo, la concentración de albúmina, en general, se incrementó después de la reducción de la frecuencia de ordeño, manteniéndose el incremento durante todo el período experimental. En el caso de la haptoglobina su concentración fue menor en los días 30 y 35, no encontrándose diferencias entre los otros días de muestreo. Los mayores niveles de paraoxonasa se registraron el día 70, no existiendo diferencias entre los demás días de muestreo.

La concentración plasmática de ROM y la capacidad antioxidante determinada por el método FRAP variaron ($P < 0,001$) con el día de muestreo, siendo también estadísticamente significativa la interacción entre el día y el nivel de producción ($P < 0,05$). Los menores valores de los niveles plasmáticos de ROM y de FRAP se observaron en el día 30 (24 horas posteriores al cambio de la frecuencia de ordeño), si bien la evolución posterior fue diferente entre grupos experimentales.

No se encontraron diferencias ($P > 0,10$) en la concentración plasmática de la enzima aspartato aminotransferasa atribuibles al día de muestreo ni al nivel de producción, ni a la interacción entre ambos.

La concentración plasmática de glucosa se vio afectada tanto por el grupo experimental ($P < 0,10$) como por el día ($P < 0,05$). Los valores más altos en la concentración plasmática de glucosa se encontraron en el grupo MP y los más bajos en el grupo AP, situándose en una posición intermedia los valores para el grupo BP. Los menores niveles plasmáticos de glucosa se registraron el último día de muestreo (día 70), no existiendo diferencias ($P > 0,10$) entre los otros días de muestreo.

El grupo experimental no afectó ($P > 0,10$) a la concentración plasmática de NEFA, pero la concentración de β -HB tendió ($P < 0,10$) a ser mayor en el grupo AP y menor en el grupo BP, situándose el grupo MP en una posición intermedia. El día de muestreo influyó ($P < 0,05$) en ambos parámetros, correspondiendo los mayores valores de NEFA al día 30 (24 horas posteriores al cambio de la frecuencia de ordeño) y los menores a los días de muestreo 32, 35, 49 y 70. En contraposición, los menores valores de β -HB se encontraron el día 28 de muestreo, no existiendo diferencias entre el resto de los días de muestreo.

Los resultados obtenidos indican que existen diferencias en el efecto a corto y medio plazo de la frecuencia de ordeño tanto sobre la producción como sobre la composición de la leche. Tras una intensa reducción a corto plazo, se produce una recuperación de la producción, alcanzándose un nuevo pico cuyo valor es proporcional a la producción de leche previa al cambio de frecuencia. La persistencia de la producción, no obstante, disminuye al reducirse la frecuencia y también parece modificarse el metabolismo energético y lipídico, reduciéndose la gluconeogénesis y favoreciéndose la formación de cuerpos cetónicos.

Riassunto.

Stabilire una strategia basata sulla realizzazione di una sola mungitura al giorno permette di ridurre il tempo dedicato a questa attività, contribuendo a migliorare la qualità di vita dell'allevatore e della sua famiglia. D'altra parte, disporre di tempo per altre attività potrebbe anche contribuire a implementare la redditività dell'azienda, attraverso la diversificazione delle attività. Tuttavia, la riduzione della produzione di latte conseguente alla realizzazione di una sola mungitura giornaliera deve essere attentamente quantificata, visto che l'aumento dell'intervallo di tempo fra le mungiture produce cambi morfologici e fisiologici che possono causare l'inizio dell'involuzione della ghiandola mammaria.

Gli studi attualmente disponibili relativi all'effetto della riduzione della frequenza di mungitura sulla produzione e composizione del latte hanno dato luogo a risultati molto variabili, a volte addirittura contraddittori, probabilmente perché sono molti i fattori che sembrano modulare la risposta. Tale variabilità della risposta, lontano dall'essere un inconveniente, deve essere vista come un'opportunità, visto che permette di formulare l'ipotesi che, se si identificano questi fattori e si riesce a intervenire su di essi, sarebbe possibile stabilire sistemi di produzione basati su una mungitura al giorno, con rendimenti produttivi accettabili. Di conseguenza, per raggiungere l'obiettivo, è necessario identificare il meccanismo biologico che regola l'effetto della frequenza di mungitura su produzione e composizione del latte e i fattori che sono in grado di influenzare la risposta ottenuta.

L'obiettivo generale di questo lavoro è stato quello di studiare nella specie ovina l'effetto a breve e medio termine della riduzione del numero di mungiture giornaliere (da 2 a 1) sulla produzione e composizione del latte e la salute della ghiandola mammaria e di identificare i fattori che modulano la risposta ottenuta e i meccanismi implicati. Tale obiettivo generale è stato suddiviso in due obiettivi concreti, affrontati in due prove sperimentali indipendenti.

La **prima prova sperimentale** è stata disegnata con l'obiettivo di determinare se l'effetto della frequenza di mungitura su produzione e composizione del latte e la salute della ghiandola mammaria potrebbe essere influenzato dallo stato antiossidante degli animali. A tale scopo si utilizzarono 16 pecore di razza Assaf che si distribuirono in 4 gruppi di 4 pecore cadauno, assegnando casualmente 2 gruppi a ciascuno dei seguenti trattamenti sperimentali: trattamento controllo (gli animali ricevettero una razione mista a volontà) e trattamento AOX [gli animali ricevettero la stessa razione mista a volontà con il supplemento giornaliero, per via orale, di 1 g di vitamina E (DL- α -tocoferolo acetato),

equivalente a 1000 UI, e 4 mg di Selenio (selenito di sodio anidro)]. Il periodo sperimentale ebbe una durata totale di 11 settimane, suddivise in due periodi consecutivi in cui si modificò la frequenza di mungitura in maniera unilaterale: periodo 1, dalla prima alla terza settimana, durante il quale le pecore furono munte 2 volte al giorno (2x), e periodo 2, dalla quarta all'undicesima settimana, durante il quale una ghiandola (ghiandola A) fu munta una volta al giorno (1x) e l'altra (ghiandola B) due volte al giorno (2x). Con cadenza settimanale si registrò l'ingestione di alimento e il peso degli animali. Tre volte alla settimana si controllò la produzione di latte di ogni ghiandola, raccogliendo campioni di latte per quantificare il numero di cellule somatiche e determinare il contenuto di estratto secco, proteine, grasso e lattosio. Nei giorni 1, 14, 21 e 77 si raccolsero ulteriori campioni per determinare il contenuto di vitamina E e minerali (Ca, P, Na, K, Cl, Mg, Se). Nei campioni raccolti i giorni 21 e 77 si determinò anche il profilo degli acidi grassi e la stabilità ossidativa del grasso. Nei giorni 1, 14, 21, 35, 49, 63 e 77 si prelevarono campioni di sangue per determinarne l'emocromo. Inoltre, nei giorni 1, 14, 21, 49 e 77 si determinò il contenuto di vitamina E, dei minerali e la capacità antiossidante del plasma. Alla fine del periodo sperimentale (giorno 78), furono selezionate 4 pecore in ogni trattamento sperimentale che furono sacrificate per il prelievo di campioni da aree differenti della ghiandola mammaria per l'analisi istologica.

La somministrazione di AOX non ebbe effetto ($P>0,10$) sull'ingestione di MS. Tuttavia, il periodo sperimentale modificò ($P<0,05$) l'ingestione di MS che si rivelò maggiore in entrambi i gruppi nel secondo periodo sperimentale (+3,5% per il gruppo AOX e +4,5% per il gruppo Controllo). Le differenze fra i trattamenti e fra i periodi per l'incremento di peso mostrarono una tendenza alla significatività statistica ($P<0,10$), con incrementi maggiori nel gruppo Controllo e nel primo periodo sperimentale.

Il supplemento AOX ingerito dagli animali influenzò ($P<0,05$) il numero totale di cellule bianche e di granulociti, i cui valori maggiori furono registrati negli animali del gruppo Controllo. Non si riscontrarono differenze ($P>0,10$) attribuibili alla somministrazione di AOX nei restanti parametri ematici analizzati. Il periodo sperimentale ebbe effetti ($P<0,05$) sulla maggior parte dei parametri ematici analizzati con la sola eccezione del numero totale di monociti ($P>0,10$). In entrambi i gruppi sperimentali l'ematocrito, il numero di cellule rosse, di cellule bianche, di linfociti e granulociti fu minore ($P<0,05$) nel secondo periodo.

La somministrazione del supplemento AOX ebbe effetti ($P<0,05$) sulla concentrazione plasmatica di vitamina E e sulla capacità antiossidante del plasma, con i

valori più alti registrati nel gruppo AOX. Non furono rilevate differenze ($P>0,10$) nella concentrazione plasmatica dei minerali analizzati dovute al supplemento AOX. La maggiore concentrazione plasmatica di vitamina E ($P<0,05$) si osservò nel primo periodo, con un andamento simile in entrambi i gruppi sperimentali. Le concentrazioni plasmatiche di Se, Na, K e Mg ($P<0,05$) furono maggiori nel primo periodo sperimentale. Tuttavia, nel caso di Na e K tale effetto fu legato al supplemento somministrato agli animali. In entrambi i minerali, le maggiori differenze fra periodi furono registrate nel gruppo AOX. Anche la capacità antiossidante del plasma fu maggiore ($P<0,05$) nel primo periodo sperimentale.

La somministrazione del supplemento AOX non influì ($P>0,10$) né sulla produzione, né sulla composizione del latte in nessuno dei due periodi sperimentali. Tuttavia, nel secondo periodo sperimentale si osservarono differenze ($P<0,05$) sia nella produzione che nella composizione del latte (% di estratto secco, grasso, proteine e lattosio) dovute alla frequenza di mungitura (2x vs 1x). Così, la riduzione della frequenza di mungitura da due (2x) a una mungitura giornaliera (1x) provocò una diminuzione ($P<0,001$) della produzione di latte. Relativamente alla composizione del latte, si osservò una diminuzione del contenuto di lattosio (5,08 vs 4,97%, $P<0,05$) e un aumento del contenuto di proteina (5,11 vs 5,20 %, $P<0,05$) nella ghiandola sottoposta a una sola mungitura giornaliera. Il contenuto di grasso (5,57 vs 5,72 %) non si vide modificato ($P>0,10$) dalla riduzione della frequenza di mungitura, mentre il contenuto di estratto secco mostrò una tendenza ($P<0,07$) a essere maggiore nel latte prodotto nella ghiandola munta una volta al giorno (16,83 vs 16,66 %).

Nel primo periodo sperimentale sia il contenuto di vitamina E del latte sia la stabilità all'ossidazione del grasso latteo fu maggiore ($P<0,05$) nel gruppo che ricevette il supplemento AOX, con un comportamento simile in entrambe le ghiandole. Nello stesso periodo non si osservarono differenze ($P>0,10$) attribuibili alla somministrazione di AOX nella concentrazione di nessuno dei minerali analizzati. Ciò nonostante, il contenuto di P, Na, Cl e Mg nel latte variò fra le ghiandole. Nel secondo periodo sperimentale si osservarono differenze ($P<0,01$) nel contenuto di vitamina E del latte e nella stabilità all'ossidazione del grasso latteo, attribuibili al supplemento AOX (entrambi i parametri risultarono maggiori nel gruppo AOX). In entrambi i gruppi sperimentali il contenuto di Ca e P fu maggiore ($P<0,001$) quando la frequenza di mungitura fu di una sola volta al giorno. Al contrario, il contenuto di Na e K fu maggiore ($P<0,001$) quando la frequenza di mungitura fu di due volte al giorno.

Nel primo periodo sperimentale non si evidenziarono differenze ($P>0,10$) né fra ghiandole, né fra trattamenti sperimentali nei principali gruppi di acidi grassi (SFA, MUFA e PUFA). Nel secondo periodo, la somministrazione del supplemento AOX non ebbe effetto ($P> 0,10$) sulle proporzioni di SFA, MUFA e PUFA, ma diminuì ($P<0,01$) la percentuale di acidi grassi con meno di 16 atomi di carbonio e aumentò ($P<0,05$) la percentuale di acidi grassi con 16 o più atomi di carbonio. La frequenza di mungitura ebbe effetto ($P<0,01$) sulla proporzione di MUFA, provocandone un aumento al ridursi la frequenza di mungitura.

Nel primo periodo dell'esperimento, quando entrambe le ghiandole furono munte due volte al giorno, non si evidenziarono differenze nel RCS fra le ghiandole ($P>0,10$). Tuttavia, nel secondo periodo sperimentale, l'RCS si dimostrò più elevato ($P<0,05$) nelle ghiandole munte una sola volta al giorno. La somministrazione del supplemento AOX non ebbe effetto ($P>0,10$) sull'RCS in nessuno dei due periodi sperimentali.

La frequenza di mungitura non ebbe effetto ($P>0,10$) sul diametro degli alveoli, sul numero di cellule epiteliali, né sulla proporzione di casi con infiltrati infiammatori, sebbene l'intensità dell'infiltrato si rilevò maggiore nelle ghiandole sottoposte a una sola mungitura. La somministrazione del supplemento AOX non modificò la associazione fra intensità dell'infiltrazione infiammatoria e la frequenza di mungitura.

I risultati ottenuti indicano che la somministrazione di vitamina E e Se aumentò la capacità antiossidante dell'organismo, sebbene non modificò l'effetto della riduzione della frequenza di mungitura né sulla produzione, né sulla composizione del latte. Neanche l'intensità dell'infiltrazione infiammatoria delle ghiandole sottoposte a una sola mungitura giornaliera si vide influenzata dallo stato antiossidante degli animali.

La **seconda prova sperimentale** fu impostata con l'obiettivo di studiare la relazione fra il potenziale di produzione di latte degli animali, la capacità cisternale della ghiandola mammaria e l'effetto a breve e medio termine della riduzione della frequenza di mungitura sulla produzione e composizione del latte, la salute della ghiandola mammaria e il profilo metabolico. A tale scopo si utilizzarono 21 pecore di razza Assaf, che furono distribuite in 3 gruppi di 7 animali cadauno, a seconda della produzione di latte [**Gruppo BP (produzione bassa:** fra 1093 e 1790 g/giorno); **Gruppo MP (produzione media:** fra 1990 e 2528 g/giorno); **Gruppo AP (produzione alta:** fra 2663 e 3013 g/giorno)], dell'età, del peso, del numero di lattazioni, dei giorni post-parto, della produzione media di latte, del quoziente fra le produzioni di latte per ogni ghiandola, della proporzione di latte cisternale

e del quoziente fra le porzioni di ogni ghiandola. La prova sperimentale durò 10 settimane e fu suddivisa in due periodi durante i quali si modificò la frequenza di mungitura da 2 (TDM) a 1 (ODM) mungitura al giorno: periodo 1, della durata di 4 settimane (dal giorno 1 al 28), durante il quale le pecore furono munte due volte al giorno (2x), e periodo 2, della durata di 6 settimane (dal giorno 29 al 70), durante il quale le pecore furono munte una volta al giorno (1x). Ai fini dell'analisi dei dati, il periodo 2 fu ulteriormente suddiviso in due sottoperiodi per studiare l'effetto a breve termine (periodo post1, giorni 29 e 30) e a medio termine (periodo post2, dal giorno 32 al 70) del cambio della frequenza di mungitura. I giorni 1, 7, 14, 28, 29, 30, 32, 35, 42, 49, 56, 63 e 70 si controllò la produzione di latte individuale per ogni ghiandola, raccogliendo un campione di latte da ogni ghiandola per determinarne la composizione (estratto secco, proteine, grasso e lattosio) e realizzare il conteggio delle cellule somatiche (RCS). I giorni 28, 30, 32, 35, 49 e 70 del periodo sperimentale si prelevarono campioni di sangue da ogni animale per la determinazione del lattosio (come indicatore del danno alle unioni intercellulari strette dell'epitelio mammario, le cosiddette *tight junctions*) e di alcuni metaboliti utilizzati come marcatori della risposta infiammatoria acuta (APP positive: aptoglobina, ceruloplasmina; APP negative: albumina, paraoxonasi, colesterolo totale), dello stato antiossidante e del funzionamento epatico [perossido di idrogeno, FRAP (*ferric reducing ability of plasma*) e GOT (aspartato ammino transferasi)] e del metabolismo energetico e proteico [glucosio, acidi grassi non esterificati (NEFA), β -idrossibutirrato e urea].

Nelle prime 48 ore dopo il cambio di frequenza di mungitura, diminuì ($P < 0,05$) la produzione di latte nei 3 gruppi sperimentali, con i valori di maggior riduzione registrati nel gruppo AP, quelli di minor variazione nel gruppo BP, e con il gruppo MP in una situazione intermedia, quando detta riduzione si misurò in g/pecora al giorno. Tuttavia, quando la riduzione massima nella produzione di latte si misurò come percentuale, i valori di riduzione del gruppo MP non differirono ($P > 0,05$) né dai valori del gruppo BP, né da quelli del gruppo AP. La riduzione della produzione di latte immediatamente dopo il cambio di frequenza non dimostrò una relazione con la capacità cisternale della ghiandola in nessun gruppo sperimentale.

Dopo aver raggiunto un valore minimo, la produzione di latte aumentò, descrivendo una curva che si aggiusta al modello proposto da Wood. Non ci furono differenze ($P > 0,10$) fra i gruppi sperimentali nel tempo impiegato a raggiungere il nuovo picco di produzione dopo il cambio di frequenza di mungitura ($10 \pm 1,1$ giorni), né nella produzione massima di latte, espressa come proporzione della produzione di latte registrata il giorno anteriore al cambio di frequenza di mungitura ($90 \pm 1,6\%$). Il livello di produzione

di latte non ebbe effetto ($P>0,05$) sui valori medi di persistenza in nessuno dei due periodi sperimentali (prima e dopo il cambio di frequenza di mungitura). Tuttavia, la persistenza diminuì ($P<0,05$) al ridursi la frequenza di mungitura nei tre gruppi sperimentali.

Il livello di produzione non ebbe effetti ($P>0,10$) sul contenuto di nessuno dei componenti del latte determinati. Ci furono differenze ($P<0,001$) dovute all'effetto sia del periodo, sia del giorno su tutti i componenti del latte studiati. Il contenuto di estratto secco fu maggiore nel periodo post2 nei tre gruppi sperimentali, senza, invece, differenze ($P>0,10$) fra gli altri due periodi. In tutti i gruppi sperimentali il contenuto di grasso maggiore e minore furono registrati nel periodo post2 e post1, rispettivamente. Il contenuto di proteine del latte in tutti i gruppi sperimentali fu più elevato nel periodo post1 e minore nel periodo pre, con i valori del periodo post2 in una posizione intermedia. Anche il contenuto di lattosio risultò differente ($P<0,05$) nei tre periodi e in tutti i gruppi sperimentali, con i valori maggiori e minori registrati nel periodo post 1 e post2, rispettivamente.

Relativamente allo stato sanitario della mammella, non si osservarono differenze ($P>0,10$) fra gruppi sperimentali nell'RCS determinato durante il periodo antecedente al cambio di frequenza di mungitura. Tuttavia, l'effetto del periodo e dell'interazione livello di produzione x periodo fu statisticamente significativo ($P<0,05$). Quindi, nel gruppo MP non ci furono differenze fra periodi, che, invece, si registrarono nei gruppi AP e BP, con valori maggiori nel periodo post2 rispetto al periodo antecedente al cambio di frequenza di mungitura. La concentrazione plasmatica di lattosio non subì variazioni ($P>0,10$) con nessuna delle fonti di variazioni prese in considerazione.

Nel valutare la risposta infiammatoria acuta, si osservò che la concentrazione plasmatica di colesterolo non fu influenzata ($P>0,10$) né dal gruppo sperimentale, né dal giorno di campionamento, né dall'interazione fra questi due fattori di variazione. Al contrario, la concentrazione di albumina, in generale, aumentò dopo la riduzione della frequenza di mungitura, mantenendo tale aumento durante tutto il periodo sperimentale. Nel caso dell'apotoblobina si registrò una minor concentrazione nei giorni 30 e 35, senza altre differenze negli altri giorni di campionamento. I maggiori livelli di paraoxonasi furono registrati il giorno 70, senza altre differenze registrate negli altri giorni di campionamento.

La concentrazione plasmatica di ROM e la capacità antiossidante determinata con il metodo FRAP variarono ($P<0,001$) a seconda del giorno di campionamento, con anche un'interazione statisticamente significativa fra il giorno e il livello di produzione ($P<0,05$).

I valori più bassi dei livelli plasmatici di ROM e di FRAP si osservarono il giorno 30 (24 ore dopo il cambio di frequenza di mungitura), sebbene l'evoluzione successiva fu differente fra gruppi sperimentali.

Non ci furono differenze ($P>0,10$) nella concentrazione plasmatica dell'enzima aspartato ammino transferasi attribuibili al giorno di campionamento o al livello di produzione, né all'interazione fra entrambi i fattori.

La concentrazione plasmatica di glucosio fu influenzata sia dal gruppo sperimentale ($P<0,10$), sia dal giorno ($P<0,05$). I valori più elevati nella concentrazione plasmatica di glucosio si riscontrarono nel gruppo MP e quelli più bassi nel gruppo AP, con i valori del gruppo BP in una posizione intermedia. I valori più bassi del livello di glucosio si registrarono l'ultimo giorno di campionamento (giorno 70), senza differenze ($P>0,10$) fra gli altri giorni presi in considerazione.

Il gruppo sperimentale non ebbe effetto ($P>0,10$) sulla concentrazione plasmatica di NEFA, mentre la concentrazione di β -HB osservò una tendenza ($P<0,10$) ad essere maggiore nel gruppo AP e minore nel gruppo BP, con il gruppo MP in una situazione intermedia. Il giorno di campionamento influenzò ($P<0,05$) entrambi i parametri, con i valori più elevati di NEFA registrati il giorno 30 (24 ore dopo il cambio di frequenza di mungitura) e i più bassi registrati i giorni 32, 35, 49 e 70. In contrasto, i valori minori di β -HB si registrarono il giorno 28, senza differenze evidenziabili negli altri giorni di campionamento.

I risultati ottenuti indicano che esistono differenze nell'effetto a breve e medio termine della frequenza di mungitura sia sulla produzione, sia sulla composizione del latte. Dopo un'intensa riduzione a breve termine, si produce un recupero della produzione, raggiungendo un nuovo picco il cui valore è proporzionale alla produzione di latte antecedente al cambio di frequenza. Ciò nonostante, la persistenza della produzione diminuisce al ridursi la frequenza, così come sembrerebbe modificarsi il metabolismo energetico e lipidico, con una riduzione della gluconeogenesi e il favorirsi della formazione di corpo chetonici.

Summary.

Establishing a strategy that allows once daily milking reduces the time dedicated to this activity, contributing to the improvement in quality of life of the farmer and his family. On the other side, more free time would help contributing to productivity improvement, through diversification of the activities. With no doubts, the reduction in milk yield due to once daily milking should be quantified carefully, since increasing the interval between milking induces morphologic and physiologic changes that can cause the beginning of the mammary gland involution.

Recent studies regarding the effects of milking frequency reduction on milk production and its composition yielded variable results, sometimes contradictory, possibly due to the many factors that can modulate the response. This variability, more than an inconvenient, should be seen as an opportunity, since it allows to raise the hypothesis that by identifying controllable factors, it would be possible to establish a production system based on once a day milking, with acceptable productivity. In order to advance in this objective, it is necessary to identify the biological mechanisms that regulate the effect of milking frequency on production and milk composition and factors that modulate its response.

The general objective of this investigation was to study the short and long term effects, in the ovine species, of milking frequency reduction (from twice to once daily) on production and milk composition; the health of the mammary gland and identify the factors that modulate the response and its underlying pathway. The study was composed of two independent experimental parts.

The **first experimental study** had the objective of studying if the effects of milking frequency on milk production and composition and udder health could be modulated by the antioxidant status of the animals. For this study 16 ewes of breed assaf, divided into 4 groups of 4 ewes each were used. The ewes were randomly allocated to one of the following experimental treatment groups: control (animals receiving ad libitum mixed ratio) and AOX (animals receiving ad libitum mixed ratio and daily oral administration of 1 g of vitamin E (DL- α -tocopherol acetate) equivalent to 1 000 UI, and 0,4 mg of Selenium (Sodium selenite anhydrous). The experimental period lasted 11 weeks distributed in two consecutive periods in which milking frequency was reduced in a unilateral fashion: period 1, from week 1 to 3, during which milking occurred twice daily (2x), and period 2, from

week 4 to 11, during which one half (gland A) was milked once daily (1x) and the other (gland B) twice daily (2x). Feed consumption and weight of the animal was measured weekly. Milk production of each gland was measured three times weekly, collecting milk samples to perform somatic cell count and determine the milk solids, protein, fat and lactose contents. On day 1, 14, 21 and 77 extra samples were collected in order to determine vitamin E and mineral (Ca, P, Na, K, Cl, Mg, Se) contents. Additionally, the milk fatty acid and the oxidative fat stability were measured in samples collected on day 21 and 77. On day 1, 14, 21, 35, 49, 63 and 77 blood samples were collected to determine the complete blood count. On days 1, 14, 21, 49 and 77 plasma vitamin E, minerals content and plasma antioxidant capacity of plasma were also determined. At the end of the experimental period (day 78), 4 ewes were selected from each experimental group and euthanized for collection of samples from different sites on the mammary gland for its histological study.

The administration of AOX supplement did not influence ($P>0.10$) the dry matter intake. However, the experimental period affected dry matter ingestion ($P<0.05$) which was greater for both groups in the second experimental period (+3.5% in AOX group and +4.5% in control group). The influence of treatment and periods on weight gain indicated a statistical trend ($P<0.10$), being this greater in control group and in the first experimental period.

The AOX supplement influenced the total white blood cell and neutrophil counts, higher in the control group ($p<0.05$). No other blood parameter showed statistically significant differences ($p>0.10$). The experimental period influenced ($P<0.05$) the majority of the blood parameters a part from the total monocyte count ($P>0.10$). In both groups haematocrit, total red blood cell, white blood cell, lymphocytes and granulocytes counts were lower ($P<0.05$) in the second experimental period.

The administration of AOX supplement influenced ($P<0.05$) the plasma concentration of vitamin E and the plasma antioxidant capacity, with the highest concentrations recorded for the AOX group. No significant differences ($P>0.10$) were noticed in minerals plasma concentration following AOX supplementation. The highest vitamin E concentration ($P<0.05$) was observed in the first experimental period, with similar behaviour between the two groups. The plasma concentration of Se, Na, K and Mg ($P<0.05$) was higher in the first experimental period. Most likely Na and K were influenced by the supplement administered to the animals. For both minerals, the highest

differences between periods was observed in the AOX group. Plasma antioxidant capacity was also higher in the first experimental period ($P < 0.05$).

The administration of AOX supplement did not influence ($P > 0.10$) the production or the composition of the milk, in any experimental groups. However, in the second experimental period differences were observed ($P < 0.05$) in both milk production and composition (% of milk solids, crude fat, crude protein and lactose) due to the milking frequency (2x vs 1x). The milking frequency reduction from twice (2x) to once daily (1x) induced a decrease ($P < 0.001$) in milk production. For what concerns milk composition, a decrease in lactose content was noticed (5,08 vs 4,97%, $P < 0,05$) and an increase in protein content (5,11 vs 5,20 %, $P < 0,05$) in the half gland undergoing once daily milking. Fat content (5,57 vs 5,72 %,.) did not show any changes ($p > 0.10$) due to milking frequency, however the milk solids content demonstrated a statistical trend ($P < 0.07$) in the half gland undergoing once daily milking (16,83 vs 16,66 %).

In the first experimental period, both milk vitamin E and the oxidative stability of the milk fat was higher in the AOX group ($P < 0.05$), with both mammary glands demonstrating the same behaviour. During the same period, no differences ($P > 0.10$) in the measured minerals concentration were observed in the AOX supplemented group. However, milk P, Na, Cl, and Mg concentrations varied between glands. In the second experimental period differences were observed ($P < 0.01$) in milk vitamin E concentration and milk fat oxidative stability, attributable to AOX supplementation (both parameters were greater in the AOX group). In both experimental groups Ca and P concentration was greater ($P < 0.001$) when milking frequency was changed to once daily. Na and K concentrations were instead greater ($P < 0.01$) when milking was performed twice daily.

In the first experimental period no differences ($P > 0.10$) were noticed between glands or experimental period on the principal group of fatty acids (SFA, MUFA, PUFA). In the second administration period the administration of AOX did not influence ($P > 0.10$) the proportion of SFA, MUFA and PUFA, however it reduced ($P < 0.01$) the percentage of <16 C fatty acid and increased ($P < 0.05$) the percentage of fatty acids of >16C fatty acid. Milking frequency influenced ($P < 0.01$) MUFA proportion, which showed an increase at reducing milking frequency.

During the first experimental period, when both glands were milked twice daily, no difference in the somatic cell count was noticed between glands ($p > 0.10$). However during

the second experimental period the somatic cell count was greater ($p>0.05$) in glands that were milked once daily. Somatic cell count was not influenced by AOX supplementation ($p>0.10$) in any of the experimental periods.

Milking frequency did not influence ($p>0.10$) the alveolar diameter, the number of epithelial cells or the number of cases with inflammatory infiltration, however the intensity of the inflammation was greater in the glands undergoing once daily milking. Supplementing AOX did not modify the association between intensity of the inflammation and milking frequency.

The results obtained indicate that administering vitamin E and Se did increase the systemic antioxidant capacity, however did not modify the effect of milking frequency on neither production nor milk composition. The degree of inflammation of the mammary glands undergoing once daily milking were also not modulated by the antioxidant status of the animals.

The **second experimental study** had the objective of investigating the relationship between the milk production potential of the animals, the cistern capacity of the mammary gland and the short and long term effects on milking frequency reduction on milk production and composition, the health of the mammary gland and the metabolic profile. For this purpose, 21 assaf ewes were used and were divided into 3 groups of 7 animals each, accordingly to their milk production [**Group BP (low production:** between 1093 and 1790 g/day); **Group MP (medium production:** between 1990 and 2528 g/day); **Group AP (high production:** between 2663 and 3013 g/day)], age, weight, lactation number, days post partum, average production of milk, inter gland milk production ratio, cisternal milk quantity and inter gland cisternal milk ratio. The experimental period was of 10 weeks and was divided into two periods, during which milking frequency was modified from twice (TDM) to once (ODM) daily: period 1, 4 week duration (day 1 to 28), during which the ewes were milked twice daily (2x), and period 2, 6 week duration (day 29 to 70) during which the ewes were milked once daily (1x). For statistical analysis purposes period 2 was further subdivided into 2 periods in order to study the short (post period 1, days 29 and 30) and medium term (post period 2, days 32 to 70) effects of milking frequency change. On days 1, 7, 14, 28, 29, 30, 32, 35, 42, 49, 56, 63 and 70 each individual mammary gland milk production was measured, and a sample was collected in order to determine milk composition (milk solids, protein, fat and lactose) and somatic cell count. On days 28, 30, 32, 35, 49 and 70 of the experimental period blood samples were taken in order to measure

blood lactose concentration (as indicator of damage of the mammary epithelium tight junctions) and of other different metabolites that were used like markers of acute phase response (positive APP: haptoglobin, ceruloplasmin; negative APP: albumin, paraoxonase and total cholesterol), the oxidative status and hepatic function [(hydrogen peroxide, FRAP (*ferric reducing ability of plasma*) y GOT (aspartate amino-transferase)] and energetic and proteic metabolism [glucose, non esterified fatty acids (NEFAs), β -hydroxybutyrate and urea].

In the first 48 hours after the milking frequency was reduced, milking production decreased ($P<0.05$) in all 3 experimental groups, with the highest reduction values corresponding to group AP and the lowest values to BP group, with MP demonstrating an intermediate reduction, when said reduction was expressed in g/ewe and day. When the maximum reduction in milk production was expressed as percentages, group MP reduction values did not differ ($P>0.05$) from neither the BP nor the AP group values. The reduction in milk production immediately after the change in milk frequency was not related to the cisternal capacity in any experimental groups.

After reaching the minimum production value, milk production increased, describing a curve that was adjusted to the model proposed by Wood. No differences in the time needed to reach the new production peak after the change in milk frequency ($10\pm 1,1$ days) or in maximum milk production, expressed as quantity of milk recorded on the day before the change of milking frequency ($90\pm 1,6\%$) were noticed ($P>0.10$) between experimental groups. The level of milk production did not affect ($P>0.05$) the average persistency of milk production values in any of the experimental groups (before or after the change in milking frequency). However, the persistency decreased ($P<0.05$) with the reduction in milking frequency in the three experimental groups.

The production level ($P>0.10$) did not influence the content of any milk component that was determined. Both experimental period or day influenced ($P<0.001$) all studied milk components. The milk solid content was greater in the period post 2, in the three experimental groups, with no differences ($P>0.10$) encountered between the two periods. In all experimental groups, the highest or lowest milk fat contents corresponded to period post 2 and post 1, respectively. The milk fat content was greater in the period post 1, intermediate in post 2 and the lowest in the period pre, in all-experimental groups. Lactose content was also different ($P<0.05$) between the three periods and all experimental groups, with the highest and lowest values corresponding to period post 1 and post 2 respectively.

For what concerned udder health, no difference in somatic cell counts measured in the period before the milking frequency was modified was noticed ($P>0.10$) between experimental groups. However, the effects of both period and interaction of yield level x period were statistically significant ($P<0.05$). Differences between periods were noticed in the group AP and BP, but not in the MP group, with greater values noticed in the period post 2 compared to the period before the change in milking frequency. Lactose plasma concentration did not vary ($P>0.10$) with any of the statistical methods used.

The evaluation of the acute phase response reported that total cholesterol concentration was not affected ($P>0.10$) by experimental group, day of sampling or by the interaction of these two factors. However, the concentration of albumin increased after reducing the milking frequency, maintaining increased throughout the all-experimental period. Haptoglobin concentration was lower on days 30 and 35, with no differences encountered between the other sampling days. The highest paraoxonase concentration was recorded on day 70, with no difference between sampling days.

Plasma ROM concentration and the antioxidant capacity determined by FRAP varied ($p<0.001$) between sampling days, with the interaction between day and production level ($p<0.05$) being also statistically significant. The lowest values of plasma ROM concentration and FRAP were observed on day 30 (24 hours after the change in milking frequency), followed by different behaviours between experimental groups.

No difference ($p>0.10$) was noticed in the plasma concentration of the enzyme aspartate amino transferase between sampling days, production level or the interaction between them.

Plasma glucose concentration was influenced by the experimental group ($P<0.10$) and by the day ($P<0.05$). The highest plasma glucose concentration was noticed in the group MP, the intermediate values in the group MP and the lowest in the group BP. The lowest plasma glucose concentration was recorded on the last day of sampling (day 70), with no significant differences ($P>0.10$) between the other sampling days.

The experimental group did not influence ($P>0.10$) the plasma concentration of NEFAs however BHB concentrations were greater in group AP, intermediate in the group MP and lower in the group BP, trending towards significance ($P<0.10$). Sampling day

influenced ($P < 0.05$) both parameters, with the highest NEFAs concentration recorded on day 30 (24 hours after the change in milking frequency) and the lowest on days 32, 35, 49 and 70. In contrast to this, the lowest BHB values were recorded on day 28, with no differences noticed between the rest of the sampling days.

The results obtained indicated that there are differences in the short and medium term on milk production and composition due to milking frequency. After an intense reduction in the short term, there is recuperation in milk production, creating a new production peak whose value is proportional to the milk production before the modification in milking frequency. Nonetheless, the persistency of milk production decreased with the reduction in milking frequency and it also seems that the energetic and lipidic profiles modify, reducing gluconeogenesis and favouring ketone bodies production.

9 Referencias bibliográficas.

- Aardt, Van M., Duncan, S., Marcy, J., Long, T., O'Keefe, S., & Nielsen-Sims, S. (2005). Effect of antioxidant (α -tocopherol and ascorbic acid) fortification on light-induced flavor of milk. *Journal of Dairy Science*, 88(3), 872-880.
- Abascal, G., Blanco, A., Palacios, C., Martinez, A., Beneitez, E., Gonzalez, F., et al. (2004). In Consorcio de Promoción del Ovino (Ed.), *Buenas prácticas ganaderas, control de riesgos y sistemas integrales de calidad y seguridad alimentaria en las explotacioneslecheras de ganado ovino y caprino*. Zamora, España.
- Agre, P. (2006). The aquaporin water channels. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 3(1), 5-13.
- AKERS, M. R., BAUMAN, D. E., CAPUCO, A. V., GOODMAN, G. T., & TUCKER, A. H. (1981). Prolactin regulation of milk secretion and biochemical differentiation of mammary epithelial cells in periparturient cows*. *Endocrinology*, 109(1), 23-30.
- Akers, R. M. (2002). *Lactation and the mammary gland* (1st ed.). Ames, Iowa: Iowa State University Press.
- Akers, R. M., Heald, C. W., Bibb, T. L., & McGilliard, M. L. (1977). Effect of prepartum milk removal on quantitative morphology of bovine lactogenesis. *Journal of Dairy Science*, 60(8), 1273-1282.
- AKSAKAL, M., NAZIROĞLU, M., & Mehmet, Ç. A. Y. (1996). The effects of selenium and vitamin E on some hematological and biochemical values of blood in lambs. *TURKISH JOURNAL OF*
- Aldai, N., Lavín, P., Kramer, J. K., Jaroso, R., & Mantecón, A. R. (2012). Breed effect on quality veal production in mountain areas: emphasis on meat fatty acid composition. *Meat science*, 92(4), 687-696.
- Allen, D. B., DePeters, E., & Laben, R. (1986). Three times a day milking: Effects on milk production, reproductive efficiency, and udder health. *Journal of Dairy Science*, 69(5), 1441-1446.
- Andersen, J. B., Friggens, N. C., Larsen, T., Vestergaard, M., & Ingvarsten, K. L. (2004). Effect of energy density in the diet and milking frequency on plasma metabolites and hormones in early lactation dairy cows. *Transboundary and Emerging Diseases*, 51(2), 52-57.
- Anderson, R. R., & Wahab, I. M. (1990). Changes in parenchyma and stroma of goat udders during pregnancy, lactation and involution. *Small Ruminant Research*, 3(6), 605-615.
- Annen, E. L., Collier, R. J., McGuire, M. A., & Vicini, J. L. (2004). Effects of dry period length on milk yield and mammary epithelial cells. *Journal of Dairy Science*, 87, Supplement (0), E66-E76.
- Annison, G. (1993). The role of wheat non-starch polysaccharides in broiler nutrition. *Australian Journal of Agricultural Research*, 44(3), 405-422.
- ANTON, J. J. R.; MAYAYO, L. M. F. La exploración clínica del ganado ovino y su entorno . Zaragoza: Servet, 2007. 448 p.

- Antongiovanni, M., Secchiari, P., Mele, M., Boccioni, A., Serra, A., Ferruzzi, G., et al. (2002). Olive oil calcium soaps and rumen protected methionine in the diet of lactating ewes: Effect on milk quality. *Ital. J. Anim. Sci., 1*, 55-63.
- Appeddu, L. A., Ely, D. G., Aaron, D. K., Deweese, W. P., & Fink, E. (2004). Effects of supplementing with calcium salts of palm oil fatty acids or hydrogenated tallow on ewe milk production and twin lamb growth. *Journal of animal science, 82*(9), 2780-2789.
- Armstrong, D. P., & Ho, C. (2009). Economic impact of switching to once-a-day milking on a dairy farm in northern Victoria. *Australian Farm Business Management Journal, 6*(1), 55.
- Aschenbach, J. R., Kristensen, N. B., Donkin, S. S., Hammon, H. M., & Penner, G. B. (2010). Gluconeogenesis in dairy cows: the secret of making sweet milk from sour dough. *IUBMB life, 62*(12), 869-877.
- Assémat, E., Bazellières, E., Pallesi-Pocachard, E., Le Bivic, A., & Massey-Harroche, D. (2008). Polarity complex proteins. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 1778*(3), 614-630.
- Atabai, K., Sheppard, D., & Werb, Z. (2007). Roles of the innate immune system in mammary gland remodeling during involution. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia, 12*(1), 37-45.
- Atroshi, F., Rizzo, A., Kangasniemi, R., Sankari, S., Työppönen, T., Österman, T., et al. (1989). Role of plasma fatty acids, prostaglandins and antioxidant balance in bovine mastitis. *Journal of Veterinary Medicine Series A, 36*(10), 702-711.
- Atroshi, F., Työppönen, J., Sankari, S., Kangasniemi, R., & Parantainen, J. (1987). Possible roles of vitamin E and glutathione metabolism in bovine mastitis. *International Journal for Vitamin and Nutrition 57*(1), 37-43.
- Atwal, A. S., Hidioglou, M., Kramer, J. K. G., & Binns, M. R. (1990). Effects of feeding α -tocopherol and calcium salts of fatty acids on vitamin E and fatty acid composition of cow's milk. *Journal of Dairy Science, 73*(10), 2832-2841.
- Auchtung, T. L., Kendall, P. E., Salak-Johnson, J. L., McFadden, T. B., & Dahl, G. E. (2003). Photoperiod and bromocriptine treatment effects on expression of prolactin receptor mRNA in bovine liver, mammary gland and peripheral blood lymphocytes. *The Journal of Endocrinology, 179*(3), 347-356.
- Auchtung, T., Rius, A., Kendall, P., McFadden, T., & Dahl, G. (2005). Effects of photoperiod during the dry period on prolactin, prolactin receptor, and milk production of dairy cows. *Journal of Dairy Science, 88*(1), 121-127.
- Auldish, M. J., Walsh, B. J., & Thomson, N. A. (1998). Seasonal and lactational influences on bovine milk composition in new zealand. *Journal of Dairy Research, 65*(03), 401-411.
- Ayadi, M. (2003). Evaluación de la estructura interna de la ubre mediante ecografía y efectos de la frecuencia de ordeño en vacas lecheras. Universitat Autònoma de Barcelona. Departament de Ciència Animal i dels Aliments).
- Ayadi, M., Caja, G., Such, X., & Knight, C. (2003). Effect of omitting one milking weekly on lactational performances and morphological

- udder changes in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 86(7), 2352-2358.
- Ayadi, M., Hammadi, M., Khorchani, T., Barmat, A., Atigui, M., & Caja, G. (2009). Effects of milking interval and cisternal udder evaluation in Tunisian Maghrebi dairy dromedaries (*Camelus dromedarius* L.). *Journal of Dairy Science*, 92(4), 1452-1459.
- Ayadi, Moez; Gerardo Caja, Xavier Such and Christopher H Knight. Use of ultrasonography to estimate cistern size and milk storage at different milking intervals in the udder of dairy cows. *J. of Dairy Research*, 70(2003). pp.1-7
- Balıkcı, E., Yıldız, A., & Gürdoğan, F. (2007). Blood metabolite concentrations during pregnancy and postpartum in Akkaraman ewes. *Small Ruminant Research*, 67(2), 247-251.
- Banerjee, R., & Chen, H. (1995). Functional properties of edible films using whey protein concentrate. *Journal of Dairy Science*, 78(8), 1673-1683.
- Bar-Pelled, U., Maltz, E., Bruckental, I., Folman, Y., Kali, Y., Gacitua, H., et al. (1995). Relationship between frequent milking or suckling in early lactation and milk production of high producing dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 78(12), 2726-2736.
- Barbas, C., & Herrera, E. (1998). Lipid composition and vitamin E content in human colostrum and mature milk. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 54(3), 167-173.
- Barber, M. C., Clegg, R. A., Travers, M. T., & Vernon, R. G. (1997). Lipid metabolism in the lactating mammary gland. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, 1347(2-3), 101-126.
- Barrington, G. M., McFadden, T. B., Huylar, M. T., & Besser, T. E. (2001). Regulation of colostrumogenesis in cattle. *Livestock Production Science*, 70(1-2), 95-104.
- Bassett, N. S., Currie, M. J., Breier, B. H., Klempt, M., Min, S. H., McCutcheon, S. N., et al. (1998). The effects of ovine placental lactogen and bovine growth hormone on hepatic and mammary gene expression in lactating sheep. *Growth Hormone & IGF Research*, 8(6), 439-446.
- Batalla, M. I., Pinto, M., & del Hierro, O. (2014). Environmental, Social and Economic Aptitudes for Sustainable Viability of Sheep Farming Systems in Northern Spain. In *11th European IFSA Symposium 'Farming systems facing global challenges: Capacities and strategies'*, Berlin, Germany.
- Battaccone, G., Nudda, A., Cannas, A., Borlino, A. C., Bomboi, G., & Pulina, G. (2003). Excretion of aflatoxin M1 in milk of dairy ewes treated with different doses of aflatoxin B1. *Journal of Dairy Science*, 86(8), 2667-2675.
- Battaccone, G., Nudda, A., Palomba, M., Pascale, M., Nicolussi, P., & Pulina, G. (2005). Transfer of aflatoxin B1 from feed to milk and from milk to curd and whey in dairy sheep fed artificially contaminated concentrates. *Journal of Dairy Science*, 88(9), 3063-3069.
- Bauman, D. E., Mather, I. H., Wall, R. J., & Lock, A. L. (2006). Major advances associated with the biosynthesis of milk. *Journal of Dairy Science*, 89(4), 1235-1243.

- Bauman, D. E., McGuire, M. A., & Harvatine, K. J. (2011). MAMMARY GLAND, MILK BIOSYNTHESIS AND SECRETION | milk fat. In J. W. Fuquay (Ed.), *Encyclopedia of dairy sciences (second edition)* (pp. 352-358). San Diego: Academic Press.
- Baumrucker, C. R., Burkett, A. M., Magliaro-Macrina, A. L., & Dechow, C. D. (2010). Colostrogenesis: Mass transfer of immunoglobulin G1 into colostrum. *Journal of Dairy Science*, 93(7), 3031-3038.
- Baumrucker, C. R., Stark, A., Wellnitz, O., Dechow, C., & Bruckmaier, R. M. (2014). Short communication: Immunoglobulin variation in quarter-milked colostrum. *Journal of Dairy Science*, 97(6), 3700-3706.
- Baxter, F., Neoh, K., & Tevendale, M. (2007). The beginning of the end: Death signaling in early involution. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 12(1), 3-13.
- Beam, S. W., & Butler, W. R. (1999). Effects of energy balance on follicular development and first ovulation in postpartum dairy cows. *JOURNAL OF REPRODUCTION AND FERTILITY-SUPPLEMENT*, 411-424.
- Bednarek, D., Kondracki, M., & Cakala, S. (1996). Investigations into the influence of selenium and vitamin E on red and white blood pictures, on concentrations of several minerals and micro-elements in blood serum, and on immunologic parameters in calves. *DEUTSCHE TIERARZTLICHE WOCHENSCHRIFT*, 103(11), 457-459.
- Ben Chedly, H., Boutinaud, M., Bernier-Dodier, P., Marnet, P. -, & Lacasse, P. (2010). Disruption of cell junctions induces apoptosis and reduces synthetic activity in lactating goat mammary gland. *Journal of Dairy Science*, 93(7), 2938-2951.
- Ben Chedly, H., Lacasse, P., Marnet, P. -, Komara, M., Marion, S., & Boutinaud, M. (2011). Use of milk epithelial cells to study regulation of cell activity and apoptosis during once-daily milking in goats. *Animal*, 5(04), 572-579.
- Ben Chedly, H., Lacasse, P., Marnet, P., & Boutinaud, M. (2013). The decrease in milk yield during once daily milking is due to regulation of synthetic activity rather than apoptosis of mammary epithelial cells in goats. *Animal*, 7(01), 124-133.
- Bencini, R., & Pulina, G. (1997). The quality of sheep milk: A review. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 37(4), 485-504.
- Bequette, B. J., Hanigan, M. D., Calder, A. G., Reynolds, C. K., Loble, G. E., & MacRae, J. C. (2000). Amino acid exchange by the mammary gland of lactating goats when histidine limits milk production. *Journal of Dairy Science*, 83(4), 765-775.
- Bequette, B., & Douglass, L. (2010). The frequency of unilateral milking alters leucine metabolism and amino acid removal by the mammary gland of lactating goats. *Journal of Dairy Science*, 93(1), 162-169.
- Bergonier, D., De Crémoux, R., Rupp, R., Lagriffoul, G., & Berthelot, X. (2003). Mastitis of dairy small ruminants. *Veterinary research*, 34(5), 689-716.
- Bernier-Dodier, P., Delbecchi, L., Wagner, G.F., Talbot, B.G., Lacasse, P. Effect of milking frequency on lactation persistency and mammary gland remodeling in mid-lactation cows. *J. Dairy Sci.* 93(2010). pp. 555-564.

- Bernués, A., Ruiz, R., Olaizola, A., Villalba, D., & Casasús, I. (2011). Sustainability of pasture-based livestock farming systems in the european mediterranean context: Synergies and trade-offs. *Livestock Science*, 139(1), 44-57.
- Bertoni, G., & Trevisi, E. (2013). Use of the liver activity index and other metabolic variables in the assessment of metabolic health in dairy herds. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 29(2), 413-431.
- Bertoni, G., Minuti, A., & Trevisi, E. (2014). Immune system, inflammation and nutrition. In *Proceedings of the 5th Australasian Dairy Science Symposium* (p. 355).
- Bertoni, G., Trevisi, E., Han, X., & Bionaz, M. (2008). Effects of inflammatory conditions on liver activity in puerperium period and consequences for performance in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 91(9), 3300-3310.
- Bichi, E., Hervás, G., Toral, P. G., Loor, J. J., & Frutos, P. (2013). Milk fat depression induced by dietary marine algae in dairy ewes: Persistency of milk fatty acid composition and animal performance responses. *Journal of Dairy Science*, 96(1), 524-532.
- Bichi, E., Toral, P. G., Hervás, G., Frutos, P., Gómez-Cortés, P., Juárez, M., et al. (2012). Inhibition of Δ -9-desaturase activity with sterculic acid: Effect on the endogenous synthesis of cis-9 18: 1 and ciS-9, trans-11 18: 2 in dairy sheep. *Journal of Dairy Science*, 95(9), 5242-5252.
- Bionaz, M., Trevisi, E., Calamari, L., Librandi, F., Ferrari, A., & Bertoni, G. (2007). Plasma paraoxonase, health, inflammatory conditions, and liver function in transition dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 90(4), 1740-1750.
- Blaxter, K. L. (1962). The energy metabolism of ruminants. *The energy metabolism of ruminants*.
- Bligh, E.G., and Dyer W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37:911-917.
- Bocio, A., Nadal, M., & Domingo, J. L. (2005). Human exposure to metals through the diet in tarragona, spain. *Biological Trace Element Research*, 104(3), 193-201.
- Bocquier, F., & Caja, G. (2001). Production et composition du lait de brebis: Effets de l'alimentation. *INRA Productions Animales*, 14(2), 129-140.
- Bocquier, F., Caja, G. Production et composition du lait de brebis: effets de l'alimentation. *INRA Prod. Anim.* 14 (2001). pp. 129-140.
- Bodas, R. (2004). *El bicarbonato sódico en la alimentación de corderos en la etapa de crecimientocebo y de ovejas en lactación*. Tesis Doctoral. Universidad de León. España.
- Bodas, R., Tabernero de Paz, M. J., Bartolomé, D. J., Posado, R., García, J. J., Olmedo, S., & Rodríguez, L. (2013). Consumo eléctrico en granjas de ganado ovino lechero de Castilla y León. *Archivos de zootecnia*, 62(239), 439-446.
- Boersma, E. R., Offringa, P. J., Muskiet, F. A., Chase, W. M., & Simmons, I. J. (1991). Vitamin E, lipid fractions, and fatty acid composition of colostrum, transitional milk, and mature milk: An international comparative study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 53(5), 1197-1204.

- Bonnet, D. (2002). Haematopoietic stem cells1. *The Journal of Pathology*, 197(4), 430-440.
- Bordoni, A., Hrelia, S., Angeloni, C., Giordano, E., Guarnieri, C., Caldarera, C. M., & Biagi, P. L. (2002/2003). Green tea protection of hypoxia/reoxygenation injury in cultured cardiac cells. *The Journal of nutritional biochemistry*, 13(2), 103-111.
- Bourne, N., Wathes, D. C., Lawrence, K. E., McGowan, M., & Laven, R. A. (2008). The effect of parenteral supplementation of vitamin E with selenium on the health and productivity of dairy cattle in the UK. *The Veterinary Journal*, 177(3), 381-387.
- Boutinaud, M., & Jammes, H. (2004). Growth hormone increases Stat5 and Stat1 expression in lactating goat mammary gland: A specific effect compared to milking frequency. *Domestic Animal Endocrinology*, 27(4).
- Boutinaud, M., Chedly, M. B., Delamaire, E., & Guinard-Flament, J. (2008). Milking and feed restriction regulate transcripts of mammary epithelial cells purified from milk. *Journal of Dairy Science*, 91(3), 988-998.
- Boutinaud, M., Galio, L., Lollivier, V., Finot, L., Wiart, S., Esquerre, D., et al. (2013). Unilateral once daily milking locally induces differential gene expression in both mammary tissue and milk epithelial cells revealing mammary remodeling. *Physiological Genomics*, 45(20), 973-985.
- Boutinaud, M., Rousseau, C., Keisler, D. H., & Jammes, H. (2003). Growth hormone and milking frequency act differently on goat mammary gland in late lactation. *Journal of Dairy Science*, 86(2), 509-520.
- Bouwstra, R., Nielen, M., Newbold, J., Jansen, E., Jelinek, H., & Van Werven, T. (2010). Vitamin E supplementation during the dry period in dairy cattle. part II: Oxidative stress following vitamin E supplementation may increase clinical mastitis incidence postpartum. *Journal of Dairy Science*, 93(12), 5696-5706.
- Bouwstra, R., Nielen, M., Stegeman, J., Dobbelaar, P., Newbold, J., Jansen, E., et al. (2010). Vitamin E supplementation during the dry period in dairy cattle. part I: Adverse effect on incidence of mastitis postpartum in a double-blind randomized field trial. *Journal of Dairy Science*, 93(12), 5684-5695.
- Bradley, A. J. (2002). Bovine mastitis: An evolving disease. *The Veterinary Journal*, 164(2), 116-128.
- Brake, S. C., Tavana, S., & Myers, M. M. (1986). A method for recording and analyzing intra-oral negative pressure in suckling rat pups. *Physiology & Behavior*, 36(3), 575-578.
- Bramley, P., Elmadfa, I., Kafatos, A., Kelly, F., Manios, Y., Roxborough, H., et al. (2000). Vitamin E. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7), 913-938.
- Brenes, A., Viveros, A., Goni, I., Centeno, C., Sayago-Ayerdy, S. G., Arija, I., & Saura-Calixto, F. (2008). Effect of grape pomace concentrate and vitamin E on digestibility of polyphenols and antioxidant activity in chickens. *Poultry science*, 87(2), 307-316.
- Brew, K., Castellino, F. J., Vanaman, T. C., & Hill, R. L. (1970). The complete amino acid sequence of bovine α -lactalbumin. *Journal of Biological Chemistry*, 245(17), 4570-4582.
- Brew, K., Findlay, J.B., & Khatra, B. S. (1972). *The structure and regulation of the lactose*

- synthetase system* Retrieved from 1972 Nov database.
- Brockman, R. P. (1978). Roles of glucagon and insulin in the regulation of metabolism in ruminants. A review. *The Canadian Veterinary Journal*, 19(3), 55.
- Brockman, R. P. (1990). Effect of insulin on the utilization of propionate in gluconeogenesis in sheep. *British Journal of Nutrition*, 64(1), 95-101.
- Brockman, R. P., & Bergman, E. N. (1975). Effect of glucagon on plasma alanine and glutamine metabolism and hepatic gluconeogenesis in sheep. *American Journal of Physiology--Legacy Content*, 228(6), 1628-1633.
- Brozos, C. N., Kiossis, E., Georgiadis, M. P., Piperelis, S., & Boscos, C. (2009). The effect of chloride ammonium, vitamin E and se supplementation throughout the dry period on the prevention of retained fetal membranes, reproductive performance and milk yield of dairy cows. *Livestock Science*, 124(1-3), 210-215.
- Bruckmaier, R. (2005). Normal and disturbed milk ejection in dairy cows. *Domestic Animal Endocrinology*, 29(2), 268-273.
- Bruckmaier, R. M., & Blum, J. W. (1996). Simultaneous recording of oxytocin release, milk ejection and milk flow during milking of dairy cows with and without prestimulation. *Journal of Dairy Research*, 63(02), 201-208.
- Bruckmaier, R. M., & Hilger, M. (2001). Milk ejection in dairy cows at different degrees of udder filling. *Journal of Dairy Research*, 68(3), 369-376.
- BRUCKMAIER, R. M., PAUL, G., MAYER, H., & SCHAMS, D. (1997). Machine milking of ostfriesian and lacaune dairy sheep: Udder anatomy, milk ejection and milking characteristics. *Journal of Dairy Research*, 64(02), 163-172.
- Bruckmaier, R. M., Schams, D., & Blum, J. W. (1992). Aetiology of disturbed milk ejection in parturient primiparous cows. *Journal of Dairy Research*, 59(04), 479-489.
- Bruckmaier, R. M., Schams, D., & Blum, J. W. (1993). Milk removal in familiar and unfamiliar surroundings: Concentrations of oxytocin, prolactin, cortisol and β -endorphin. *Journal of Dairy Research*, 60(04), 449-456.
- Bruckmaier, R. M., Schams, D., & Blum, J. W. (1994). Continuously elevated concentrations of oxytocin during milking are necessary for complete milk removal in dairy cows. *Journal of Dairy Research*, 61(03), 323-334.
- Bruckmaier, R., & Blum, J. (1998). Oxytocin release and milk removal in ruminants. *Journal of Dairy Science*, 81(4), 939-949.
- Burgoyne, R. D., & Wilde, C. J. (1994). Control of secretory function in mammary epithelial cells. *Cellular Signalling*, 6(6), 607-616.
- Burvenich, C., Paape, M. J., Hill, A. W., Guidry, A. J., Miller, R. H., Heyneman, R., ... & Brand, A. (1994). Role of the neutrophil leucocyte in the local and systemic reactions during experimentally induced *E. coli* mastitis in cows immediately after calving. *Veterinary Quarterly*, 16(1), 45-50.
- Butler, W. R. (2003). Energy balance relationships with follicular development, ovulation and fertility in postpartum dairy cows. *Livestock production science*, 83(2), 211-218.

- Buxadé, C. (1996). Tomo VIII. producción ovina. *Zootecnia: Bases De Producción Animal*. Ediciones Mundi Prensa, Madrid-España,
- Caggiano, R., Sabia, S., D'Emilio, M., Macchiato, M., Anastasio, A., Ragosta, M., et al. (2005). Metal levels in fodder, milk, dairy products, and tissues sampled in ovine farms of southern Italy. *Environmental Research*, 99(1), 48-57.
- Caja, G., Ayadi, M., & Knight, C. H. (2004). Changes in cisternal compartment based on stage of lactation and time since milk ejection in the udder of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 87(8), 2409-2415.
- Caja, G., Such, X., & Rovai, M. (2000). Udder morphology and machine milking ability in dairy sheep. Paper presented at the *Dairy Sheep Symposium*, pp. 17-40.
- Calamari, L., Petretera, F., & Bertin, G. (2010). Effects of either sodium selenite or se yeast (sc CNCM I-3060) supplementation on selenium status and milk characteristics in dairy cows. *Livestock Science*, 128(1-3), 154-165.
- Caldeira, R. M., Belo, A. T., Santos, C. C., Vazques, M. I., & Portugal, A. V. (2007). The effect of body condition score on blood metabolites and hormonal profiles in ewes. *Small Ruminant Research*, 68(3), 233-241.
- Cannas, A., & Avondo, M. (2002). Relationships among milk fat content, energy balance and NDF intake in lactating ewes fed at pasture. [Abstract]. *Proceedings of the 53rd Annual Meeting of EAAP (European Association of Animal Production)*, 55.
- Cannas, A., Cabiddu, A., Bomboi, G., Ligios, S., Floris, B., & Molle, G. (2013). Decreasing dietary NFC concentration during mid-lactation of dairy ewes: Does it result in higher milk production? *Small Ruminant Research*, 111(1-3), 41-49.
- Cannas, A., Pes, A., Mancuso, R., Vodret, B., & Nudda, A. (1998). Effect of dietary energy and protein concentration on the concentration of milk urea nitrogen in dairy ewes. *Journal of Dairy Science*, 81(2), 499-508.
- Cannas, A., Tedeschi, L. O., Fox, D. G., Pell, A. N., & Van Soest, P. J. (2004). A mechanistic model for predicting the nutrient requirements and feed biological values for sheep. *Journal of Animal Science*, 82(1), 149-169.
- Capote, J., Argüello, A., Castro, N., López, J., & Caja, G. (2006). Short communication: Correlations between udder morphology, milk yield, and milking ability with different milking frequencies in dairy goats. *Journal of Dairy Science*, 89(6), 2076-2079.
- Capper, J. L., Wilkinson, R. G., Kasapidou, E., Pattinson, S. E., Mackenzie, A. M., & Sinclair, L. A. (2005). The effect of dietary vitamin E and fatty acid supplementation of pregnant and lactating ewes on placental and mammary transfer of vitamin E to the lamb. *British Journal of Nutrition*, 93(04), 549-557.
- Capuco, A. V., Ellis, S. E., Hale, S. A., Long, E., Erdman, R. A., Zhao, X., & Paape, M. J. (2003). Lactation persistency: insights from mammary cell proliferation studies. *Journal of animal science*, 81(suppl_3), 18-31.
- Capuco, A. V., Wood, D. L., Baldwin, R., Mcleod, K., & Paape, M. J. (2001). Mammary cell number, proliferation, and apoptosis during a bovine lactation: Relation to milk production and effect of bST. *Journal of Dairy Science*, 84(10), 2177-2187.

- Capuco, A., & Akers, R. M. (1999). Mammary involution in dairy animals. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 4(2), 137-144.
- Caroprese, M., Albenzio, M. F., Muscio, A. F., & Sevi, A. (2006). *Relationship between welfare and udder health indicators in dairy ewes*. Retrieved from 2006 Jan database.
- Carruthers, V., Davis, S., & Norton, D. (1991). The effects of oxytocin and bovine somatotropin on production of cows milked once a day. Paper presented at the *Proc. NZ Soc. Anim. Prod.*, 51. pp. 197-201.
- Carta, A., Sanna, S. R., & Casu, S. (1995). Estimating lactation curves and seasonal effects for milk, fat and protein in Sarda dairy sheep with a test day model. *Livestock Production Science*, 44(1), 37-44.
- Castañares Castro, N. (2008). *Recría de corderas de raza ASSAF española: Efecto de la alimentación entre el nacimiento y los 5 meses de edad sobre el crecimiento de los animales, el desarrollo de la glándula mamaria y la producción de leche en la primera lactación*. Tesis Doctoral. Universidad de León.
- Castañares, N., Colitti, M., Nudda, A., Stefanon, B., & Pulina, G. (2013). Dynamics of mammary secretory cells in lactating dairy ewes. *Small Ruminant Research*, 113(1), 251-253. doi:10.1016/j.smallrumres.2013.01.003
- Castillo López, V. (2008). Evaluación de diferentes estrategias de ordeño en ovejas lecheras de raza manchega y lacaune: Efectos de la disminución de la frecuencia de ordeño sobre la secreción y el almacenamiento de la leche en la ubre. Tesis Doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona.
- Castillo, V., Such, X., Caja, G., Casals, R., Albanell, E., & Salama, A. A. K. (2008). Effect of milking interval on milk secretion and mammary tight junction permeability in dairy ewes. *Journal of Dairy Science*, 91(7), 2610-2619.
- Castillo, V., Such, X., Caja, G., Casals, R., Salama, A. A. K., & Albanell, E. (2009). Long- and short-term effects of omitting two weekend milkings on the lactational performance and mammary tight junction permeability of dairy ewes. *Journal of Dairy Science*, 92(8), 3684-3695.
- Castillo, V., Such, X., Caja, G., Salama, A. A. K., Albanell, E., & Casals, R. (2008). Changes in alveolar and cisternal compartments induced by milking interval in the udder of dairy ewes. *Journal of Dairy Science*, 91(9), 3403-3411.
- Castro-Carrera, T., Toral, P. G., Frutos, P., McEwan, N., Hervás, G., Abecia, L., et al. (2014). Rumen bacterial community evaluated by 454 pyrosequencing and terminal restriction fragment length polymorphism analyses in dairy sheep fed marine algae. *Journal of Dairy Science*, 97(3), 1661-1669.
- Casu, S., & Labussière, J. (1972). Premiers résultats concernant la suppression d'une ou plusieurs traites par semaine chez la brebis sarde. Paper presented at the *Annales De Zootechnie*, 21. (2) pp. 223-232.
- Çay, M., & Naziroğlu, M. (1999). Effects of intraperitoneally administered vitamin E and selenium on the blood biochemical and haematological parameters in rats. *Cell biochemistry and function*, 17(2), 143-148.
- Celi, P. (2011). Biomarkers of oxidative stress in ruminant medicine. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 33(2), 233-240.

- Chappell, J. E., Francis, T., & Clandinin, M. T. (1985). Vitamin A and E content of human milk at early stages of lactation. *Early Human Development*, 11(2), 157-167.
- Charismiadou, M. A., Bizelis, J. A., & Rogdakis, E. (2000). Metabolic changes during the perinatal period in dairy sheep in relation to level of nutrition and breed. I. Late pregnancy. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 84(3□4-4), 61-72.
- Charmley, E., & Nicholson, J. (1994). Influence of dietary fat source on oxidative stability and fatty acid composition of milk from cows receiving a low or high level of dietary vitamin E. *Canadian Journal of Animal Science*, 74(4), 657-664.
- Charmley, E., Nicholson, J., & Zee, J. (1993). Effect of supplemental vitamin E and selenium in the diet on vitamin E and selenium levels and control of oxidized flavor in milk from holstein cows. *Canadian Journal of Animal Science*, 73(2), 453-457.
- Chauhan, S., Celi, P., Leury, B., Clarke, I., & Dunshea, F. (2014). Dietary antioxidants at supranutritional doses improve oxidative status and reduce the negative effects of heat stress in sheep. *Journal of Animal Science*, 92(8), 3364-3374.
- Chawla, R., & Kaur, H. (2004). Plasma antioxidant vitamin status of periparturient cows supplemented with α -tocopherol and β -carotene. *Animal feed science and technology*, 114(1), 279-285.
- Chedly, H. B., Lacasse, P., Marnet, P. G., Komara, M., Marion, S., & Boutinaud, M. (2011). Use of milk epithelial cells to study regulation of cell activity and apoptosis during once-daily milking in goats. *animal*, 5(4), 572-579.
- Chikunya, S., Demirel, G., Enser, M., Wood, J. D., Wilkinson, R. G., & Sinclair, L. A. (2004). Biohydrogenation of dietary n-3 PUFA and stability of ingested vitamin E in the rumen, and their effects on microbial activity in sheep. *British Journal of Nutrition*, 91(4), 539-550.
- Chilliard, Y. (1993). Dietary fat and adipose tissue metabolism in ruminants, pigs, and rodents: A review. *Journal of Dairy Science*, 76(12), 3897-3931.
- Chilliard, Y., Delavaud, C., & Bonnet, M. (2005). Leptin expression in ruminants: nutritional and physiological regulations in relation with energy metabolism. *Domestic animal endocrinology*, 29(1), 3-22.
- Chilliard, Y., Ferlay, A., Rouel, J., & Lamberet, G. (2003). A review of nutritional and physiological factors affecting goat milk lipid synthesis and lipolysis. *Journal of Dairy Science*, 86(5), 1751-1770.
- Chilliard, Y., Glasser, F., Ferlay, A., Bernard, L., Rouel, J., & Doreau, M. (2007). Diet, rumen biohydrogenation and nutritional quality of cow and goat milk fat. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109(8), 828-855.
- Chilliard, Y., Toral, P. G., Shingfield, K. J., Rouel, J., Leroux, C., & Bernard, L. (2014). Effects of diet and physiological factors on milk fat synthesis, milk fat composition and lipolysis in the goat: A short review. *Small Ruminant Research*, 122(1), 31-37.
- Christie, W.W. Preparation of lipid extracts from tissues in *Advances in Lipid Methodology – Two* (1993) pp195-213.

- Clark, D., Phyn, C., Tong, M., Collis, S., & Dalley, D. (2006). A systems comparison of once-versus twice-daily milking of pastured dairy cows. *Journal of Dairy Science*, *89*(5), 1854-1862.
- Clausen, M. R., Connolly, C., Skibsted, L. H., & Stagsted, J. (2010). Oxidative stability of bovine milk determined by individual variability in herd irrespective of selenium status. *International Dairy Journal*, *20*(8), 507-513.
- Clegg, R. A., Barber, M. C., Pooley, L., Ernens, I., Larondelle, Y., & Travers, M. T. (2001). Milk fat synthesis and secretion: Molecular and cellular aspects. *Livestock Production Science*, *70*(1-2), 3-14.
- Colitti, M., Stradaoli, G., & Stefanon, B. (2000). Effect of α -tocopherol deprivation on the involution of mammary gland in sheep. *Journal of Dairy Science*, *83*(2), 345-350.
- Conchillo, A., Valencia, I., Puente, A., Ansorena, D., & Astiasarán, I. (2006). Componentes funcionales en aceites de pescado y de alga. *Nutrición Hospitalaria*, *21*(3), 369-373.
- CONI, E., BOCCA, B., & CAROLI, S. (1999). Minor and trace element content of two typical Italian sheep dairy products. *Journal of Dairy Research*, *66*(04), 589-598.
- Connor, E. E., Siferd, S., Elsasser, T. H., Evock-Clover, C. M., Van Tassell, C. P., Sonstegard, T. S., et al. (2008). Effects of increased milking frequency on gene expression in the bovine mammary gland. *BMC Genomics*, *9*, 362-2164-9-362.
- Convey, E. M. (1974). Serum hormone concentration in ruminants during mammary growth, lactogenesis, and lactation: A review. *Journal of Dairy Science*, *57*(8), 905-917.
- Cortes, J. F. C., Robinson, J. J., McHattie, I., & Fraser, C. (1977). The sensitivity of ewe milk yield to changes in dietary crude protein concentration [Abstract]. *Anim. Prod.*, *24* 135.
- Couto Hack, A. K. (2011). Caracterización genética y perfil hematológico y bioquímico en ovinos de raza "Criolla lanada serrana" del Planalto Serrano Catarinense-Santa Catarina, Brasil.
- Cowan, R. T., Robinson, J. J., McHattie, I., & Pennie, K. (1981). Effects of protein concentration in the diet on milk yield, change in body composition and the efficiency of utilization of body tissue for milk production in ewes. *Animal Science*, *33*(02), 111-120.
- Craven, P. A., Caines, M. A., & DeRubertis, F. R. (1987). Sequential alterations in glomerular prostaglandin and thromboxane synthesis in diabetic rats: Relationship to the hyperfiltration of early diabetes. *Metabolism*, *36*(1), 95-103.
- CROSS, B. A. (1955). Neurohormonal mechanisms in emotional inhibition of milk ejection. *The Journal of Endocrinology*, *12*(1), 29-37.
- Cross, B., & Peaker, M. (1977). Comparative physiology of milk removal. *UK, Zoological Society of London: Comparative Aspects of Lactation*. 193-210.
- CROWLEY, W. R., & ARMSTRONG, W. E. (1992). Neurochemical regulation of oxytocin secretion in lactation. *Endocrine Reviews*, *13*(1), 33-65.
- Culotta, C. P., & Schmidt, G. H. (1988). An economic evaluation of three times daily milking of dairy Cows¹. *Journal of Dairy Science*, *71*(7), 1960-1966.

- Cunningham, James G. Fisiología Veterinaria. 3era Ed. Elsevier Ed. España (2003). pp.406-420.
- Cunsolo, V., Fasoli, E., Di Francesco, A., Saletti, R., Muccilli, V., Gallina, S., ... & Foti, S. (2017). Polyphemus, Odysseus and the ovine milk proteome. *Journal of Proteomics*, 152, 58-74.
- Dahl, G. (2002). Milking frequency effects in early lactation. *Proc.of the Dairy Summit.Minnetonka, Minn,*
- Dahl, G. E., Wallace, R. L., Shanks, R. D., & Lueking, D. (2004). Hot topic: Effects of frequent milking in early lactation on milk yield and udder health.*Journal of Dairy Science*, 87(4), 882-885.
- Dahl, G., Wallace, R., Shanks, R., & Lueking, D. (2004). Hot topic: Effects of frequent milking in early lactation on milk yield and udder health. *Journal of Dairy Science*, 87(4), 882-885.
- Davis, P., McDowell, L., Wilkinson, N., Buergelt, C., Alstyne, R. V., Weldon, R., et al. (2006). Effects of selenium levels in ewe diets on selenium in milk and the plasma and tissue selenium concentrations of lambs. *Small Ruminant Research*, 65(1), 14-23.
- DAVIS, S. R., FARR, V. C., COPEMAN, P. J., CARRUTHERS, V. R., KNIGHT, C. H., & STELWAGEN, K. (1998). Partitioning of milk accumulation between cisternal and alveolar compartments of the bovine udder: Relationship to production loss during once daily milking. *Journal of Dairy Research*, 65(01), 1-8.
- Davis, S., Farr, V., & Stelwagen, K. (1999). Regulation of yield loss and milk composition during once-daily milking: A review. *Livestock Production Science*, 59(1), 77-94.
- De la Fuente, L., Fernández, G., & San Primitivo, F. (1996). A linear evaluation system for udder traits of dairy ewes. *Livestock Production Science*, 45(2), 171-178.
- Debier, C., & Larondelle, Y. (2005/2006). Vitamins A and E: Metabolism, roles and transfer to offspring. *British Journal of Nutrition*, 93(02), 153-174.
- Debier, C., Pottier, J., Goffe, C., & Larondelle, Y. (2005). Present knowledge and unexpected behaviours of vitamins A and E in colostrum and milk. *Livestock Production Science*, 98(1-2), 135-147.
- del Estado, B. O. (2013). Real Decreto 53/2013 por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia. *BOE*, 34, 11370-11421.
- Delamaire, E., & Guinard-Flament, J. (2006). Increasing milking intervals decreases the mammary blood flow and mammary uptake of nutrients in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 89(9), 3439-3446.
- Delamaire, E., & Guinard-Flament, J. Longer milking intervals alter mammary epithelial permeability and the udder's ability to extract nutrients. *J. Dairy Sci.* 89(2006b) pp.2007-2016.
- DePeters, E., Smith, N., & Acedo-Rico, J. (1985). Three or two times daily milking of older cows, and first lactation cows for entire lactations. *Journal of Dairy Science*, 68(1), 123-132.

- Dewhurst, R. J., & Knight, C. H. (1993). An investigation of the changes in sites of milk storage in the bovine udder over two lactation cycles. *Animal Science*, 57(3), 379-384.
- Dimitrov, N. V., Meyer, C., Gilliland, D., Ruppenthal, M., Chenoweth, W., & Malone, W. (1991). Plasma tocopherol concentrations in response to supplemental vitamin E. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 53(3), 723-729.
- Djonov, V., FAU, A. A., & Ziemiecki, A. (2001). *Vascular remodelling during the normal and malignant life cycle of the mammary gland*. Retrieved from 2001 Jan 15 database.
- Donker, J. D. (1958). Lactation studies. I. effects upon milk ejection in the bovine of various injection treatments using oxytocin and relaxin. *Journal of Dairy Science*, 41(4), 537-544.
- Doreau, M., & Chilliard, Y. (1992). Influence d'une supplémentation de la ration en lipides sur la qualité du lait chez la vache. *Inra Productions Animales*, 5(2), 103-111.
- Drackley, J. K., & Andersen, J. B. (2006). Splanchnic metabolism of long-chain fatty acids in ruminants. *Ruminant Physiology: Digestion, Metabolism and Impact of Nutrition on Gene Expression, Immunology and Stress*. K. Sejrsen, T. Hvelplund, and MO Nielsen, ed. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, the Netherlands, 199-224.
- Driggers, P. H., & Segars, J. H. (2002). Estrogen action and cytoplasmic signaling pathways. part II: The role of growth factors and phosphorylation in estrogen signaling. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 13(10), 422-427.
- Dunn, T. G., & Kaltenbach, C. C. (1979/1980). Nutrition and the postpartum interval of the ewe, sow and cow. *Journal of Animal Science*, 51 Suppl 2, 29-39.
- El-Zarei, M. F. (2005). *Detección de QTLs implicados en la producción láctea y en la morfología mamaria mediante secuencias microsatélite en el ganado ovino*. Tesis Doctoral. Universidad de León.
- Emery, R. S. (1988). Milk fat depression and the influence of diet on milk composition. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, 4(2), 289-305.
- Erdman, R. A., & Varner, M. (1995). Fixed yield responses to increased milking frequency. *Journal of Dairy Science*, 78(5), 1199-1203.
- Faixova, Z., Faix, Š., Leng, L., Vaczi, P., Makova, Z., & Szaboova, R. (2007). Haematological, blood and rumen chemistry changes in lambs following supplementation with Se-yeast. *Acta Veterinaria Brno*, 76(1), 3-8.
- Farmer, C. (2001). The role of prolactin for mammatogenesis and galactopoiesis in swine. *Livestock Production Science*, 70(1-2), 105-113.
- Farr, V. C., Prosser, C. G., & Davis, S. R. (2000). Effects of mammary engorgement and feed withdrawal on microvascular function in lactating goat mammary glands. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 279(4), H1813-8.
- Farr, V., Prosser, C., Clark, D., Tong, M., Cooper, C., Willix-Payne, D., et al. (2002). Lactoferrin concentration is increased in milk from cows milked once daily. Paper presented at the *Proceedings-New Zealand Society of Animal Production*, , 62. pp. 225-226.

- Fatima, A., & Morris, D. G. (2013). MicroRNAs in domestic livestock. *Physiological Genomics*, 45(16),685-696.
- Faulconnier, Y., Chilliard, Y., Torbati, M. B. M., & Leroux, C. (2011). The transcriptomic profiles of adipose tissues are modified by feed deprivation in lactating goats. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 6(2), 139-149.
- Feng, S., Lock, A. L., & Garnsworthy, P. C. (2004). Technical note: A rapid lipid separation method for determining fatty acid composition of milk. *Journal of Dairy Science*, 87(11), 3785-3788.
- Feng, Z., Marti, A. F., Jehn B FAU - Altermatt, H.J., FAU, A. H., Chicaiza, G. F., & Jaggi, R. (1995). *Glucocorticoid and progesterone inhibit involution and programmed cell death in the mouse mammary gland* Retrieved from 1995 Nov database.
- Fernandez, G., Alvarez, P., San Primitivo, F., & de la Fuente, L. F. (1995). Factors affecting variation of udder traits of dairy ewes. *Journal of Dairy Science*, 78(4), 842-849.
- Fernández, N. (1985). Estudio de las características y aptitud al ordeño mecánico de la raza de ovejas manchega. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia.
- Ferris, C., Frost, J., Mayne, C., McCoy, M., & Kilpatrick, D. (2008). A comparison of the direct and residual response of dairy cows to once or twice-daily milking, in late lactation. *Livestock Science*, 114(2), 305-314.
- Finch, J., & Turner, R. (1996). Effects of selenium and vitamin E on the immune responses of domestic animals. *Research in Veterinary Science*, 60(2), 97-106.
- Flamant, J. C., & Morand-Fehr, P. (1981/1982). Milk production in sheep and goats. *Sheep and goat production*, 275-295.
- Focant, M., Mignolet, E., Marique, M., Clabots, F., Breyne, T., Dalemans, D., et al. (1998). The effect of vitamin E supplementation of cow diets containing rapeseed and linseed on the prevention of milk fat oxidation. *Journal of Dairy Science*, 81(4), 1095-1101.
- Folley, S., & Knaggs, G. (1965). Oxytocin levels in the blood of ruminants with special reference to the milking stimulus. *Advances in Oxytocin Research*, 37-49.
- Folman, Y., Volcani, R., & Eyal, E. (1966). Mother-offspring relationships in Awassi sheep: I. The effect of different suckling regimes and time of weaning on the lactation curve and milk yield in dairy flocks. *The Journal of Agricultural Science*, 67(3), 359-368.
- Forsyth, I. A. (1986). Variation among species in the endocrine control of mammary growth and function: The roles of prolactin, growth hormone, and placental lactogen. *Journal of Dairy Science*, 69(3), 886-903.
- Frei, B. (1994). Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: Mechanisms of action. *The American Journal of Medicine*, 97(3), S5-S13.
- Galio, L., Droineau, S., Yeboah, P., Boudiaf, H., Bouet, S., Truchet, S., et al. (2013). MicroRNA in the ovine mammary gland during early pregnancy: Spatial and temporal expression of miR-21, miR-205, and miR-200. *Physiological Genomics*, 45(4), 151-161.
- Gallego, L. (1983). Análisis de lactación y respuesta al ordeño mecánico en ovejas de raza

- manchega. Universidad Politécnica de Valencia, España).
- García, C. D., Hernández, M. P., Cantalapiedra, G., Salas, J. M., & Merino, J. A. (2005). Bypassing the rumen in dairy ewes: the reticular groove reflex vs. calcium soap of olive fatty acids. *Journal of dairy science*, 88(2), 741-747.
- Gargouri, A., Caja, G., Casals, R., & Mezghani, I. (2006). Lactational evaluation of effects of calcium soap of fatty acids on dairy ewes. *Small Ruminant Research*, 66(1), 1-10.
- Gargouri, A., Such, X., Caja, G., Casals, R., Ferret, A., Vbergara, H., et al. (1993). Estrategias de cria-ordeño en ovino lechero: 1. efecto del tipo de cria (libre o restringida) y número de ordeños diarios (2 ó 3) sobre la producción de leche de ovejas de raza manchega. *Información Técnica Económica Agraria (ITEA)*, 30-32.
- Gaucheron, F. (2005). The minerals of milk. *Reprod.Nutr.Dev.*, 45(4), 473-483.
- Gaynor, P., Waldo, D., Capuco, A., Erdman, R., Douglass, L., & Teter, B. (1995). Milk fat depression, the glucogenic theory, and Trans C 18:1 fatty acids. *Journal of Dairy Science*, 78(9), 2008-2015.
- Gelasakis, A. I., Arsenos, G., Valergakis, G. E., Oikonomou, G., Kioussis, E., & Fthenakis, G. C. (2012). Study of factors affecting udder traits and assessment of their interrelationships with milking efficiency in chios breed ewes. *Small Ruminant Research*, 103(2-3), 232-239.
- Giadinis, N., Panousis, N., Petridou, E., Siarkou, V., Lafi, S., Pourliotis, K., et al. (2011). Selenium, vitamin E and vitamin A blood concentrations in dairy sheep flocks with increased or low clinical mastitis incidence. *Small Ruminant Research*, 95(2), 193-196.
- Gleeson, D. E., O'Brien, B., Boyle, L., & Earley, B. (2007). Effect of milking frequency and nutritional level on aspects of the health and welfare of dairy cows. *Animal*, 1(1), 125-132.
- González Calvo, L., Ripoll García, G., Molino Gahete, F., Pérez Velasco, L., Sarto Aured, M. P., Serrano, M., ... & Calvo Lacosta, J. H. (2013). Efecto de la suplementación con vitamina E en los ácidos grasos poliinsaturados y en la expresión de genes relacionados con el metabolismo lipídico en L. Thoracis de corderos ligeros. AIDA.
- González-García, E., Tesniere, A., Camous, S., Bocquier, F., Barillet, F., & Hassoun, P. (2015). The effects of parity, litter size, physiological state, and milking frequency on the metabolic profile of lacaune dairy ewes. *Domestic Animal Endocrinology*, 50, 32-44.
- González-Rodríguez, M. C., Gonzalo, C., San Primitivo, F., & Cármenes, P. (1995). Relationship between somatic cell count and Intramammary infection of the half udder in dairy ewes. *Journal of Dairy Science*, 78(12), 2753-2759.
- Gonzalo, C., Ariznabarreta, A., Carriedo, J. A., & San Primitivo, F. (2002). Mammary pathogens and their relationship to somatic cell count and milk yield losses in dairy ewes. *Journal of Dairy Science*, 85(6), 1460-1467.
- Gonzalo, C., Baro, J. A., Carriedo, J. A., & Primitivo, F. S. (1993). Use of the fossomatic method to determine somatic cell counts in sheep milk. *Journal of Dairy Science*, 76(1), 115-119.

- Gonzalo, C., Boixo, J. C., Carriedo, J. A., & San Primitivo, F. (2004). Evaluation of rapid somatic cell counters under different analytical conditions in ovine milk. *Journal of Dairy Science*, 87(11), 3623-3628.
- Gonzalo, C., Martínez, J., Carriedo, J., & San Primitivo, F. (2003). Fossomatic cell-counting on ewe milk: Comparison with direct microscopy and study of variation factors. *Journal of Dairy Science*, 86(1), 138-145.
- Goodwin, T. M., Paul, R., Silver, H., Spellacy, W., Parsons, M., Chez, R., et al. (1994). The effect of the oxytocin antagonist atosiban on preterm uterine activity in the human. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 170(2), 474-478.
- Goodwin, T. M., Valenzuela, G., Silver, H., Creasy, G., & Atosiban Study Group. (1996). Dose ranging study of the oxytocin antagonist atosiban in the treatment of preterm labor. *Obstetrics & Gynecology*, 88(3), 331-336.
- Gootwine, E., Alef, B., & Gadeesh, S. (1980). Udder conformation and its heritability in the assaf (awassi \bar{A} — east friesland) cross of dairy sheep in israel. *Genetics Selection Evolution*, 12(1), 1-5.
- Gorewit, R., Aromando, M., & Bristol, D. (1989). Measuring bovine mammary gland blood flow using a transit time ultrasonic flow probe. *Journal of Dairy Science*, 72(7), 1918-1928.
- Goulas, C., Zervas, G., & Papadopoulos, G. (2003). Effect of dietary animal fat and methionine on dairy ewes milk yield and milk composition. *Animal Feed Science and Technology*, 105(1-4), 43-54.
- Grala, T., Phyn, C., Kay, J., Rius, A., Littlejohn, M., Snell, R., et al. (2011). Temporary alterations to milking frequency, immediately post-calving, modified the expression of genes regulating milk synthesis and apoptosis in the bovine mammary gland. Paper presented at the *Proc. NZ Soc. Anim. Prod.*, 71. pp. 3-8.
- Grala, T., Roche, J., Kay, J., Rius, A., White, H., Donkin, S., et al. (2014). The expression of genes involved in hepatic metabolism is altered by temporary changes to milking frequency. *Journal of Dairy Science*, 97(2), 838-850.
- Gregoraszczuk, E. L., Zia, D., Wierzchoś, E., Murawski, M., & Gertler, A. (2000). Placental lactogen as a regulator of luteal cells function during pregnancy in sheep. *Theriogenology*, 53(4), 877-885.
- Griinari, J. M., Dwyer, D. A., McGuire, M. A., Bauman, D. E., Palmquist, D. L., & Nurmela, K. V. V. (1998). Trans-octadecenoic acids and milk fat depression in lactating dairy Cows1. *Journal of Dairy Science*, 81(5), 1251-1261.
- Griinari, J. M., McGuire, M. A., Dwyer, D. A., Bauman, D. E., Barbano, D. M., & House, W. A. (1997). The role of insulin in the regulation of milk protein synthesis in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 80(10), 2361-2371.
- Grimble, R. F. (1998). Nutritional modulation of cytokine biology. *Nutrition*, 14(7), 634-640.
- Gross, J. J., Kessler, E. C., Bjerre-Harpoth, V., Dechow, C., Baumrucker, C. R., & Bruckmaier, R. M. (2014). Peripartal progesterone and prolactin have little effect on the rapid transport of immunoglobulin G into colostrum of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 97(5), 2923-2931.
- Gross, J., van Dorland, H. A., Bruckmaier, R. M., & Schwarz, F. J. (2011). Milk fatty acid profile related to energy balance in dairy

- cows. *Journal of dairy research*, 78(04), 479-488.
- Grossi, P. A. O. L. O., Bertoni, G., Cappelli, F. P., & Trevisi, E. R. M. I. N. I. O. (2012/ 2013). Effects of the precalving administration of omega-3 fatty acids alone or in combination with acetylsalicylic acid in periparturient dairy cows. *Journal of Animal Science*, 91(6), 2657-2666.
- Guinard-Flament, J., Delamaire, E., Lamberton, P., & Peyraud, J. (2007). Adaptations of mammary uptake and nutrient use to once-daily milking and feed restriction in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 90(11), 5062-5072.
- Guinard-Flament, J., Delamaire, E., Lemosquet, S., Boutinaud, M., & David, Y. (2006). Changes in mammary uptake and metabolic fate of glucose with once-daily milking and feed restriction in dairy cows. *Reproduction Nutrition Development*, 46(5), 589-598.
- Guinard-Flament, J., Lemosquet, S., Delamaire, E., Le Bris, G., Lamberton, P., & Hurtaud, C. (2011). Alteration of the nutrient uptake by the udder over an extended milking interval in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 94(11), 5458-5468.
- Gutiérrez-Gil, B., Arranz, J. J., Pong-Wong, R., García-Gómez, E., Kijas, J., & Wiener, P. (2014). Application of selection mapping to identify genomic regions associated with dairy production in sheep. *PLoS One*, 9(5), e94623.
- Gutiérrez-Gil, B., El-Zarei, M. F., Alvarez, L., Bayón, Y., de la Fuente, L. F., San Primitivo, F., et al. (2008). Quantitative trait loci underlying udder morphology traits in dairy sheep. *Journal of Dairy Science*, 91(9), 3672-3681.
- Guyot, H., Spring, P., Andrieu, S., & Rollin, F. (2007). Comparative responses to sodium selenite and organic selenium supplements in belgian blue cows and calves. *Livestock Science*, 111(3), 259-263.
- Hadorn, H., & Zurcher, K. (1974). Zur bestimmung der oxydationsstabilitat von olen und fetten. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*.
- Haenlein, G. (2001). Past, present, and future perspectives of small ruminant dairy research. *Journal of Dairy Science*, 84(9), 2097-2115.
- Hale, S., Capuco, A., & Erdman, R. (2003). Milk yield and mammary growth effects due to increased milking frequency during early lactation. *Journal of Dairy Science*, 86(6), 2061-2071.
- Halliwell, B. (1991). Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry, and role in human disease. *The American Journal of Medicine*, 91(3), S14-S22.
- Hanayama, R., & Nagata, S. (2005). Impaired involution of mammary glands in the absence of milk fat globule EGF factor 8. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(46), 16886-16891.
- Hansen, H. O., & Knudsen, J. (1987). Effect of exogenous long-chain fatty acids on individual fatty acid synthesis by dispersed ruminant mammary gland cells. *Journal of Dairy Science*, 70(7), 1350-1354.
- Hansen, H. O., & Knudsen, J. (1987). Effect of exogenous long-chain fatty acids on lipid biosynthesis in dispersed ruminant mammary gland epithelial cells: esterification of long-chain exogenous fatty acids. *Journal of Dairy Science*, 70(7), 1344-1349.

- Harmon, R. J. (1994). Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. *Journal of Dairy Science*, 77(7), 2103-2112.
- Hart, I. C., Chadwick, P. M. E., Coert, A., James, S., & Simmonds, A. D. (1985). Effect of different growth hormone-releasing factors on the concentrations of growth hormone, insulin and metabolites in the plasma of sheep maintained in positive and negative energy balance. *Journal of endocrinology*, 105(1), 113-119.
- Hartmann, P. E. (1973). Changes in the composition and yield of the mammary secretion of cows during the initiation of lactation. *Journal of Endocrinology*, 59(2), 231-247.
- Hatfield, P. G., Snowden, G. D., Head, W. A., Glimp, H. A., Stobart, R. H., & Besser, T. (1995). Production by ewes rearing single or twin lambs: effects of dietary crude protein percentage and supplemental zinc methionine. *Journal of animal science*, 73(5), 1227-1238.
- Havemose, M. S., Weisbjerg, M. R., Bredie, W., Poulsen, H. D., & Nielsen, J. H. (2006). Oxidative stability of milk influenced by fatty acids, antioxidants, and copper derived from feed. *Journal of Dairy Science*, 89(6), 1970-1980.
- Heesom, K. J., Souza, P., Ilic, V., & Williamson, D. H. (1992). Chain-length dependency of interactions of medium-chain fatty acids with glucose metabolism in acini isolated from lactating rat mammary glands. A putative feedback to control milk lipid synthesis from glucose. *Biochem.J*, 281, 273-278.
- Heitzman, R. J. (1967). Enzymes of lactose synthesis in the mammary glands of normal and hormonally treated rabbits. *The Biochemical Journal JID* - 2984726R, Retrieved from
- Hélène Jammes, J. D. (1988). Le développement de la glande mammaire et son contrôle hormonal dans l'espèce bovine. *INRA-Unité d'Endocrinologie Moléculaire 78350 Jouy-En-Josas*, 1(5), 299.
- Henderson, A., & Peaker, M. (1984). Feedback control of milk secretion in the goat by a chemical in milk. *The Journal of Physiology*, 351(1), 39-45.
- Henshaw, A. H., Varner, M., & Erdman, R. A. (2000). The effects of six times a day milking in early lactation on milk yield, milk composition, body condition and reproduction. *J.Dairy Sci.*, 83 (Suppl. 1)
- Hernandez, L., Collier, J., Vomachka, A., Collier, R., & Horseman, N. (2011). Suppression of lactation and acceleration of involution in the bovine mammary gland by a selective serotonin reuptake inhibitor. *Journal of Endocrinology*, 209, 45-54.
- Hernandez, L., Limesand, S., Collier, J., Horseman, N., & Collier, R. J. (2009). The bovine mammary gland expresses multiple functional isoforms of serotonin receptors. *Journal of Endocrinology*, 203, 123-131.
- Hernandez, L.L., Stiening, C.M., Wheelock, J.B., Baumgard, L.H., Parkhurst, A.M., Collier, R.J. Evaluation of serotonin as a feedback inhibitor of lactation in the bovine. *J. Dairy Sci.* 91(2008). pp. 1834-1844.
- Hervás, G., Ramella, J. L., López, S., González, J. S., & Mantecón, A. R. (2006). Effect of omitting one or two milkings weekly on lactational performance in dairy ewes. *Journal of Dairy Research*, 73(02), 207-215.

- Hickson, R., Lopez-Villalobos, N., Dalley, D., Clark, D., & Holmes, C. (2006). Yields and persistency of lactation in Friesian and Jersey cows milked once daily. *Journal of Dairy Science*, *89*(6), 2017-2024.
- Hidiroglou, M. (1989). Mammary transfer of vitamin E in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, *72*(4), 1067-1071.
- Hillerton, J. E., & Semmens, J. E. (1999). Comparison of treatment of mastitis by oxytocin or antibiotics following detection according to changes in milk electrical conductivity prior to visible signs. *Journal of dairy science*, *82*(1), 93-98.
- Hillerton, J. E., Knight, C. H., Turvey, A., Wheatley, S. D., & Wilde, C. J. (1990). Milk yield and mammary function in dairy cows milked four times daily. *Journal of Dairy Research*, *57*(03), 285-294.
- Holmes, C., & Woolford, M. (1992). Why are somatic cells important? Paper presented at the *44th Ruakura Farmers Conference Proceedings 9th-10th June*.
- Holmes, C., Kamote, H., Mackenzie, D., & Morel, P. (1996). Effects of a decrease in milk yield, caused by once-daily milking or by restricted feeding, on the somatic cell count in milk from cows with or without subclinical mastitis. *Australian Journal of Dairy Technology*, *51*(1), 8-11.
- Holmström, K. M., & Finkel, T. (2014). Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. *Nature reviews Molecular cell biology*, *15*(6), 411-421.
- Holt, C., & Jenness, R. (1984). Interrelationships of constituents and partition of salts in milk samples from eight species. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, *77*(2), 275-282.
- Horseman, N., & Collier, R. (2014). Serotonin: A local regulator in the mammary gland epithelium. *Annual Review of Animal Biosciences*, *2*, 353-374.
- Hou, J., Wang, F., Wang, Y., & Liu, F. (2013). Effects of vitamin E on the concentration of conjugated linoleic acids and accumulation of intermediates of ruminal biohydrogenation in vitro. *Small Ruminant Research*, *111*(1), 63-70.
- Hovinen, M., & Pyörälä, S. (2011). Invited review: Udder health of dairy cows in automatic milking. *Journal of Dairy Science*, *94*(2), 547-562.
- Huerta Jiménez, M., Ortega Cerrilla, M. E., Cobos Peralta, M., Herrera Haro, J. G., Díaz Cruz, A., & Guinzberg Perrusquía, R. (2005). Estrés oxidativo y el uso de antioxidantes en animales domésticos. *Interciencia*, *30*(12).
- Huntley, S. J., Cooper, S., Bradley, A. J., & Green, L. E. (2012). A cohort study of the associations between udder conformation, milk somatic cell count, and lamb weight in suckler ewes. *Journal of Dairy Science*, *95*(9), 5001-5010.
- Hurley, T. W., D'Ercole, A. J., Handwerger, S., Underwood, L. E., Furlanetto, R. W., & Fellows, R. E. (1977). Ovine placental lactogen induces somatomedin: a possible role in fetal growth. *Endocrinology*, *101*(5), 1635-1638.
- Hurley, W. L. (2010). *Lactation biology website*. <http://ansci.illinois.edu/static/ansc438/>
- Hurley, W. L., & Looor, J. J. (2011). Mammary gland l growth, development and involution. In

- Editor-in-Chief: John W. Fuquay (Ed.), *Encyclopedia of dairy sciences (second edition)* (pp. 338-345).
- Inderwies, T., Riedl, J., Kiossis, E., & Bruckmaier, R. M. (2003). Effects of α - and β -adrenergic receptor stimulation and oxytocin receptor blockade on milking characteristics in dairy cows before and after removal of the teat sphincter. *Journal of Dairy Research*, 70(03), 289-292.
- Infascelli, F., Moniello, G., Cutrignelli, M. I., & Bovera, F. (2005). Vitamin and water requirements of dairy sheep. *Italian Journal of Animal Science*, 4(suppl. 1), 75-83.
- INRA, T. 2. (2007). In Quae éditions (Ed.), *Alimentation des bovins, ovins et caprins. besoins des animaux - valeurs des aliments*.
- Itoh, M., & Bissell, M. J. (2003). The organization of tight junctions in epithelia: Implications for mammary gland biology and breast tumorigenesis. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 8(4), 449-462.
- Jandal, J. M. (1996). Comparative aspects of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*, 22(2), 177-185.
- Jenness, R. (1974). Biosynthesis and composition of milk. *J Investig Dermatol*, 63(1), 109-118. Retrieved from
- Jerry, D. J., Dickinson, E. S., Roberts, A. L., & Said, T. K. (2002). Regulation of apoptosis during mammary involution by the p53 tumor suppressor gene. *Journal of Dairy Science*, 85(5), 1103-1110.
- Josimovich, J., & MacLaren, J. (1962). Presence in the human placenta and term serum of a highly lactogenic substance immunologically related to pituitary growth hormone. *Endocrinology*, 71(2), 209-220.
- Joy, M., Molino, F., Gil, C., Estopañan, G., Álvarez-Rodríguez, J., & Blanco, M. (2011). Influencia de la alimentación y de la lactancia sobre el contenido en vitamina E y ácidos grasos de la carne de corderos ligeros. *AIDA XIV Jornadas Sobre Producción Animal*, 2, 652-654.
- Juárez, M., Dugan, M. E., Aalhus, J. L., Aldai, N., Basarab, J. A., Baron, V. S., & McAllister, T. A. (2011). Effects of vitamin E and flaxseed on rumen-derived fatty acid intermediates in beef intramuscular fat. *Meat Science*, 88(3), 434-440.
- Juniper, D. T., Phipps, R. H., Jones, A. K., & Bertin, G. (2006). Selenium supplementation of lactating dairy cows: Effect on selenium concentration in blood, milk, urine, and feces. *Journal of Dairy Science*, 89(9), 3544-3551.
- Kamote, H., Holmes, C., Mackenzie, D., & Holdaway, R. (1994). Effects of once daily milking in later lactation on cows with either low or high initial somatic cell counts. Paper presented at the *Proceedings-New Zealand Society of Animal Production*, 54. pp. 285-285.
- Katz, A. I., Hollingsworth, D. R., & Epstein, F. H. (1968). Influence of carbohydrate and protein on sodium excretion during fasting and refeeding. *Translational Research*, 72(1), 93-104.
- Kay, J. K., Phyn, C. V. C., Rius, A. G., Morgan, S. R., Grala, T. M., & Roche, J. R. (2013). Once-daily milking during a feed deficit decreases milk production but improves energy status in early lactating grazing dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 96(10), 6274-6284.

- Kay, J. K., Phyn, C. V. C., Rius, A. G., Morgan, S. R., Grala, T. M., & Roche, J. R. (2013/2014). Once-daily milking during a feed deficit decreases milk production but improves energy status in early lactating grazing dairy cows. *Journal of dairy science*, *96*(10), 6274-6284.
- Kay, J. K., Roche, J. R., Kolver, E. S., Thomson, N. A., & Baumgard, L. H. (2005). A comparison between feeding systems (pasture and TMR) and the effect of vitamin E supplementation on plasma and milk fatty acid profiles in dairy cows. *Journal of Dairy Research*, *72*(03), 322-332.
- Kay, J., Phyn, C., Rius, A., Morgan, S., Grala, T., & Roche, J. (2011). Effect of milking frequency and nutrition in early lactation on milk production and body condition in grazing dairy cows. Paper presented at the *Proc. NZ Soc. Anim. Prod.*, *71*. pp. 37-41.
- Kehoe, S. I., Heinrichs, A. J., Moody, M. L., Jones, C. M., & Long, M. R. (2011). Comparison of immunoglobulin G concentrations in primiparous and multiparous bovine colostrum. *The Professional Animal Scientist*, *27*(3), 176-180.
- Kelly, A. L., Reid, S., Joyce, P., Meaney, W. J., & Foley, J. (1998). Effect of decreased milking frequency of cows in late lactation on milk somatic cell count, polymorphonuclear leucocyte numbers, composition and proteolytic activity. *Journal of Dairy Research*, *65*(03), 365-373.
- Kendall, P., Tucker, C., Dalley, D., Clark, D., & Webster, J. (2008). Milking frequency affects the circadian body temperature rhythm in dairy cows. *Livestock Science*, *117*(2), 130-138.
- Ketelaars, J. J., & Tolcamp, B. J. (1996). Oxygen efficiency and the control of energy flow in animals and humans. *Journal of Animal Science*, *74*(12), 3036-3051.
- Kim, S. W., & Wu, G. (2009). Regulatory role for amino acids in mammary gland growth and milk synthesis. *Amino acids*, *37*(1), 89-95.
- Kitessa, S. M., Peake, D., Bencini, R., & Williams, A. J. (2003). Fish oil metabolism in ruminants: III. transfer of n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) from tuna oil into sheep's milk. *Animal Feed Science and Technology*, *108*(1-4), 1-14.
- Klei, L. R., Lynch, J. M., Barbano, D. M., Oltenacu, P. A., Lednor, A. J., & Bandler, D. K. (1997). Influence of milking three times a day on milk quality. *Journal of Dairy Science*, *80*(3), 427-436.
- Kline, K., Lawson, K. A., Yu, W., & Sanders, B. G. (2007). Vitamin E and cancer. *Vitamins & Hormones*, *76*, 435-461.
- Klinkon, M., & Zadnik, T. (1999). Dynamics of red and white blood picture in dairy cows during the periparturient period. *Comparative Haematology International*, *9*(3), 156-161.
- Knekt, P., Aromaa, A., Maatela, J., Aaran, R. K., Nikkari, T., Hakama, M., et al. (1991). Vitamin E and cancer prevention. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *53*(1 Suppl), 283S-286S.
- Knight, C. H. (2001). Overview of prolactin's role in farm animal lactation. *Livestock Production Science*, *70*(1-2), 87-93.
- Knight, C. H., & Wilde, C. J. (1987). Mammary growth during lactation: Implications for

- increasing milk yield. *Journal of Dairy Science*, 70(9), 1991-2000.
- Knight, C. H., Hirst, D., & Dewhurst, R. J. (1994). Milk accumulation and distribution in the bovine udder during the interval between milkings. *Journal of Dairy Research*, 61(02), 167-177.
- KNIGHT, C. H., WILDE, C. J., & PEAKER, M. (1988). 1 - Manipulation of milk secretion. In P. C. GARNSWORTHY (Ed.), *Nutrition and lactation in the dairy cow* (pp. 3-14) Butterworth-Heinemann.
- Knight, C.H. and Peaker, M. (1982). Development of the mammary gland. *Journal of Reproduction & Fertility*, 65, 521.
- Knight, T. W., Atkinson, D. S., Haack, N. A., Palmer, C. R., & Rowland, K. H. (1993). Effects of suckling regime on lamb growth rates and milk yields of Dorset ewes. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 36(2), 215-222.
- Knight, T., & Gosling, L. (1995). Effects of milking frequency and machine stripping on the yield and composition of milk from poll dorset ewes. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 38(1), 123-130.
- Knutson, R., MacKenzie, D., Davis, S., & McCutcheon, S. (1993). The effect of once daily milking on concentrations and yields of plasminogen, plasmin and other whey proteins. Paper presented at the *Proceedings-New Zealand Society of Animal Production*, , 53. pp. 155-155.
- Kobayashi, K., Oyama, S., Numata, A., Rahman, M. M., & Kumura, H. (2013). Lipopolysaccharide disrupts the milk-blood barrier by modulating claudins in mammary alveolar tight junctions. *PloS one*, 8(4), e62187.
- Koenig, K. M., Rode, L. M., Cohen, R. D., & Buckley, W. T. (1997). Effects of diet and chemical form of selenium on selenium metabolism in sheep. *Journal of Animal Science*, 75(3), 817-827.
- Köhler, K., & Zahraoui, A. (2005). Tight junction: A coordinator of cell signalling and membrane trafficking. *Biology of the Cell*, 97(8), 659-665.
- Komara, M.; Giger-Reverdin, S.; Marnet, P.G.; Roussel, S.; Duvaux-Ponter, D. The combined effects of milking frequency and feeding level on dairy goat welfare and milk emission characteristics in late lactation. *Applied Animal Behaviour Science*. 127(2010). pp. 96-103
- Koutsouli, P., Patounas, G., Massouras, T., Bizelis, I., & Politis, I. (2015). Plasmin-plasminogen system and milk coagulation properties of two greek dairy sheep breeds. *Small Ruminant Research*, 124(0), 89-94.
- Koutsouli, P., Simitzis, P., Theodorou, G., Massouras, T., Bizelis, I., & Politis, I. (2017). The effect of milking frequency reduction from twice to once daily on mammary physiology and animal welfare of two dairy Greek sheep breeds. *Small Ruminant Research*, 147, 18-24.
- Kuehl, F. A., Jr, & Egan, R. W. (1980). Prostaglandins, arachidonic acid, and inflammation. *Science (New York, N.Y.)*, 210(4473), 978-984.
- Kuhn, N. J., Carrick, D. T., & Wilde, C. J. (1980). Lactose synthesis: The possibilities of regulation. *Journal of Dairy Science*, 63(2), 328-336.

- Labussière, J. (1983). Étude des aptitudes laitières et de la facilité de traite de quelques races de brebis du bassin méditerranéen. projet M4 FAO. Paper presented at the *3rd International Symposium on Machine Milking of Small Ruminants*. Sever-Cuesta, Valladolid, Spain, pp. 780-803.
- Labussière, J. (1988). Review of physiological and anatomical factors influencing the milking ability of ewes and the organization of milking. *Livestock Production Science*, 18(3-4), 253-274.
- Labussière, J. (1993). Physiologie de l'éjection du lait: Conséquences sur la traite. *Biologie De La Lactation*. INRA, Service De Publications, Versailles, France. 259-294.
- Labussière, J., & Martinet, J. (1964). Description of two devices for automatically controlling milk flow during machine milking: first results obtained in sheep. In *Annales de Zootechnie* (Vol. 13, pp. 199-212).
- Labussière, J., Combaud, J., Petrequin, P., & CHESNE, P. (1974). Influence de la fréquence des traites et des têtées sur la production laitière des brebis préalpes du sud. Paper presented at the *Annales De Zootechnie*. 23. (4) pp. 445-457.
- Labussière, J., Martinet, J., Petrequin, P., Lascaray, P., & Mirman, B. (1964). Description de deux appareils permettant le contrôle automatique des débits de lait au cours de la traite à la machine. premiers résultats obtenus chez la brebis. *Ann.Zootech*, 14, 63-126.
- Lacasse, P., Farr, V., Davis, S., & Prosser, C. (1996). Local secretion of nitric oxide and the control of mammary blood flow. *Journal of Dairy Science*, 79(8), 1369-1374.
- Lacetera, N., Bernabucci, U., Ronchi, B., & Nardone, A. (1999). The effects of injectable sodium selenite on immune function and milk production in sardinian sheep receiving adequate dietary selenium. *Veterinary Research*, 30(4), 363-370.
- Lacy-Hulbert, C. (2005). The effects of once a day milking on mastitis and somatic cell count. Paper presented at the *Proceedings-New Zealand Society of Animal Production*, 65. pp. 137.
- Lacy-Hulbert, S., Woolford, M., Nicholas, G., Prosser, C., & Stelwagen, K. (1999). Effect of milking frequency and pasture intake on milk yield and composition of late lactation cows. *Journal of Dairy Science*, 82(6), 1232-1239.
- Lakic, B., Sjaunja, K. S., Norell, L., Dornfalk, J., & Östensson, K. (2011). The effect of a single prolonged milking interval on inflammatory parameters, milk composition and yield in dairy cows. *Veterinary immunology and immunopathology*, 140(1), 110-118.
- Larsson, S. C., Kumlin, M., Ingelman-Sundberg, M., & Wolk, A. (2004). Dietary long-chain n-3 fatty acids for the prevention of cancer: A review of potential mechanisms. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79(6), 935-945.
- Lauzon, K., Zhao, X., Bouetard, A., Delbecchi, L., Paquette, B., & Lacasse, P. (2005). Antioxidants to prevent bovine neutrophil-induced mammary epithelial cell damage. *Journal of Dairy Science*, 88(12), 4295-4303.
- Lavín González, M. P. Los sistemas de producción ovina en la provincia de León: Factores condicionantes de su distribución y estructura. Tesis Doctoral, Universidad de León. 1996. pp. 319-323.

- Lee, C. S., Meeusen, E., & Brandon, M. R. (1989). *Subpopulations of lymphocytes in the mammary gland of sheep* Retrieved from 1989 Mar database.
- Lee, R. C., & Ambros, V. (2001). An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, *294*(5543), 862-864.
- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., ... & Kim, V. N. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, *425*(6956), 415-419.
- Legaz, E., Cervantes, I., Pérez-Cabal, M. A., de la Fuente, L. F., Martínez, R., Goyache, F., et al. (2011). Multivariate characterisation of morphological traits in assaf sheep. *Small Ruminant Research*, *100*(2-3), 122-130.
- Leroy, J. L. M. R., Opsomer, G., Van Soom, A., Goovaerts, I. G. F., & Bols, P. E. J. (2008). Reduced fertility in High-yielding dairy cows: Are the oocyte and embryo in danger? Part I the importance of negative energy balance and altered corpus luteum function to the reduction of oocyte and embryo quality in High-yielding dairy cows. *Reproduction in domestic animals*, *43*(5), 612-622.
- Li, J., Zhang, L., Wu, Y., Liu, Y., Zhou, P., Wen, S., et al. (2009). A national survey of polychlorinated dioxins, furans (PCDD/Fs) and dioxin-like polychlorinated biphenyls (dl-PCBs) in human milk in china. *Chemosphere*, *75*(9), 1236-1242.
- Li, P., Rudland, P. S., Fernig, D. G., Finch, L., & Wilde, C. J. (1999). Modulation of mammary development and programmed cell death by the frequency of milk removal in lactating goats. *The Journal of Physiology*, *519*(3), 885-900.
- Li, W., Hosseinian, F. S., Tsopmo, A., Friel, J. K., & Beta, T. (2009). Evaluation of antioxidant capacity and aroma quality of breast milk. *Nutrition*, *25*(1), 105-114.
- Liebler, D. C., & Burr, J. A. (1992). *Oxidation of vitamin E during iron-catalyzed lipid peroxidation: Evidence for electron-transfer reactions of the tocopheroxyl radical* Retrieved from 1992 Sep 8 database.
- Lindman, S. (Tesis Ms. Sc. 2015). The effect of rapeseed oil and palm oil supplement and milking frequency on milk yield and milk fat quality. SLU, Dept. of Animal Nutrition and Management).
- Linzell, J. (1960). Mammary-gland blood flow and oxygen, glucose and volatile fatty acid uptake in the conscious goat. *The Journal of Physiology*, *153*(3), 492-509.
- Lippman, S. M., Klein, E. A., Goodman, P. J., Lucia, M. S., Thompson, I. M., Ford, L. G., et al. (2009). Effect of selenium and vitamin E on risk of prostate cancer and other cancers: The selenium and vitamin E cancer prevention trial (SELECT). *Jama*, *301*(1), 39-51.
- Littlejohn, M. D., Walker, C. G., Ward, H. E., Lehnert, K. B., Snell, R. G., Verkerk, G. A., et al. (2009-2010). Effects of reduced frequency of milk removal on gene expression in the bovine mammary gland. *Physiological Genomics*, *41*(1), 21-32.
- Liu, Z. L., Yang, D. P., Chen, P., Dong, W. X., & Wang, D. M. (2008). Supplementation with selenium and vitamin E improves milk fat depression and fatty acid composition in dairy cows fed fat diet. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences*, *21*(6), 838.

- Loften, J. R., Linn, J. G., Drackley, J. K., Jenkins, T. C., Soderholm, C. G., & Kertz, A. F. (2014). Invited review: Palmitic and stearic acid metabolism in lactating dairy cows. *Journal of dairy science*, *97*(8), 4661-4674.
- Loiselle, M., Ster, C., Talbot, B., Zhao, X., Wagner, G., Boisclair, Y., et al. (2009). Impact of postpartum milking frequency on the immune system and the blood metabolite concentration of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, *92*(5), 1900-1912.
- Lollivier, V., & Marnet, P. (2005). Galactopoietic effect of milking in lactating holstein cows: Role of physiological doses of oxytocin. *Livestock Production Science*, *95*(1), 131-142.
- Lollovier, V., & Marnet, P. (2005). Comparative study of the galactopoietic effect of oxytocin during and between milkings in cows and goats. *Physiological and Technical Aspects of Machine Milking*. (Ed. Tancin, V., Mihina, S. & Uhrincat, M.) Nitra, Slovak Republic,
- Lonn, E., Bosch, J., Yusuf, S., Sheridan, P., Pogue, J., Arnold, J. M., et al. (2005). Effects of long-term vitamin E supplementation on cardiovascular events and cancer: A randomized controlled trial. *Jama*, *293*(11), 1338-1347.
- Loor, J. J., & Herbein, J. H. (2003). Dietary canola or soybean oil with two levels of conjugated linoleic acids (CLA) alter profiles of 18: 1 and 18: 2 isomers in blood plasma and milk fat from dairy cows. *Animal feed science and technology*, *103*(1), 63-83.
- Loor, J. J., Bionaz, M., & Drackley, J. K. (2013). Systems physiology in dairy cattle: Nutritional genomics and beyond. *Annu. Rev. Anim. Biosci.*, *1*(1), 365-392.
- Loor, J. J., Bionaz, M., & Hurley, W. L. (2011). Mammary gland l gene networks controlling development and involution. In J. W. Fuquay (Ed.), *Encyclopedia of dairy sciences (second edition)* (pp. 346-351). San Diego: Academic Press.
- Loor, J. J., Bionaz, M., & Invernizzi, G. (2011). Systems biology and animal nutrition: insights from the dairy cow during growth and the lactation cycle. *Systems Biology and Livestock Science*, *19*, 24.
- Loor, J., & Cohick, W. (2009). ASAS centennial paper: Lactation biology for the twenty-first century. *Journal of Animal Science*, *87*(2), 813-824.
- López Campos, O. (2007). *La vinaza de remolacha : composición química y empleo en la alimentación de ovejas en lactación y corderos en cebo*. Tesis Doctoral. Universidad de León. España.
- López, J., Frutos, P., Giráldez, F. J., & Mantecón, Á. R. (1995). Efecto de la frecuencia diaria de ordeño sobre la producción y composición de la leche en el ganado ovino en condiciones prácticas de explotación.
- Luna, P., Juárez, M., & de la Fuente, M. A. (2005). Validation of a rapid milk fat separation method to determine the fatty acid profile by gas chromatography. *Journal of Dairy Science*, *88*(10), 3377-3381.
- Luster, M. I., Johnson, V. J., Yucesoy, B., & Simeonova, P. P. (2005). Biomarkers to assess potential developmental immunotoxicity in children. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *206*(2), 229-236.

- Lykkesfeldt, J., & Svendsen, O. (2007). Oxidants and antioxidants in disease: oxidative stress in farm animals. *The Veterinary Journal*, 173(3), 502-511.
- Lynch, G. P., FAU, E. T., Jackson C Jr FAU - Rumsey, T.S., FAU, R. T., & Camp, M. J. (1991). Nitrogen metabolism of lactating ewes fed rumen-protected methionine and lysine.
- MAGRAMA (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente). Encuesta Nacional de Ganado Ovino. 2013. http://www.mapama.gob.es/es/ganaderia/publicaciones/caracterizaciondelsectorovinoycaprinoenespana2014_def_tcm7-411855.pdf
- Makovický, P., Nagy, M., & Makovický, P. (2014). The comparison of ewe udder morphology traits of Improved Valachian, Tsigai, Lacaune breeds and their crosses. *Mljekarstvo*, 64(2), 86-93.
- Malafa, M. P., & Neitzel, L. T. (2000). Vitamin E succinate promotes breast cancer tumor dormancy. *Journal of Surgical Research*, 93(1), 163-170.
- Malven, P. V., Head, H. H., & Collier, R. J. (1987). Secretion and mammary gland uptake of prolactin in dairy cows during lactogenesis. *Journal of Dairy Science*, 70(11), 2241-2253.
- Mao, G., Kraus, G. A., Kim, I., Spurlock, M. E., Bailey, T. B., Zhang, Q., & Beitz, D. C. (2010). A mitochondria-targeted vitamin E derivative decreases hepatic oxidative stress and inhibits fat deposition in mice. *The Journal of nutrition*, 140(8), 1425-1431.
- Mao, W., & Caruolo, E. (1973). Effect of lactose content and milking interval on mammary blood flow 1, 2. *Journal of Dairy Science*, 56(6), 729-732.
- MARM (Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino). Estadística láctea anual. 2010.
- Marnet, P. G., & Komara, M. (2008). Management systems with extended milking intervals in ruminants: Regulation of production and quality of milk. *Journal of Animal Science*, 86(13 Suppl), 47-56.
- Marnet, P. G., Billon, P., Da Ponte, P., Martin, J., & Manfredi, E. (2001). Machine milking ability in goats: genetic variability and physiological basis of milk flow rate. *of the Series: ICAR Technical Series*.
- Marnet, P., & McKusick, B. (2001). Regulation of milk ejection and milkability in small ruminants. *Livestock Production Science*, 70(1), 125-133.
- Marnet, P., Negrao, J., & Labussière, J. (1998). Oxytocin release and milk ejection parameters during milking of dairy ewes in and out of natural season of lactation. *Small Ruminant Research*, 28(2), 183-191.
- Marnet, P.G. & McKusick, B.C., Regulation of milk ejection and milkability in small ruminants", *Livestock Production Science*, vol. 70(2001), no. 1-2, pp. 125-133.
- Marti, A., Jehn, B., Costello, E., Keon, N., Ke, G., Martin, F., et al. (1994). Protein kinase A and AP-1 (c-Fos/JunD) are induced during apoptosis of mouse mammary epithelial cells. *Oncogene*, 9(4), 1213-1223.
- Martin, B., Pomiès, D., Pradel, P., Verdier-Metz, I., & Rémond, B. (2009). Yield and sensory properties of cheese made with milk from holstein or montbéliarde cows milked twice or once daily. *Journal of Dairy Science*, 92(10), 4730-4737.

- Martinet, J., Houdebine, L., & Head, H. H. (1999). In INRA (Ed.), *Biology of lactation* (1a ed.). Paris: INRA.
- Martínez-Marin, A. (2011). Adición de aceites vegetales de diferente grado de insaturación a la ración de cabras lecheras. efectos sobre la utilización de la ración y la producción y composición de la leche. Universidad de Córdoba). *Tesis Doctoral*,
- Martínez, M. E., Calderón, C., de la Barra, R., de la Fuente, L. F., & Gonzalo, C. (2011). Udder morphological traits and milk yield of Chilota and Suffolk Down sheep breeds. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 71(1), 90
- Martini, M., Scolozzi, C., Gatta, D., Taccini, F., & Verità, P. (2004). Effects of olive oil calcium soap and phase of lactation on the fatty acid composition in the milk of massese ewes. *Ital. J. Anim. Sci.*, 4, 353-362.
- Matsuda, M., Imaoka, T., Vomachka, A. J., Gudelsky, G. A., Hou, Z., Mistry, M., et al. (2004). Serotonin regulates mammary gland development via an autocrine-paracrine loop. *Developmental Cell*, 6(2), 193-203.
- Maureen E. Dunbar, John J. Wysolmerski. (1999). Parathyroid hormone-related protein: A developmental regulatory molecule necessary for mammary gland development. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 4(1), 21-34.
- Mavrogianni, V. S., Cripps, P. J., Papaioannou, N., Taitzoglou, I., & Fthenakis, G. C. (2006). Teat disorders predispose ewes to clinical mastitis after challenge with *Mannheimia haemolytica*. *Veterinary research*, 37(1), 89-105.
- McAnulty, P. A., & Burns, L. M. (2004). Evaluation of the maternal and neonatal effects of the oxytocin antagonist, atosiban, in a cross-fostering study in rats. *Reproductive Toxicology*, 19(1), 65-70.
- McCGraham, N. (1964). Energy costs of feeding activities and energy expenditure of grazing sheep. *Australian Journal of Agricultural Research*, 15(6), 969-973.
- McDowell, L. R., Williams, S. N., Hidiroglou, N., Njeru, C. A., Hill, G. M., Ochoa, L., et al. (1996). Vitamin E supplementation for the ruminant. *Animal Feed Science and Technology*, 60(3-4), 273-296.
- McFadden, J. W., & Corl, B. A. (2008). Activation of AMP-activated protein kinase (AMPK) inhibits fatty acid synthesis in bovine mammary epithelial cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 390(3), 388-393.
- McIntyre, B. S., Briski, K. P., Gapor, A., & Sylvester, P. W. (2000). Antiproliferative and apoptotic effects of tocopherols and tocotrienols on preneoplastic and neoplastic mouse mammary epithelial cells. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 224(4), 292-301.
- McIntyre, B. S., Briski, K. P., Tirmenstein, M. A., Fariss, M. W., Gapor, A., & Sylvester, P. W. (2000). Antiproliferative and apoptotic effects of tocopherols and tocotrienols on normal mouse mammary epithelial cells. *Lipids*, 35(2), 171-180.
- McKusick, B., Thomas, D., Berger, Y., & Marnet, P. (2002). Effect of milking interval on alveolar versus cisternal milk accumulation and milk production and composition in dairy ewes. *Journal of Dairy Science*, 85(9), 2197-2206.

- McNamara, S., Murphy, J., O'Mara, F., Rath, M., & Mee, J. (2008). Effect of milking frequency in early lactation on energy metabolism, milk production and reproductive performance of dairy cows. *Livestock Science*, 117(1), 70-78.
- Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, 454(7203), 428-435.
- Mehennaoui, S., Delacroix-Buchet, A., Duche, A., Enriquez, B., Kolf-Clauw, M., & Milhaud, G. (1999). Comparative study of cadmium transfer in ewe and cow milks during rennet and lactic curds preparation. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 37(3), 389-395.
- Mele, M., Buccioni, A., & Serra, A. (2005). Neutral detergent fiber (NDF) and non-structural carbohydrate (NSC) requirements in the nutrition of dairy ewes. *Ital. J. Anim. Sci*, 4, 53-62.
- Mele, M., Petacchi, F., Boccioni, A., Serra, A., Ferruzzi, G., Antongiovanni, M. et al. (2002). Qualità del latte di pecore sarde in relazione al contenuto di grasso e di foraggio della dieta. [Abstract]. *Proceedings of the 15th National Congress of SIPAOC*, 239.
- Menzies, P. I., & Ramanoon, S. Z. (2001). Mastitis of sheep and goats. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 17(2), 333-358.
- Metcalf, J. A., Roberts, S. J., & Sutton, J. D. (1992). Variations in blood flow to and from the bovine mammary gland measured using transit time ultrasound and dye dilution. *Research in Veterinary Science*, 53(1), 59-63.
- Michaelidou, A. M. (2008). Factors influencing nutritional and health profile of milk and milk products. *Small Ruminant Research*, 79(1), 42-50.
- Mikolayunas-Sandroch, C., Armentano, L. E., Thomas, D. L., & Berger, Y. M. (2009). Effect of protein degradability on milk production of dairy ewes. *Journal of Dairy Science*, 92(9), 4507-4513.
- Mikus, M. (1968). b. A study on relation between the quantity of milk and dimensions of the udder in sheep during lactation. *Ved.Pr.Vysk.Ustavu Ovciar.Trencine*, 4, 131-151.
- Mikus, M. (1969). Manual stripping in the case of machine milking of sheep in relation to the measurements of udder, to the lactation days and certain further indices. *Zyvocisna Vyroba*, 14(12), 827.
- Mikus, M. (1979). Study of the mutual relationships between dimensions of the udder with regard to improvement of sheep for machine milking.
- Milán, M.J., Caja, G., González-González, R., Fernández-Pérez, A.M., Such, X. Structure and performance of Awassi and Assaf dairy sheep farms in northwestern Spain. *J. Dairy Sci.* 94 (2011). pp. 771-784.
- Miller, J., Brzezinska-Slebodzinska, E., & Madsen, F. (1993). Oxidative stress, antioxidants, and animal function. *Journal of Dairy Science*, 76(9), 2812-2823.
- Min, S., Mackenzie, D., McCutcheon, S., Breier, B., & Gluckman, P. (1997). Comparative effects of recombinant ovine placental lactogen and bovine growth hormone on galactopoiesis in ewes. *Journal of Dairy Science*, 80(4), 640-645.

- Minuti, A., Palladino, A., Khan, M. J., Alqarni, S., Agrawal, A., Piccioli-Capelli, F., ... & Loor, J. J. (2015). Abundance of ruminal bacteria, epithelial gene expression, and systemic biomarkers of metabolism and inflammation are altered during the periparturient period in dairy cows. *Journal of dairy science*, 98(12), 8940-8951.
- Moeini, M. M., Bahrami, A., Ghazi, S., & Targhibi, M. R. (2011). The effect of different levels of organic and inorganic chromium supplementation on production performance, carcass traits and some blood parameters of broiler chicken under heat stress condition. *Biological trace element research*, 144(1-3), 715-724.
- Mohri, M., Ehsani, A., Norouzian, M. A., Bami, M. H., & Seifi, H. A. (2011). Parenteral selenium and vitamin E supplementation to lambs: hematology, serum biochemistry, performance, and relationship with other trace elements. *Biological trace element research*, 139(3), 308-316.
- Mohri, M., Seifi, H. A., & Khodadadi, J. (2005). Effects of preweaning parenteral supplementation of vitamin E and selenium on hematology, serum proteins, and weight gain in dairy calves. *Comparative Clinical Pathology*, 14(3), 149-154.
- Molle, G., Decandia, M., Cabiddu, A., Landau, S. Y., & Cannas, A. (2008). An update on the nutrition of dairy sheep grazing mediterranean pastures. *Small Ruminant Research*, 77(2-3), 93-112.
- Moniello, G., Infascelli, F., Pinna, W., & Camboni, G. (2005). Mineral requirements of dairy sheep. *Italian Journal of Animal Science*, 4(suppl. 1), 63-74.
- Montuschi, P., Barnes, P., & Jackson Roberts, L. (2007). Insights into oxidative stress: The isoprostanes. *Current Medicinal Chemistry*, 14(6), 703-717.
- Morag, M. (1968). The effect of varying the daily milking frequency on the milk yield of the ewe and evidence on the nature of the inhibition of milk ejection by half udder milking. *Ann.Zootech*, 17, 351-369.
- Morán, L., Andrés, S., Blanco, C., Benavides, J., Martínez-Valladares, M., Moloney, A. P., & Giráldez, F. J. (2017). Effect of dietary supplementation with carnolic acid or vitamin E on animal performance, haematological and immunological characteristics of artificially reared suckling lambs before and after road transport. *Archives of Animal Nutrition*, 71(4), 272-284.
- Murney, R., Stelwagen, K., Wheeler, T., Margerison, J., & Singh, K. (2015). The effects of milking frequency in early lactation on milk yield, mammary cell turnover, and secretory activity in grazing dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 98(1), 305-311.
- Murphy Goodwin, T., Millar, L., North, L., Abrams, L. S., Weglein, R. C., & Holland, M. L. (1995). The pharmacokinetics of the oxytocin antagonist atosiban in pregnant women with preterm uterine contractions. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 173(3), 913-917.
- N. Prieto, R. Bodás, Ò. López-Campos, S. Andrés, S. López and F.J. Giráldez. Effect of sunflower oil supplementation and milking frequency reduction on sheep milk production and composition. *J. Anim. Sci.* 91(2013). pp. 446-454

- Naziroğlu, M., Güler, T., & Yüce, A. (2002). Effect of vitamin E on ruminal fermentation in vitro. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, 49(5), 251-255.
- Negrao, J., Marnet, P., & Labussiere, J. (2001). Effect of milking frequency on oxytocin release and milk production in dairy ewes. *Small Ruminant Research*, 39(2), 181-187.
- Neville, M. C. (1983). Regulation of mammary development and lactation. *Lactation* (pp. 103-140) Springer.
- Neville, M. C., McFadden, T. B., & Forsyth, I. (2002). Hormonal regulation of mammary differentiation and milk secretion. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 7(1), 49-66.
- Neville, M. C., Morton, J., & Umemura, S. (2001). Lactogenesis: The transition from pregnancy to lactation. *Pediatric Clinics of North America*, 48(1), 35-52.
- Nicholson, J., & St-Laurent, A. (1991). Effect of forage type and supplemental dietary vitamin E on milk oxidative stability. *Canadian Journal of Animal Science*, 71(4), 1181-1186.
- Nickerson, S., Smith, J., & Keenan, T. W. (1980). Role of microtubules in milk secretion – action of colchicine on microtubules and exocytosis of secretory vesicles in rat mammary epithelial cells. *Cell and Tissue Research*, 207(3), 361-376.
- Nielsen, M. O., & Jakobsen, K. (1994). Changes in mammary uptake of free fatty acids, triglyceride, cholesterol and phospholipid in relation to milk synthesis during lactation in goats. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 109(4), 857-867.
- Njeru, C. A., McDowell, L. R., Wilkinson, N. S., Linda, S. B., & Williams, S. N. (1994). Pre- and postpartum supplemental DL-alpha-tocopheryl acetate effects on placental and mammary vitamin E transfer in sheep. *Journal of Animal Science*, 72(6), 1636-1640.
- Noble, M. S., & Hurley, W. L. (1999). Effects of secretion removal on bovine mammary gland function following an extended milk stasis. *Journal of Dairy Science*, 82(8), 1723-1730.
- Nolan, J. V., & Leng, R. A. (1972). Dynamic aspects of ammonia and urea metabolism in sheep. *British Journal of Nutrition*, 27(1), 177-194.
- Nordberg, J., & Arnér, E. S. (2001). Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology and Medicine*, 31(11), 1287-1312.
- Nørgaard, J., Sørensen, A., Sørensen, M. T., Andersen, J. B., & Sejrsen, K. (2005). Mammary cell turnover and enzyme activity in dairy cows: Effects of milking frequency and diet energy density. *Journal of Dairy Science*, 88(3), 975-982.
- Nozad, S. H., Ramin, A. G., Moghadam, G. H., Asri-Rezaei, S., Kalantary, L., Babapour, A., ... & Phillips, C. J. C. (2013). Monthly and seasonal evaluation of dietary nutrients and their relationships with blood and milk parameters in lactating dairy cows. *Acta veterinaria*, 63(2-3), 255-268.
- Nozad, S., Ramin, A. G., Moghaddam, G., Asri-Rezaei, S., & Kalantary, L. (2014). Monthly evaluation of blood hematological, biochemical, mineral, and enzyme parameters during the lactation period in Holstein dairy cows. *Comparative Clinical Pathology*, 23(2), 275-281.

- NRC, 2. (2007). *Nutrient requirements of small ruminants: Sheeps, goats, cervids and new world camelids* (1 st ed.). Washington, DC: National Academy Press.
- Nudda, A., Battacone, G., Bencini, R., & Pulina, G. (2004). Nutrition and milk quality. *Dairy Sheep Nutrition*, , 129.
- Nudda, A., Bencini, R., Mijatovic, S., & Pulina, G. (2002). The yield and composition of milk in sarda, awassi, and merino sheep milked unilaterally at different frequencies. *Journal of Dairy Science*, 85(11), 2879-2884.
- Nudda, A., Pulina, G., Vallebella A, R., Bencini, R., & Enne, G. (2000). Ultrasound technique for measuring mammary cistern size of dairy ewes. *Journal of Dairy Research*, 67(01), 101-106.
- Nudda, A.; Battacone, G.; Bencini, R.; Pulina, G. Nutrition and milk quality. Dairy Sheep Feeding and Nutrition (Pulina G. Ed.). Avenue Media, Bologna. 2002. pp. 197-228.
- Nwose, E. U., Jelinek, H. F., Richards, R. S., & Kerr, P. G. (2008). The 'vitamin E regeneration system'(VERS) and an algorithm to justify antioxidant supplementation in diabetes—A hypothesis. *Medical Hypotheses*, 70(5), 1002-1008.
- O'Brien, B., Ryan, G., Meaney, W. J., McDonagh, D., & Kelly, A. (2002). Effect of frequency of milking on yield, composition and processing quality of milk. *Journal of Dairy Research*, 69(03), 367-374.
- O'Brien, B., Gleeson, D., & Mee, J. (2005). Effect of milking frequency and feeding level on milk production, somatic cell count and reproductive performance of dairy cows over the first 20 weeks of lactation. Paper presented at the *Proceedings of the Agricultural Research Forum, Tullamore, Co. Offaly*, pp. 14-15.
- O'Driscoll, K., O'Brien, B., Gleeson, D., & Boyle, L. (2010). Milking frequency and nutritional level affect grazing behaviour of dairy cows: a case study. *Applied animal Behaviour science*, 122(2), 77-83.
- Ochoa-Cordero, M. A., Torres-Hernández, G., Ochoa-Alfaro, A. E., Vega-Roque, L., & Mandeville, P. B. (2002). Milk yield and composition of Rambouillet ewes under intensive management. *Small Ruminant Research*, 43(3), 269-274.
- Oravcová, M., Margetín, M., Peskovicova, D., Dano, J., Milerski, M., Hetényi, L., & Polák, P. (2007). Factors affecting ewe's milk fat and protein content and relationships between milk yield and milk components. *Czech Journal of Animal Science*, 52(7), 189.
- Osorio, J. S., Lohakare, J., & Bionaz, M. (2016). Biosynthesis of milk fat, protein, and lactose: roles of transcriptional and posttranscriptional regulation. *Physiological genomics*, 48(4), 231-256.
- Osorio, J. S., Trevisi, E., Ji, P., Drackley, J. K., Luchini, D., Bertoni, G., & Loor, J. J. (2014). Biomarkers of inflammation, metabolism, and oxidative stress in blood, liver, and milk reveal a better immunometabolic status in peripartal cows supplemented with Smartamine M or MetaSmart. *Journal of dairy science*, 97(12), 7437-7450.
- Overton, T. R., Drackley, J. K., Ottemann-Abbamonte, C. J., Beaulieu, A. D., Emmert, L. S., & Clark, J. H. (1999). Substrate utilization for hepatic gluconeogenesis is

- altered by increased glucose demand in ruminants. *Journal of animal science*, 77(7), 1940-1951.
- Paape, M. J., & Capuco, A. V. (1997). Cellular defense mechanisms in the udder and lactation of goats. *Journal of animal science*, 75(2), 556-565.
- Paape, M. J., Capuco, A. V., Lefcourt, A., Burvenich, C., & Miller, R. H. (1992). Physiological response of dairy cows to milking. *PUBLICATION-EUROPEAN ASSOCIATION FOR ANIMAL PRODUCTION*, 65, 93-93.
- Paape, M. J., Pearson, R. E., Wergin, W. P., & Guidry, A. J. (1977). Enhancement of chemotactic response of polymorphonuclear leukocytes into the mammary gland and isolation from milk. *Journal of dairy science*, 60(1), 53-62.
- Paape, M. J., Poutrel, B., Contreras, A., Marco, J. C., & Capuco, A. V. (2001/2002). Milk somatic cells and lactation in small ruminants. *Journal of Dairy Science*, 84, Supplement(0), E237-E244.
- PAC 2013/2020, EU. The Common Agricultural Policy after 2013. European Commission. http://ec.europa.eu/agriculture/cap-post-2013/legal-proposals/slide-show_en.pdf
- Pai, P. V., & Horseman, N. (2011). Mammary gland involution: Events, regulation and influences on breast disease. In J. Carrasco, & M. Mota (Eds.), *Endothelium and epithelium* (pp. 247-284) Nova Science Publishers, Inc.
- Palmquist, D. L. (1994). *The role of dietary fats in efficiency of ruminants* Retrieved from 1994 Aug database.
- Palmquist, D. L., & Jenkins, T. C. (1980). Fat in lactation rations: Review. *Journal of Dairy Science*, 63(1), 1-14.
- Palmquist, D. L., Denise Beaulieu, A., & Barbano, D. M. (1993). Feed and animal factors influencing milk fat composition. *Journal of Dairy Science*, 76(6), 1753-1771.
- Papachristoforou, C., Roushias, A., & Mavrogenis, A. (1982). The effect of milking frequency on the milk production of chios ewes and damascus goats. *Ann.Zootech*, 31, 37-46.
- Park, Y. W., Juárez, M., Ramos, M., & Haenlein, G. F. W. (2007). Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*, 68(1-2), 88-113.
- Partearroyo, A. M., & Flamant, J. C. (1978). Caracteristiques moyennes de traite et de mammelle de trois genotypes de brebis laitieres (Lacaune, Sarde, FSL). In *Proc. 2nd Int. Symp. "Traite Mecanique des petit ruminats"*, Alghero, Italy (pp. 80-92).
- Patton, J., Kenny, D., Mee, J., O'mara, F., Wathes, D., Cook, M., et al. (2006). Effect of milking frequency and diet on milk production, energy balance, and reproduction in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 89(5), 1478-1487.
- Patton, S., & Keenan, T. W. (1975). The milk fat globule membrane. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes*, 415(3), 273-309.
- Peaker, M. (1975). Recent advances in the study of monovalent ion movements across the mammary epithelium: Relation to onset of lactation. *Journal of Dairy Science*, 58(7), 1042-1047.

- Peaker, M. (1980). The effect of raised intramammary pressure on mammary function in the goat in relation to the cessation of lactation. *The Journal of Physiology*, 301(1), 415-428.
- Peaker, M., Wooding, F. B. P., Dils, R., Clark, S., Knudsen, J., Mephram, T. B., ... & Hayden, T. J. (1977). Comparative aspects of lactation. The Proceedings of a Symposium held at the Zoological Society of London on 11 and 12 November 1976.
- Pearson, R. E., Fulton, L. A., Thompson, P. D., & Smith, J. W. (1979). Three Times a Day Milking during the First Half of Lactation. *Journal of Dairy Science*, 62(12), 1941-1950.
- Pechova, A., Misurova, L., Pavlata, L., & Dvorak, R. (2008). Monitoring of changes in selenium concentration in goat milk during short-term supplementation of various forms of selenium. *Biological Trace Element Research*, 121(2), 180-191.
- Pennington, J. A., & Malven, P. V. (1985). Prolactin in bovine milk near the time of calving and its relationship to premature induction of lactogenesis. *Journal of Dairy Science*, 68(5), 1116-1122.
- Pereira, U. P., Oliveira, D. G. S., Mesquita, L. R., Costa, G. M., & Pereira, L. J. (2011). Efficacy of staphylococcus aureus vaccines for bovine mastitis: A systematic review. *Veterinary Microbiology*, 148(2-4), 117-124.
- Petrera, F., Calamari, L., & Bertin, G. (2009). Effect of either sodium selenite or Se-yeast supplementation on selenium status and milk characteristics in dairy goats. *Small Ruminant Research*, 82(2-3), 130-138.
- Pfeilsticker, H., Bruckmaier, R. M., & Blum, J. W. (1996). Cisternal milk in the dairy cow during lactation and after preceding teat stimulation. *Journal of Dairy Research*, 63(04), 509-515.
- Phillips, D., Woolford, M., & Copeman, P. (1980). The implications of milking management strategies involving variations of milking frequency in the immediate post-partum period. Paper presented at the *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production*, , 40. pp. 166-174.
- Phyn, C., & JK-Rius, A. (2010). Review: Impact of short-term alterations to milking frequency in early lactation. Paper presented at the *Proceedings of the 4th Australasian Dairy Science Symposium*, pp. 156-164.
- Pires, J. A. A., Delavaud, C., Faulconnier, Y., Pomiès, D., & Chilliard, Y. (2013). Effects of body condition score at calving on indicators of fat and protein mobilization of periparturient holstein-friesian cows. *Journal of Dairy Science*, 96(10), 6423-6439.
- Politis, I., Bizelis, I., Tsiaras, A., & Baldi, A. (2004). Effect of vitamin E supplementation on neutrophil function, milk composition and plasmin activity in dairy cows in a commercial herd. *Journal of Dairy Research*, 71(03), 273-278.
- Pomiès, D., Martin, B., Chilliard, Y., Pradel, P., & Rémond, B. (2007). Once-a-day milking of holstein and montbeliarde cows for 7 weeks in mid-lactation.
- Portolano, B., Spatafora, F., Bono, G., Margiotta, S., Todaro, M., Ortoleva, V., & Leto, G. (1997). Application of the Wood model to lactation curves of Comisana sheep. *Small Ruminant Research*, 24(1), 7-13.

- Pottier, J., Focant, M., Debier, C., De Buysser, G., Goffe, C., Mignolet, E., et al. (2006). Effect of dietary vitamin E on rumen biohydrogenation pathways and milk fat depression in dairy cows fed high-fat diets. *Journal of Dairy Science*, 89(2), 685-692.
- Prieto, N., Bodas, R., López-Campos, Ó., Andrés, S., López, S., & Giráldez, F. J. (2013). Effect of sunflower oil supplementation and milking frequency reduction on sheep milk production and composition. *Journal of animal science*, 91(1), 446-454.
- Prieto, N., López, D., Bodas, R., López, S., Mantecón, A. R., & Giráldez, F. J. (2011). Effects of the addition of sunflower oil to the diet and of milking frequency on milk yield and composition in Assaf ewes. *XIV Jornadas sobre Producción Animal, Zaragoza, España, 17 y 18 de mayo de 2011*, 231-233.
- Prosser, C., Davis, S., Farr, V., & Lacasse, P. (1996). Regulation of blood flow in the mammary microvasculature. *Journal of Dairy Science*, 79(7), 1184-1197.
- Prosser, C., Nicholas, G., Stelwagen, K., & Lacy-Hulbert, S. (1995). Influence of milking frequency and feeding level on plasmin activity and casein degradation in milk. Paper presented at the *Proceedings-New Zealand Society of Animal Production*, , 55. pp. 9-9.
- Pulido, E., Giráldez, F. J., Bodas, R., Andrés, S., & Prieto, N. (2012). Effect of reduction of milking frequency and supplementation of vitamin E and selenium above requirements on milk yield and composition in Assaf ewes. *Journal of dairy science*, 95(7), 3527-3535.
- Pulina, G. (2007, 2004). *Dairy sheep nutrition* (R. Bencini Trans.). Oxfordshire, UK: CABI Publishing.
- Pulina, G., Macciotta, N. P. P., & Nudda, A. (2005). Milk composition and feeding in the Italian dairy sheep. *Italian Journal of Animal Science*, 4(Suppl. 1), 5-14.
- Pulina, G., Nudda, A., Battacone, G., & Cannas, A. (2006). Effects of nutrition on the contents of fat, protein, somatic cells, aromatic compounds, and undesirable substances in sheep milk. *Animal Feed Science and Technology*, 131(3-4), 255-291.
- Pulina, G., Serra, A., Campus, R. L., & Papoff, C. M. (1990). Effetto della grassatura e della concentrazione proteica della razione sulla composizione acidica del grasso del latte di pecore di razza sarda. [Abstract]. *Proceedings of the Ninth National Congress of SIPAOC*, 3.3
- Putman, M. E., & Comben, e. (1988). Vitamin E. *Veterinary Records*, 121, 541-545.
- Radcliff, R. P., Vandehaar, M. J., Skidmore, A. L., Chapin, L. T., Radke, B. R., Lloyd, J. W., et al. (1997). Effects of diet and bovine somatotropin on heifer growth and mammary development. *Journal of Dairy Science*, 80(9), 1996-2003.
- Ramella, J. L. (2002). *Producción y composición de la leche en ovejas de raza assaf: Efecto de la duración del intervalo entre ordeños*. Tesis Doctoral. Universidad de León.
- Ramella, J.L., Mantecón, A.R., González, J.S, López, S. y Broixo, J.C. Efecto de la reducción del número de ordeños sobre la composición química y el contenido de células somáticas en la leche de ovejas Assaf. ITEA. Vol, Extra 22, Tomo II (2001) pp. 652-654.

- Rapisarda, T., Mereu, A., Cannas, A., Belvedere, G., Licitra, G., & Carpino, S. (2012). Volatile organic compounds and palatability of concentrates fed to lambs and ewes. *Small Ruminant Research*, *103*(2–3), 120-132.
- Rattray, P. V., Garrett, W. N., Hinman, N., & East, N. E. (1974). Energy cost of protein and fat deposition in sheep. *Journal of Animal Science*, *38*(2), 378-382.
- Raynal-Ljutovac, K., Lagriffoul, G., Paccard, P., Guillet, I., & Chilliard, Y. (2008). Composition of goat and sheep milk products: An update. *Small Ruminant Research*, *79*(1), 57-72.
- Regadas Filho, J. G. L., Tedeschi, L. O., Cannas, A., Vieira, R. A. M., & Rodrigues, M. T. (2014). Using the small ruminant nutrition system to develop and evaluate an alternative approach to estimating the dry matter intake of goats when accounting for ruminal fiber stratification. *Journal of Dairy Science*, *97*(11), 7185-7196.
- Rémond, B., & Pomiès, D. (2005). Once-daily milking of dairy cows: A review of recent french experiments. *Animal Research*, *54*(6), 427-442.
- Rémond, B., Aubailly, S., Chilliard, Y., Dupont, D., Pomiès, D., & Petit, M. (2002). Combined effects of once-daily milking and feeding level in the first three weeks of lactation on milk production and enzyme activities, and nutritional status, in holstein cows. *Animal Research*, *51*(2), 101-117.
- Rémond, B., Coulon, J., Nicloux, M., & Levieux, D. (1999). Effect of temporary once-daily milking in early lactation on milk production and nutritional status of dairy cows. Paper presented at the *Annales De Zootechnie*, *48*(5) pp. 341-352.
- Rémond, B., Pomiès, D., Dupont, D., & Chilliard, Y. (2004). Once-a-day milking of multiparous holstein cows throughout the entire lactation: Milk yield and composition, and nutritional status. *Animal Research*, *53*(3), 201-212.
- Reneau, J., Schukken, Y. H., Wilson, D. J., & Barkema, H. W. (2001, February). Somatic cell counts: measures of farm management and milk quality. In *ANNUAL MEETING-NATIONAL MASTITIS COUNCIL INCORPORATED* (Vol. 40, pp. 29-37). National Mastitis Council; 1999.
- Renmson, M., Kerr, M., Addey, C., Handel, S., Turner, M., Wilde, C., et al. (1993). Inhibition of constitutive proteom secretion from lactating mouse mammary epithelial cells by FIL feedback inhibitor of lactation, a secreted milk proteom. *J.Cell Sci*, *106*, 641.
- Renna, M., Cornale, P., Lussiana, C., Malfatto, V., Fortina, R., Mimosi, A., et al. (2012). Use of pisum sativum (L.) as alternative protein resource in diets for dairy sheep: Effects on milk yield, gross composition and fatty acid profile. *Small Ruminant Research*, *102*(2–3), 142-150.
- Rennison, M. E., Kerr, M., Addey, C. V., Handel, S. E., Turner, M. D., Wilde, C. J., et al. (1993). Inhibition of constitutive protein secretion from lactating mouse mammary epithelial cells by FIL (feedback inhibitor of lactation), a secreted milk protein. *Journal of Cell Science*, *106*, 641-648.
- Rice, D. A., & Kennedy, S. (1988). Assessment of vitamin E, selenium and polyunsaturated fatty acid interactions in the aetiology of disease in the bovine. *Proceedings of the Nutrition Society*, *47*(02), 177-184.

- Riedel, J., Casasús, I., & Bernués, A. (2007). Sheep farming intensification and utilization of natural resources in a mediterranean pastoral agro-ecosystem. *Livestock Science*, *111*(1), 153-163.
- Rimbach, G., Minihane, A. M., Majewicz, J., Fischer, A., Pallauf, J., Virgli, F., & Weinberg, P. D. (2002). Regulation of cell signalling by vitamin E. *Proceedings of the Nutrition Society*, *61*(4), 415-425.
- Ripoll-Bosch, R., Díez-Unquera, B., Ruiz, R., Villalba, D., Molina, E., Joy, M., et al. (2012). An integrated sustainability assessment of mediterranean sheep farms with different degrees of intensification. *Agricultural Systems*, *105*(1), 46-56.
- Ripoll-Bosch, R., Joy, M., & Bernués, A. (2014). Role of self-sufficiency, productivity and diversification on the economic sustainability of farming systems with autochthonous sheep breeds in less favoured areas in southern europe. *Animal*, *8*(08), 1229-1237.
- Rius, A., Kay, J., Phyn, C., Morgan, S., & Roche, J. (2010). Milking frequency and milk production in pasture-based lactating dairy cows. Paper presented at the *Journal of Dairy Science*, *93*. pp. 569-569.
- Riveiro, J. A., Mantecón, A. R., Álvarez, C. J., & Lavín, P. (2013). A typological characterization of dairy Assaf breed sheep farms at NW of Spain based on structural factor. *Agricultural systems*, *120*, 27-37.
- Rizzo, M.R.; Abbatecola, A.M., Barbieri, M., Vietri, M.T., Cioffi, M. Evidence for anti-inflammatory effects of combined administration of vitamin E and C in older persons with impaired fasting glucose: Impacto n insulin action. *Journal of the Am. Col. Nut.* *27* (2008). pp. 505-511.
- Rodríguez Ruiz, L. A. (2013). *Análisis de la rentabilidad de las explotaciones de ovino de leche en Castilla y León*. Tesis Doctoral. Universidad de León.
- Rodriguez, L. A., Mantecon, A. R., Lavin, P., Asensio, C., Martindiana, A. B., Olmedo, S., ... & Bartolome, D. (2011). Hematological and biochemical blood parameters in ewes and lambs Assaf sheep. In *XXXVI Congreso de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia (SEOC), Donostia-San Sebastián, España, 6-7 de octubre de 2011* (pp. 351-354). Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia (SEOC).
- Roncada, P., Piras, C., Soggiu, A., Turk, R., Urbani, A., & Bonizzi, L. (2012). Farm animal milk proteomics. *Journal of Proteomics*, *75*(14), 4259-4274.
- Rooke, J. A., Robinson, J. J., & Arthur, J. R. (2004). Effects of vitamin E and selenium on the performance and immune status of ewes and lambs. *The Journal of Agricultural Science*, *142*(3), 253-262.
- Rossi, G., & Pulina, G. (1991). Il ruolo dell'alimentazione nella composizione lipidica del latte ovino (Role of nutrition in the lipidic composition of sheep milk). *L'informatore Agrario*, *47*, 1-5.
- Rovai, M. (2001). Caracteres morfológicos y fisiológicos que afectan la aptitud al ordeño mecánico en ovejas de raza manchega y lacaune. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona, España.
- Rovai, M., Caja, G., & Such, X. (2008). Evaluation of udder cisterns and effects on milk yield of dairy ewes. *Journal of Dairy Science*, *91*(12), 4622-4629.

- Rovai, M., Such, X., Caja, G., & Piedrafita, J. (2002). Milk emission during machine milking in dairy sheep. *J. Anim. Sci.*, 80(Suppl 1), 5.
- Rowson, A. R., Daniels, K. M., Ellis, S. E., & Hovey, R. C. (2012). Growth and development of the mammary glands of livestock: A veritable barnyard of opportunities. Paper presented at the *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 23. (5) pp. 557-566.
- Ruberte, J., Carretero, A., Fernández, M., Pons, J., & Gine, J.M. y Sautet, J. (1994). In Ovis (Ed.), *Anatomía de la ubre de la oveja: Datos morfológicos necesarios para comprender la producción de leche y el ordeño*. Madrid, España: Luzan 5 S.A.
- Ruckebusch, Y. (1994). *Fisiología de pequeñas y grandes especies* (1st ed.). México: Manual Moderno.
- Rüegg, M., & Blanc, B. (1981). The fat globule size distribution in human milk. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 666(1), 7-14.
- Rüegg, M., & Blanc, B. (1981). The fat globule size distribution in human milk. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 666(1), 7-14.
- Ruegg, P. (2001). *Evaluating the effectiveness of mastitis vaccines*. <http://milkquality.wisc.edu/>
- Salama, A. A. K. (Tesis Doctoral. 2005). Modifying the lactation curve in dairy goats: Effects of milking frequency, dry period, and kidding interval. Universitat Autònoma de Barcelona. Tesis Doctoral.
- Salama, A. A. K., Caja, G., Such, X., Peris, S., Sorensen, A., & Knight, C. H. (2004). Changes in cisternal udder compartment induced by milking interval in dairy goats milked once or twice daily. *Journal of Dairy Science*, 87(5), 1181-1187.
- Salama, A., Such, X., Caja, G., Rovai, M., Casals, R., Albanell, E., et al. (2003). Effects of once versus twice daily milking throughout lactation on milk yield and milk composition in dairy goats. *Journal of Dairy Science*, 86(5), 1673-1680.
- Sanders, A. H. (2001). *The effects of six times a day milking in early lactation on milk yield, milk composition, body condition, and reproduction* (Doctoral dissertation, University of Maryland, College Park).
- Sanz Sampelayo, M. R., Chilliard, Y., Schmidely, P., & Boza, J. (2007). Influence of type of diet on the fat constituents of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*, 68(1-2), 42-63.
- Sanz Sampelayo, M., Pérez, L., Martín Alonso, J., Amigo, L., & Boza, J. (2002). Effects of concentrates with different contents of protected fat rich in PUFAs on the performance lactating granadina goats. *Small Ruminant Research*, 43(2), 141-148.
- Sañudo, C. y Cepero, R. Ovinotecnia: Producción y economía de la especie ovina. *Prensa Universitaria de Zaragoza*. 2009, pp. 417-429
- Satohisa, S., Chiba, H., Osanai, M., Ohno, S., Kojima, T., Saito, T., et al. (2005). Behavior of tight-junction, adherens-junction and cell polarity proteins during HNF-4 α -induced epithelial polarization. *Experimental Cell Research*, 310(1), 66-78.
- Schams, D., Russe, I., Schallenberger, E., Prokopp, S., & Chan, J. S. (1984). The role of steroid hormones, prolactin and placental lactogen on

- mammary gland development in ewes and heifers. *The Journal of Endocrinology*, 102(1), 121-130.
- Schechter, A., Pavuk, M., Papke, O., Ryan, J. J., Birnbaum, L., & Rosen, R. (2003). Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in U.S. mothers' milk. *Environmental Health Perspectives*, 111(14), 1723-1729.
- Schroeder, G., Gagliostro, G. A., Bargo, F., Delahoy, J., & Muller, L. (2004). Effects of fat supplementation on milk production and composition by dairy cows on pasture: A review. *Livestock Production Science*, 86(1), 1-18.
- Segerson, E.C., Gunsett, F.C., Getz, W.R. Selenium-vitamin E supplementation and production efficiency in ewes marginally deficient in selenium. *Livest. Prod. Sci.* 14 (1986). pp. 149-159.
- Sejrsen, K., Huber, J. T., Tucker, H. A., & Akers, R. M. (1982). Influence of nutrition on mammary development in pre- and postpubertal heifers. *Journal of Dairy Science*, 65(5), 793-800.
- SEOC, 2013.
http://www.mapama.gob.es/es/ganaderia/publicaciones/caracterizaciondelsectorovinoycaprinoenespana2014_def_tcm7-411855.pdf
- Serra, A. (1998). La valutazione degli alimenti ed il razionamento negli ovini da latte. *Dottorato di ricerca thesis, Perugia, Italy*.
- Servet Gülümhad Sumnu, Serpil Sahin. (2008). In Servet Gülüm Sumnu, Serpil Sahin (Ed.), *Advances in deep-fat frying of foods. Series Contemporary food engineering*. Florida, USA: CRC Press Taylor & Francis Group. pp. 66
- Shamay, A., Shapiro, F., Leitner, G., & Silanikove, N. (2003). Infusions of casein hydrolyzates into the mammary gland disrupt tight junction integrity and induce involution in cows. *Journal of Dairy Science*, 86(4), 1250-1258.
- Shamay, A., Shapiro, F., Mabjeesh, S. J., & Silanikove, N. (2002). Casein-derived phosphopeptides disrupt tight junction integrity, and precipitously dry up milk secretion in goats. *Life Sciences*, 70(23), 2707-2719.
- Sharp, J., Lefevre, C., Brennan, A., & Nicholas, K. (2007). The fur Seal-a model lactation phenotype to explore molecular factors involved in the initiation of apoptosis at involution. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 12(1), 47-58.
- Shennan, D. B., & Peaker, M. (2000). Transport of milk constituents by the mammary gland. *Physiological Reviews*, 80(3), 925-951.
- Shields, S. L., Rezamand, P., Sevier, D. L., Seo, K. S., Price, W., & McGuire, M. A. (2011). Effects of increased milking frequency for the first 21 days post partum on selected measures of mammary gland health, milk yield and milk composition. *Journal of dairy research*, 78(3), 301-307.
- Shokrollahi, B., Mansouri, M., & Amanlou, H. (2013). The effect of enriched milk with selenium and vitamin E on growth rate, hematology, some blood biochemical factors, and immunoglobulins of newborn goat kids. *Biological trace element research*, 153(1-3), 184-190.
- Silanikove, N., Leitner, G., Merin, U., & Prosser, C. (2010). Recent advances in exploiting goat's milk: Quality, safety and production aspects. *Small Ruminant Research*, 89(2), 110-124.

- Sisson, S., & Grossman, J. D. (1980). In Salvat Editores S. A. (Ed.), *Anatomía de los animales domésticos* (4ta ed.). Barcelona, España: Salvat.
- Sklan, D. (1992). A note on production responses of lactating ewes to calcium soaps of fatty acids. *Animal Science*, 55(02), 288-291. doi:10.1017/S0003356100037582
- Smith-Kirwin, S. M., O'Connor, D. M., Johnston, J., de Lancy, E., Hassink, S. G., & Funanage, V. L. (1998). Leptin expression in human mammary epithelial cells and breast milk. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 83(5), 1810-1810.
- Smith, J. W., Ely, L. O., Graves, W. M., & Gilson, W. D. (2002). Effect of milking frequency on DHI performance measures. *Journal of Dairy Science*, 85(12), 3526-3533.
- Smith, J., Ely, L., Graves, W., & Gilson, W. (2002). Effect of milking frequency on DHI performance measures. *Journal of Dairy Science*, 85(12), 3526-3533.
- Smith, K. L., Hogan, J. S., & Weiss, W. P. (1997). Dietary vitamin E and selenium affect mastitis and milk quality. *Journal of Animal Science*, 75(6), 1659-1665.
- Smoczyński, M. (2017). Role of Phospholipid Flux during Milk Secretion in the Mammary Gland. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 1-13.
- Snowder, G. D., & Glimp, H. A. (1991). Influence of breed, number of suckling lambs, and stage of lactation on ewe milk production and lamb growth under range conditions. *Journal of animal science*, 69(3), 923-930.
- Soberon, F., Lukas, J., Van Amburgh, M., Capuco, A., Galton, D., & Overton, T. (2010). Effects of increased milking frequency on metabolism and mammary cell proliferation in holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 93(2), 565-573.
- Soberon, F., Ryan, C., Nydam, D., Galton, D., & Overton, T. (2011). The effects of increased milking frequency during early lactation on milk yield and milk composition on commercial dairy farms. *Journal of Dairy Science*, 94(9), 4398-4405.
- Sohal, R. S., & Weindruch, R. (1996). Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science (New York, NY)*, 273(5271), 59.
- Soloff, M. S. (1982). Oxytocin receptors and mammary myoepithelial cells. *Journal of Dairy Science*, 65(2), 326-337.
- Sordillo, L. M. (2005). Factors affecting mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *Livestock Production Science*, 98(1-2), 89-99.
- Sordillo, L. M., & Aitken, S. L. (2009). Impact of oxidative stress on the health and immune function of dairy cattle. *Veterinary immunology and immunopathology*, 128(1), 104-109.
- Sordillo, L. M., & Streicher, K. L. (2002). Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 7(2), 135-146.
- Sordillo, L. M., Shafer-Weaver, K., & DeRosa, D. (1997). Immunobiology of the mammary gland. *Journal of Dairy Science*, 80(8), 1851-1865.
- Sorensen, M. T., Nørgaard, J. V., Theil, P. K., Vestergaard, M., & Sejrsen, K. (2006). Cell turnover and activity in mammary tissue during lactation and the dry period in dairy

- cows. *Journal of Dairy Science*, 89(12), 4632-4639.
- Spitsberg, V. L. (2005). Invited review: Bovine milk fat globule membrane as a potential nutraceutical. *Journal of Dairy Science*, 88(7), 2289-2294.
- Squires, E. J. (2006). *Endocrinología animal aplicada*. Zaragoza : (sp): Acribia,.
- Stefanakis, A., Volanis, M., Zoiopoulos, P., & Hadjigeorgiou, I. (2007). Assessing the potential benefits of technical intervention in evolving the semi-intensive dairy-sheep farms in crete. *Small Ruminant Research*, 72(1), 66-72.
- Stefanon, B., Colitti, M., Gabai, G., Knight, C. H., & Wilde, C. J. (2002). Mammary apoptosis and lactation persistency in dairy animals. *Journal of Dairy Research*, 69(1), 37-52.
- Stein, T., Salomonis, N., & Gusterson, B. (2007). Mammary gland involution as a multi-step process. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 12(1), 25-35.
- Stelwagen, K. (2001). Effect of milking frequency on mammary functioning and shape of the lactation curve. *Journal of Dairy Science*, 84, E204-E211.
- Stelwagen, K. (2011). Mammary gland, milk biosynthesis and secretion | milk protein. In J. W. Fuquay (Ed.), *Encyclopedia of dairy sciences (second edition)* (pp. 359-366). San Diego: Academic Press.
- STELWAGEN, K., & KNIGHT, C. H. (1997). Effect of unilateral once or twice daily milking of cows on milk yield and udder characteristics in early and late lactation. *Journal of Dairy Research*, 64(04), 487-494.
- Stelwagen, K., & Lacy-Hulbert, S. J. (1996). Effect of milking frequency on milk somatic cell count characteristics and mammary secretory cell damage in cows. *American Journal of Veterinary Research*, 57(6), 902-905.
- Stelwagen, K., & Singh, K. (2014). The role of tight junctions in mammary gland function. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 19(1), 131-138.
- Stelwagen, K., Carpenter, E., Haigh, B., Hodgkinson, A., & Wheeler, T. T. (2009). Immune components of bovine colostrum and milk. *Journal of Animal Science*, 87(13 Suppl), 3-9.
- Stelwagen, K., Davis, S. R., Farr, V. C., Prosser, C. G., & Sherlock, R. A. (1994). Mammary epithelial cell tight junction integrity and mammary blood flow during an extended milking interval in goats. *Journal of Dairy Science*, 77(2), 426-432.
- Stelwagen, K., Farr, V. C., Davis, S. R., & Prosser, C. G. (1995). EGTA-induced disruption of epithelial cell tight junctions in the lactating caprine mammary gland. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 269(4), R848-R855.
- Stelwagen, K., Farr, V. C., McFadden, H. A., Prosser, C. G., & Davis, S. R. (1997). Time course of milk accumulation-induced opening of mammary tight junctions, and blood clearance of milk components. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 273(1), R379-R386.
- Stelwagen, K., Lacy-Hulbert, J. effect of milking frequency on milk somatic cell count characteristics and mammary secretory cell

- damage in cows. *Amer. J. Vet. Res.* 57 (1996). pp. 902-905.
- Stelwagen, K., Phyn, C., Davis, S., Guinard-Flament, J., Pomiès, D., Roche, J., et al. (2013). Invited review: Reduced milking frequency: Milk production and management implications. *Journal of Dairy Science*, 96(6), 3401-3413.
- Stelwagen, Kerst. Effect of Milking Frequency on Mammary Functioning and Shape of the Lactation Curve. *J. Dairy Sci.* 84 (2001), pp. E204-E211.
- Stockdale, C. (2006). Influence of milking frequency on the productivity of dairy cows. *Animal Production Science*, 46(7), 965-974.
- Stoffel, C. M., Crump, P. M., & Armentano, L. E. (2015). Effect of dietary fatty acid supplements, varying in fatty acid composition, on milk fat secretion in dairy cattle fed diets supplemented to less than 3% total fatty acids. *Journal of Dairy Science*, 98(1), 431-442.
- Strijker, D. (2005). Marginal lands in Europe—causes of decline. *Basic and Applied Ecology*, 6(2), 99-106.
- Strzetelski, J., Bilik, K., Niwinska, B., Skrzynski, G., Luczynska, E., & Choroszy, Z. (2005). Efficacy of ultrasound examination of heifer's mammary glands for predicting their milk yield. *Medycyna Weterynaryjna*, 61(9), 1032.
- Such, X. (1990). Factores condicionantes de la aptitud al ordeño mecánico de ovejas de raza manchega: Influencia de la simplificación de rutina y las características de la máquina de ordeño. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona.
- Susin, I., FAU, L. S., & McClure, K. E. (1995). *Effects of feeding a high-grain diet at a restricted intake on lactation performance and rebreeding of ewes* Retrieved from 1995 Nov database.
- Sylvester, P. W. (2007). Vitamin E and apoptosis. *Vitamins & Hormones*, 76, 329-356.
- Szencziová, I., Strapák, P., Stádník, L., Ducháček, J., & Beran, J. (2013). Relationship of udder and teat morphology to milking characteristics and udder health determined by ultrasonographic examinations in dairy *Annals of Animal Science*, 13(4), 783-795.
- Tedeschi, L. O., Cannas, A., & Fox, D. G. (2010). A nutrition mathematical model to account for dietary supply and requirements of energy and other nutrients for domesticated small ruminants: The development and evaluation of the small ruminant nutrition system. *Small Ruminant Research*, 89(2-3), 174-184.
- Thomas, C. S. Svennersten-Sjaunja, K., R Bhosrekar, M., & Bruckmaier, R. M. (2004). Mammary cisternal size, cisternal milk and milk ejection in murrah buffaloes. *Journal of Dairy Research*, 71(02), 162-168.
- Topper, Y. J., & Freeman, C. S. (1980). Multiple hormone interactions in the developmental biology of the mammary gland. *Physiological Reviews*, 60(4), 1049-1106.
- Toral, P. G., Frutos, P., Hervás, G., Gómez-Cortés, P., Juárez, M., & De la Fuente, M. (2010). Changes in milk fatty acid profile and animal performance in response to fish oil supplementation, alone or in combination with sunflower oil, in dairy ewes. *Journal of Dairy Science*, 93(4), 1604-1615.

- Toral, P. G., Hervás, G., Bichi, E., Belenguer, Á., & Frutos, P. (2011). Tannins as feed additives to modulate ruminal biohydrogenation: Effects on animal performance, milk fatty acid composition and ruminal fermentation in dairy ewes fed a diet containing sunflower oil. *Animal Feed Science and Technology*, *164*(3), 199-206.
- Torres, A., Castro, N., Hernández-Castellano, L., Argüello, A., & Capote, J. (2013). Short communication: Effects of milking frequency on udder morphology, milk partitioning, and milk quality in 3 dairy goat breeds. *Journal of Dairy Science*, *96*(2), 1071-1074.
- Tras, B., Inal, F., Bas, A. L., Altunok, V., Elmas, M., & Yazar, E. (2000). Effects of continuous supplementations of ascorbic acid, aspirin, vitamin E and selenium on some haematological parameters and serum superoxide dismutase level in broiler chickens. *British poultry science*, *41*(5), 664-666.
- Travers, M. T., & Barber, M. C. (1993). Isolation of a goat acetyl-CoA carboxylase complementary DNA and effect of milking frequency on the expression of the acetyl-CoA carboxylase and fatty acid synthase genes in goat mammary gland. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, *105*(1), 123-128.
- Trayer, I. P., & Hill, R. L. (1971). The purification and properties of the A protein of lactose synthetase. *Journal of Biological Chemistry*, *246*(21), 6666-6675.
- Trevisi, E. R. M. I. N. I. O., Amadori, M., Cogrossi, S. I. M. O. N. E., Razzuoli, E., & Bertoni, G. (2012/2013). Metabolic stress and inflammatory response in high-yielding, periparturient dairy cows. *Research in veterinary science*, *93*(2), 695-704.
- Trevisi, E., Zecconi, A., Bertoni, G., & Piccinini, R. (2010). Blood and milk immune and inflammatory profiles in periparturient dairy cows showing a different liver activity index. *Journal of dairy research*, *77*(3), 310-317.
- Triggianese, P., Perricone, C., Perricone, R., & De Carolis, C. (2015). Prolactin and natural killer cells: Evaluating the Neuroendocrine-Immune axis in women with primary infertility and recurrent spontaneous abortion. *American Journal of Reproductive Immunology*, *73*(1), 56-65.
- Tucker, H. A. (1971). Hormonal response to milking. *Journal of Animal Science*, *32 Suppl 1*, 137-144.
- Tucker, H. A. (1981). Physiological control of mammary growth, lactogenesis, and lactation. *Journal of Dairy Science*, *64*(6), 1403-1421.
- Tucker, H. A. (1987). Quantitative estimates of mammary growth during various physiological states: A review. *Journal of Dairy Science*, *70*(9), 1958-1966.
- Tucker, H. A. (2000). Hormones, mammary growth, and lactation: A 41-year perspective. *Journal of Dairy Science*, *83*(4), 874-884.
- Tucker, H. A., & Meites, J. (1965). Induction of lactation in pregnant heifers with 9-fluoroprednisolone acetate. *Journal of Dairy Science*, *48*(3), 403-405.
- Tufarelli, V., & Laudadio, V. (2011). Dietary supplementation with selenium and vitamin E improves milk yield, composition and

- rheological properties of dairy jonica goats. *Journal of Dairy Research*, 78(02), 144-148.
- Turley, J. M., Sanders, B. G., & Kline, K. (1992). RRR- α -tocopheryl succinate modulation of human promyelocytic leukemia (HL60) cell proliferation and differentiation.
- Turner, C. W. (1952). In Columbia, Mo., Lucas Bros., (Ed.), *The mammary gland*. United States of America:
- Ugarte, E., Ruiz, R., Gabiña, D., & De Heredia, I. B. (2001). Impact of high-yielding foreign breeds on the Spanish dairy sheep industry. *Livestock Production Science*, 71(1), 3-10.
- Ullrey, D. E. (1981). Vitamin E for swine. *Journal of Animal Science*, 53(4), 1039-1056.
- Ullrey, D. E., Miller, E. R., Long, C. H., & Vincent, B. H. (1965). Sheep hematology from birth to maturity I. Erythrocyte population, size and hemoglobin concentration. *Journal of animal science*, 24(1), 135-140.
- Underwood, E.J. and Suttle, N.F. The mineral nutrition of livestock. 3rd Ed. CABI Pub. UK, (1999) 2001. pp. 1728-1737
- Van Keymeulen, A., Rocha, A. S., Ousset, M., Beck, B., Bouvencourt, G., Rock, J., et al. (2011). Distinct stem cells contribute to mammary gland development and maintenance. *Nature*, 479(193),
- Van Soest, P.J.; Robertson, J.B. and Lewis, B.A. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science* .74pp. 3583-3597.
- Vasta, V., Nudda, A., Cannas, A., Lanza, M., & Priolo, A. (2008). Alternative feed resources and their effects on the quality of meat and milk from small ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, 147(1-3), 223-246.
- Walker, G., Dunshea, F., & Doyle, P. (2004). Effects of nutrition and management on the production and composition of milk fat and protein: A review. *Crop and Pasture Science*, 55(10), 1009-1028.
- Wall, E., & McFadden, T. (2007). Optimal timing and duration of unilateral frequent milking during early lactation of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 90(11), 5042-5048.
- Wall, E., & McFadden, T. (2008). Use it or lose it: Enhancing milk production efficiency by frequent milking of dairy cows. *Journal of Animal Science*, 86(1), 27.
- Wall, E., & McFadden, T. (2012). Triennial lactation symposium: A local affair: How the mammary gland adapts to changes in milking frequency. *Journal of Animal Science*, 90(5), 1695-1707.
- Wall, E., Crawford, H., Ellis, S., Dahl, G., & McFadden, T. (2006). Mammary response to exogenous prolactin or frequent milking during early lactation in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 89(12), 4640-4648.
- Walstra, P., Geurts, T. J., Noomen, A., Jellema, A., Van Boekel, & M.A.J.S. Butter. (1999). Dairy technology-principles of milk properties and processes. In Marcel Dekker, New York, NY (Ed.), (pp. 485-515)
- Wang, J., Bian, Y., Wang, Z., Li, D., Wang, C., Li, Q., et al. (2014). MicroRNA-152 regulates DNA methyltransferase 1 and is involved in the development and lactation of mammary glands in dairy cows. *PLoS One*, 9(7), e101358.

- Wang, M., Moisés, S., Khan, M., Wang, J., Bu, D., & Loor, J. (2012). MicroRNA expression patterns in the bovine mammary gland are affected by stage of lactation. *Journal of Dairy Science*, 95(11), 6529-6535.
- Wareski, P., Motyl, T., Ryniewicz, Z., Orzechowski, A., Gajkowska, B., Wojewodzka, U., et al. (2001). Expression of apoptosis-related proteins in mammary gland of goat. *Small Ruminant Research*, 40(3), 279-289.
- Watson, C., & Kreuzaler, P. (2009). The role of cathepsins in involution and breast cancer. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 14(2), 171-179.
- Wattiaux, M. A., Homan, J., del Carmen Moreno, M., & de Rodríguez, A. M. (1998). *Nutrición y alimentación*. Instituto Babcock para Investigación y Desarrollo Internacional para la Industria Lechera.
- Weber, T., Lu, M., Andera, L., Lahm, H., Gellert, N., Fariss, M. W., ... & Schröder, A. (2002). Vitamin E succinate is a potent novel antineoplastic agent with high selectivity and cooperativity with tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (Apo2 ligand) in vivo. *Clinical Cancer Research*, 8(3), 863-869.
- Weiss, W.P., Hogan, J.S., Todhunter, D.A., Smith, L. Effect of vitamin E supplementation in diets with a low concentration of selenium on mammary gland health of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 80(1997). pp. 1728-1737.
- Wellnitz, O., & Bruckmaier, R. M. (2001). Central and peripheral inhibition of milk ejection. *Livestock Production Science*, 70(1), 135-140.
- WELLNITZ, O., BRUCKMAIER, R. M., ALBRECHT, C., & BLUM, J. W. (1999). Atosiban, an oxytocin receptor blocking agent: pharmacokinetics and inhibition of milk ejection in dairy cows. *Journal of Dairy Research*, 66(1), 1-8.
- Wheeler, T., Smolenski, G., Harris, D., Gupta, S., Haigh, B., Broadhurst, M., et al. (2012). Host-defence-related proteins in cows' milk. *Animal*, 6(03), 415-422.
- Wiking, L., Bertram, H. C., Björck, L., & Nielsen, J. H. (2005). Evaluation of cooling strategies for pumping of milk—Impact of fatty acid composition on free fatty acid levels. *Journal of dairy research*, 72(4), 476-481.
- Wiking, L., Nielsen, J. H., Båvius, A. K., Edvardsson, A., & Svennersten-Sjaunja, K. (2006). Impact of milking frequencies on the level of free fatty acids in milk, fat globule size, and fatty acid composition. *Journal of dairy science*, 89(3), 1004-1009.
- Wilde, C. J., & Knight, C. H. (1990). Milk yield and mammary function in goats during and after once-daily milking. *Journal of Dairy Research*, 57(4), 441-447.
- Wilde, C. J., Addey, C. V. P., Blatchford, D. R., Peaker, M., & Casey, M. J. (1988). Feed-back inhibition of milk secretion: The effect of a fraction of goat milk on milk yield and composition. *Experimental Physiology*, 73(3), 391-397.
- Wilde, C. J., Addey, C., Boddy, L. M., & Peaker, M. (1995). Autocrine regulation of milk secretion by a protein in milk. *Biochem.j*, 305, 51-58.
- Wilde, C. J., Addey, C.V.P., Boddy, L. M., Peaker, M. Autocrine regulation of milk secretion by a protein in milk. *Biochemical Journal* 305(1995). pp. 51-58.

- Wilde, C. J., Henderson, A. J., Knight, C. H., Blatchford, D. R., Faulkner, A., & Vernon, R. G. (1987). Effects of long-term thrice-daily milking on mammary enzyme activity, cell population and milk yield in the goat. *Journal of Animal Science*, *64*(2), 533-539.
- Wilde, C., & Peaker, M. (1990). Autocrine control in milk secretion. *The Journal of Agricultural Science*, *114*(03), 235-238.
- Wood P.D.P. (1967) Algebraic Model of the lactation Curve in Cattle. *Nature* *216*, 164-5.
- Wood, I. S., & Trayhurn, P. (2003). Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. *British Journal of Nutrition*, *89*(1), 3-9.
- Wouters, J. T. M. (2012). Encyclopedia of dairy sciences. *International Dairy Journal*, *24*(1), 48.
- Wu, Z., & Huber, J. T. (1994). Relationship between dietary fat supplementation and milk protein concentration in lactating cows: A review. *Livestock Production Science*, *39*(2), 141-155.
- Wu, Z., Huber, J., Chan, S., Simas, J., Chen, K., Varela, J., et al. (1994). Effect of source and amount of supplemental fat on lactation and digestion in cows. *Journal of Dairy Science*, *77*(6), 1644-1651.
- Wu, Z., Ohajuruka, O. A., & Palmquist, D. L. (1991). Ruminal Synthesis, Biohydrogenation, and Digestibility of Fatty Acids by Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, *74*(9), 3025-3034.
- Yang, F., Li, X. S., & He, B. (2011). Effects of vitamins and trace-elements supplementation on milk production in dairy cows: A review. *African Journal of Biotechnology*, *10*, 2574-2578.
- Zened, A., Troegeler-Meynadier, A., Najar, T., & Enjalbert, F. (2012). Effects of oil and natural or synthetic vitamin E on ruminal and milk fatty acid profiles in cows receiving a high-starch diet. *Journal of Dairy Science*, *95*(10), 5916-5926.
- Zervas, G., Fegeros, K., Koysotolis, K., Goulas, C., & Mantzios, A. (1998). Soy hulls as a replacement for maize in lactating dairy ewe diets with or without dietary fat supplements. *Animal Feed Science and Technology*, *76*(1-2), 65-75.
- Zhang, R. H., Mustafa, A. F., & Zhao, X. (2006). Effects of feeding oilseeds rich in linoleic and linolenic fatty acids to lactating ewes on cheese yield and on fatty acid composition of milk and cheese. *Animal Feed Science and Technology*, *127*(3-4), 220-233.
- Zhao, F. & Keating, A. F. (2007). Expression and regulation of glucose transporters in the bovine mammary gland. *Journal of Dairy Science*, *90*, Supplement(0), E76-E86.