

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Producción Animal



TESIS DOCTORAL

Suplementación de las raciones para vacas lecheras de alta producción con aceites de origen vegetal

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Diego Martínez del Olmo

Directores

Teresa Castro Madrigal y Vicente Jimeno Vinatea

Madrid, 2012

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Producción Animal



**SUPLEMENTACIÓN DE LAS RACIONES PARA
VACAS LECHERAS DE ALTA PRODUCCIÓN CON
ACEITES DE ORIGEN VEGETAL: RENDIMIENTOS
PRODUCTIVOS Y REPRODUCTIVOS.**

TESIS DOCTORAL

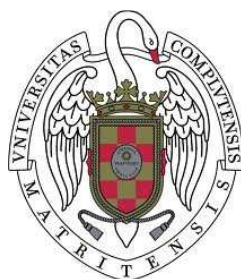
DIEGO MARTÍNEZ DEL OLMO
Ldo. en Veterinaria

Madrid, 2012

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Producción Animal



**SUPLEMENTACIÓN DE LAS RACIONES PARA
VACAS LECHERAS DE ALTA PRODUCCIÓN CON
ACEITES DE ORIGEN VEGETAL: RENDIMIENTOS
PRODUCTIVOS Y REPRODUCTIVOS.**

**Tesis doctoral presentada por
Diego Martínez del Olmo**

**Bajo la dirección de la
Dra. Teresa Castro Madrigal
y el Dr. Vicente Jimeno Vinatea**

**para optar al grado de Doctor por la
Universidad Complutense de Madrid**

Madrid, 2012

Dña. Teresa Castro Madrigal, Profesora Titular de Universidad del Departamento de Producción Animal (Facultad de Veterinaria) de la Universidad Complutense de Madrid y D. Vicente Jimeno Vinatea, Profesor Titular de Universidad (EUITA) de la Universidad Politécnica de Madrid,

CERTIFICAN:

Que la memoria titulada: “Suplementación de las raciones para vacas lecheras de alta producción con aceites de origen vegetal: rendimientos productivos y reproductivos” presentada por el licenciado en Veterinaria D. Diego Martínez del Olmo para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid, ha sido realizada bajo nuestra dirección, y considerándola concluida, autorizamos su presentación para que sea juzgada por la comisión correspondiente.

Y para que así conste, firmamos el presente certificado en Madrid, 4 de mayo de 2012.

Dra. Teresa Castro Madrigal

Dr. Vicente Jimeno Vinatea

AGRADECIMIENTOS

A los Dres. Teresa Castro Madrigal y Vicente Jimeno Vinatea, por su constante apoyo profesional y personal a este proyecto. Ha sido para mí un honor participar de sus enseñanzas, agradeciendo su paciencia y sobre todo su amistad.

A la Dra. Beatriz Isabel Redondo por su inestimable ayuda en los análisis de laboratorio para el perfil de ácidos grasos de la leche y al Departamento de Producción Animal de la facultad de Veterinaria de Madrid, por haberme facilitado este trabajo de tesis.

A Núter Feed S.A.U. por transmitirme la confianza y los medios necesarios, a Granja Vacuno Pascual Agropecuario S.L.U. por dejarme innovar, improvisar, molestar, aprender y en definitiva, disfrutar y a Pfizer Salud Animal, por ayudar a hacer posible este proyecto.

Por último agradecer a D. Juan Pedro Campillo Benítez su colaboración desinteresada en los trabajos y desarrollo del periodo experimental, a D. Angel Revilla Colás por su amistad y apoyo sin los que no hubiera sido posible llevar a buen puerto este trabajo, a D. Oscar Hontoria Esteban por ser mis ojos en la distancia y a D. Juan Pablo Ruipérez Aguirre por su infinita paciencia.

A mis padres, por transmitirme la cultura del esfuerzo, de que todo es posible con sólo intentarlo, sin lo cual, no sería lo que soy, por lo que este trabajo no existiría,

A mis hermanos por estar siempre a mi lado,

Siempre, a María, por infundirme, durante tantos años ininterrumpidos, torrentes de realidad diaria, que han hecho que no fracasara ni en este, ni en otros proyectos; por su comprensión y confianza.

Esto es de los dos.

.

Para Álvar y Rodrigo;

Recordad siempre que,
el camino que tenéis por delante, es el más importante,
el que dejáis atrás, usadlo tan sólo para aprender,
vital es acordaros de no destruir vuestros sueños,
solamente los muros que os impiden llegar a ellos,
no os preocupe intentarlo y fallar,
lo que ha de preocuparos sólo es no intentarlo.

Gracias por ser parte de lo que mas amo,
gracias por entender mi inconformismo ilimitado,
gracias por demostrarme que las pequeñas cosas si importan,
gracias por no reprocharme nada,
gracias por disfrutar lo poco que os doy,
gracias por ser mi vida.

RESUMEN

La presente tesis doctoral se llevó a cabo con el objetivo principal de estudiar la posibilidad de mejorar la calidad nutritiva de la leche de vaca, en particular el contenido en ácidos grasos poliinsaturados de la serie n-3 y CLA, y mejorar los rendimientos reproductivos, mediante la incorporación de aceites vegetales insaturados a la ración.

Para la realización de la tesis doctoral se realizaron dos pruebas experimentales en las que se utilizaron un total de 380 vacas lecheras de raza Holstein.

En la primera prueba se estudiaron los efectos de la suplementación con aceite de soja o de linaza sobre la producción y composición de la leche, así como sobre el perfil de ácidos grasos (AG) de la leche, en comparación con una ración isoenergética e isoproteica, sin grasa añadida, en inicio de lactación. Se utilizaron 6 vacas lecheras multíparas de raza Holstein, con 67 ± 17 días en leche (DEL), una producción media de $33,1 \pm 5,4$ kg/día y un peso vivo (PV) medio de $682 \pm 10,18$ kg, que fueron distribuidas al azar a los distintos tratamientos experimentales. El experimento se realizó según un diseño en cuadrado latino replicado 3 x 3 con periodos de 21 días. Los animales se alojaron en cubículos individuales que permitieron el control individual del consumo de alimentos. Las raciones experimentales fueron: control (ración sin grasa añadida), soja (ración con un 4% de aceite de soja en el concentrado y linaza (ración con un 4% de aceite de linaza en el concentrado).

No se observaron diferencias estadísticamente significativa ($p > 0,05$) en la materia seca ingerida (kg/día), la producción de leche (kg/día), ni el porcentaje y cantidad de proteína y lactosa. En la variación de peso diaria, tampoco se observan diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los tratamientos. Tanto el porcentaje, como la cantidad de grasa láctea producida fueron superiores ($P < 0,05$) en los animales del grupo control, que no consumieron aceite (4,24% y 1,79 kg), en relación a los que consumieron soja (2,77% y 1,12 kg) o linaza (3,20% y 1,26 kg). No se observaron diferencias estadísticamente significativas ($P > 0,05$) en el contenido en C4:0, C8:0, C12:0, C14:0, C14:1, C16:1 y C18:0. El contenido en C18:1 *trans-11* (ácido vaccénico)

fue significativamente superior ($P < 0,001$) en la leche de los animales que consumieron aceite, frente a la ración control, presentando los de linaza mayor contenido que los de soja (1,79%, 2,65% y 3,4% para los tratamientos control, soja y linaza, respectivamente). El contenido en ácido ruménico (C18:2 *cis*-9, *trans*-11 CLA) de la leche de los animales que fueron suplementados con aceite fue significativamente ($p < 0,0001$) mayor que la del grupo control (0,85 %, 1,24 % y 1,38 % para los tratamientos control, soja y linaza, respectivamente). El contenido en ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) fue inferior ($P < 0,05$) en la leche de los animales que no consumieron aceite frente a la de los que consumieron soja o linaza (5,71% frente a 7,31% y 7,07%, respectivamente) y el de PUFA de la serie n-3 fue superior ($p < 0,0001$) en la leche de los animales que consumieron linaza (1,46 %), seguido del tratamiento con soja (0,816 %) y por último el tratamiento control (0,576 %).

En el segundo trabajo experimental, se utilizaron 374 vacas lecheras de raza Holstein que se agruparon en 6 lotes homogéneos y fueron distribuidos al azar a los distintos tratamientos experimentales, en dos réplicas por tratamiento. Las raciones experimentales fueron las mismas que se utilizaron en el experimento 1. A los 32 ± 3 días postparto, todas las vacas fueron sometidas a un protocolo de sincronización de la ovulación. A lo largo del periodo postparto (46, 57 y 67 días postparto) se tomaron 3 muestras de 10 cc de sangre para analizar la concentración de ácidos grasos no esterificados (NEFA), β -hidroxibutirato (BHBA), Progesterona (P_4), Insulina, y el factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF-1). Los datos reproductivos de las 374 vacas fueron recogidos a lo largo de todo el periodo experimental y se controlaron: días al pico, número de inseminaciones, días abiertos, días a la 1ª inseminación artificial y porcentaje de detección de celos. Durante las tres últimas semanas del periodo experimental se seleccionaron 15 animales de cada lote, que se encontraban en media lactación ($DEL = 210 \pm 22$), de los que se tomaron muestras de leche (una muestra semanal, semana 30, 31 y 32 de lactación).

La suplementación con aceites vegetales o el tipo de aceite empleado no afectó ($p > 0,05$) la ingestión de materia seca (kg/día), la producción de leche (kg/día), la producción de leche corregida al 4 % de grasa, el porcentaje de lactosa, ni las cantidades

(kg/día) de proteína y lactosa. La leche de los animales que consumieron aceite en la ración (soja o linaza) presentó un menor porcentaje ($P < 0,05$) de grasa que los del grupo control (3,41% frente a 2,65% y 2,99%, para los tratamientos control, soja y linaza, respectivamente). El contenido en proteína de la leche fue superior ($P < 0,05$) en el tratamiento control (3,33%) que en los tratamientos con aceite (soja: 3,09% o linaza: 3,16%).

La grasa de la leche de los animales que no consumieron aceite (control) presentó un mayor contenido en C4:0, C12:0, C14:1, C16:1 ($P < 0,05$) y C16:0 ($P < 0,0001$) y un menor contenido C18:0 ($P < 0,05$) que la de los que consumieron aceite de soja o de linaza. La concentración en C18:1 *trans-11* (ácido vaccénico) más alta ($P < 0,0001$) se obtuvo en los animales que consumieron aceite de linaza (3,45 %), seguido del tratamiento con aceite de soja (1,80 %) y por último el tratamiento control (1,55 %). Los animales alimentados con aceite de soja presentaron el valor más alto en C18:0 *cis-9* (26,24%) y C18:2 *cis-9, cis-12*, (5,01%) seguidos por los que consumieron aceite de linaza (23,20%, 4,51%) y por último los que no consumieron aceite en la ración (20,06%, 3,99%). La grasa de la leche de los animales que consumieron aceite (soja o linaza) presentó un mayor contenido en los dos isómeros estudiados del ácido linoleico (C18:2 *cis-9, trans-11* CLA ($P < 0,0001$) y C18:2 *trans-10, cis 12* CLA ($P < 0,001$). La de los que consumieron aceite de linaza presentó un mayor contenido en C18:2 *cis-9, trans-11* CLA (ácido ruménico), pero un menor contenido en C18:2 *trans-10, cis 12* CLA que la de los que consumieron aceite de soja ($P < 0,05$). La leche de los animales de los tratamientos con aceite (soja o linaza) presentó un mayor contenido en el total de ácidos grasos insaturados ($P < 0,0001$), monoinsaturados (MUFA) ($P < 0,001$) y poliinsaturados (PUFA) ($P < 0,0001$) que la de los que no consumieron aceite en la ración (grupo control). El mayor contenido en PUFA n-3 ($p < 0,0001$) se observó en la leche de los animales que consumieron aceite de linaza (1,34%) seguido del tratamiento soja (0,891 %) y por último el tratamiento control (0,845 %). El Índice de aterogenicidad fue más alto ($p < 0,05$) en la leche de los animales que no consumieron aceite (3,295) comparado con los tratamientos con aceite de soja, (2,38) o linaza (2,42), sin diferencias entre estos dos últimos.

La concentración media en plasma de betahidroxibutirato (BHBA) fue significativamente mayor ($p < 0,05$) para el tratamiento con aceite de linaza (0,505 mmol/l), respecto al tratamiento aceite de soja (0,442 mmol/l), aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas. La concentración media del factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF-1), fue mayor ($P < 0,01$) en las vacas que consumieron la ración control (162,71 ng/ml) y aceite de soja (157,63 ng/ml) frente a las que consumieron aceite de linaza (129,41 ng/ml). A lo largo de todo el periodo experimental, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos para la concentración de insulina ($p > 0,05$) y la concentración plasmática de ácidos grasos no esterificados (NEFA) (mmol/l). La concentración plasmática de progesterona fue significativamente menor en los tratamientos con aceite de soja (2,876 ng/ml) y linaza (3,613 ng/ml), frente al tratamiento control (4,572 ng/ml).

Los animales que consumieron aceites poliinsaturados en la ración presentaron mejor fertilidad a la primera inseminación que los del tratamiento control. Los días abiertos y días a la primera inseminación fueron significativamente superiores ($p < 0,05$) en el tratamiento control (123,5 y 68,0, respectivamente), cuando los comparamos con el de tratamiento aceite de linaza (75,00 y 49,19, respectivamente).

En conclusión, la suplementación con aceites vegetales insaturados da lugar a un aumento en el contenido en PUFA n-3 y C18:2 *cis*-9, *trans*-11 CLA (ácido ruménico), lo que se asocia con una leche más saludable desde el punto de vista de la salud humana. En este trabajo, los indicadores metabólicos del *status* energético de las vacas no estuvieron afectados por las diferentes fuentes de grasa incorporadas a las raciones, presentando mejor fertilidad a la primera inseminación las vacas alimentadas con aceites vegetales insaturados.

SUMMARY

The main aim of this doctoral thesis was to study the possibility of improving both the nutritional quality of cow's milk, particularly the n-3 series polyunsaturated fatty acid and CLA content, and reproductive performance by incorporating unsaturated vegetable oils in the cattle feed.

For the purposes of the thesis, two experiments were carried out on a total of 380 Holstein dairy cows.

The first experiment studied the effects of soya or linseed oil supplementation in early lactation on the production, composition and fatty acid profile of the milk, as compared with isoenergetic and isoproteic feed without added fat. Six multiparous Holstein cows were used, which had 67 ± 17 days in milk (DIM), an average production of 33.1 ± 5.4 kg/day and an average live weight (LW) of 682 ± 10.18 kg. These were randomly assigned to the different experimental treatments. The experiment was carried out following a 3 x 3 replicated Latin square design with 21 day periods. Each animal was housed in its own cubicle, allowing food intake to be controlled individually. The experimental feeds were: control (feed with no added fats), soya (4% soya oil in the feed concentrate) and linseed (4% linseed oil in the feed concentrate).

No statistically significant differences ($p > 0.05$) were found in dry material intake (kg/day), milk production (kg/day) or the percentage and amount of protein and lactose. Neither were there significant differences ($p > 0.05$) between treatments in daily weight variation. Both the percentage and the amount of fat produced were higher ($P < 0.05$) in the control group of animals not treated with oil (4.24% and 1.79 kg), compared to those supplemented with soya oil (2.77% and 1.12 kg) or linseed oil (3.20% and 1.26 kg). No statistically significant differences ($p > 0.05$) in content were found in C4:0, C8:0, C12:0, C14:0, C14:1, C16:1 and C18:0. The C18:1 *trans-11* content (vaccenic acid) was found to be significantly higher ($p < 0.0001$) in the milk of animals supplemented with oil than in that of the control group, with a higher content

obtained with linseed oil than with soya oil (1.79%, 2.65% and 3.4% for the control, soya and linseed treatments respectively). The rumenic acid content (C18:2 *cis*-9, *trans*-11 CLA) in the milk of animals fed with oil supplements was significantly higher ($P < 0.0001$) than in that of the control group (0.85 %, 1.24 % and 1.38 % for the control, soya and linseed treatments respectively). The polyunsaturated fatty acid (PUFA) content was lower ($P < 0.05$) in the milk of animals not given oil than in that of animals supplemented with soya or linseed oil (5.71% compared to 7.31% and 7.07% respectively). The n-3 series PUFA content was higher ($p < 0.0001$) in the milk of animals treated with linseed oil (1.46%) and soya oil (0.816%) with respect to the control treatment (0.576%).

In the second experiment 374 Holstein dairy cows were divided into 6 homogeneous groups and randomly assigned to the different experimental treatments, with two replicates per treatment. The feeds administered were the same as in the first experiment. All the cows underwent an estrus synchronisation protocol at 32 ± 3 days postpartum. Three 10 cc blood samples were extracted during the postpartum period (at 46, 57 and 67 days postpartum) in order to analyse the concentration of non-esterified fatty acids (NEFA), β -hydroxybutyrate (BHBA), progesterone (P_4), insulin, and type 1 insulin-like growth factor (IGF-1). Reproductive data on all 374 cows was gathered throughout the whole experimental period, and peak days, number of inseminations, open days, days to first artificial insemination and the heat detection percentage were monitored. During the last three weeks of the experimental period, milk samples were taken at weeks 30, 31 and 32 of lactation (one per week) from 15 animals in mid-lactation selected from each group ($DIM = 210 \pm 22$).

Supplementation with vegetable oils or the type of oil used did not affect ($p > 0.05$) dry material intake (kg/day), milk production (kg/day), milk production corrected to 4% fat, the percentage of lactose or the amounts (kg/day) of protein and lactose. Milk from animals with soya or linseed oil added to their feed showed a lower percentage ($P < 0.05$) of fat (2.65% and 2.99% for soya and linseed respectively) than milk from the control group (3.41%). The protein content of the milk was higher

($P < 0.05$) in the control group (3.33%) than in the animals treated with oil supplements (soya: 3.09%; linseed: 3.16%).

Fat in the milk of animals not treated with oil (the control group) was found to have a higher content of C4:0, C12:0, C14:1, C16:1 ($P < 0.05$) and C16:0 ($P < 0.0001$) and a lower C18:0 content ($P < 0.05$) than in animals treated with soya or linseed oil supplements. The highest concentration of C18:1 *trans-11* (vaccenic acid) ($P < 0.0001$) was obtained from animals treated with linseed oil (3.45%), followed by those treated with soya oil (1.80%), and the lowest concentration was found in animals in the untreated control group (1.55%). Animals treated with soya oil showed the highest content of C18:0 *cis-9* (26.24%) and C18:2 *cis-9, cis-12* (5.01%), followed by those treated with linseed oil (23.20% and 4.51% respectively), while the lowest content was found in animals not treated with oil supplements (20.06% and 3.99% respectively). Fat in the milk of animals treated with soya or linseed oil had a higher linoleic acid content in the two isomers studied: C18:2 *cis-9, trans-11* CLA ($P < 0.0001$) and C18:2 *trans-10, cis-12* CLA ($P < 0.001$). Milk from animals treated with linseed oil contained more C18:2 *cis-9, trans-11* CLA (rumenic acid) but less C18:2 *trans-10, cis-12* CLA than that of animals treated with soya oil ($P < 0.05$). Milk from animals treated with either soya or linseed oil supplements had a higher total of unsaturated fatty acids ($P < 0.0001$), monounsaturates (MUFA) ($P < 0.001$) and polyunsaturates (PUFA) ($P < 0.0001$) than that of animals not treated with oil in the control group. The highest PUFA n-3 content ($p < 0.0001$) was found in milk from animals treated with linseed oil (1.34%), followed by those treated with soya (0.891%) and lastly those in the control group (0.845%). The atherogenic index was higher ($p < 0.05$) in the milk of animals not treated with oil (3.295) than in that of animals treated with soya oil (2.38) or linseed oil (2.42), with no difference between these last two.

The average beta-hydroxybutyrate plasma concentration (BHBA) was significantly higher ($p < 0.05$) with the linseed oil treatment (0.505 mmol/l) than with the soya oil treatment (0.442 mmol/l), although the difference was not statistically significant. The average concentration of type I insulin-like growth factor (IGF-1) was greater ($P < 0.01$) in cows given the control feed (162.71 ng/ml) or soya oil supplement

(157.63 ng/ml) than in those treated with linseed oil (129.41 ng/ml). Throughout the experimental period, no statistically significant differences between treatments were observed in either insulin concentration ($p>0.05$) or the plasma concentration of non-esterified fatty acids (NEFA) (mmol/l). The plasma progesterone concentration was significantly less in the treatments with soya oil (2.876 ng/ml) and linseed oil (3.613 ng/ml) than in the control treatment (4.572 ng/ml).

Animals given polyunsaturated oils with their feed had better fertility at first insemination than those in the control group. The numbers of open days and days to first insemination were significantly higher ($p<0.05$) with the control treatment (123.5 and 68.0 respectively) than with the linseed oil treatment (75.00 and 49.19 respectively).

This research has shown that supplementation with unsaturated vegetable oils leads to an increased PUFA n-3 and C18:2 *cis-9, trans-11* CLA (rumenic acid) content, which is associated with milk that is more beneficial to human health. In this study, the metabolic indicators of the energetic status of the cows were not affected by the different sources of fat incorporated in the feed, and greater fertility at first insemination was observed in cows treated with unsaturated vegetable oils.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS.	V
ÍNDICE DE FIGURAS.	VII
ABREVIATURAS.	IX
1. INTRODUCCIÓN.	1
2. OBJETIVOS.	5
3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.	7
3.1. Lípidos en la nutrición de rumiantes.	8
3.1.1. Clasificación, estructura y nomenclatura.	8
3.1.2. Metabolismo de los lípidos en el rumen.	12
3.1.3. Síntesis de grasa en la glándula mamaria.	16
3.2. Ácido Linoleico Conjugado (CLA).	16
3.3. Relaciones grasa y salud humana.	19
3.3.1. Ácidos grasos poliinsaturados <i>n</i> -3 (PUFA <i>n</i> -3).	19
3.3.2. Ácido Linoleico Conjugado (CLA).	21
3.3.3. Recomendaciones dietéticas.	24
3.4. Utilización de grasas en la alimentación del ganado vacuno lechero.	26
3.4.1. Efectos sobre la ingestión.	27

3.4.2.	Efectos sobre la producción y composición de la leche.	28
3.4.2.1.	Efectos sobre la producción.	29
3.4.2.2.	Efectos sobre la grasa.	30
3.4.2.3.	Efectos sobre la proteína.	31
3.4.2.4.	Efectos sobre el perfil de ácidos grasos (AG).	32
3.4.2.4.1.	Ácidos grasos de cadena corta y media.	32
3.4.2.4.2.	Ácidos esteárico y oleico.	33
3.4.2.4.3.	Ácidos grasos poliinsaturados.	34
3.4.2.4.4.	Ácidos grasos <i>trans</i> y Ácido Linoleico Conjugado (CLA).	35
3.4.3.	Fase de lactación.	36
3.4.4.	Efectos sobre la reproducción.	37
3.4.4.1.	Efecto de los ácidos grasos sobre la reactivación ovárica durante el postparto.	39
3.4.4.2.	Efecto de la insulina sobre la reactivación ovárica durante el postparto.	39
3.4.4.3.	Efecto de las grasas sobre la función lútea.	40
4.	MATERIAL Y MÉTODOS.	42
4.1.	Prueba Experimental 1: Incorporación de aceites vegetales insaturados en raciones de vacas lecheras en inicio de lactación.	43
4.1.1.	Animales, Alojamiento y tratamientos experimentales.	43
4.1.2.	Desarrollo experimental.	46
4.1.3.	Determinaciones analíticas.	46
4.1.4.	Análisis Estadístico.	48

4.2.	Prueba experimental 2: Incorporación de aceites vegetales insaturados en raciones de vacas lecheras: parámetros productivos en media lactación y parámetros reproductivos.	49
4.2.1.	Animales, Alojamiento y tratamientos experimentales.	49
4.2.2.	Desarrollo experimental.	52
4.2.3.	Determinaciones analíticas.	54
4.2.4.	Análisis Estadístico.	54
5.	RESULTADOS.	56
5.1.	Prueba experimental 1: Parámetros productivos y composición de la leche en inicio de lactación.	57
5.1.1.	Parámetros productivos en inicio de lactación.	57
5.1.2.	Composición de los ácidos grasos de la leche en inicio de lactación.	58
5.2.	Prueba Experimental 2: Parámetros productivos, composición de la leche en media lactación y parámetros reproductivos.	63
5.2.1.	Parámetros productivos en media lactación.	63
5.2.2.	Composición de ácidos grasos de la leche en media lactación.	64
5.2.3.	Parámetros reproductivos.	68
6.	DISCUSIÓN.	76
6.1.	Incorporación de aceites vegetales insaturados en raciones de vacas lecheras: Efectos sobre los parámetros productivos.	77
6.2.	Incorporación de aceites vegetales insaturados en raciones de vacas lecheras: Efectos sobre la composición en ácidos grasos de la leche.	82

6.3.	Incorporación de aceites vegetales insaturados en raciones de vacas lecheras: Efectos sobre la reproducción.	89
6.3.1.	Parámetros sanguíneos.	89
6.3.2.	Parámetros reproductivos.	92
7.	CONCLUSIONES.	94
8.	BIBLIOGRAFÍA.	97

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 4.1. Raciones experimentales.	44
Tabla 4.2. Composición química (% MS) de las raciones experimentales.	45
Tabla 4.3. Composición en ácidos grasos (g/100 g del total de ácidos grasos) de las raciones experimentales.	45
Tabla 4.4. Composición en ácidos grasos de los aceites utilizados en las raciones experimentales (g/100 g del total de ácidos grasos).	45
Tabla 4.5. Composición química (% MS) de los ingredientes y de las raciones experimentales.	50
Tabla 5.1. Ingestión de materia seca (MSI), producción y composición de la leche en los diferentes tratamientos experimentales en inicio de lactación (medias corregidas por mínimos cuadrados, <i>least square means</i>).	58
Tabla 5.2. Composición en ácidos grasos (g/100 g del total de ácidos grasos) de la grasa de la leche en los diferentes tratamientos experimentales en inicio de lactación (medias corregidas por mínimos cuadrados, <i>least square means</i>).	59
Tabla 5.3. Producción y composición de la leche en los diferentes tratamientos experimentales en media lactación (medias corregidas por mínimos cuadrados, <i>least square means</i>).	63

Tabla 5.4. Composición en ácidos grasos (g/100 g del total de ácidos grasos) de la grasa de la leche en los diferentes tratamientos experimentales en media lactación (medias corregidas por mínimos cuadrados, <i>least square means</i>).	65
Tabla 5.5. Producción, días a los que se alcanza el pico de producción y variaciones de peso en los diferentes tratamientos experimentales (medias corregidas por mínimos cuadrados, <i>least square means</i> , excepto días al pico de producción que se presentan las medianas).	68
Tabla 5.6. Parámetros sanguíneos en los diferentes tratamientos experimentales (medias corregidas por mínimos cuadrados, <i>least square means</i>).	69
Tabla 5.7. Índices reproductivos en los diferentes tratamientos experimentales (mediana y rango intercuartílico).	75

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3.1. Biosíntesis de los ácidos grasos poliinsaturados.	11
Figura 3.2. Principales vías de biohidrogenación de los ácidos linoleico y linolénico.	15
Figura 3.3. Principales vías de síntesis de ácido vaccénico y ácido ruménico en la leche.	17
Figura 4.1. Esquema del programa reproductivo (sincronización y resincronización de la ovulación) para la 1ª y 2ª inseminación artificial.	52
Figura 5.1. Evolución de la concentración plasmática de betahidroxibutirato (BHBA) (mmol/l), entre los 21 y 10 días antes de la IA y en el momento de la IA (46, 57 y 67 días post parto) para los tratamientos control, soja y linaza.	70
Figura 5.2. Evolución de la concentración plasmática del factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF-1) (ng/ml), entre los 21 y 10 días antes de la IA y en el momento de la IA (46, 57 y 67 días post parto) para los tratamientos control, soja y linaza.	71
Figura 5.3. Evolución de la concentración plasmática de insulina ($\mu\text{g/l}$), entre los 21 y 10 días antes de la IA y en el momento de la IA (46, 57 y 67 días post parto) para los tratamientos control, soja y linaza.	72
Figura 5.4. Evolución de la concentración plasmática de ácidos grasos no esterificados (NEFA) (mmol/l), entre los 21 y 10 días antes de la IA y en el momento de la IA (46, 57 y 67 días post parto) para los tratamientos control, soja y linaza.	73

Figura 5.5. Evolución de la concentración plasmática de progesterona (ng/ml), entre los 21 y 10 días antes de la IA y en el momento de la IA (46, 57 y 67 días post parto) para los tratamientos control, soja y linaza.

74

ABREVIATURAS

IA	Inseminación artificial
AA	Ácido Araquidónico
AG	Ácido graso
AGS	Ácido graso saturado
AGCC (SCFA)	Ácido graso de cadena corta
AGCL (LCFA)	Ácido graso de cadena larga
AGCM (MCFA)	Ácido graso de cadena media
AGNE	Ácido graso no esterificado
AOAC	Association of Analytical Communities
BEN	Balance energético negativo
BHBA	β -Hidroxibutirato
CLA	Ácido Linoleico conjugado
Cnz	Cenizas
DEL	Días en leche
DG	Diagnóstico de gestación
DHA	Ácido Docosahexaenoico
DMBA	7,12-dimetilbenzo(a)antraceno
dpp	Días post parto
EC	Ecógrafo

EE	Extracto etéreo
EFSA	European Food Safety Authority
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ENI	Energía neta leche
EPA	Ácido Eicosapentaenóico
F:C	Relación forraje:concentrado
FEDNA	Federación española para el desarrollo de la nutrición animal
FAD	Fibra ácido detergente
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FND	Fibra neutro detergente
FNDf	Fibra Neutro Detergente aportada por el forraje
GnRH	Hormona liberadora de Gonadotropina
IA	Inseminación artificial
Ig A	Inmunoglobulina A
Ig G	Inmunoglobulina B
Ig M	Inmunoglobulina M
Ig E	Inmunoglobulina E
IGF-1	Factor de crecimiento similar a la Insulina tipo I
INRA	Institut National de la Recherche Agronomique
LDL	Low density lipoprotein
LH	Hormona luteinizante

MF	Materia fresca
MS	Materia seca
MSI	Materia seca ingerida
MUFA	Ácidos grasos monoinsaturados
n-3	Ácidos grasos poliinsaturados de la serie 3
n-6	Ácidos grasos poliinsaturados de la serie 6
n-9	Ácidos grasos poliinsaturados de la serie 9
NEFA	Ácidos grasos no esterificados
NRC	National Research Council
OMS	Organización Mundial de la Salud
P/S	Relación ácidos grasos poliinsaturados/saturados
P ₄	Progesterona
PB	Proteína bruta
PGF ₂ α	Prostaglandina F ₂ α
PL	Producción de leche
PUFA	Ácidos grasos poliinsaturados
PUFA n-3	Ácidos grasos poliinsaturados de la serie 3
PV	Peso vivo
SEM	Error estándar de la media
UFL	Unidad forrajera leche

1. Introducción

Las altas necesidades energéticas de las vacas lecheras para la producción de leche, la limitación en la capacidad de ingestión y la necesidad de mantener unos mínimos de fibra, determinan la necesidad de utilizar grasas en la formulación de las raciones, sobre todo en inicio de lactación. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la mayoría de las grasas no son inertes en el rumen y, particularmente las grasas insaturadas, pueden producir alteraciones en el metabolismo ruminal que podrían reducir los rendimientos productivos (Palmquist, 1984).

Por otra parte, se sabe que las grasas en general y algunos ácidos grasos en particular influyen sobre los rendimientos reproductivos (Staples y col., 2006). Las grasas podrían actuar modulando la función de los ácidos grasos no esterificados (NEFA) que actuarían como una señal entre el estado nutricional y la reproducción (Friggens y col., 2010). Aunque los mecanismos que explican las relaciones nutrición–reproducción en el ganado vacuno, todavía no están suficientemente establecidos, parece ser que la influencia de las grasas sobre los rendimientos reproductivos tiene que ver con una mejora en el crecimiento folicular y en la secreción uterina de progesterona (P₄), mayor viabilidad del embrión y una mejora en el mantenimiento de la gestación (Santos y col., 2008).

Otro de los beneficios que se obtienen del empleo grasas en las raciones de vacas es la posibilidad de alterar la composición de la grasa de la leche. En los últimos años, este aspecto ha cobrado un enorme interés por la posibilidad de mejorar la calidad de la leche y los productos lácteos desde un punto de vista de la salud humana. En efecto, el creciente interés de los consumidores de los países desarrollados por la relación entre dieta y salud ha tenido un claro impacto en la demanda de productos alimenticios y ha determinado cambios notables en los sistemas de producción animal, dirigidos hacia la obtención de productos que sean en primer lugar seguros, pero que además presenten efectos favorables para la salud.

La leche y los productos lácteos se han considerado siempre como alimentos de un alto valor nutritivo para el hombre, fuentes de proteínas de alto valor biológico, minerales y vitaminas (NRC, 1998, Demment y Allen, 2004). Proporcionan entre un 15

a un 25 % de las grasas que consume el hombre y de un 25 a un 35 % de las grasas saturadas (Chilliard y col., 2001a). Además, la grasa de la leche es la responsable de muchas de las propiedades físicas, sensoriales y de fabricación de los productos lácteos (Kaylegain y Lindsay, 1995).

La presencia de lípidos en la dieta, particularmente las grasas saturadas, es considerada globalmente como negativa, y la mayoría de los organismos oficiales de los países desarrollados con responsabilidad en la salud de la población insisten en la recomendación de limitar su consumo (EFSA, 2010). El consumo de grasas en general y de grasas saturadas en particular ha sido relacionado con la obesidad, la incidencia de problemas cardiovasculares y con algunos tipos de tumores (Lin y col., 2004).

Sin embargo, en los últimos años la idea negativa que tenía el consumidor de las grasas de origen animal ha ido cambiando, ya que descubrimientos recientes han demostrado que algunos ácidos grasos no son necesariamente aterogénicos, como es el caso del ácido esteárico, y que los ácidos grasos son aterogénicos sólo si se ingieren en cantidades excesivas, mientras que algunos ácidos grasos insaturados poseen efectos beneficiosos para la salud humana, como son los ácidos grasos mono (MUFA) y poliinsaturados (PUFA) de la serie n-3 y el ácido linoleico conjugado (CLA) (Pariza 2004).

A pesar de la intensa hidrogenación que sufren los ácidos grasos insaturados en el rumen, estudios recientes indican que es posible modificar su perfil para obtener leche con un menor contenido en ácidos grasos saturados de cadena corta y media, y un mayor contenido en poliinsaturados de cadena larga. Una forma sencilla de modificar la composición de la grasa de la leche es suplementando las raciones de las vacas con lípidos insaturados. En alimentación animal, la principal fuente de lípidos insaturados son los aceites vegetales procedentes de semillas oleaginosas (aceite de girasol, oliva,

colza, soja o linaza) que se pueden incluir en las raciones incorporando la propia semilla, o bien como aceites libres.

De los aceites vegetales sin procesar, el más utilizado es el de soja por su mayor disponibilidad en el mercado de materias primas, y en menor medida el de girasol o linaza. Hace unos 15 años se realizaron algunos estudios con linaza, con el objetivo de reducir el contenido en grasa de la leche. En los últimos años, la semilla de linaza ha vuelto a despertar cierto interés, pero en este caso, los estudios realizados se plantean con el fin de modificar el perfil de ácidos grasos de la leche y mejorar la reproducción de las vacas (Fuentes y col., 2008, Brunshwig y col., 2010). Sin embargo, son muy escasos los estudios realizados con aceite de linaza incorporado como aceite libre.

La suplementación de las raciones para vacas lecheras con aceites vegetales insaturados como el de soja o linaza podría mejorar los rendimientos reproductivos de las vacas lecheras y obtener leche con una grasa más saludable para el consumidor, con un mayor contenido en ácidos grasos poliinsaturados de la serie n-3 y en ácido linoleico conjugado (CLA).

Como consecuencia, la presente Tesis Doctoral pretende evaluar los efectos de la utilización de aceites vegetales insaturados, como el de soja o linaza, sobre los rendimientos productivos, reproductivos y el perfil de ácidos grasos de la leche, con la intención de generar nuevos conocimientos desde el rigor científico, que pueden ser de utilidad a la realidad concreta y repercutir positivamente en el sector.

2. Objetivos

El objetivo general del presente trabajo fue estudiar la posibilidad de mejorar la calidad nutritiva de leche de vaca, en particular su concentración en ácidos grasos poliinsaturados de la serie n-3 y en ácido linoleico conjugado (CLA) y mejorar los rendimientos reproductivos mediante la incorporación de distintos tipos de aceites vegetales a la ración.

Objetivos específicos:

1. Comparar los resultados productivos en vacas lecheras de alta producción obtenidos con raciones sin grasa añadida o con aceites vegetales poliinsaturados (soja y linaza) en inicio y media lactación.
2. Cuantificar el efecto de la suplementación con aceites poliinsaturados (soja y linaza) sobre el perfil de ácidos grasos de la grasa de la leche en inicio y media lactación.
3. Evaluar los efectos de la suplementación con aceites poliinsaturados (soja y linaza) sobre los rendimientos reproductivos en vacas lecheras de alta producción

3. Revisión bibliográfica

3.1. Lípidos en la nutrición de los rumiantes

3.1.1. Clasificación, estructura y nomenclatura

Los lípidos son un grupo heterogéneo de compuestos que tienen la propiedad común de ser relativamente insolubles en agua y solubles en solventes no polares (Murray y col., 2001).

Generalmente, el término grasa se emplea tanto para referirse a grasa, como a aceites y tanto uno como otro son constituyentes de las plantas y de los animales, con la misión principal de aportar energía. Los aceites suelen ser líquidos a temperatura ambiente, y más reactivos químicamente, mientras que las grasas tienen consistencia sólida o semisólida.

Los lípidos están formados por carbono, hidrógeno y oxígeno, y en ocasiones también pueden contener fósforo, azufre y nitrógeno. Una forma de clasificarlos es como saponificables, si tienen capacidad de formar jabones con sosa y potasa; o insaponificables, si no tienen esa propiedad (De Blas y col, 1987; Fuentes, 2009).

Desde el punto de vista de la alimentación, los lípidos se pueden clasificar en triglicéridos o triacilglicéridos, fosfolípidos, glucolípidos y ésteres del colesterol. Los componentes cualitativa y cuantitativamente más importantes son los triglicéridos.

Las grasas o glicéridos son ésteres de ácidos grasos con el alcohol trihídrico glicerol. Cuando los tres grupos alcohol se esterifican con ácidos grasos, se habla de triglicéridos. Los mono y diglicéridos, con uno o los dos grupos alcohol esterificados respectivamente, también se encuentran naturalmente, pero en menores cantidades. El tipo de ácidos grasos, y la posición en la que se esterifican con el glicerol, determina las características de los triglicéridos (Murray y col., 2001).

Los fosfolípidos están compuestos por una molécula de glicerol, dos ácidos grasos, un grupo fosfato y un grupo hidrófilo, mientras que los glucolípidos contienen azúcares. Ambos forman parte de las membranas celulares y modulan su actividad. Los ésteres de colesterol también son componentes estructurales de las membranas. Están

formados por colesterol y un ácido graso. El colesterol, además es precursor de esteroides hormonales, ácidos biliares y vitamina D. Los forrajes contienen mayoritariamente glucolípidos (70-80 %) y fosfolípidos (20-30, mientras que las semillas contienen fundamentalmente triglicéridos.

Las grasas y aceites naturales son mezclas de triglicéridos mixtos (tres ácidos grasos diferentes) o simples (los tres ácidos grasos son similares). El aceite de linaza contiene entre un 6 y un 10 % de ácidos grasos saturados y el resto son insaturados, siendo el mayoritario el ácido α linolénico (entre un 53,3 y un 57,3 %). Presenta un 75 % de triglicéridos mixtos y un 25 % de triglicéridos simples. El aceite de soja contiene entre un 13 y un 17 % de ácidos grasos saturados y el resto son insaturados siendo el mayoritario el ácido linoleico (54 %). Presenta un 82 % de triglicéridos mixtos y el resto son simples.

Los ácidos grasos (AG) son moléculas formadas por una cadena hidrocarbonada lineal larga con un extremo de la cadena acabado en un grupo carboxilo (-COOH). De manera general, se pueden clasificar atendiendo a diferentes criterios como la longitud de la cadena, su origen, o bien el grado de saturación. La clasificación según la longitud de la cadena o número de átomos de carbono fue establecida por Bloor (1943) en tres categorías:

- AG de cadena corta (AGCC o SCFA): de 4 a 6 carbonos
- AG de cadena media (AGCM o MCFA), de 8 a 14 carbonos
- AG de cadena larga (AGCL o LCFA), de 16 a 24 carbonos

Según el grado de saturación se clasifican como AG saturados, si no contienen ningún doble enlace, monoinsaturados (AGMI o MUFA), si contienen un doble enlace, o AG poliinsaturados, (AGPI o PUFA) si contienen dos o más.

Los AG saturados abundan en los animales terrestres y en el aceite de palma y coco, los AGMI predominan en el aceite de oliva y en el de colza, y los AGPI en el de girasol, maíz, soja, y linaza.

Cuando existe un doble enlace en la cadena pueden presentarse dos formas en función de la disposición en el espacio de los átomos de hidrógeno unidos a los átomos de carbono del doble enlace. Se habla de configuración *cis*, cuando los dos átomos de hidrógeno se encuentran del mismo lado del doble enlace, y de *trans*, cuando se encuentran uno a cada lado.

La mayoría de los ácidos grasos presentan configuración *cis*. Los isómeros *trans* se encuentran de forma natural en la grasa de la carne y leche de los rumiantes ya que se originan durante la biohidrogenación ruminal de los ácidos grasos insaturados. También se pueden originar por transformación química de los ácidos naturales en determinados procesos tecnológicos. La mayoría de los ácidos grasos de configuración *trans* se consideran negativos para la salud humana, salvo algunas excepciones como el *trans*-11 C18:1 o ácido vaccénico (Chilliard y col., 2001b).

Los ácidos grasos poliinsaturados a su vez se pueden clasificar en función de donde se encuentre el primer doble enlace en la cadena, empezando a contar por el extremo del grupo metilo, en tres series principales: *n*-3 (omega-3), *n*-6 (omega-6) y *n*-9 (omega-9).

Los ácidos grasos de la serie *n*-9 no son esenciales ya que el cuerpo humano puede introducir una insaturación a un ácido graso saturado en la posición del carbono 9 y sintetizarlos a partir de una grasa saturada. De esta forma, el ácido oleico (C18:1, *n*-9), componente del aceite de oliva y al cual se le atribuyen propiedades nutricionales beneficiosas, no requiere estar presente en nuestra dieta.

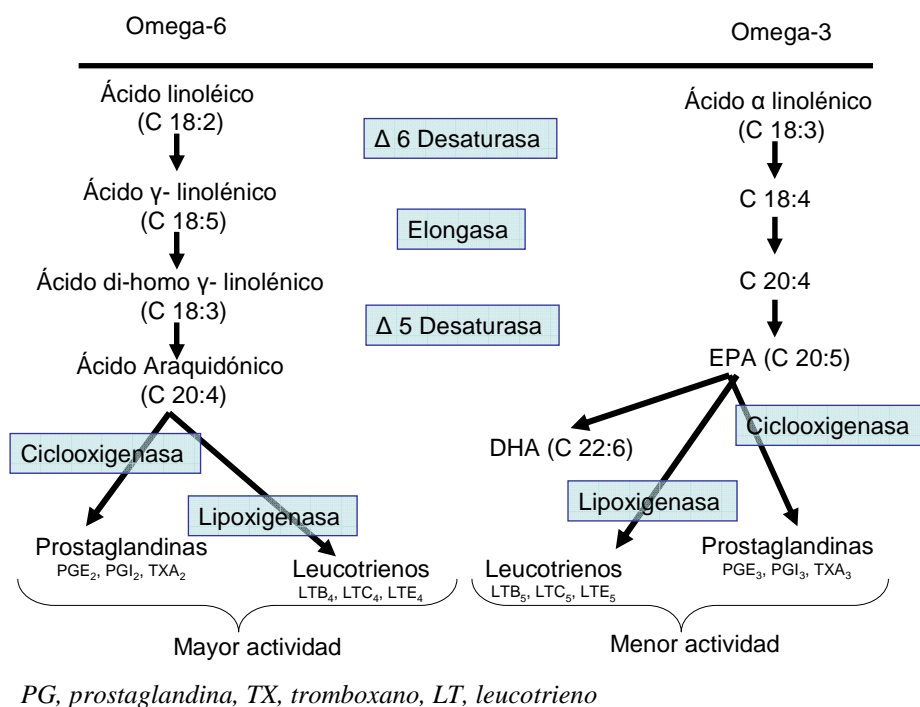
No ocurre lo mismo con los ácidos grasos *n*-6 y *n*-3, ya que nuestro organismo no puede introducir insaturaciones en dichas posiciones. De esta forma, los ácidos linoleico (C18:2, *n*-6) y α linolénico (C18:3, *n*-3) sí son esenciales, y deben ser aportados con la dieta en proporciones bien determinadas ya que su carencia produce serias alteraciones metabólicas (Sanders, 2000). La serie *n*-6, deriva del ácido linoleico y la *n*-3 del α linolénico. La distinción de los ácidos grasos por la posición de los dobles enlaces determina el tipo de eicosanoides que puede sintetizar el organismo a partir de los ácidos grasos. Para algunas funciones metabólicas y también estructurales, se

requieren ácidos grasos poliinsaturados de mayor número de carbonos, como el ácido araquidónico (AA), ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA). Estos ácidos grasos, se forman en el organismo a partir de ácidos grasos precursores, de la serie *n*-6 o de la serie *n*-3, que son sometidos a procesos de elongación y de desaturación. El ácido linoleico se metaboliza a AA (C20:4 *n*-6) y el α linolénico da lugar al EPA (C20:5 *n*-3) y al DHA (C20:6 *n*-3) (Nakamura y Nara, 2003) (figura 3.1.)

Además de ser una fuente de energía, los AGPI de la serie *n*-6 y *n*-3, se incorporan a las membranas de las células donde son precursores de los eicosanoides, como las prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos que intervienen en numerosos procesos fisiológicos como la coagulación de la sangre ó la respuesta inflamatoria e inmunológica.

Las fuentes más ricas en DHA y EPA son los aceites de pescado en general, especialmente el pescado azul y las algas marinas. El alto contenido en estos AG del pescado es consecuencia del consumo de fitoplancton, rico en AGPI *n*-3.

Figura 3.1. Biosíntesis de los ácidos grasos poliinsaturados



3.1.2. Metabolismo de los lípidos en el rumen

La única vía metabólica para la utilización de las grasas es la beta-oxidación para producir acetil-CoA, y su introducción en el ciclo de Krebs, de donde se obtiene la energía. Pero la extracción de energía en el ciclo de Krebs requiere la presencia de oxígeno, y el carácter anaerobio del rumen impide la utilización de grasas como fuente de energía por parte de las bacterias ruminales. Sin embargo, aunque no los utilizan como fuente de energía, la población microbiana actúa sobre los lípidos, modificándolos.

La digestión de la grasa incluye una fase de hidrólisis o lipólisis y otra de hidrogenación, de modo que los ácidos grasos absorbidos en el intestino son más saturados que los presentes en la ración (Doreau y Chilliard, 1997).

Hidrólisis o lipólisis

La hidrólisis de los lípidos de la ración se producen por acción de lipasas, galactosidasas y fosfolipasas, producidas por bacterias (principalmente *Anaerovibrio lipolytica*) y protozoos (Harfoot y Hazlewood, 1988). Se ha observado que los antibióticos (Van Nevel y Demeyer, 1995) y valores bajos de pH (Van Nevel y Demeyer, 1996) disminuyen la lipólisis. La velocidad y el grado de lipólisis pueden verse influidos por la fuente de grasa (más alto cuando son puras, que si son jabones cálcicos o integradas en una estructura celular, Doreau y Ferlay, 1994).

Según Salinas y col., (2006), los ácidos grasos que resultan de la hidrólisis de la mayor parte de la grasa de la ración por acción de las enzimas microbianas en el rumen, son fundamentalmente de cadena larga. La abundancia de ácidos grasos de cadena larga altera la fermentación ruminal, cubriendo la fibra y por tanto deprimiendo su digestión. La actividad tanto de las lipasas vegetales como de la saliva tiene poca importancia en rumiantes. El producto final del proceso son ácidos grasos libres y glicerol.

Palmquist y Kinsey, (1994) demostraron que la velocidad de hidrólisis ruminal está directamente relacionada con el grado de instauración. Los aceites son hidrolizados más rápidamente que el sebo. El aceite de pescado es hidrolizado a niveles comparables

al sebo (Palmquist, 1996) debido a la disposición especial de los ácidos grasos de cadena larga (C20-C22) insaturados en estos lípidos. Van Nevel y Demeyer (1996) observaron que la lipólisis disminuía para pH ruminales inferiores a 6 y que este proceso era más sensible a valores de pH bajos.

Los ácidos grasos insaturados no esterificados son muy tóxicos para las bacterias gram-positivas o celulolíticas, las bacterias metanogénicas y los protozoos (Brodisou y col., 1994)

Biohidrogenación ruminal

Tras la lipólisis, tiene lugar la hidrogenación ruminal, que alcanzan el 60-90 % de los ácidos grasos insaturados (Palmquist y Jenkins, 1980), pero el proceso de saturación depende de la presencia del grupo carboxilo libre, por lo que sólo ocurre después de la lipólisis. Las hidrogenasas permiten la reducción de los ácidos grasos mediante diferentes vías. El producto final de los ácidos grasos poliinsaturados de 18 átomos de carbono es el ácido esteárico (Harfoot y Hazlewood, 1988). El proceso de biohidrogenación lo pueden llevar a cabo multitud de bacterias normalmente presentes en el rumen, especialmente ciertas cepas de *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Bacteroides rumenicola*, *Ruminococcus albus*, y *Ruminococcus flavefaciens*, espiroqueto *Borrelia spp*, y protozoos oligótricos (Dawson y Kemp 1970 y Maczulak y col, 1981).

Los ácidos grasos saturados son menos tóxicos para los microorganismos ruminales que los insaturados.

Previa a la biohidrogenación tiene lugar la isomerización de la forma *cis* a su forma *trans*, un isómero más estable en el rumen. Después de la isomerización tiene lugar la biohidrogenación progresiva de las insaturaciones. En función del ritmo de paso y del pH ruminal, la biohidrogenación puede ser incompleta, lo que resulta en un flujo de isómeros intermedios como el ácido linoleico conjugado (CLA) al duodeno. Algunos de estos isómeros son potentes inhibidores de la síntesis de grasa en la glándula mamaria (Bauman y Grinari, 2003).

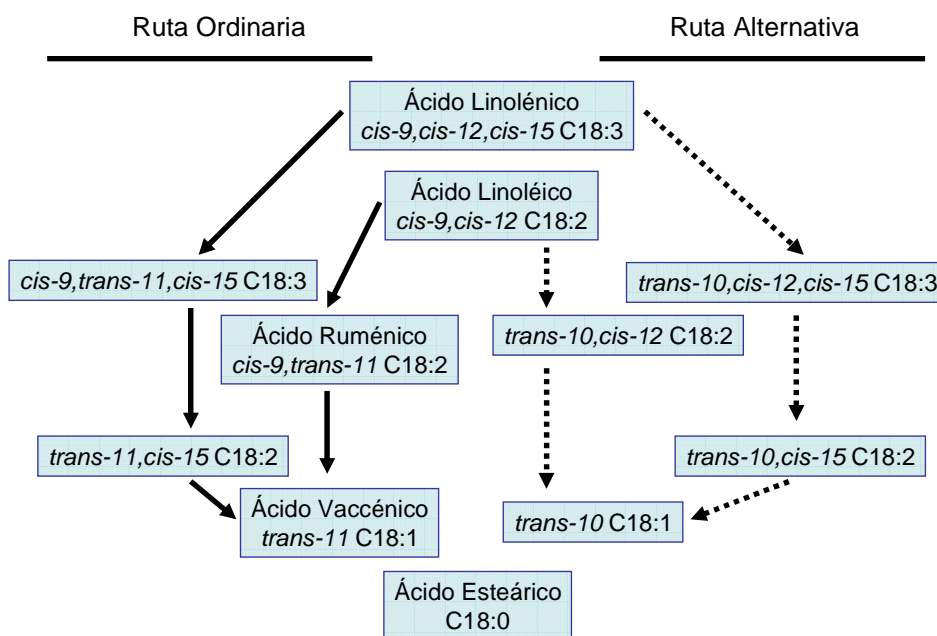
El balance entre la entrada y la salida de ácidos grasos en el rumen suele ser positivo (Jenkins, 1993), ya que los ácidos grasos no son digeridos en el rumen, y debido a que las bacterias ruminales sintetizan ácidos grasos a partir de hidratos de carbono y proteínas. Como consecuencia de estos procesos, la composición de los ácidos grasos que llega al duodeno es muy diferente de la de los lípidos ingeridos. Así, mientras que los ácidos grasos ingeridos de origen vegetal contienen un número par de carbonos, son insaturados y los dobles enlaces se encuentran en posición *cis*, los ácidos grasos que alcanzan el duodeno del rumiante contienen cadenas con números pares o impares (procedentes de la síntesis microbiana) y los insaturados pueden encontrarse en configuración *cis* y *trans* (consecuencia de la saturación incompleta de los ácidos grasos insaturados).

Los PUFA mayoritarios en las raciones de rumiantes son el ácido linoleico y linolénico. La figura 3.2. muestra las vías para su hidrogenación en el rumen.

El proceso de biohidrogenación ruminal del ácido linoleico se realiza en tres pasos (Jenkins, 1993). En primer lugar ocurre una rápida isomerización del enlace *cis*-12 a *trans*-11 dando como resultado un conjunto de isómeros (C18:2 *cis*-9, *trans*-11; *trans*-9, *cis*-11; *trans*-10, *cis*-12;...) en proporciones variables que recibe el nombre genérico de ácido linoleico conjugado (CLA), siendo el ácido ruménico (C18:2 *cis*-9, *trans*-11) el isómero mayoritario (Piperova y col., 2002). En una segunda fase, el enlace *cis*-9 es hidrogenado para formar ácido vaccénico (C18:1 *trans*-11).

Harfoot y Hazelwood, (1997), señalan que el ácido vaccénico también se produce por biohidrogenación ruminal del ácido α linolénico. Griinari y Bauman, (1999) señalan que el CLA ruminal y la producción de ácido vaccénico dependen de factores de la ración como la fuente y nivel de grasa que se incluye en la alimentación y del forraje.

Figura 3.2. Principales vías de biohidrogenación de los ácidos linoleico y linolénico.



Adaptado de Griinari y Bauman (1999).

La biohidrogenación del ácido α linolénico comienza igualmente con la isomerización del enlace *cis*-12 a *trans*-11, posteriormente se hidrogenan los enlaces *cis*-9 y *cis*-15 dando lugar a ácido vaccénico (C18:1 *trans*-11).

El último paso es la reducción del ácido vaccénico para formar ácido esteárico (C18:0). Esta hidrogenación ocurre a una velocidad limitada, lo que tiene como consecuencia la acumulación ruminal de ácido vaccénico (Tanaka, 2005) y un mayor paso del mismo a intestino delgado en relación al CLA (Lee y col., 2006).

En determinadas circunstancias, la población microbiana se desequilibra y se alteran los patrones de fermentación ruminal, siendo entonces cuando las fermentaciones transcurren por la ruta alternativa (figura 3.2.). Bauman y Griinari (2003) indican que estas alteraciones en los procesos de biohidrogenación se producen

cuando se utilizan raciones con alto contenido en concentrado o con alto contenido en AGPI.

3.1.3. Síntesis de grasa en la glándula mamaria

El 40 % de los ácidos grasos de la leche de rumiantes se sintetiza en la propia glándula mamaria, utilizando como precursores acetato y β hidroxibutirato, procedentes de la fermentación de los hidratos de carbono (Chilliard y col., 2000). Esta vía es el origen de los ácidos grasos de cadena corta y media (de 4 a 14 átomos de carbono) y de aproximadamente, la mitad del ácido palmítico (C16:0). El resto del ácido palmítico y de los ácidos grasos de cadena larga (principalmente C18:1 y C 18:0) provienen de lípidos circulantes en el torrente sanguíneo (Chilliard y col., 2000) que tienen su origen en la grasa de la ración, en los microorganismos ruminales, y en la grasa movilizada de las reservas corporales. Además, en la glándula mamaria existe actividad Δ^9 desaturasa a través de la cual, los ácidos esteáricos (C18:0) y vaccénico (*trans*-11 C18:1), procedentes de la biohidrogenación ruminal, se convierten en ácido oleico (*cis* 9, C18:1) y ruménico (*cis*-9 *trans*-11, C18:2), respectivamente (Chilliard y col., 2000). Esta última es la principal vía de síntesis de *cis*-9 *trans*-11, C18:2 CLA (Piperova y col., 2002).

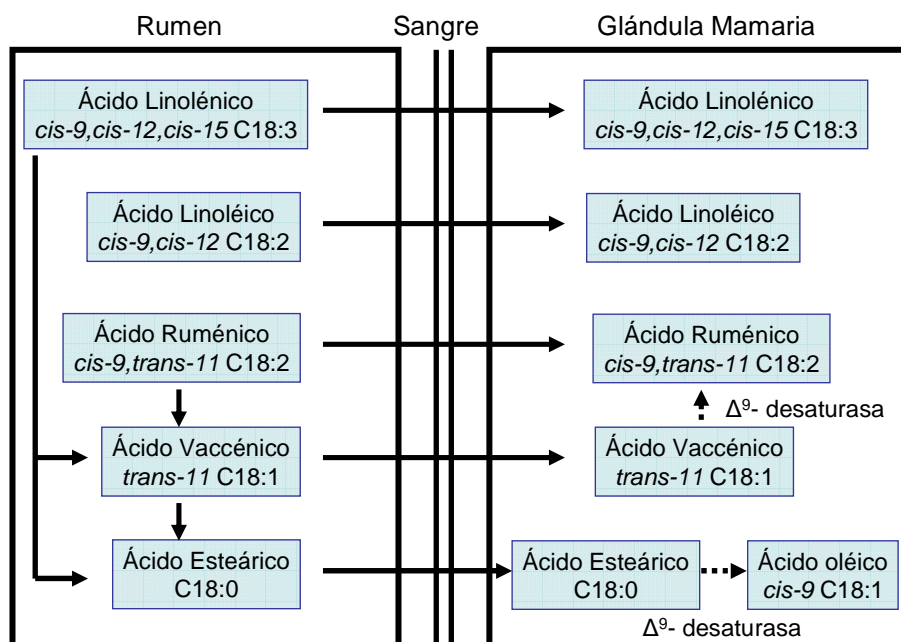
3.2. Ácido Linoleico Conjugado (CLA)

El ácido linoleico conjugado (CLA) es un término colectivo que describe una mezcla de isómeros geométricos y posicionales del ácido linoleico (C18:2 *n*-6). Actualmente existe un enorme interés por estos compuestos ya que se ha podido comprobar que presentan importantes efectos beneficiosos para la salud humana. Se ha demostrado que poseen un potente efecto anticancerígeno (Pariza, 2004), reducen la concentración plasmática de lipoproteínas de baja densidad, modifican la distribución de los nutrientes y el metabolismo de los lípidos y participan en la modulación del sistema inmune (Lee y col., 1994).

El CLA se sintetiza en el rumen como un producto intermediario en la biohidrogenación del ácido linoleico a esteárico, por lo que el CLA se encuentra de

forma natural en la leche y tejidos de los rumiantes. El isómero predominante y el biológicamente más activo es el *cis*-9, *trans*-11 octadecadienoico, que representa aproximadamente un 80-90% del total de CLA (Grinari y Bauman, 1999) y se deposita principalmente en los triacilglicéridos (Dannenberger y col., 2004). Kramer y col., (1998), han propuesto el nombre de ácido Ruménico para este isómero.

Figura 3.3. Principales vías de síntesis de ácido vaccénico y ácido ruménico en la leche.



Adaptado de Bauman y col., 2001

Inicialmente se asumió que la mayor parte del ácido ruménico presente en la carne y en la leche de los rumiantes procedía de la hidrogenación del ácido linoleico en el rumen (Harfoot y Hazelwood, 1988). Sin embargo, Grinari y col., (2000), indicó que la mayor parte del C18:2 *cis*-9, *trans*-11 CLA procede de la síntesis en la glándula mamaria y tejido adiposo a partir del C18:1 *trans*-11 (ácido vaccénico), otro intermediario en la hidrogenación ruminal del ácido linoleico y linolénico por acción de la Δ^9 desaturasa (figura 3.3).

Existe una relación lineal entre la concentración de ácido vaccénico y ácido ruménico en la leche de vaca CLA (Wijesundera y col., 2003).

La cantidad de CLA en la grasa de la carne y la leche depende de las cantidades de *cis*-9, *trans*-11 CLA (ácido Ruménico) y de *trans*-11 C18:1 (ácido vaccénico) que se produzcan en el rumen, y de la actividad de la Δ^9 desaturasa en el tejido mamario.

Los niveles de CLA registrados en la leche de vaca son muy variables. La principal fuente de variación en el contenido en CLA de la leche es la alimentación (Collomb y col., 2006). Factores como la raza, (Kelsey, y col., 2003), la edad o número de lactación (Stanton y col., 1997) tienen menor influencia. Además, se observa una gran variabilidad individual entre vacas en el contenido en estos isómeros (Peterson y col., 2002, Kelsey y col., 2003). Kelsey y col. (2003) registraron un contenido en CLA hasta tres veces superior en animales que habían consumido la misma ración. Otras variables como días en leche, producción de leche, contenido y producción de grasa tienen muy poco o ningún efecto sobre el contenido en CLA (Kelsey y col., 2003; Lock, y col., 2005).

Numerosos estudios indican que el consumo de pasto aumenta la concentración de CLA en la leche. Se ha podido comprobar que cuando se pasa de una alimentación a base de forrajes, concentrados y subproductos (raciones unifeed) a un sistema de pastoreo aumenta el contenido en CLA en la leche, y que el contenido en CLA aumenta cuando aumenta el consumo de pasto (Dhiman y col., 1999, Kelly y col., 1998, Stanton y col., 1997). Esto es debido a que la hierba verde presenta un alto contenido ácido α linolénico

Los aceites vegetales con un alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados (Linoleico y Linolénico), como el aceite de soja o linaza dan lugar a un ligero aumento de CLA en la grasa de la carne y un aumento más importante en la de la leche, ya que aumentan los precursores para la formación de *cis*-9, *trans*-11 CLA (a partir de Linoleico) y *trans*-11 C18:1 (a partir de Linoleico y Linolénico) en el rumen (Dhiman y col., 1997, Bu y col., 2007). Los estudios realizados con distintos tipos de aceites sugieren que la forma más eficaz de aumentar el contenido en CLA es con aceites ricos

el ácido linoleico (Dhiman, y col., 2000, Stanton y col., 2003, Collomb y col., 2004). Sin embargo Lock y Garnsworthy (2002) indican que el ácido linoleico da lugar a incrementos en el contenido en CLA similares los obtenidos con ácido linolénico.

La grasa de los organismos marinos es muy rica en PUFA de más de 20 carbonos (>35%) (Pratoomyot y col., 2005). Los PUFA de cadena larga *n*-3 se encuentran en el aceite de pescado, harina de pescado y productos de algas (Nettleton, 1991; Givens y col., 2000). En general, los estudios realizados con aceite de pescado indican que cantidades equivalentes de aceite de pescado son más eficaces que los aceites vegetales para aumentar el contenido en CLA (Chilliard y col., 2001a). Esto es debido a la importante producción de ácido vaccénico en el rumen que es desaturado a *cis*-9 *trans* 11 CLA en la glándula mamaria. Los PUFA de más de 20 carbonos, inhiben el último paso de la biohidrogenación a esteárico, lo que produce una acumulación de vaccénico en el rumen (Wonsil y col., 1994; Lee y col., 2005).

3.3. Relaciones grasa y salud humana

3.3.1. Ácidos grasos poliinsaturados *n*-3 (PUFA *n*-3)

La ingesta diaria de ácidos grasos insaturados se ha demostrado como un potente factor para reducir el riesgo de enfermedad cardiovascular, así como un papel importantísimo para reducir la incidencia de determinados tipo de cánceres, asma o diabetes (Woods y Fearson, 2009).

La cardiopatía como complicación de la aterosclerosis se produce como consecuencia de un proceso inflamatorio que se desarrolla por la interacción entre el colesterol, los monolitos-macrófagos, las plaquetas y las células de la pared arterial (Mata y col, 1996, Bulliyya, 2002, Dewailly y col, 2003, Navarro, 2007).

Numerosos estudios epidemiológicos han asociado el consumo de pescado con una reducción en el riesgo de mortalidad debido a problemas cardiovasculares en diversas poblaciones no mediterráneas (Kromhout y col, 1985, Daviglius y col 1997, Albert y col., 1998). Otro estudio sobre la prevención de aterosclerosis coronaria con ácidos grasos *n*-3 de origen marino demostró una reducción en el desarrollo de la

aterosclerosis al administrar 1,65 g de PUFA *n*-3 al día (Von Schacky y col., 2001). Por otra parte, Hopper y col. (1999) demostraron que con el consumo de 1 g al día de PUFA disminuye un 17 % el riesgo de mortalidad por enfermedades cardiovasculares, con respecto al grupo control, que no consumió el suplemento.

El desarrollo de la diabetes mellitus tipo 2 y resistencia a la insulina se asocia con un exceso de peso y obesidad (Swindurn y col., 1991) y con una ingesta calórica excesiva especialmente con grasa saturada y baja en carbohidratos (Marshall y col., 1991).

El posible mecanismo de acción vendría determinado por la capacidad de los PUFA *n*-3 para influir en la coagulación sanguínea y la trombosis, la presión sanguínea y la inflamación (Carrero y col, 2005).

Se ha demostrado que las grasas influyen en la gravedad de las enfermedades auto inmunitarias, así como en la duración de la aceptación de homo-injertos (Kremer, 1996; Lawrence y Sorrel, 1993). Las células del sistema inmunitario dependen en gran medida de la función de la membrana celular para realizar operaciones tales como secreción de citoquinas y anticuerpos; la importancia de los lípidos en el mantenimiento de la integridad de la membrana lipídica, indica que pueden ser nutrientes específicos en la regulación de la función inmunitaria (Stubbs y Smith, 1984).

La PGE₂ que controla distintos aspectos de la respuesta inflamatoria e inmunológica celular, disminuye tras consumir PUFA *n*-3 (Goodman y Weigle, 1980).

Mediante estudios epidemiológicos se ha podido establecer una correlación entre la ingesta excesiva de grasas y alcohol, junto con una disminución en la ingesta de fibras dietéticas y antioxidantes, con el aumento de la incidencia de cáncer (Nacional Research Council, 1982 y 1989; Hunter y Applewhite., 1991; García Muriana, 2002).

Estudios *in vitro* han demostrado que los PUFA *n*-3 tienen la capacidad de reducir el crecimiento de distintas células cancerígenas humanas. Este efecto es dependiente de la concentración de los ácidos grasos *n*-3 y se relaciona con una disminución de la proliferación y un aumento de la apoptosis (Finstad y col., 1998).

Las defensas se desarrollan durante los primeros años de vida, estando influidas por la ingesta de AGPI (Field y Schley, 2004). Estudios epidemiológicos sugieren que la ración, sobre todo lípidos, consumidos a una edad temprana influyen en la incidencia de cáncer (Terry y col., 2003).

3.3.2. Ácido Linoleico Conjugado (CLA)

Se han publicado numerosas revisiones sobre las propiedades fisiológicas del CLA, algunas de las más relevantes son las de McDonald, H.B. (2000), Pariza (2001), Lock y Bauman (2004) Collomb y col. (2006). Los numerosos trabajos de investigación publicados atribuyen al CLA efecto anticancerígeno, reducción de la grasa corporal, disminución de la aterogénesis, características antidiabéticas y modulador del sistema inmune.

El equipo del Dr. Michael Pariza de la Universidad de Wisconsin fueron los primeros que aislaron CLA a partir de carne de vacuno picada y frita, por isomerización del ácido linoleico, observando que era un potente inhibidor de la neoplasia epidermoide en ratones, que había sido previamente inducida por benzo(a)pireno (Ha y col., 1987). Más tarde, estos investigadores suministrando CLA a roedores o pollos observaron un incremento de la actividad fagocitaria de los macrófagos (Cook, y col., 1993).

Posteriormente IP y col., (1991) observaron que la incorporación de un 0,5%, 1% y 1,5% de CLA prevenía la carcinogénesis mamaria en ratas expuestas a DMBA (7,12-dimetilbenzo(a)antraceno), un compuesto conocido por inducir tumores mamarios.

De los diferentes tipos de cáncer en los que se ha estudiado el efecto del consumo de CLA, su actividad sobre los tumores mamarios son los más evidentes.

Aunque la mayoría de los experimentos se han realizado en animales de laboratorio y en líneas celulares humanas, los estudios epidemiológicos en humanos confirmar una correlación negativa entre consumo de CLA y aparición de tumores (Aro y col., 2000).

Se ha identificado al ácido ruménico (C18:2 *cis*-9, *trans*-11) como el isómero con mayor capacidad para inhibir el cáncer. Sin embargo, algunos estudios señalan también al ácido vaccénico (C18:1 *trans*-11) por su capacidad de transformarse en ruménico en el tejido humano (Turpeinen y col., 2002, Lock, y col., 2004).

Los ácidos grasos puede alterar el crecimiento de las células tumorales mediante la influencia en la replicación celular interfiriendo en los componentes del ciclo o incrementando la muerte celular vía necrosis o apoptosis. Así mismo, Se ha podido comprobar, que el CLA altera la expresión de proteínas clave que regulan el ciclo celular, disminuyendo la proliferación tumoral por modificación de las proteínas del ciclo que regulan este proceso (Belury, 2002a).

En modelos animales se ha comprobado que el CLA modifica la composición corporal, principalmente reduciendo la acumulación de tejido adiposo. En particular, algunos depósitos de grasa son especialmente sensibles a la acción de este ácido (Belury, 2002 b).

El efecto del CLA puede depender del género del animal, siendo más efectivo en machos, de la adiposidad ya existente y del isómero ingerido, siendo el *t10c12* el causante de la reducción de tejido adiposo y de la modulación génica en pre-adipocitos (Park y col., 1999; Choi y col., 2001). Se ha podido comprobar en ratones que esta reducción de tejido adiposo es independiente de la cantidad de alimento consumido y de su nivel de grasa (Park y col., 1997). En animales los resultados obtenidos han sido muy concluyentes, en parte debido a las dosis tan altas utilizadas, mucho mayores que las de los estudios clínicos en humanos (Tricon y col., 2004).

Tanto en animales como en humanos se ha visto que el CLA induce importantes reducciones en la grasa corporal sin reducir el peso. Estas reducciones se hacen principalmente en la grasa que se está acumulando y no en la previamente acumulada a la ingesta (Pariza, 2004). Se ha especulado con la posibilidad de que esta reducción en la masa grasa se deba no a una menor síntesis de novo de AG sino a un mecanismo relacionado con un incremento en el gasto energético, que podría ser resultado de un

mayor metabolismo basal, un aumento del incremento térmico de los alimentos o en la actividad física (Rainer y Heiss, 2004).

La capacidad del CLA para reducir el tejido adiposo se ha demostrado en algunos, pero no en todos los ensayos clínicos (Blankson y col., 2000; Zambell y col., 2000; Mougios y col., 2001; Smedman y Vessby, 2001; Thom y col., 2001).

La mayoría de los ensayos realizados en humanos, han utilizado CLA encapsulado como ácido graso libre en cantidades desde 3 g/d hasta 7,2 g/d, con resultados variables, observándose las mayores reducciones de grasa corporal cuando se utilizan los suplementos más puros (Gaulhier y col., 2002).

Cada vez es mayor la evidencia existente acerca de que el CLA reduce la formación de la placa aterosclerótica en modelos animales así como los niveles de colesterol LDL y triglicéridos (Lee y col., 1994). Esta habilidad podría ser debida a los cambios en la susceptibilidad a la oxidación del colesterol LDL.

También se ha estudiado el efecto del CLA en cultivos de plaquetas y en seres humanos. En un estudio realizado con voluntarios a los que se les dio 3 g/d de una mezcla de isómeros de CLA (50% de cada isómero) se redujeron de una forma significativa las concentraciones basales de triacilglicerol (Noone y col., 2002).

En un estudio clínico, (Tricon y col., 2004), realizado con 49 voluntarios adultos, durante 6 meses, y dosis hasta 2,52 g/día de cada uno de los dos isómeros por separado (80-85% de riqueza de triglicérido de CLA), no encontraron una relación dosis-dependiente entre el CLA y la composición corporal. Así mismo se encontraron con que las propiedades antiaterogénicas del CLA podrían ser debidas a cambios en el metabolismo de las lipoproteínas.

Otros grupos de investigación han encontrado que el CLA reduce la inflamación en animales de experimentación y presenta efectos cardioprotectores que podrían ser relevantes para el hombre (Noone y col., 2002).

Uno de los factores de riesgo de la diabetes tipo 2, es la obesidad. Por ello, el CLA se ensayó como coadyuvante en el tratamiento de la diabetes tipo 2 en humanos.

En este sentido, se realizó un estudio (Belury y col., 2003) doble ciego, aleatorio durante 8 semanas con la ingesta de 6 g de CLA diarios, que redujo significativamente la glucosa sérica basal, la leptina circulante, el índice de masa corporal, el peso y la masa grasa corporal. Como dato negativo se produjo un incremento en los niveles de colesterol LDL tanto en el grupo placebo como en el del tratamiento, aunque el aumento fue menor en este grupo.

El CLA disminuye la insulina basal en animales diabéticos, mientras que en los que no lo son, la eleva. Esto podría ser indicativo de una reducción de la sensibilidad a la insulina en un estado normoglicémico (Belury, 2002 b).

Al igual que otros ácidos grasos, el CLA modula el sistema inmunitario a través de la formación de eicosanoides (Belury, 2002 b). El estímulo que se ejerce en la síntesis de Ig A, Ig G, Ig M, y una disminución significativa de los niveles de Ig E, presume que podría tener un efecto decisivo en la prevención y tratamiento de las Alergias Alimentarias.

Uno de los mecanismos de acción del CLA puede ser la modulación de la acumulación de araquidónico en los fosfolípidos, reduciendo su concentración y, por tanto, la aparición de sus eicosanoides derivados. Esta modulación parece ser específica para cada tejido.

3.3.3 Recomendaciones dietéticas

Según Henderson y col., (2003), la carne, subproductos cárnicos, leche y derivados lácteos suponen un 25 % de las necesidades energéticas diarias, y además contribuyen con la mitad de la grasa saturada ingerida.

La creciente diversificación del mercado de la alimentación en España ha conducido a situaciones confusas en cuanto a las propiedades funcionales reales de determinados productos.

Los ácidos grasos poliinsaturados deben limitarse a una cantidad que no superen el 5 % de la energía total, y de esa cantidad el 4 % deberían ser de la serie omega 6 y el 1 % restante de la serie omega 3, con una relación que establece la FAO y la OMS

(2003) de 4:1, mientras que diferentes autores establecen esa relación entre 5:1 y 10:1 (Budowsky y col., 1987, Mata y col., 2002; Simopoulos, 2002). El panel de la EFSA (European Food Safety Authority) 2010 sobre productos dietéticos, nutrición y alergias, recomienda, como valor dietético de referencia para la ingesta de grasas, un rango que va desde el 20 % del total de la energía consumida para el nivel inferior, hasta el 35 % para el nivel superior, en adultos. Para los niños se propone bajar del 40 % del aporte total de la energía proveniente de la ingesta de grasas, hasta un 35 %, en el tercer año de vida. A nivel de especificación de ácidos grasos, la recomendación es que el consumo de grasas saturadas y trans sea tan baja como sea posible, sin establecer valores de referencia para el consumo de ácidos grasos cis monoinsaturados o poliinsaturados, ni establecer valores de referencia para la relación ácidos grasos n-3/n-6, ni para el ácido araquidónico, ni para cualquiera de los ácidos grasos poliinsaturados n-6. En cambio si se establece que el nivel adecuado de ingesta para el ácido linoleico, es del 4 %, y para el ácido α linolénico, del 0,5 % del total de la energía consumida. También se recomienda en el informe de la EFSA 2010 un consumo de 250 mg para el ácido eicosapentaenoico (EPA) y 100 mg para el ácido decosaenoico (DHA) para los adultos, además de un consumo adecuado durante el embarazo y la lactancia de ácidos grasos poliinsaturados n-3. Para el colesterol se decidió no poner nivel de referencia más allá de la limitación del consumo de grasa saturada.

En España no hay datos fiables sobre el consumo de CLA, pero en Estados Unidos, se estima que es de 150 mg/día en las mujeres y de 200 mg/día en los hombres (Ritzenthaler y col, 2001). En otros países, como en Alemania, el consumo de CLA es más elevado rondando los 309 mg/día (Jahreis, y col. 1999). Todos estos datos se encuentran muy alejados de las cantidades diarias recomendadas. La mayor parte del CLA consumido es ácido ruménico y el 60 % de todo ello procede de la leche.

El CLA se encuentra ampliamente distribuido en muchos alimentos, incluyendo productos animales de rumiantes y ciertos vegetales. Los productos lácteos se distinguen como fuentes importantes de CLA, variando de 2.5 a 7.0 mg/g de grasa dependiendo del producto, tipo de alimentación en el ganado y del tipo de proceso al que se sometió la leche durante su transformación. Se considera que el consumo de

CLA al que se le atribuyen propiedades beneficiosas es de 3.0 mg /g (Ramírez, 2004). En otro estudio (Smedman y Vessby, 2001), 35 hombres y mujeres sanos con edades comprendidas entre 23 y 63 años fueron suplementados con 4,2 gr/día de CLA y la misma cantidad de aceite de oliva durante 4 semanas, demostrando que la proporción de grasa corporal disminuía en el grupo que consumió la dosis de CLA.

3.4. Utilización de grasas en la alimentación del ganado vacuno lechero

Las grasas aportan unas 2-3 veces más energía que los cereales, por lo que se incluyen en las raciones de vacas lecheras con el fin de aumentar la densidad energética y reducir el aporte diario de concentrados. Las raciones con elevada densidad energética en inicio y alta producción permiten mejorar los rendimientos productivos y reproductivos. Además de aportar mucha energía por unidad de materia seca, las grasas contribuyen a prevenir la acidosis ruminal y facilitan la absorción de nutrientes liposolubles (Palmquist, 1990).

Los lípidos son además una fuente de ácidos grasos utilizables directamente por la glándula mamaria para la síntesis de grasa en la leche, con un efecto directo sobre el porcentaje y la composición de la grasa láctea.

Durante los últimos años se ha generalizado el suministro de raciones con alto contenido en grasa para animales en lactación, con el fin de aumentar su contenido en energía, motivado también, por la disponibilidad de grasas y aceites a un precio competitivo para la industria de los piensos.

Los lípidos que consumen los rumiantes proceden de las materias primas de la ración (forrajes, concentrados y subproductos), y de las grasas incorporadas a la misma. Los suplementos grasos que se utilizan en alimentación animal podemos clasificarlos, según su origen, en vegetales, animales o mezcla. Dentro de las grasas de origen animal tenemos grasas poliinsaturadas, cuyo origen es marino; grasas insaturadas, las procedentes de las aves; moderadamente insaturadas, como es la manteca de porcino; saturadas, del vacuno; y mezcla de todas las anteriores. Dentro de las grasas vegetales,

los aceites de las semillas de girasol, maíz, soja y linaza contienen AG con dobles y triples enlaces y son por tanto más insaturados que los de oliva, palma o coco. Un tercer grupo de lípidos es el formado por subproductos de diversas industrias cuya materia prima original es la grasa, como las oleínas (de las grasas comestible), subproductos industriales y los destilados procedentes de las industrias del glicerol y otros (Mateos y col., 1996; Fuentes, 2009).

Además, en el mercado existen las denominadas grasas inertes, principalmente los jabones cálcicos y las grasas hidrogenadas. Los jabones cálcicos resultan de la saponificación de los AG libres con iones de calcio. A pH normales del rumen (>6), estos jabones permanecen sin disociar, son insolubles en el líquido ruminal, y por lo tanto inertes. Sin embargo, en el abomaso, el pH disminuye, por lo que se disocian, dando lugar al calcio y a los AG libres correspondientes, que son entonces digeridos y absorbidos. Las grasas hidrogenadas se obtienen por la hidrogenación parcial de los dobles enlaces de diversas fuentes lipídicas con el fin de elevar su punto de fusión, reduciendo de esta forma su reactividad en el rumen, al ser más insolubles.

Durante los últimos 30 años se han realizado numerosas trabajos sobre la suplementación de grasas en las raciones de vacas (ver revisiones de Chilliard y col., 2001a y b, Onetti y Grummer, 2004, Lock y Bauman, 2004, Jenkins y McGuire, 2006, Glasser y col., 2008a y b, Petit, 2010). Los resultados obtenidos muestran una considerable variación en la respuesta según distintos factores, como el tipo y cantidad de la grasa utilizada y el estado de lactación.

3.4.1. Efectos sobre la ingestión

La suplementación con distintas fuentes de grasa no protegidas y a dosis relativamente altas, en las raciones de vacas lecheras, puede producir una reducción en el consumo de materia seca (MS) (Palmquist y col., 1993, Jenkins y Palmquist, 1984, Beaulieu y Palmquist, 1995, Chilliard y col., 2009). Sin embargo, numerosos trabajos no muestran ningún efecto (Ohajuruka y col., 1991, Pantoja y col., 1996, Weiss y Wyatt, 2004, Kim y col., 2008, Atkinson y col., 2009), mientras que en otros se observa

un efecto positivo al suplementar con aceites tan insaturados como el aceite de pescado (Doreau y Chilliard, 1997) o de linaza (Ueda y col., 2003).

La mayor parte de los estudios realizados indican que la suplementación con grasas, particularmente las insaturadas, pueden interferir en los procesos digestivos del rumen, afectando principalmente la digestión de los carbohidratos estructurales (Doreau y Chilliard, 1997), dando lugar a un menor consumo de MS (Chilliard y col., 2001a, Rego y col., 2005, Chilliard y col., 2009). Cuando los suplementos grasos inhiben la fermentación de la fibra, la digestión de la materia orgánica también se reduce, pero no se reduce la digestibilidad del almidón (Jenkins, 1993). De todas formas, según Allen (2000), la inclusión de lípidos en las raciones a dosis menores del 3% no suele afectar el consumo de alimentos en vacas lecheras.

Los mecanismos por los que la suplementación con grasas reducen la ingestión fueron revisados por Allen, (2000). Las hipótesis propuestas por este autor son:

- mayor llenado ruminal, consecuencia de la alteración en la fermentación y la digestibilidad de la fibra
- liberación de hormonas intestinales, como la colecistoquinina, que es inhibidora de la ingestión
- oxidación de la grasa en el hígado, alterando las señales aferentes generadas en los nervios vagales hepáticos, que dan lugar a la señal de saciedad en los centros cerebrales.

Grummer y col., (1990) relacionan la disminución en la ingestión con una menor palatabilidad, y Palmquist (1990) sugiere que las vacas suplementadas con lípidos reducen su ingestión para regular la concentración plasmática de los AG.

3.4.2. Efectos sobre la producción y composición de la leche

Los efectos de la suplementación con grasa sobre la producción y composición de la leche han sido ampliamente estudiados (Palmquist, 1984, 1996, Chilliard, 1993, Garnsworthy, 1997, Doreau y col., 1999, Schroeder y col., 2004, Petit, 2010). Aunque

existe una gran variabilidad en el nivel de respuesta, los estudios realizados muestran en general una tendencia a una mayor producción de leche, una moderada, pero casi sistemática disminución en el contenido en proteína, y una ligera modificación de la tasa butírica, con excepción de los aceites con alto contenido en PUFA (como pescado o linaza) que provocan una fuerte bajada, y los lípidos protegidos por encapsulación, que la aumentan considerablemente.

3.4.2.1. Efectos sobre la producción

Wu y Hubert (1994) indican que la respuesta en producción de leche a la suplementación con grasa parece ser curvilínea, aumentando hasta aproximadamente un 9% del extracto etéreo total en la ración, para disminuir con niveles superiores.

Jenkins (1998) describe mediante un modelo el efecto de la suplementación con grasa sobre la producción de leche. Según este modelo, comparando con una ración control, al aumentar el porcentaje de grasa en la ración, se producen tres cambios importantes en la producción de leche. Propone que existe una primera fase en la que la suplementación con grasa da lugar a un aumento en la producción, debido al mayor aporte energético. Una segunda fase en la que, a pesar de aumentar el contenido en grasa, la producción de leche permanece estable, ya que los efectos negativos que producen las grasas (reducción en la digestibilidad de la fibra, menor ingestión de materia seca y efectos metabólicos negativos), contrarrestan el incremento en el aporte energético; y la tercera, donde los efectos negativos predominan sobre el aporte extra de energía, dando lugar a una reducción en la producción de leche. Concluye, que el nivel de suplementación que produce el mayor aumento en la producción de leche es en el punto donde se encuentran la fase una y dos. La adición de grasa por encima de este nivel no es rentable, ya que no aumenta la producción de leche. Las grasas insaturadas tienden a tener una fase uno y dos más pequeñas comparadas con las grasas saturadas, si se administran en la misma proporción.

Los resultados obtenidos por Clapperton y Steele (1983) se ajustan a este modelo. En este trabajo se suministraron raciones con un 0; 2,4; 3,8; 4,2 y 6,7 % de sebo, obteniendo producciones de leche de 20,67; 22,32; 22,01; 21,73 y 22,68 kg/día,

respectivamente. Concluyen, que niveles por encima del 2,4% no mejoran la producción de leche. En este estudio, los niveles utilizados no fueron lo suficientemente elevados para alcanzar la fase tres, donde la producción de leche disminuye.

Schroeder y col., (2004) en una revisión donde analizan los resultados de numerosos trabajos de investigación, indican, que en general, cuando se suplementan las raciones de vacas lecheras con grasas insaturadas no se observan incrementos en la producción de leche, mientras que al suplementar con saturadas, la producción aumenta.

3.4.2.2 Efectos sobre la grasa

La suplementación de la ración con aceites poliinsaturados, y en general ácidos grasos de cadena larga, conduce a una disminución de la síntesis de *novo* y de la concentración total de grasa en la leche (Chilliard y col., 2002). Este efecto es tanto mayor cuanto mayor es la longitud de la cadena, el grado de insaturación y la proporción de dobles enlaces en configuración *trans* (Chilliard y col., 2001a).

Por lo general, cantidades moderadas de grasa saturada, jabones cálcicos o grasas encapsuladas no producen efecto, o aumentan ligeramente la concentración de grasa en la leche (NRC, 2001), mientras que cantidades similares de grasa insaturada reducen tanto el porcentaje como la cantidad total de grasa (Dhiman y col., 1999, Bu y col., 2007, Huang y col., 2008).

El grado de protección al ataque microbiano que presenten las grasas que se incorporan a la ración, puede influir en el contenido y cantidad de grasa en la leche. Kenelly (1996), en una revisión sobre los efectos de la inclusión de semillas oleaginosas en vacas lecheras concluye que, en general, cuando los lípidos se suministran protegidos suele producirse un aumento en el contenido y cantidad de grasa, mientras que cuando las grasas se suministran sin proteger, se observan efectos variables. Además, indica que el procesado físico de las semillas aumenta los efectos sobre el porcentaje y composición de la grasa de la leche.

Las grasas disminuye la síntesis de “*novo*” en la glándula mamaria por una disminución en la síntesis de acetato y butirato a nivel ruminal o bien por el efecto

inhibidor de determinados ácidos grasos sobre las enzimas lipogénicas (Palmquist, 1984, Chilliard, 1993, Chilliard y col., 2007, Harvatine y col., 2009). Estos ácidos grasos se originan durante la biohidrogenación de los ácidos grasos poliinsaturados, en determinadas condiciones de fermentación ruminal (Bauman y Griinari 2003, Bauman y col., 2008). Brent y col., (2008) y Bauman y col., (2008) indican que el C18:2 *trans-10 cis-12* CLA y el ácido α linolénico disminuyen la actividad de la enzima *diacilglicerol aciltransferasa* en las células epiteliales de la glándula mamaria en el ganado vacuno.

Aunque el C18:2 *trans 10-cis 12* CLA, es el isómero que se señala como principal responsable de la reducción en la síntesis de grasa, estudios recientes indican que otros isómeros como el C18:2 *cis-10, trans-12* CLA (Saebo y col., 2005) y el C18:2 *trans-9, cis-11* CLA (Perfield y col., 2007) pueden ejercer un efecto similar, pero de menor magnitud.

3.4.2.3. Efectos sobre la proteína

El efecto de la suplementación con lípidos sobre el contenido en proteína de la leche suele ser negativo (Wu y Huber, 1994, Ward y col., 2002, Fearon y col., 2004, Shingfield y col., 2006, Alzahal y col., 2008), aunque esto no sucede en todos los casos (Mandebvu y col., 2003, Loor y col., 2005, Flowers y col., 2008).

En la revisión de Schroeder y col., (2004) se indica que la reducción en el contenido en proteína no está relacionada con la cantidad de lípidos añadidos en un rango de 200 a 1000 g por vaca y día.

Los mecanismos fisiológicos que explican la reducción en el contenido en proteína por la suplementación con grasa no están completamente establecidos. Existen varias teorías para explicarlo:

- Por una alteración en la fermentación ruminal que reduce la síntesis de proteína microbiana y por lo tanto los aminoácidos que llegan a la glándula mamaria para la síntesis proteica (Onetti y Grumer, 2004)

- Por un efecto de dilución, al aumentar más la producción de leche que de proteína (Wu y Huber, 1994, Garnsworthy, 1997, Schroeder y col., 2004).

- Al aumentar el flujo energético a la glándula mamaria, se requiere un menor flujo sanguíneo para sintetizar el mismo volumen de leche, con lo que se reduce el aporte de aminoácidos y la síntesis de proteína en la glándula mamaria, provocando un menor porcentaje de proteína láctea (Cant y col., 1993).

3.4.2.4. Efectos sobre el perfil de ácidos grasos (AG)

El control nutricional del perfil de ácidos grasos en la grasa de la leche ha recibido una considerable atención en los últimos años (ver revisiones de Chilliard y col., 2001a y b, Chilliard y col., 2003, Collomb y col., 2006, Jenkins y McGuire, 2006, Glasser y col., 2008a y b, Moate y col., 2008, Kadegowda y col., 2008, Woods y Fearon, 2009, Palmquist, 2009, Kouba y Mourot, 2010, Petit, 2010, Brunschwig y col., 2010). El objetivo se ha centrado en modificar la relación P/S, reduciendo los ácidos grasos saturados de cadena corta y media y aumentando los PUFA; y en aumentar el contenido de los isómeros del CLA, sobre todo el ácido ruménico (C18:2 *cis*-9, *trans*-11). Con esta finalidad, las fuentes de grasa más interesantes para incluir en las raciones de los rumiantes son las que aportan alguno de los siguientes ácidos grasos: linoleico, linolénico, EPA y DHA. El ácido linoleico se encuentra en la semilla y aceite de girasol y soja, el linolénico en la semilla y aceite de linaza y los ácidos EPA y DHA en los aceites marinos, procedentes de algas o de pescado.

La forma en que se incorpora el aceite a la ración influye en la capacidad de modificar el perfil de ácidos grasos de la leche. Así, algunos trabajos ponen de manifiesto que cuando el aceite se suministra en forma de semilla se limita la biohidrogenación ruminal en relación al aporte del aceite en forma libre. La cubierta de la semilla restringe el acceso de las bacterias a los lípidos que contiene (Jenkins y Bridges, 2007), lo que determina que para un mismo tipo de aceite, los ácidos grasos que abandonan el rumen sean distintos si éste se incorpora en forma libre o se suministra la semilla.

3.4.2.4.1.- Ácidos grasos de cadena corta y media

La mayor parte de los ácidos grasos procedentes de la lipogénesis *de novo* en la glándula mamaria son saturados (C4:0 a C16:0) ya que la Δ^9 tiene muy poca actividad

sobre los ácidos grasos con menos de 18 átomos de carbono (Chilliard y col., 2001a). Sin embargo, una pequeña cantidad de C14:0 y C16:0 son desaturados a C14:1 y C16:1 en la glándula mamaria. En general, la suplementación con aceites ricos en AG de cadena larga (> de 16 átomos de carbono) da lugar a una reducción en el porcentaje de los de cadena corta y media y un aumento en los de cadena larga. Los ácidos grasos de más de 16 átomos de carbono inhiben la lípogénesis *de novo*, y el consumo de aceites (ricos el AG de cadena larga) da lugar a un mayor flujo de estos ácidos a la glándula mamaria procedentes de la absorción intestinal (Palmquist y col., 1993). El efecto inhibitor aumenta con la longitud de la cadena, la insaturación y la presencia de dobles enlaces de estructura *trans* (Chilliard y col., 2001a).

Kennelly, (1996) ha revisado el efecto del suministro de semillas enteras de oleaginosas (colza, rica en C18:1, soja, rica en C18:2 y linaza, rica en C18:3) sobre el perfil de ácidos grasos de la leche. En general, la adición de semillas enteras reduce las proporciones de AG de cadena corta y media (hasta C14) y aumenta las proporciones de C18:1 y C18:0.

Recientemente Glasser y col. (2008b) han realizado una revisión en la que analizan los resultados obtenidos en 145 experimentos, sobre la respuesta en vacas lecheras a la suplementación con aceites de colza, soja, girasol y linaza, suministrados en forma de semillas (sometidas a distintos procesados) o como aceite. Concluyen que todos los suplementos dan lugar a una reducción en el contenido en ácidos grasos C6 a C16 con una respuesta variable en C4, que las fuentes de lípidos ricas en C18:2 (soja, girasol) y C18:3 (linaza) producen un una respuesta similar y que las fuentes ricas en C18:3 suministradas como semilla presentan menor efecto inhibitor que cuando se suministran como aceite libre.

3.4.2.4.2. Ácidos esteárico y oleico

Los ácidos esteárico y oleico aumentan en la grasa de la leche cuando se suministran grasas que los contienen (sebo, manteca, grasa hidrogenada, oliva, colza) o por la suplementación con aceites insaturados de 18 átomos de carbono (girasol, soja, linaza). Los dobles y triples enlaces que poseen los ácidos grasos insaturados son

hidrogenados en el rumen a esteárico y posteriormente desaturados a oleico en la glándula mamaria por la acción de la enzima Δ^9 desaturasa (Palmquist, 1984, Chilliard y col., 2001a). Numerosos trabajos obtienen un aumento en el contenido en oleico y esteárico en la leche de vacas suplementadas con aceites ricos en ácido oleico, como el de colza (Tesfa y col., 1991), linoleico como el de girasol o soja (Rego y col., 2005), y linolénico como el de linaza (Bu y col., 2007, Chilliard y col., (2009).

Algunos autores señalan que los aceites ricos en C18:2 dan lugar a una mayor proporción de C18:0 que los ricos en C18:3 (Petit, 2003, Petit y col., 2004, Loor y col., 2005) mientras que otros trabajos no encuentran diferencias en el contenido en C18:0 al suplementar con aceites ricos en C18:2 o C18:3 (Ward y col., 2002, Brzoska, 2005).

En la revisión realizada por Glasser y col. (2008b) se indica que todos los suplementos (aceites vegetales procedentes de semillas oleaginosas incorporados forma libre, como semilla o protegidos por encapsulación o formaldehído) dieron lugar a aumentos similares en el contenido en oleico y esteárico en la leche.

3.4.2.4.3. Ácidos grasos poliinsaturados

Suministrando aceites ricos en linoleico y linolénico aumenta ligeramente su concentración en la leche, ya que la hidrogenación que sufren estos ácidos grasos en el rumen limita su incorporación a la leche. La única forma de aumentar el contenido de estos ácidos en cantidades apreciables es protegerlos de la hidrogenación ruminal, suministrando el aceite en forma de semilla o encapsulando la grasa. Esta última es, hasta el momento, la forma más eficaz de aumentar considerablemente el contenido en estos ácidos en la grasa de la leche (Chilliard y col., 2001a).

Suministrando aceites marinos (de pescado o algas) aumenta el contenido en AG de la serie n-3 de 20 y 22 átomos de carbono como el C20:5 o EPA y C22:6 o DHA, respectivamente (Chilliard y col., 2001a). Sin embargo, tal y como comentamos para otros ácidos grasos poliinsaturados, la hidrogenación ruminal hace que la transferencia a la leche sea muy pequeña.

Glasser y col., (2008b) en la revisión mencionada anteriormente, comparando distintos tipos de aceite protegidos o libres concluyen que la protección física de los suplementos mejora considerablemente el contenido en ácido linoleico y linolénico, mientras que la semilla o el aceite libre presenta un efecto mucho más moderado.

3.4.2.4.4. Ácidos grasos *trans* y Ácido Linoleico Conjugado (CLA)

La clave para aumentar el contenido en CLA de la leche es aumentar la producción de C18:1 *trans*-11 (ácido vaccénico) a nivel ruminal, lo que permite aumentar la síntesis endógena en la glándula mamaria (Griinari y col., 2000; ver revisión de Shingfield y col., 2007, Glasser y col., 2008a). Como señalamos anteriormente (apartado 3.3), la desaturación del ácido vaccénico se considera la primera fuente de C18:2 *cis*-9, *trans*-11 CLA (ácido ruménico) en los tejidos de los rumiantes (Bauman y col., 1999; Griinari y col., 2000, Piperova y col., 2002). Maximizar la producción de vaccénico en el rumen puede conseguirse aumentando sus precursores (PUFA de 18 átomos de carbono) e inhibiendo la reducción de vaccénico a esteárico. Aportar PUFA de 18 átomos de carbono en la ración se puede hacer fácilmente utilizando aceites ricos en ácido linoleico y/o linolénico.

En efecto, numerosos trabajos han podido comprobar que suplementando las raciones de vacas lecheras con aceites vegetales ricos en C18:2 y C18:3 como la soja o la linaza, aumentan las concentraciones de C18:2 *cis*-9, *trans*-11 CLA (ácido ruménico) y C18:1 *trans*-11 (ácido vaccénico) en la leche, así como la de otros isómeros que se producen también durante la hidrogenación ruminal del ácido linoleico y linolénico (Dhiman y col., 2000, Lock y Garnsworthy, 2002, Bu y col., 2007, Fuentes y col, 2008, Flowers y col., 2008, Caroprese y col., 2010).

Algunos trabajos realizados con distintos tipos de aceites vegetales sugieren que los aceites ricos en ácido linoleico aumenta la concentración de CLA más eficazmente (Collomb y col., 2004, Bu y col, 2007). Sin embargo, Lock y Garnsworthy (2002) y Glasser y col (2008b), indican que el ácido linolénico puede dar lugar a aumentos comparables a los obtenidos con ácido linoleico.

En general, los aceites vegetales aumentan más el contenido en CLA que la semilla entera, lo que refleja una mayor accesibilidad de las bacterias ruminales sobre los ácidos grasos cuando los aceites se incorporan en forma libre, que cuando se encuentran protegidos en el interior de la semilla (Glasser y col., 2008b).

Los trabajos consultados indican que, en general, los aceites de pescado son más eficaces que los vegetales para aumentar el contenido en CLA (Chilliard y col., 2001a). Los aceites de pescado aportan una mínima cantidad de PUFA de C18 átomos de carbono, por lo tanto el aumento es consecuencia de la producción de vaccénico en el rumen (Shingfield y col., 2003), ya que la reducción de vaccénico a esteárico es inhibida por el DHA (C22:6 n-3) (AbuGhazaleh y Jenkins, 2004).

3.4.3. Fase de lactación

Los estudios realizados, analizando los efectos de la incorporación de grasas sobre la producción de leche, en las distintas fases de la lactación, son muy escasos. La bibliografía consultada indica una mayor respuesta en media que en inicio de lactación debido a que la máxima respuesta a la suplementación con grasa no se alcanza hasta que las vacas se encuentran en balance energético positivo (Doreau y Chilliard, 1992, Onetti y Grumer, 2004).

Schroeder y col., (2004) indican que la reducción que se observa en el contenido en proteína al suplementar con grasa, parece ser mayor en media que en inicio de lactación.

Las publicaciones consultadas (Murphy y col., 1990, Barber y col., 1997, Demeyer y Doreau, 1999,) ponen de manifiesto que, en general, la proporción relativa de AG de cadena corta (excepto C4) tiende a aumentar durante las primeras 8-10 semanas de la lactación, la proporción de C16:0 permanece relativamente constante, mientras que la de C18:0 y C18:1 tiende a disminuir durante este periodo. En fases posteriores de la lactación los cambios observados son menores. Barber y col., (1997) observan que cuando las vacas se encuentran en balance energético negativo, movilizándolo tejido adiposo para la síntesis de leche durante el inicio de lactación, la proporción de de AG de cadena media en la grasa de la leche disminuye, mientras que

los C18 aumentan. Fearon y col., (2004) con 4 niveles (0, 200, 400 y 600 g/día) de aceite de colza suministrado en forma de semilla entera, observaron que las vacas al final de la lactación ($231 \pm 58,9$ DEL) produjeron grasa con una mayor proporción de ácidos grasos insaturados que en media lactación ($130 \pm 16,2$ DEL). Hay que tener en cuenta que cuando se estudian los efectos de la incorporación de grasa en distintas fases de la lactación, las respuestas observadas pueden estar influidas por factores relacionados con la síntesis de la leche y de la grasa y por lo tanto, la respuesta del animal no se debe solamente a la fase de lactación (Fearon y col., 2004).

3.4.4. Efectos sobre la reproducción

Las vacas lecheras, durante los primeros días postparto, en inicio de lactación, sufren un balance energético negativo (BEN) fisiológico que resuelven movilizándolo una gran cantidad de triglicéridos almacenados en su tejido adiposo de reserva, lo que provoca un aumento en la concentración plasmática de ácidos grasos no esterificados (NEFA o AGNE). Cuando este BEN no puede ser controlado por los mecanismos fisiológicos del animal, se produce un desequilibrio entre los aportes y las necesidades energéticas, que normalmente afecta negativamente a la ingesta de materia seca (MSI) y en consecuencia, a la cantidad de energía ingerida (Drackley, 1999). Staples y col., (1998), señalan que la incorporación de grasas en la ración de vacas en postparto no modifica su estatus energético y sugieren que el efecto sobre la respuesta reproductiva tiene más que ver con el aporte de ácidos grasos de cadena larga (AGCL) que alteran la disponibilidad del sustrato, que el simple aporte energético.

La ineficiencia reproductiva es el principal problema en las explotaciones lecheras, sobre todo durante la fase de BEN que tiene lugar en inicio de lactación. Una forma de mejorar el estatus energético de los animales durante esta fase y quizás los rendimientos reproductivos, sea incrementar la densidad energética de la ración mediante la suplementación con grasas (Ambrose y col., 2006). Aunque Staples y col., (1998) señalan que el rendimiento reproductivo se mejora con la incorporación de grasas en la ración, independientemente del estatus energético. La suplementación de la ración de vacas en lactación con grasas, bien de origen animal o vegetal, puede influir

positivamente en el estatus reproductivo de las vacas lecheras, mejorando la fertilidad, como consecuencia de un incremento en el tamaño del folículo ovulatorio, el número de folículos ováricos, la concentración plasmática de progesterona, la vida útil del cuerpo lúteo y una reducción en la secreción metabólica de prostaglandina (PGF_α) (Santos y col., 2008). Igualmente, Santos y col., (2008) observaron que el efecto de las grasas incluidas en la ración de vacas lecheras en lactación sobre la reproducción, tiene más que ver con el tipo de grasa (perfil en AG), que con la grasa *per se*. Estos mismos autores concluyen que al aumentar la densidad energética de la ración con la suplementación con grasas, generalmente mejoran los índices reproductivos. Sin embargo, cuando la producción de leche y la pérdida de peso corporal de las vacas aumentan, no siempre se observan efectos positivos sobre la reproducción.

Parece ser que los AGPI o PUFA de las familias n-3 y n-6 tienen un efecto más notable sobre la respuesta reproductiva en vacas, aunque no está claro si los efectos están mediados únicamente por estos ácidos grasos o por otros intermediarios que se producen durante su biohidrogenación ruminal.

La suplementación de las raciones para vacas en lactación con grasas ricas en AGPI de la serie n-6, mejoran el crecimiento del folículo, la secreción uterina de prostaglandinas, la calidad del embrión y el desarrollo de la gestación. Del mismo modo, la alimentación durante la lactación con grasas ricas en AGPI de la familia n-3 inhibe la secreción uterina de prostaglandinas, mejora la calidad del embrión y ayuda a mantener la gestación (Santos y col., 2008).

No se conocen muy bien los posibles mecanismos por los que grasas mejoran los rendimientos reproductivos de las vacas. Se han propuesto cuatro hipótesis:

- Una mejoría del BEN que conduciría a un acortamiento del anoestro postparto
- Un incremento de la esteroidogénesis que favorecería una mayor fertilidad
- Un aumento en la concentración plasmática de insulina que estimularía el desarrollo de los folículos ováricos

-La estimulación e inhibición de la producción y secreción de $\text{PGF}_{2\alpha}$ que influiría sobre la persistencia del cuerpo lúteo (Staples y col., 1998).

3.4.4.1. Efecto de los ácidos grasos sobre la reactivación ovárica durante el postparto.

Uno de los mecanismos por los que la suplementación con grasa durante el inicio de lactación puede mejorar la fertilidad en las vacas lecheras, está relacionado con su efecto positivo sobre el crecimiento folicular, tamaño folicular y la ovulación. (Lucy y col., 1993; Staples y col., 1998).

Diversos estudios han comprobado que el diámetro del folículo dominante aumenta en vacas alimentadas con raciones enriquecidas en PUFA comparado con MUFA, sugiriendo que existen efectos diferenciales de los ácidos grasos sobre el crecimiento folicular (Bilby y col., 2006; Santos y col., 2008).

Beam y Butler (1997), observaron que las vacas que presentaron un anestro postparto más corto tenían un mayor número de folículos ováricos. Seguramente, al aumentar el número y tamaño de folículos dominantes mediante la incorporación de grasas en las raciones, se reduzca el intervalo parto primera ovulación postparto (Lammoglia y col., 1997; De Fries y col., 1998).

3.4.4.2. Efecto de la insulina sobre la reactivación ovárica durante el postparto.

La insulina es un potente estimulador de la función celular en el folículo ovárico, mejora la proliferación celular y en consecuencia la producción de progesterona. Normalmente, la concentración plasmática de insulina refleja el consumo de energía por parte del animal.

El efecto de suplementar con grasas la ración de vacas lecheras, sobre la concentración plasmática de insulina es muy variado y depende del estatus energético en el que se encuentran las vacas. En los trabajos en los que la suplementación con grasas mejora el estatus energético, la concentración plasmática de insulina aumenta. Cuando la suplementación con grasas deprime la secreción de insulina, las células de la

granulosa producen una mayor cantidad de IGF-1 que estimula positivamente el desarrollo folicular (Spicer y col., 1993).

Los PUFA de la ración pueden tener efectos sobre la función ovárica y uterina, y en consecuencia sobre la síntesis de hormonas esteroideas y prostaglandinas. La insulina y los IGF-1 influyen en la mejora de la esteroidogénesis folicular (Robinson y col., 2002).

3.4.4.3. Efecto de las grasas sobre la función luteal

En ganado vacuno, la mejora de la fertilidad está relacionada con un aumento en la concentración plasmática de progesterona (P_4) durante la fase luteal, antes y después de la inseminación artificial (Santos y col., 2008).

Después de la ovulación, las células de la granulosa se diferencian en células latéales en el cuerpo lúteo que son capaces de secretar progesterona tras ser expuestas al pulso de LH (Staples y col., 1998).

La concentración plasmática de colesterol y su contenido en las células latencias del folículo aumentan de forma considerable con raciones suplementadas con grasas, ya que el colesterol plasmático puede ser transportado al ovario (Carroll y col., 1992). El colesterol actúa como precursor en la síntesis de progesterona por parte de las células latencias del folículo y esta hormona desempeña un importante papel en la implantación del embrión en el útero y en el mantenimiento de la gestación.

El perfil en AG de la grasa de la ración puede influir sobre la concentración plasmática de progesterona. Numerosos estudios muestran que los PUFA de la ración pueden actuar modulando el metabolismo y la síntesis de prostaglandinas (Abayasekara y Wathes, 1999; Mattos y col., 2000).

El ácido linolénico (C18:3, n-3), EPA y DHA son conocidos inhibidores de la enzima ciclooxygenasa en el tejido endometrial de las vacas lecheras y por lo tanto, deprimen la secreción uterina de prostaglandinas, mejorando la supervivencia embrionaria (Mattos y col., 2002, 2003, 2004, Santos y col., 2008). El ácido linolénico (C18:3, n-3), muy abundante en el aceite de linaza, es un precursor del EPA y DHA.

El ácido linoleico actúa como un precursor endógeno en la síntesis de araquidónico (C20:4 *n*-6), por lo que podría incrementar la incorporación de éste AG en la membrana fosfolipídica de las células endometriales y consecuentemente la síntesis de PGF_{2α} (Mattos y col., 2003). Igualmente, tendría un importante papel en la involución uterina en el postparto (Kindahl y col., 1992).

Thangavelu y col., (2007), concluyen que las raciones enriquecidas en ácido linoleico (C18:2, *n*-6) y linolénico (C18:3, *n*-3), aceleran el desarrollo inicial del embrión en vacas lecheras, comparadas con raciones con alto contenido en ácidos grasos saturados. La mejora en el desarrollo embrionario se manifiesta por un significativo incremento en el número de blastómeros a partir de la fase de mórula.

4. Material y métodos

4.1. PRUEBA EXPERIMENTAL 1: Incorporación de aceites vegetales insaturados en raciones de vacas lecheras en inicio de lactación

4.1.1. Animales, Alojamiento y tratamientos experimentales

El experimento se realizó en la explotación de vacuno lechero que posee el grupo Leche Pascual en Aranda de Duero. El manejo de los animales durante el desarrollo de la prueba experimental se realizó según el real decreto 1201/2005 y Directiva del Consejo europeo 86/609/EEC sobre la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.

Para la realización de este experimento se utilizaron 6 vacas lecheras multíparas de raza Holstein en inicio de lactación, con 67 ± 17 días en leche (DEL), una producción media de leche de $33,1 \pm 5,4$ kg/día y un peso vivo (PV) medio de $682 \pm 10,18$ kg, que fueron distribuidos al azar a los distintos tratamientos experimentales. Antes de comenzar el periodo experimental todos los animales estaban consumiendo la misma ración y la semana previa a comenzar el periodo de adaptación (semana 0) se controló la producción de leche, se pesaron los animales y se tomaron muestras de leche para conocer su composición. El experimento se realizó según un diseño en cuadrado latino replicado 3 x 3 con periodos de 21 días. Los primeros 14 días fueron para la adaptación de los animales a las raciones experimentales y los últimos 7 se utilizaron como periodo de control. Los animales se alojaron en cubículos individuales de 8 m² de superficie con cama de paja que disponían de comedero independiente y permitía el control individual del consumo de alimentos. Durante todo el experimento, los animales dispusieron de agua limpia a voluntad.

Las raciones experimentales fueron:

CONTROL: Ración sin grasa añadida

SOJA: Ración con un 4% de aceite de soja sobre MF del pienso (altamente insaturado, rico en C18:2 y C18:3) en el concentrado.

LINAZA: Ración con un 4% de aceite de linaza sobre MF del pienso (altamente insaturado, rico en C18:3) en el concentrado.

Las raciones experimentales se presentan en la tabla 4.1. Las tablas 4.2. y 4.3. muestran la composición química y composición en ácidos grasos de las raciones experimentales, y en la tabla 4.4. aparece la composición en ácidos grasos de los aceites utilizados.

Tabla 4.1. Raciones experimentales

Materias primas (% MF)	Raciones experimentales		
	Control	Soja	Linaza
Ensilado de maíz	39,7	40,5	40,5
Heno de alfalfa	15,0	15,3	15,3
Cascarilla de soja	4,3	4,3	4,3
Cebada nacional	2,1	11,7	11,7
Paja cebada	1,4	1,4	1,4
Maíz nacional	13,3	-	-
Trigo nacional	7,4	5,8	5,8
DDGS maíz	4,0	-	-
Harina palmaste	4,0	2,9	2,9
Harina de soja 44%	7,7	7,2	7,2
Raicilla de cebada	-	2,9	2,9
Salvado	-	4	4
Melaza de caña	-	1,2	1,2
Aceite de soja	-	1,5	-
Aceite de linaza	-	-	1,5
Carbonato cálcico	0,3	0,3	0,3
Fosfato bicálcico	0,1	0,1	0,1
Bicarbonato sódico	0,6	0,6	0,6
Sal	0,1	0,1	0,1
Corrector ¹	0,1	0,1	0,1
Composición calculada (% MS)	Control	Soja	Linaza
MS	22,46	22	22
Proteína Bruta	16,47	16,50	16,50
Extracto etéreo	3,61	4,84	4,84
FND	32,39	34,15	34,15
FAD	20,14	20,72	20,72
FNDf	15,60	15,92	15,92
UFL (UFL/Kg MS)	1	1	1

¹Corrector 0,3% (Nuter Feed, España): Vit A 3.000.000 UI, Vit D3 750.000 UI, Vit E 12.500 UI, Óxido de Zn 20.500 mg, Quelato de Zn 7.500 mg, Sulfato Cúprico 5.500 mg, Quelato de Cobre 750 mg, Selenito Sódico 200 mg, Calcio 1.904 mg, Sodio 222 mg

Las raciones se formularon para que fuesen isoenergéticas e isoproteicas, y para que cubriesen las necesidades nutritivas de los animales según su estado fisiológico y nivel productivo, siguiendo las recomendaciones del NRC (2001) e INRA (2007).

Tabla 4.2. Composición química (% MS) de las raciones experimentales.

Composición (% MS)	Concentrados			Raciones experimentales		
	Control	Soja	Linaza	Control	Soja	Linaza
MS	90,45	91,76	90,96	66,25	62,47	61,25
Cenizas	6,2	5,7	6	5,69	5,17	5,57
PB	19	17,9	17,4	15,67	15,79	15,55
EE	4,19	5,8	6,2	3,08	4,52	4,21
FND	14,2	22,5	20,2	30,68	31,45	32,95
FAD	6,4	8,6	8,9	21,94	23,4	22,2
Almidón	38,72	31,3	33,7	28,03	25,39	23,76

Tabla 4.3. Composición en ácidos grasos (g/100 g del total de ácidos grasos) de las raciones experimentales.

Ácidos grasos	Concentrados			Raciones experimentales		
	Control	Soja	Linaza	Control	Soja	Linaza
C12:0	8,99	2,02	2,59	6,56	2,13	4,38
C14:0	2,8	1,1	1,03	1,82	1,06	1,6
C16:0	17,66	13,35	11,66	27,05	20,32	18,32
C16:1	0,54	0,39	0,47	1,3	0,82	0,53
C18:0	2,42	3,41	3,7	4,36	3,46	4,36
C18:1	20,23	23,51	20,83	16,54	16,68	17,55
C18:2	44,96	52,23	27,45	31,65	42,56	28,3
C18:3	2,27	3,05	31,61	9,05	10,61	24,11

Tabla 4.4. Composición en ácidos grasos de los aceites utilizados en las raciones experimentales (g/100 g del total de ácidos grasos)

	Soja	Linaza
C12:0	0,12	0,05
C14:0	0,20	0,15
C16:0	9,21	6,77
C16:1	0,26	0,12
C18:0	4,82	5,02
C18:1	26,40	20,81
C18:2	52,81	13,82
C18:3	6,18	53,26

4.1.2. Desarrollo experimental

Las raciones se suministraron en forma de UNIFEED, una vez al día, empezando su distribución a las 6:30 horas.

En cada uno de los periodos, después de 14 días de adaptación a las distintas raciones experimentales, se inició el registro del consumo de alimentos durante 7 días consecutivos. Diariamente se pesaba la cantidad de alimento ofrecido y la cantidad de alimento no consumido. Estos restos eran retirados antes de ofrecer los nuevos alimentos. La cantidad de ración que se ofrecía se calculaba a partir del consumo del día anterior, para mantener un margen de alimento rehusado del 15%. Durante los 7 días del periodo de control, en cada uno de los tres periodos se procedió a la obtención de muestras de las raciones y los ingredientes de las raciones, que fueron congeladas a -24°C para su posterior análisis en el laboratorio.

Los animales se ordeñaban dos veces al día (a las 6:00 h y a las 18:00 h) en una sala de ordeño tipo paralelo con salida rápida de 12 puntos por 2, de marca Westfalia-Surge y con pulsaciones registradas de 60:40. Los 3 últimos días de cada periodo se tomaron muestras de leche en el ordeño de la mañana y de la tarde, en cantidad proporcional a la cantidad de leche producida en cada ordeño. Las muestras de leche obtenidas de los dos ordeños se mezclaron y se dividieron en dos. Una se conservó a 4°C hasta que se realizaron los análisis de grasa, proteína y lactosa. La otra muestra se conservó a -24°C y se utilizó para la determinación de los ácidos grasos.

Las vacas se pesaron durante dos días consecutivos al terminar cada periodo experimental.

4.1.3. Determinaciones analíticas

El contenido en Humedad, N total, extracto etéreo y cenizas se determinó en las muestras de las raciones y de los ingredientes de las raciones según la metodología propuesta por la AOAC (2006). El contenido en FND y FAD se realizó según la técnica propuesta por Van Soest, Robertson, Lewis (1991) utilizando el analizador de fibra ANKOM200/220.

Los análisis para la determinación de la grasa, proteína y lactosa de la leche se realizaron según the International Dairy Federation (IDF, 2000), utilizando un analizador (FOSS Electric A/S, Hillerød, Denmark).

Sobre las muestras de alimentos y leche se determinó el perfil en ácidos grasos y los diferentes isómeros del CLA. La separación, identificación y cuantificación de los ácidos grasos se realizó por cromatografía de gases.

La determinación del contenido en ácidos grasos de los alimentos se realizó según el procedimiento de extracción y cuantificación en un paso (One Step) propuesto por Sukhija y Palmquist (1988) con ligeras modificaciones a partir de muestras liofilizadas. Para ello se pesaran 0.25 g de muestra y se colocaron en un tubo con tapón de rosca. Se utilizó ácido Pentadecanóico (C15:0) disuelto en tolueno (10 mg/ml) como patrón interno, añadiéndose a cada muestra 1 ml de la solución. A continuación se añadió 3 ml de una mezcla (al 10%) de cloruro acético en metanol, y 1 ml de tolueno. Se agitó durante 30 segundos y se colocó en un baño de arena a 70 °C, durante dos horas. Tras enfriar las muestras a temperatura ambiente se añadieron 5 ml de carbonato potásico al 6% y 1 ml de tolueno. Seguidamente, se agitaron otra vez las muestras durante 2 minutos y se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 minutos. La capa superior con los ésteres metílicos de los ácidos grasos se transfirieron a otro tubo al cual se añadió 1 g. de sulfato sódico anhidro para eliminar el agua y así evitar dañar la columna cromatográfica. Se agito fuertemente y se dejó reposar una hora. La parte superior se recogió en un vial de 4 ml. Los ésteres metílicos de los ácidos grasos se analizaron mediante cromatografía de gases utilizando un aparato Hewlett Packcard HP-6890 (Avondale, PA, EEUU) equipado con un detector de ionización de llama y una columna capilar HP-Innowax (100 m x 0.32 mm x 0.25 de polietilenglicol).

La extracción de los lípidos de la leche se realizó sobre las muestras liofilizadas con una mezcla de cloroformo/metanol (2:1 v/v) según el procedimiento descrito por Folch y col., (1957). La grasa extraída fue metilada en presencia de metóxido sódico (Christie, 1982) y analizada por cromatografía de gases tal y como se describe para los ácidos grasos de los alimentos.

4.1.4. Análisis Estadístico

Inicialmente se realizó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk para determinar si los residuos se distribuían según una norma, utilizando el procedimiento UNIVARIATE del paquete estadístico SAS (V.9.1 Inst. Inc., Cary, NC). Se consideró que los residuos se distribuyeron normalmente cuando el estadístico W fue igual o mayor de 0,90.

Todos los datos, excepto el peso de los animales, se analizaron como un cuadrado latino replicado utilizando el PROC MIXED de SAS (V.9.1 Inst. Inc., Cary, NC). El modelo incluye los efectos fijos ración (3) y periodo (3), como efecto aleatorio la vaca (6), como medida repetida el día de muestreo (3) y los valores obtenidos la semana previa al comienzo del periodo de adaptación como covariable, para corregir posibles desviaciones previas al estudio.

Para elegir la estructura de covarianza que mejor se ajustaba a los datos se utilizó el Criterio de Información Bayesiano de Schwartz (BIC). La estructura de covarianza que presentó el valor de BIC más bajo se consideró la más adecuada entre las siguientes estructuras: simétrica compuesta (CS), autoregresiva de primer orden (AR (1)), auto regresiva heterogénea de primer orden (HAR) y no estructurada (UN). Las cuatro estructuras mostraron convergencia y se seleccionó la estructura CS ya que presentó el menor CIB.

El peso de los animales se analizó como un cuadrado latino replicado 3 x 3 utilizando el procedimiento GLM de SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC). El modelo incluye el efecto de la ración, el periodo y la vaca.

Para comparar las medias de los tratamientos se utilizaron los siguientes contrastes ortogonales: control vs soja y linaza, y soja vs linaza. Para comparar las medias, el nivel de significación se estableció en $P < 0,05$, pero $P < 0,1$ fue considerado como una tendencia. Los datos se presentan como medias corregidas por mínimos cuadrados (LSM, least square means).

4.2. PRUEBA EXPERIMENTAL 2: Incorporación de aceites vegetales insaturados en raciones de vacas lecheras, parámetros productivos en media lactación y parámetros reproductivos.

4.2.1. Animales, Alojamiento y tratamientos experimentales

El experimento se realizó en la explotación de vacuno lechero que posee el grupo Leche Pascual en Aranda de Duero.

Para el estudio de los parámetros reproductivos se utilizaron 374 vacas lecheras de raza Holstein no gestantes, en inicio de lactación (205 multíparas y 169 primíparas). Los animales se agruparon en 6 lotes homogéneos, según la producción de leche y número de partos, y fueron distribuidos al azar a los distintos tratamientos experimentales, en dos réplicas por tratamiento.

Antes de comenzar el periodo experimental, a los 15 ± 1 días post parto (dpp), todos los animales estaban consumiendo la misma ración y la semana previa a comenzar el periodo de adaptación se controló la producción de leche, se pesaron los animales y se tomaron muestras de leche para conocer su composición. Las vacas recibieron las raciones experimentales durante al menos 32 semanas. Asimismo, se tomaron muestras de sangre para conocer los parámetros sanguíneos estudiados en la prueba (NEFA, Hidroxibutirato, Progesterona, Insulina, e IGF-1). Estos datos se utilizaron como covariables en el análisis estadístico. En este periodo previo, y durante cuatro días, se tomó la temperatura rectal, desechando cualquier animal que presentase algún signo clínico de enfermedad.

Los animales se alojaron en 6 naves con 75 cubículos individuales de cama de carbonato cálcico. Cada nave consiste en una zona de reposo cubierta y otra al aire libre, en la que se encuentra un comedero cubierto de 46 metros lineales de longitud. El sistema de manejo de la explotación es de estabulación libre con cubículos, situados éstos en la zona de reposo. La disposición de los cubículos es de dos filas individuales, separados por un pasillo de circulación de limpieza automática mediante arrobaderas. Cada nave dispone de dos bebederos de acero inoxidable, de 3 m de largo y una

profundidad hasta la lámina de agua de 20 cm, que aseguran el suministro de agua limpia a voluntad.

Las raciones experimentales fueron las mismas que se utilizaron en el experimento 1 (tabla 4.1):

CONTROL: Ración sin grasa añadida

SOJA: Ración con un 4% de aceite de soja sobre MF del pienso (altamente insaturado, rico en C18:2 y C18:3) en el concentrado.

LINAZA: Ración con un 4% de aceite de linaza sobre MF del pienso (altamente insaturado, rico en C18:3) en el concentrado.

La tabla 4.5 muestra la composición química y composición en ácidos grasos de los concentrados y de las raciones experimentales. La composición en ácidos grasos de las raciones experimentales y de los aceites utilizados se puede observar en la tabla 4.4. (Experimento 1)

Tabla 4.5. Composición química (% MS) de los ingredientes y de las raciones experimentales.

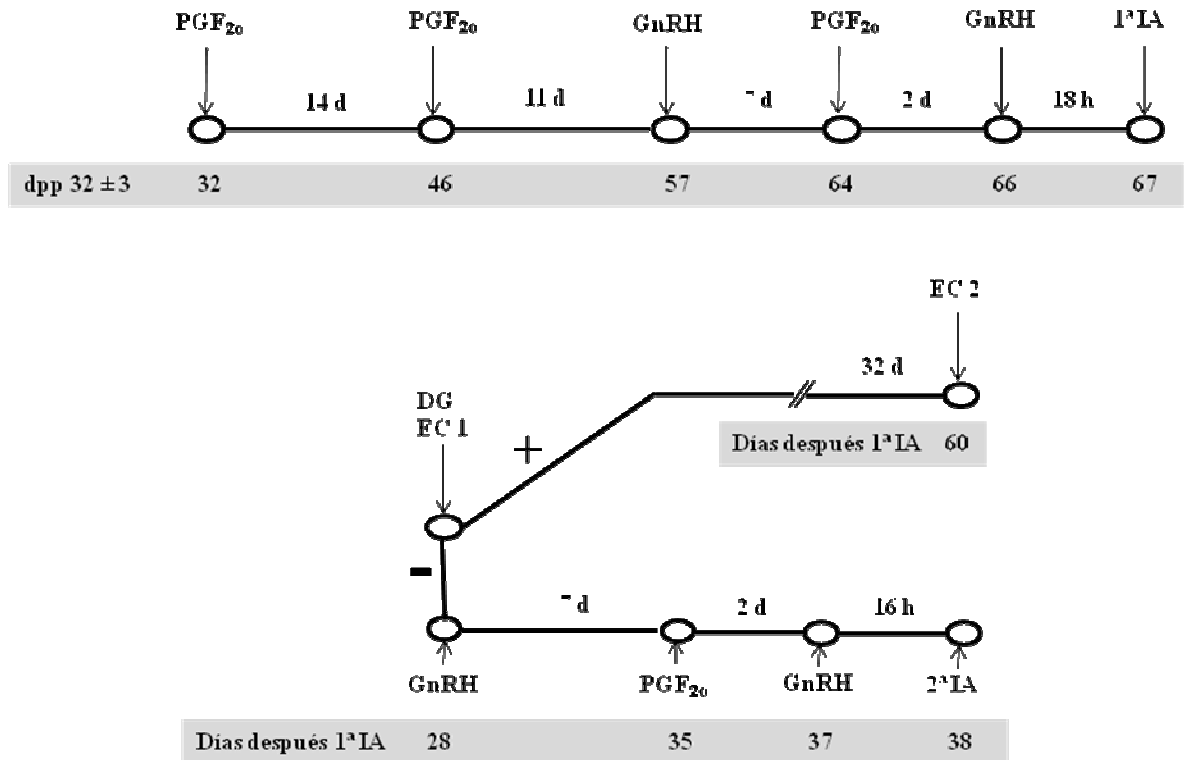
Composición (% MS)	Concentrados			Raciones experimentales		
	Control	Soja	Linaza	Control	Soja	Linaza
MS	89,20	90,71	92,37	64,33	63,47	62,12
Cnz	5,9	6,1	5,8	5,43	5,33	5,12
PB	18,8	19,4	19,8	15,66	15,25	15,87
EE	4,34	6,01	6,14	3,32	4,90	4,22
FND	16,86	23,36	22,15	32,22	38,32	37,81
FAD	5,97	9,35	10,15	20,74	22,64	22,62
Almidón	38,97	30,82	31,88	27,20	22,80	21,75

Protocolo de sincronización de la ovulación e inseminación artificial

El periodo voluntario de espera fue de 32 ± 3 días postparto, momento a partir del cual todas las vacas fueron sometidas a un protocolo de sincronización de la ovulación (figura 4.1.). Dicho protocolo consistió en una presincronización del *status* del ovario con la aplicación de dos inyecciones de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Dinolytic ®, 5 mg de dinoprost trometamina, Pfizer Salud Animal, Madrid, España) separadas 14 días una de otra (método Presynch), seguido de una inyección de GnRH (Fertagyl ®, gonadorelina 0,1 mg, Veterinaria Esteve, Barcelona, España) 11 días más tarde, con una tercera inyección de $\text{PGF}_{2\alpha}$ 7 días después y una segunda inyección de GnRH 2 días más tarde (método Ovsynch, Pursley y col., 1995), para 18 horas después proceder a la inseminación artificial (IA). El diagnóstico de gestación (DG) se realizó a los 28 días después de la primera IA, con un ecógrafo de sonda transrectal (Ecógrafo Bovino Scanner, corte transversal 90 ° sonda rectal, pantalla digital color LG Philips LCD TFT 6,4 pulgadas).

Las vacas gestantes volvieron a ser ecografiadas a los 32 días tras realizar el diagnóstico de gestación, para confirmar la gestación o identificar posibles pérdidas embrionarias. Los animales no gestantes se sometieron a un nuevo protocolo de sincronización de la ovulación según el método Ovsynch, el mismo día en el que se realizó el diagnóstico de gestación (figura 4.1.). La misma persona realizó la inseminación artificial en todas las vacas del experimento.

Figura 4.1. Esquema del programa reproductivo (sincronización y resincronización de la ovulación) para la 1ª y 2ª inseminación artificial.



dpp = días postparto; 1ª IA = primera inseminación artificial; 2ª IA = segunda inseminación artificial; DG = diagnóstico de gestación; EC = ecógrafo.

4.2.2. Desarrollo experimental

Las raciones se suministraron en forma de UNIFEED, una vez al día, empezando su distribución a las 6,30 horas.

Diariamente, en cada uno de los lotes se controló la cantidad de alimento ofrecido y la cantidad de alimento no consumido. Los restos del día anterior, de cada lote, eran retirados a la misma hora antes de ofrecer los nuevos alimentos. La cantidad de ración que se ofrecía en cada lote se calculaba a partir del consumo del día anterior, para mantener un margen de alimento no consumido del 5%.

Mensualmente se procedió a la obtención de muestras de las raciones, de los piensos y de los restos, que fueron congeladas a -24°C para su posterior análisis en el laboratorio.

Los animales se pesaron tres veces a lo largo del periodo experimental: a los 0, 32 y 67 días en leche (DEL).

Para el estudio de los rendimientos reproductivos se tomaron 3 muestras de 10 cc de sangre a lo largo del periodo postparto: 46 (-21 d), 57 (-10 d) y 67 (d 0 = IA) días postparto (dpp). La extracción de las correspondientes muestras de sangre, se realizó mediante punción en la vena coccígea recogiéndose en tubos Vacutainer (BD Vacutainer Systems, Plymouth, Reino Unido). A continuación, se separaron las células del suero o plasma mediante centrifugación. Para obtener suero, la sangre se recogió en tubos sin ningún tipo de anticoagulante, se dejó coagular durante aproximadamente 12 horas, y posteriormente se centrifugó durante 15 minutos a 3.500 rpm. El sobrenadante se traspasó a un tubo eppendorf y se congeló a -20°C, para más tarde determinar la concentración de ácidos grasos no esterificados (NEFA), β -hidroxibutirato (BHBA), Progesterona (P_4), Insulina y el factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF-1).

Los datos reproductivos de las 374 vacas fueron recogidos a lo largo de todo el periodo experimental y se controlaron: días al pico, número de inseminaciones, días abiertos, días a 1ª inseminación artificial y porcentaje de detección de celos.

Los animales se ordeñaban dos veces al día (a las 6,00 h y a las 18,00 h) en una sala de ordeño tipo paralelo con salida rápida de 12 puntos por 2, de marca Westfalia-Surge y con pulsaciones registradas de 60:40. Durante las tres últimas semanas del periodo experimental se seleccionaron 15 animales de cada lote, que se encontraban en media lactación (DEL=210±22), de los que se tomaron muestras de leche (una muestra semanal, semana 30, 31 y 32 de lactación). Las muestras se obtuvieron en el ordeño de la mañana y de la tarde, en cantidad proporcional a la cantidad de leche producida en cada ordeño. Las muestras de leche obtenidas de los dos ordeños se mezclaron y se dividieron en dos. Una se conservó a 4°C hasta que se realizaron los análisis de grasa,

proteína y lactosa. La otra muestra se conservó a -24°C y se utilizó para la determinación de los ácidos grasos.

4.2.3. Determinaciones analíticas

El análisis de las raciones y los ingredientes de las raciones (Humedad, proteína bruta, extracto etéreo, cenizas, FAD y FND), así como de las muestras de leche (grasa, proteína, lactosa y perfil de ácidos grasos) se realizaron según la metodología descrita en el experimento 1.

Para la determinación de la concentración plasmática de los NEFA se empleó el método enzimático colorimétrico (ACS-ACOD-MEHA, NEFA C, Wako®, Neuss), con el analizador Olympus AU400 (Olympus Diagnostica GmbH, Hamburg). La concentración plasmática de progesterona se realizó mediante el método de inmunoensayo enzimático competitivo (ELISA, EIA-1561, DRG Diagnostics, Marburg, Germany). La determinación plasmática de insulina se llevó a cabo con un ELISA tipo sandwich (Mercodia Bovine Insulin ELISA, Suecia), utilizando el lector EMS Reader MF V.2.9-0. Igualmente, la concentración de IGF-1 se determinó mediante el método ELISA tipo sandwich (Active Non-Extraction IGF-1 ELISA DSL-10-2800, Diagnostic Systems Laboratorios Inc., EEUU). Por último, la concentración de D-3-Hidroxybutirato se obtuvo mediante el método cinético enzimático, con el reactivo RANBUT D-3-Hydroxybutirate (RANDOX®).

4.2.4. Análisis Estadístico

Inicialmente, se realizó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk para determinar si los residuos se distribuían según una norma, utilizando el procedimiento UNIVARIATE del paquete estadístico SAS (V.9.1 Inst. Inc., Cary, NC). Se consideró que los residuos se distribuyeron normalmente cuando el estadístico W fue igual o mayor de 0,90.

Para el análisis de los datos de producción, composición y ácidos grasos de la leche, así como los parámetros sanguíneos se utilizó el procedimiento MIXED del paquete estadístico SAS (V.9.1 Inst. Inc., Cary, NC). En el modelo, la ración fue

introducida como efecto principal, la vaca como efecto aleatorio, la semana de muestreo como medida repetida y los valores obtenidos la semana previa al comienzo del periodo de adaptación como covariable, para corregir posibles desviaciones previas al estudio.

Para elegir la estructura de covarianza que mejor se ajustaba a los datos se utilizó el Criterio de Información Bayesiano de Schwartz (BIC). La estructura de covarianza que presentó el valor de BIC más bajo se consideró la más adecuada entre las siguientes estructuras: simétrica compuesta (CS), autoregresiva de primer orden (AR (1)), Auto regresiva heterogénea de primer orden (HAR) y no estructurada (UN). Las cuatro estructuras mostraron convergencia y en todos los casos se seleccionó la estructura CS ya que presentó el menor CIB.

Para estudiar la evolución de los parámetros sanguíneos en los diferentes tratamientos experimentales se estudiaron las interacciones entre el tiempo y el tratamiento. Cuando el valor P, de la interacción fue $<0,1$, las diferencias entre las medias se establecieron siguiendo el método LSD.

Se realizó un análisis de varianza de una vía para el estudiar las variaciones de peso empleando el procedimiento GLM del paquete estadístico SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC).

Para valorar los tratamientos se realizaron los siguientes contrastes: control vs soja y linaza, soja vs linaza. El nivel de significación se estableció en $P<0,05$, pero $P<0,1$ fue considerado como una tendencia. Los datos se presentan como medias corregidas por mínimos cuadrados (LSM, least square means).

Con las siguientes variables: días al pico, número de inseminaciones, días abiertos, días a la primera inseminación y porcentaje de detección de celos, debido a no ajustarse a los criterios de normalidad, se realizó un análisis de Kruskal-Wallis. Los datos se presentan en las tablas como medianas y rangos intercuartílicos.

5. Resultados

5.1. PRUEBA EXPERIMENTAL 1: Parámetros productivos y composición de la leche en inicio de lactación

5.1.1 Parámetros productivos en inicio de lactación

En la Tabla 5.1. aparecen reflejados los valores medios de ingesta diaria (kg/día) de materia seca y de grasa, la producción de leche diaria (kg/día), la producción de leche diaria corregida al 4 % de grasa (kg/día), el peso vivo medio del periodo experimental (kg), la variación de peso (kg/día), el contenido (%) y cantidad (g/día) de grasa, proteína y lactosa, para los tres tratamientos experimentales. Para todos los valores mencionados aparece en la tabla el error estándar de la media corregida por mínimos cuadrados y los niveles de significación existente entre los tratamientos.

Como se puede observar, la inclusión de aceite, o el tipo de aceite empleado no afectó de forma estadísticamente significativa ($p>0,05$) la materia seca ingerida (kg/día), la producción de leche (kg/día), ni el porcentaje y cantidad de proteína y lactosa. En la variación de peso diaria, tampoco se observaron diferencias significativas ($p>0,05$) entre los tratamientos.

Como es lógico, los animales de los tratamientos con aceite consumieron mayor cantidad de grasa ($P=0,034$) que los del tratamiento control (0,94 para el tratamiento con soja y 0,83 para el de linaza, frente a 0,69 para el tratamiento control, sin grasa añadida).

La producción de leche corregida al 4 % de grasa y expresada en kilogramos/día presentó una tendencia a la significación ($P=0,095$), con una mayor producción de leche para el tratamiento control (43,21 kg) comparado con los tratamientos soja (32,84 kg) o linaza (34,84 kg).

El porcentaje de grasa de la leche presentó un mayor valor ($P=0,016$) en el tratamiento control (4,24 %) que la de los tratamientos soja (2,77 %) o linaza (3,20 %), sin diferencias significativas entre estos dos últimos tratamientos.

De igual modo los kilogramos de grasa láctea diaria producidos presentaron diferencias significativas ($p=0,036$) entre el tratamiento control (1,79 kg) que presentó

el valor más alto, cuando lo comparamos con los tratamientos soja (1,12 kg) o tratamiento linaza (1,26 kg).

Tabla 5.1: Ingestión de materia seca (MSI), producción y composición de la leche en los diferentes tratamientos experimentales en inicio de lactación (medias corregidas por mínimos cuadrados, *least square means*).

	Tratamientos experimentales			SEM ¹	Nivel sig.
	Control	Soja	Linaza		
Materia seca ingerida (Kg./día)	22,46	20,90	19,82	1,064	0,317
Grasa ingerida (Kg./día)	0,692 ^b	0,945 ^a	0,833 ^a	0,042	0,034
Producción leche (Kg./día)	39,54	39,65	39,66	2,044	0,741
Producción leche corregida ² (Kg./día)	43,21 ^a	32,84 ^b	34,84 ^b	3,21	0,095
Peso vivo (Kg.)	690,5	687,3	668,3	11,26	0,693
Variación de peso (Kg./día)	-0,23	-1,06	-1,39	0,611	0,740
Grasa (%)	4,24 ^a	2,77 ^b	3,20 ^b	0,305	0,016
Grasa (Kg./día)	1,79 ^a	1,12 ^b	1,26 ^b	0,165	0,036
Proteína (%)	2,58	2,81	2,64	0,082	0,196
Proteína (g/día)	1,06	1,11	1,05	0,087	0,870
Lactosa (%)	4,46	4,70	4,53	0,107	0,284
Lactosa (Kg./día)	1,84	1,89	1,79	0,151	0,895

¹SEM: Error estándar de la media corregida por mínimos cuadrados

² Producción de leche corregida al 4% de grasa = (0,4 x Kg. de leche) + (15 x Kg. de grasa) (Gaines, 1927)

^{a, b} Superíndices distintos en la misma fila indican diferencias significativas (P<0,05).

5.1.2. Composición de los ácidos grasos de la leche en inicio de lactación

En la Tabla 5.2. se presenta la composición en ácidos grasos (g/100 g del total de ácidos grasos) de la grasa de la leche en los diferentes tratamientos experimentales.

Los ácidos grasos mayoritarios en el tratamiento control y soja fueron el ácido palmítico (C16:0) (32,53 % y 30,92%), seguido de los ácidos oleico (C18:1 *cis*-9) (27,70 %, y 28,24%), esteárico (C18:0) (12,26% y 13,5%) y mirístico (C14:0) (11,55% y 10,36%). En el tratamiento con aceite de linaza, los ácidos oleico (C18:1 *cis*-9) y palmítico (C16:0) alcanzaron valores similares (29,01% y 28,92%, respectivamente), seguidos de los ácidos esteárico (C18:0) (13,63%) y mirístico (C14:0) (10,51%).

No se observaron diferencias estadísticamente significativas (P>0,05) en el contenido en C4:0, C8:0, C12:0, C14:0 y C14:1.

La grasa de la leche de los animales que no consumieron aceite en la ración presentó una tendencia ($P=0,086$) a un mayor contenido en C16:0 que los que consumieron soja o linaza (32,53 % frente a 30,92 % y 28,92 %). No se observaron diferencias estadísticamente significativas ($P>0,1$) en el contenido en C16:1 y C18:0.

Tabla 5.2: Composición en ácidos grasos (g/100 g del total de ácidos grasos) de la grasa de la leche en los diferentes tratamientos experimentales en inicio de lactación (medias corregidas por mínimos cuadrados, *least square means*)

	Tratamientos experimentales			SEM ¹	Nivel sig.
	Control	Soja	Linaza		
C4:0	2,463	2,138	2,108	0,1942	0,257
C8:0	0,222	0,166	0,188	0,020	0,116
C12:0	3,288	2,897	2,707	0,255	0,257
C14:0	11,55	10,36	10,51	0,580	0,219
C14:1	1,092	0,917	1,048	0,197	0,743
C16:0	32,53 ^a	30,92 ^b	28,92 ^b	1,206	0,086
C16:1	1,613	1,481	1,290	0,189	0,379
C18:0	12,26	13,16	13,63	1,054	0,583
C18:1 <i>cis</i> -9	27,70	28,24	29,01	1,663	0,845
C18:1 <i>trans</i> -11 (Acido Vaccénico)	1,793 ^a	2,646 ^b	3,401 ^c	0,281	<0,001
C18:2 <i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12 <i>n</i> -6	4,051 ^{ab}	5,057 ^a	4,149 ^b	0,388	0,085
C18:2 <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 CLA (Ac. Ruménico)	0,855 ^b	1,240 ^a	1,384 ^a	0,085	<0,0001
C18:2 <i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12 CLA	0,028 ^c	0,064 ^a	0,037 ^b	0,006	<0,001
C18:3 <i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12, <i>cis</i> -15 <i>n</i> -3	0,466 ^c	0,669 ^b	1,314 ^a	0,081	<0,0001
C20:4 <i>n</i> -6 (Araquidónico)	0,226 ^a	0,174 ^b	0,150 ^b	0,017	0,013
C20:5 <i>n</i> -3 (EPA)	0,044 ^b	0,074 ^a	0,067 ^a	0,009	0,028
Insaturados	37,57 ^b	40,30 ^a	42,01 ^a	1,699	0,097
Saturados	62,43 ^a	59,70 ^b	57,99 ^b	1,699	0,097
Monoinsaturados (MUFA)	31,87	32,99	34,85	1,669	0,373
Poliinsaturados (PUFA)	5,713 ^b	7,309 ^a	7,091 ^a	0,457	0,029
Poliinsaturados/saturados	0,093 ^b	0,123 ^a	0,124 ^a	0,0091	0,020
Total <i>n</i> -3	0,576 ^c	0,816 ^b	1,46 ^a	0,0835	<0,0001
Total <i>n</i> -6	4,28 ^{ab}	5,23 ^a	4,29 ^b	0,386	0,097
<i>n</i> 6/ <i>n</i> 3	7,71 ^a	6,45 ^b	3,10 ^c	0,5369	<0,0001
AG cadena corta y media (C4 a C16)	52,80 ^a	48,90 ^b	46,75 ^b	2,011	0,069
AG cadena larga (>C18)	47,19 ^b	51,09 ^a	53,25 ^a	2,011	0,067
Índice Desaturasa ²					
C14:1/(C14:0+C14:1)	0,080	0,094	0,090	0,0152	0,810
C16:1/(C16:0+C16:1)	0,046	0,043	0,042	0,0048	0,770
C18:1/(C18:0+C18:1)	0,685	0,667	0,681	0,0299	0,863
C18:2 <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11/(C18:1 <i>trans</i> -11+ C18:2 <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11)	0,372	0,344	0,302	0,0399	0,461
Índice de aterogenicidad ³	2,260 ^a	1,981 ^b	1,801 ^b	0,1783	0,137

¹SEM: Error estándar de la media corregida por mínimos cuadrados

²(Kelsey y col., 2003).

³(C12:0+4×C14:0+C16:0)/(MUFA+PUFA) (Ulbricht y Southgate, 1991).

^{a, b} Superíndices distintos en la misma fila indican diferencias significativas ($P<0,05$).

El contenido en C18:1 *trans-11* (ácido vaccénico) fue significativamente superior ($P<0,001$) en los animales que consumieron aceite, y los animales que consumieron aceite de linaza presentaron un mayor contenido en este ácido graso que los que consumieron soja (1,79%, 2,65% y 3,4% para los tratamientos control, soja y linaza, respectivamente).

La leche de los animales que consumieron aceite de soja presentó una tendencia ($P=0,086$) a un mayor contenido en ácido linoleico (C28:2, *cis-9*, *cis12*) que los que consumieron aceite de linaza (5,06% frente a 4,15%).

El contenido en ácido ruménico (C18:2 *cis-9*, *trans-11* CLA) de la leche de los animales que fueron suplementados con aceite fue significativamente ($p<0,0001$) mayor que la del grupo control, sin observar diferencias significativas entre el tipo de aceite empleado. Los valores observados fueron de un 0,85 % en el control, 1,24 %, en el tratamiento con soja y un 1,38 % en el de linaza.

En el contenido en C18:2 *trans-10*, *cis 12* CLA también se observan diferencias significativas ($p<0,001$) entre los tratamientos, presentando el mayor valor el aceite de soja (0,064 %), seguido del aceite de linaza (0,037 %), y por último el tratamiento control (0,028 %).

Se encuentran diferencias significativas ($p<0,001$) para el contenido de ácido linolénico (C18:3 *cis-9*, *cis-12*, *cis-15*) entre tratamientos, presentando el valor más alto los animales alimentados con aceite de linaza (1,314 %), seguido de los animales alimentados con aceite de soja (0,669%) y por último los animales con tratamiento control (0,466%).

La grasa de la leche de los animales del grupo control (sin grasa añadida) presentó un mayor ($P<0,05$) contenido en ácido araquidónico (C20:4) y menor en ($P<0,05$) EPA (C20:5) que los que consumieron aceite de soja o linaza (0,226 %, 0,174 % y 0,150 % para el ácido araquidónico y 0,044 %, 0,074 % y 0,067 % para el EPA en los tratamientos control, soja y linaza, respectivamente).

Los tratamientos con soja o linaza presentaron una tendencia ($P=0,09$) a un mayor contenido en el total de ácidos grasos insaturados y menor contenido en saturados frente al tratamiento control (37,57%, 40,30% y 42,02% para el total de ácidos grasos insaturados y 62,43%, 59,70% y 57,99% para los saturados, en los tratamientos control, soja y linaza, respectivamente).

La cantidad total de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) de la grasa de la leche presenta un porcentaje significativamente superior ($p<0,05$) para el caso del aceite de soja (7,31 %) y del aceite de linaza (7,09 %) comparados con el tratamiento control (5,71 %).

También ocurre para la relación poliinsaturados/saturados, donde los tratamientos soja (0,123 %) y tratamiento linaza (0,124 %) presentan valores significativamente superiores ($p<0,05$) frente al tratamiento control (0,093 %), y sin diferencias entre el tipo de aceite empleado.

Para el total de ácidos grasos de la serie n-3 presentes en la leche se encuentran diferencias significativas entre los tres tratamientos ($p<0,0001$), siendo el de linaza el que presenta el mayor valor (1,46 %), seguido del tratamiento con soja (0,816 %) y por último el tratamiento control (0,576 %).

Del total de ácidos grasos de la serie n-6 se observa una tendencia a la significación ($p<0,097$), siendo superior el porcentaje en el caso del aceite de soja (5,23 %) comparado al aceite de linaza (4,29 %).

La relación n-6/n-3 presenta diferencias significativas ($p<0,0001$) entre los tratamientos, presentando el mayor valor el tratamiento control (7,71 %), seguido del tratamiento soja (6,45 %) y por último el tratamiento linaza (3,10 %).

La grasa de la leche de los animales que no consumieron aceite en la ración presentó una tendencia ($P=0,07$) a un mayor contenido en ácidos grasos de cadena corta y media (C4 a C16) y un menor contenido en los de cadena larga ($>C18$) que la de los que consumieron soja o linaza (52,80 %, 48,90 % y 46,75 % para los de cadena corta y

media y 47,19 %, 51,09 % y 53,25 % para los de cadena larga en los tratamientos control, soja y linaza, respectivamente).

El Índice desaturasa se calculó como un posible indicador de la actividad de la Δ^9 desaturasa a partir de la relación entre el ácido graso correspondiente y la suma de ese ácido graso y su precursor (Kelsey y col., 2003). El Índice de aterogenicidad, se calculó a partir de la propuesta de Ulbricht y Southgate, (1991) como: $(12:0+4\times C14:0+C16:0)/(MUFA+PUFA)$. No se observaron diferencias estadísticamente significativas ($P>0,1$) en ninguno de los índices calculados.

5.2. PRUEBA EXPERIMENTAL 2: Parámetros productivos y composición de la leche en media lactación, y parámetros reproductivos

5.2.1. Parámetros productivos en media lactación

En la Tabla 5.3. aparecen reflejados los valores medios del consumo diario de materia seca (calculado a partir del consumo del lote), la producción de leche y la producción de leche corregida al 4 % de grasa, así como los porcentajes y cantidades (kg/día) de grasa, proteína y lactosa durante las tres últimas semanas del periodo experimental (semanas 30, 31 y 32 de lactación). Para todos los valores mencionados aparecen en la tabla los niveles de significación existente entre los tratamientos.

Como se puede observar, la suplementación con aceites vegetales o el tipo de aceite empleado no afectó ($P>0,1$) la ingestión de materia seca (kg/día), la producción de leche (kg/día), la producción de leche corregida al 4 % de grasa, el porcentaje de lactosa, ni las cantidades (kg/día) de proteína y lactosa.

Tabla 5.3: Producción y composición de la leche en los diferentes tratamientos experimentales en media lactación (medias corregidas por mínimos cuadrados, *least square means*).

	Tratamientos experimentales			SEM ¹	Nivel sig.
	Control	Soja	Linaza		
Materia seca ingerida del lote (Kg./día)	23,86	23,41	24,18	1,168	0,965
Producción leche (Kg./día) semana 30 a 32	30,18	32,40	31,48	1,492	0,587
PL corregida ² (Kg./día) semana 30 a 32	28,08	26,16	25,84	1,514	0,556
Grasa (%)	3,41 ^a	2,65 ^b	2,99 ^b	0,167	0,011
Grasa (Kg./día)	1,06 ^a	0,878 ^b	0,886 ^b	0,068	0,098
Proteína (%)	3,33 ^a	3,09 ^b	3,16 ^b	0,062	0,022
Proteína (g/día)	0,976	1,00	0,984	0,061	0,921
Lactosa (%)	4,78	4,68	4,70	0,048	0,324
Lactosa (Kg./día)	1,685	1,505	1,503	0,097	0,440

¹SEM: Error estándar de la media corregida por mínimos cuadrados

² Producción de leche corregida al 4% de grasa = (0,4 x Kg. de leche) + (15 x Kg. de grasa) (Gaines, 1927)

^{a, b} Superíndices distintos en la misma fila indican diferencias significativas ($P<0,05$).

La leche de los animales que consumieron aceite en la ración (soja o linaza) presentó un menor porcentaje ($P<0,05$) y una tendencia a una menor ($P=0,098$) cantidad (kg/día) de grasa que los del grupo control (sin aceite en la ración). Los valores observados en el porcentaje de grasa fueron 3, 41% frente a 2,65% y 2,99%, y en la

cantidad de grasa 1,06 (kg/día) frente a 0,88 (kg/día) y 0,89 (kg/día) para los tratamientos control, soja y linaza, respectivamente.

Para el porcentaje de proteína láctea producido existe diferencias significativas ($P < 0,05$) entre el tratamiento control (3,33 %) comparado con los tratamientos soja (3,09 %) o linaza (3,16 %).

5.2.2. Composición de ácidos grasos de la leche en media lactación

En la Tabla 5.4. se presenta la composición en ácidos grasos (g/100 g del total de ácidos grasos) de la grasa de la leche en los diferentes tratamientos experimentales obtenidos durante las tres últimas semanas del periodo experimental (semanas 30, 31 y 32 de lactación). Para todos los valores mencionados aparecen en la tabla los niveles de significación existente entre los tratamientos.

Los ácidos grasos mayoritarios en los tratamientos control, soja y linaza fueron el ácido palmítico (C16:0) (41,64%, 34,83% y 34,53%) y oleico (C18:1 *cis*-9) (20,06 %, 26,24% y 23,20%), seguidos de los ácidos mirístico (C14:0) (13,65 %, 13,33 % y 12,89%) y esteárico (C18:0) (7,26 %, 8,98 % y 9,80 %).

La grasa de la leche de los animales que no consumieron aceite (control) presentó un mayor contenido en C4:0, C12:0, C14:1, C16:1 ($P < 0,05$) y C16:0 ($P < 0,0001$) que la de los que consumieron aceite de soja o de linaza. En el caso de los ácidos C4:0, C16:0 y C16:1, no se observaron diferencias según el tipo de aceite utilizado (soja o linaza), mientras que el contenido en C12:0 fue mayor y el de C14:1 menor en los animales que consumieron aceite de linaza frente a los que consumieron soja. Los valores observados fueron para el C4:0 de 1,22 %, 0,94 % y 1,05; para el C12:0 de 3,99 %, 2,76 % y 3,62 %; para el C14:1 de 1,69 %, 1,59 % y 1,39 %; para el C16:0 de 41,64 %, 34,86 % y 34,53 % y para el C16:1 de 2,83 %, 2,34 % y 2,12 %, en los tratamientos control, soja y linaza, respectivamente.

La grasa de la leche de los animales que no consumieron aceite (control) presentó un menor ($P < 0,005$) contenido en ácido esteárico (C18:0) que la de los que consumieron aceite de soja o de linaza (7,26 % frente a 8,98 % y 9,80%).

El contenido en ácido vaccénico (C18:1 *trans*-11) presentó diferencias significativas ($P < 0,0001$) entre los tratamientos, obteniendo el tratamiento con aceite de linaza el mayor valor (3,45 %), seguido del tratamiento con aceite de soja (1,80 %) y por último el tratamiento control (1,55 %).

Tabla 5.4.: Composición en ácidos grasos (g/100 g del total de ácidos grasos) de la grasa de la leche en los diferentes tratamientos experimentales en media lactación (medias corregidas por mínimos cuadrados, *least square means*).

	Tratamientos experimentales			SEM ¹	Nivel sig.
	Control	Soja	Linaza		
C4:0	1,22 ^a	0,942 ^b	1,05 ^b	0,049	0,002
C8:0	0,085	0,177	0,074	0,0441	0,222
C12:0	3,99 ^a	2,76 ^c	3,62 ^b	0,331	0,039
C14:0	13,65	13,33	12,89	0,528	0,611
C14:1	1,69 ^a	1,59 ^b	1,39 ^c	0,068	0,019
C16:0	41,64 ^a	34,86 ^b	34,53 ^b	0,383	<0,0001
C16:1	2,83 ^a	2,343 ^b	2,12 ^b	0,172	0,023
C18:0	7,26 ^b	8,98 ^a	9,80 ^a	0,467	0,002
C18:1 <i>trans</i> -11 (Ácido Vaccénico)	1,55 ^c	1,80 ^b	3,45 ^a	0,230	<0,0001
C18:1 <i>cis</i> -9	20,06 ^c	26,24 ^a	23,20 ^b	0,933	0,004
C18:2 <i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12 <i>n</i> -6	3,99 ^c	5,01 ^a	4,51 ^b	0,118	<0,0001
C18:2 <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 CLA	0,58 ^c	0,82 ^b	1,30 ^a	0,083	<0,0001
C18:2 <i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12 CLA	0,064 ^c	0,128 ^a	0,088 ^b	0,0102	<0,0001
C18:3 <i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12, <i>cis</i> -15 <i>n</i> -3	0,640 ^c	0,653 ^b	1,11 ^a	0,048	<0,0001
C20:4 <i>n</i> -6 (Araquidónico)	0,239 ^a	0,164 ^b	0,170 ^b	0,0271	0,090
C20:5 <i>n</i> -3 (EPA)	0,138	0,160	0,167	0,0160	0,208
Insaturados	31,86 ^b	39,07 ^a	37,59 ^a	0,949	<0,0001
Saturados	67,84 ^a	60,75 ^b	62,02 ^b	0,951	<0,0001
Monoinsaturados	26,14 ^b	32,01 ^a	30,17 ^a	0,859	<0,001
Poliinsaturados	5,72 ^b	7,01 ^a	7,40 ^a	0,201	<0,0001
Poliinsaturados/saturados	0,085 ^b	0,116 ^a	0,121 ^a	0,0043	<0,0001
Total <i>n</i> -3	0,845 ^c	0,891 ^b	1,34 ^a	0,051	<0,0001
Total <i>n</i> -6	4,23 ^c	5,17 ^a	4,67 ^b	0,118	<0,0001
<i>n</i> 6/ <i>n</i> 3	5,34 ^{ab}	6,04 ^a	3,63 ^b	0,266	<0,0001
AG cadena corta y media (C4 a C16)	65,10 ^a	55,76 ^b	55,77 ^b		<0,0001
AG cadena larga (\geq C18)	34,60 ^b	44,07 ^a	43,83 ^a	1,021	<0,0001
Índice Desaturasa ²					
C14:1/(C14:0+C14:1)	0,134	0,108	0,119	0,0201	0,425
C16:1/(C16:0+C16:1)	0,063	0,063	0,058	0,0040	0,567
C18:1/(C18:0+C18:1)	0,716	0,741	0,706	0,0212	0,509
C18:2 <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11/(C18:1 <i>trans</i> -11+ C18:2 <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11)	0,289 ^{ab}	0,393 ^a	0,268 ^b	0,0331	0,028
Índice de aterogenicidad ³	3,29 ^a	2,38 ^b	2,42 ^b	0,163	<0,0001

¹SEM: Error estándar de la media corregida por mínimos cuadrados

²(Kelsey y col., 2003).

³(C12:0+4×C14:0+C16:0)/(MUFA+PUFA) (Ulbricht y Southgate, 1991).

^{a, b} Superíndices distintos en la misma fila indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

La incorporación de aceite, así como el tipo de aceite utilizado afectaron de forma estadísticamente significativa ($P < 0,05$) el contenido en ácido oleico (C18:0 *cis*-9) y linoleico (C18:2 *cis*-9, *cis*-12) de la leche. Los animales alimentados con aceite de soja presentaron el valor más alto, seguidos por los que consumieron aceite de linaza y por último los que no consumieron aceite en la ración. Los valores observados para el ácido oleico (C18:0 *cis*-9) fueron de 20,06 %, 26,24 % y 23,20 % y para el linoleico (C18:2 *cis*-9, *cis*-12) de 3,99 %, 5,01 % y 4,51 %, en los tratamientos control, soja y linaza, respectivamente.

La grasa de la leche de los animales que consumieron aceite presentó un mayor contenido en los dos isómeros estudiados del ácido linoleico (C18:2 *cis*-9, *trans*-11 CLA ($P < 0,0001$) y C18:2 *trans*-10, *cis* 12 CLA ($P < 0,001$)). En cuanto al tipo de aceite incorporado, la grasa de los animales que consumieron aceite de linaza presentó un mayor contenido en C18:2 *cis*-9, *trans*-11 CLA (ácido ruménico), pero un menor contenido en C18:2 *trans*-10, *cis* 12 CLA que los que consumieron aceite de soja ($P < 0,05$).

El contenido de ácido linolénico (C18:3 *cis*-9, *cis*-12, *cis*-15) presentó diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,0001$) entre tratamientos, el valor más alto se observó en los animales alimentados con aceite de linaza (1,111 %), seguido de los animales alimentados con aceite de soja (0,653 %) y por último los animales con el tratamiento control (0,639 %).

En la grasa de la leche de los animales que consumieron aceite se observó una tendencia ($P = 0,09$) a un menor contenido en ácido araquidónico en relación a los animales del grupo control (0,24 % en la del grupo control, frente a 0,16 % y 0,17% en la de los grupos soja y linaza, respectivamente)

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el contenido en C20:5n-3 (EPA) ($P > 0,05$).

La grasa de la leche de los animales que consumieron aceite (soja o linaza) presentó un mayor contenido en el total de ácidos grasos insaturados ($P < 0,0001$),

monoinsaturados (MUFA) ($P < 0,001$) y poliinsaturados (PUFA) ($P < 0,0001$) que la de los que no consumieron aceite en la ración (grupo control).

El total de ácidos grasos insaturados de los tratamientos soja y linaza fue de un 39,07 % y 37,59 % frente a un 31,86 % que presentaron los del grupo control. El contenido en MUFA y PUFA fue respectivamente de un 32,01 % y 7,01 % en el tratamiento con soja y de un 30,17 % y 7,40 % en el de linaza, frente a un 26,14 % y 5,72 % que presentaron los del grupo control.

Como consecuencia, la relación poliinsaturados/saturados fue significativamente más alta ($P < 0,0001$) en la leche de los animales que consumieron soja o linaza en relación a la del grupo control (0,116 y 0,121 frente a 0,085)

El total de ácidos grasos de la serie $n-3$ presentes en la leche aumentó de forma estadísticamente significativa ($P < 0,0001$) al aumentar el grado de insaturación de la grasa incorporada en la ración. Así el contenido más bajo se observa en la ración control (0,845 %), seguido por la soja (0,891 %) y por último la linaza (1,34%).

En el total de ácidos grasos de la serie $n-6$ también se encuentran diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0,0001$) presentando valor más alto el aceite de soja (5,17 %), seguido del aceite de linaza (4,67 %), y por último el tratamiento control (4,23 %).

En la relación $n-6/n-3$ se encontraron diferencias significativas ($P < 0,0001$) entre los tratamientos soja (6,04) y linaza (3,63).

La grasa de la leche de los animales que recibieron aceite en la ración (soja o linaza) presentó ($P < 0,0001$) un menor contenido en ácidos grasos de cadena corta y media (C14 a C16) y mayor de los de cadena larga ($\geq C18$) que la de los animales que no consumieron aceite (grupo control).

El índice desaturasa $C18:2 \text{ cis-9, trans-11} / (C18:1 \text{ trans-11} + C18:2 \text{ cis-9, trans-11})$ presentó diferencias significativas ($P = 0,028$) entre el tratamiento con aceite de soja (0,393) y el tratamiento con aceite de linaza (0,268).

El Índice de aterogenicidad presentó diferencias significativas ($P < 0,0001$) entre el tratamiento control (3,295) comparado con los tratamientos con aceite de soja, (2,38) y linaza (2,42), sin diferencias entre estos dos últimos.

5.2.3. Parámetros reproductivos

La tabla 5.5 muestra la producción de leche al pico (producción más alta a lo largo de la lactación), los días en leche al pico de producción y la variación de peso (kg/día) entre la primera y la cuarta y entre la cuarta y la octava semana post parto.

Los animales que consumieron la ración con aceite de linaza produjeron mayor cantidad de leche al pico ($P < 0,0001$) y tardaron menos días en alcanzarlo ($P < 0,05$) que los del grupo control o los que consumieron aceite de soja (44,04 kg/día frente a 38,99 kg/día y 39,25 kg/día para la producción al pico).

En la variación de peso no se encontraron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre los tratamientos para cualquiera de los dos periodos estudiados.

Tabla 5.5: Producción, días a los que se alcanza el pico de producción y variaciones de peso en los diferentes tratamientos experimentales (medias corregidas por mínimos cuadrados, *least square means*, excepto días al pico de producción que se presentan las medianas).

	Tratamientos experimentales			SEM ¹	Nivel sig.
	Control	Soja	Linaza		
Producción al pico (Kg./día)	38,99 ^b	39,25 ^b	44,04 ^a	0,183	<0,0001
Días al pico ²	78,0 ^a (70)	71,0 ^a (63)	57,0 ^b (42)		0,036
Variación peso (Kg./día) semana 1 ^a a la 4 ^a	-2,88	-2,89	-3,64	0,388	0,616
Variación peso (Kg./día) semana 4 ^a a la 8 ^a	-0,52	-0,177	-0,068	0,212	0,732

¹SEM: Error estándar de la media corregida por mínimos cuadrados

² Medianas (Rango intercuartílico)

^{a, b} Superíndices distintos en la misma fila indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

En la tabla 5.6. se presentan los valores medios en la concentración plasmática de betahidroxibutirato (BHBA), factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF-1), insulina, ácidos grasos no esterificados (NEFA) y progesterona, obtenidos en los distintos tratamientos experimentales. Para todos los valores mencionados, aparecen en la tabla los niveles de significación para el tratamiento experimental, el tiempo y la

interacción entre ambos factores. Así mismo, las figuras 5.1, 5.2, 5.3, 5.4 y 5.5, muestran, respectivamente, la evolución de la concentración de BHBA, IGF-1, insulina, NEFA y progesterona, entre los 21, los 10 días antes de la inseminación artificial (IA), y en el momento de la inseminación artificial (IA), que se corresponden con los 46, 57 y 67 días post parto (dpp).

En todos los parámetros estudiados se observó un efecto estadísticamente significativo del tiempo, y exceptuando la concentración de insulina, no se observó efecto significativo de la interacción entre ambos factores.

La concentración plasmática media (mmol/l) de betahidroxibutirato (BHBA) fue significativamente mayor ($P=0,053$) para el tratamiento con aceite de linaza (0,505), respecto al tratamiento con aceite de soja (0,442), aunque no se observaron diferencias entre el tratamiento control y los tratamientos con aceites.

Tabla 5.6: Parámetros sanguíneos en los diferentes tratamientos experimentales (medias corregidas por mínimos cuadrados, *least square means*).

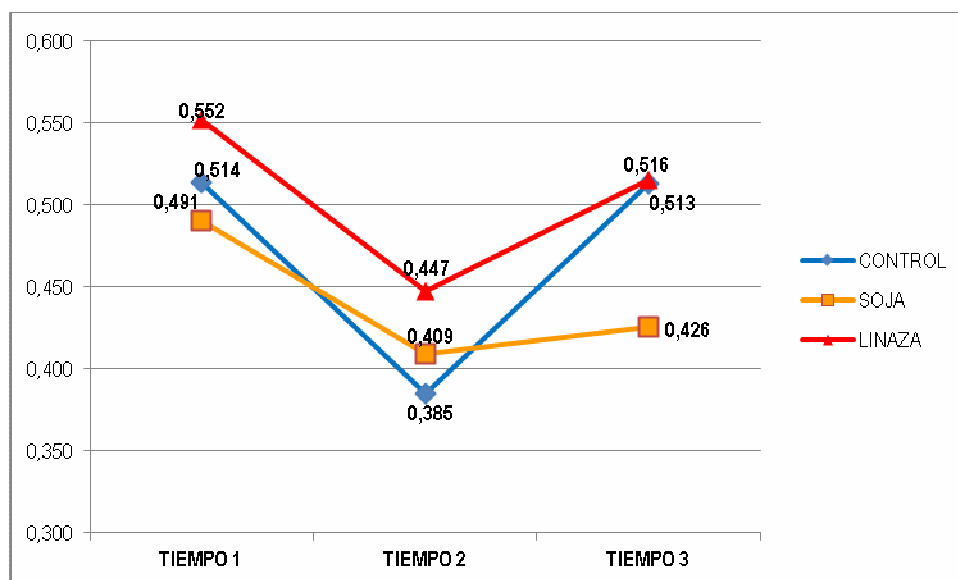
	Tratamientos experimentales				Nivel significación ¹		
	Control	Soja	Linaza	SEM ²	TE	T	TE*T
BHBA (mmol/l)	0,471 ^{ab}	0,442 ^b	0,505 ^a	0,016	0,053	<0,0001	0,232
IGF-1 (ng/ml)	162,71 ^a	157,63 ^b	129,41 ^c	7,745	0,01	0,0072	0,489
Insulina (µg/l)	0,688	0,683	0,557	0,058	0,243	0,0005	0,039
NEFA (mmol/l)	0,340	0,378	0,363	0,024	0,561	<0,0001	0,321
Progesterona (ng/ml)	4,572 ^a	2,876 ^b	3,613 ^b	0,550	0,09	<0,0001	0,104

¹ TE: efecto del tratamiento experimental (tipo de aceite), T: efecto del tiempo, TE*T: efecto de la interacción entre ambos factores

²SEM: Error estándar de la media corregida por mínimos cuadrados

^{a, b} Superíndices distintos en la misma fila indican diferencias significativas ($P<0,05$).

Figura 5.1. Evolución de la concentración plasmática de betahidroxibutirato (BHBA) (mmol/l), entre los 21 y 10 días antes de la IA y en el momento de la IA (46, 57 y 67 días post parto) para los tratamientos control, soja y linaza.



Tiempo 1: 21 días antes de la inseminación artificial (46 dpp)

Tiempo 2: 10 días antes de la inseminación artificial (57 dpp)

Tiempo 3: momento de la inseminación artificial (67 dpp)

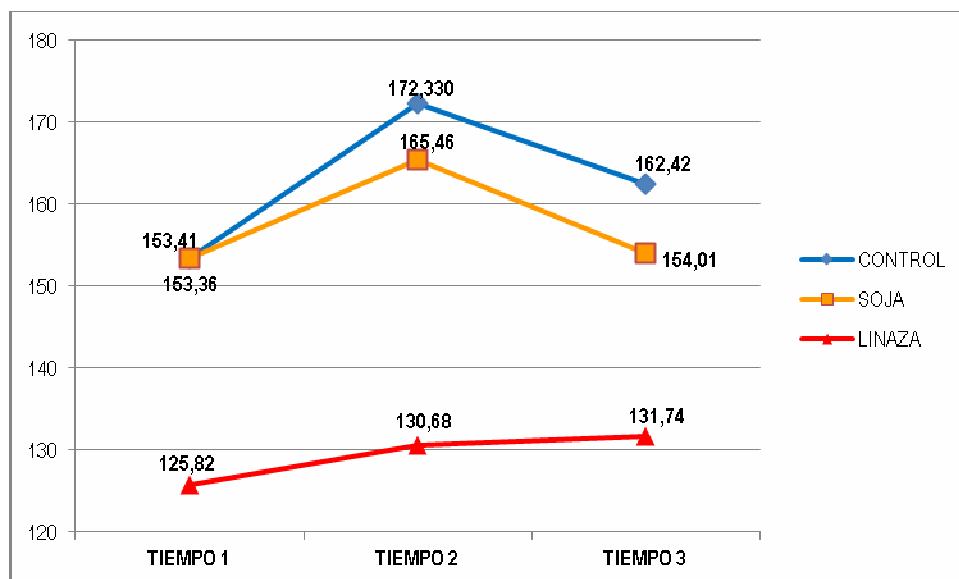
Cuando se analizó la evolución de la concentración de BHBA desde los 21, 10 días antes de la IA y el momento de la inseminación artificial, (figura 5.1) observamos un descenso en su concentración plasmática 10 días antes de la IA y un aumento en el momento de la IA, en los tres tratamientos experimentales.

La concentración media del factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF-1), fue significativamente diferente ($P=0,010$) en los tres tratamientos experimentales, siendo el valor más alto en las vacas que consumieron la ración control (162,71 ng/ml), seguido por la ración con soja (157,63 ng/ml), y por último la de linaza (129,41 ng/ml).

La concentración de IGF-1 (figura 5.2.) sigue la misma evolución en los tratamientos control y soja. Se observa, un incremento entre los 21 y 10 días antes de la IA (comienzo de la fase lútea) para a continuación disminuir en el momento de la IA (final de la fase lútea). En el tratamiento linaza la concentración de IGF-1 en este

periodo aumenta continuamente, aunque las medidas son inferiores a los tratamientos control y soja.

Figura 5.2. Evolución de la concentración plasmática del factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF-1) (ng/ml), entre los 21 y 10 días antes de la IA y en el momento de la IA (46, 57 y 67 días post parto) para los tratamientos control, soja y linaza.



Tiempo 1: 21 días antes de la inseminación artificial (46 dpp)

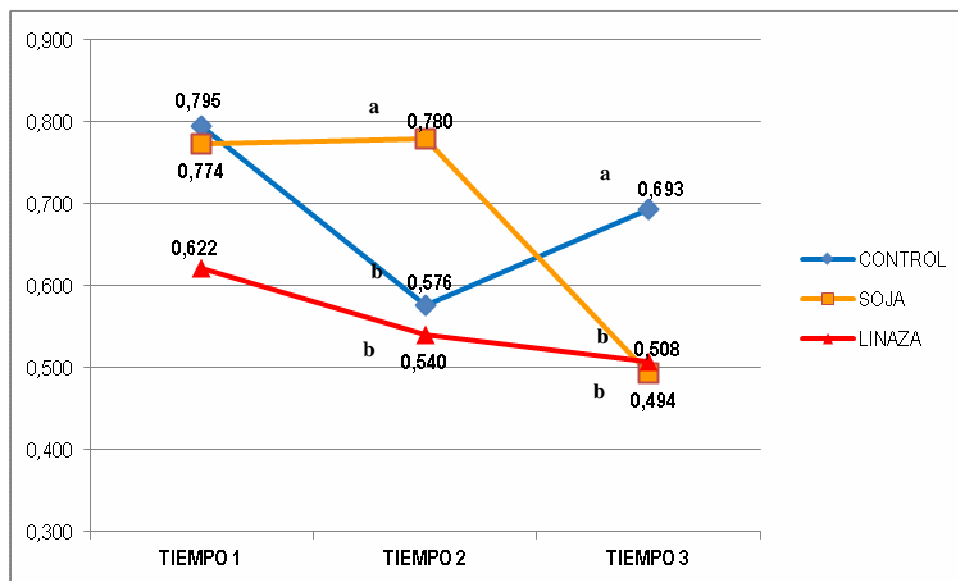
Tiempo 2: 10 días antes de la inseminación artificial (57 dpp)

Tiempo 3: momento de la inseminación artificial (67 dpp)

La concentración de insulina presentó un efecto estadísticamente significativo ($P=0,039$) de la interacción entre el tiempo y el tratamiento, de manera que la concentración de insulina evoluciona de forma diferente en los distintos tratamientos experimentales. Así en la figura 5.3 se puede observar que 21 días antes de la IA la concentración de insulina en los animales del tratamiento con linaza ($0,62 \mu\text{g/l}$) es inferior a la de los tratamientos control y soja ($0,795 \mu\text{g/l}$ y $0,774 \mu\text{g/l}$, respectivamente). 10 días antes de la IA la concentración plasmática de insulina disminuyó en los tratamientos control y aceite de linaza ($0,576 \mu\text{g/l}$ y $0,540 \mu\text{g/l}$, respectivamente), manteniéndose constante para el aceite de soja ($0,780 \mu\text{g/l}$). En el momento de la IA, las vacas que recibieron los tratamientos con aceites presentaron una disminución en la concentración plasmática de insulina ($0,494 \mu\text{g/l}$ para el aceite de soja

y 0,508 $\mu\text{g/l}$ para el aceite de linaza), mientras que en las que consumieron la ración control (0,692 $\mu\text{g/l}$), la concentración de insulina aumentó (figura 5.3).

Figura 5.3. Evolución de la concentración plasmática de insulina ($\mu\text{g/l}$), entre los 21 y 10 días antes de la IA y en el momento de la IA (46, 57 y 67 días post parto) para los tratamientos control, soja y linaza.



Tiempo 1: 21 días antes de la inseminación artificial (46 dpp)

Tiempo 2: 10 días antes de la inseminación artificial (57 dpp)

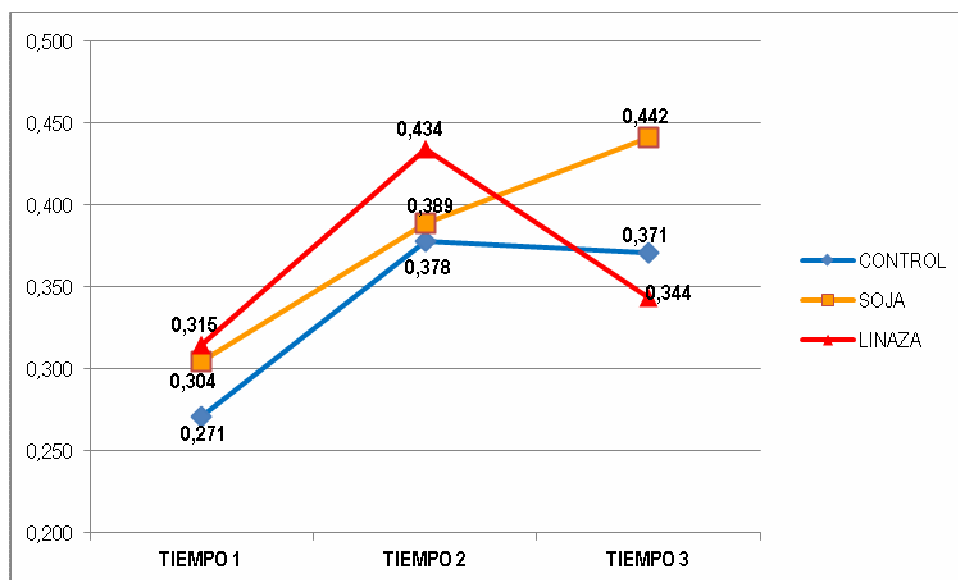
Tiempo 3: momento de la inseminación artificial (67 dpp)

^{a, b} Superíndices distintos en el mismo tiempo indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

La concentración plasmática de ácidos grasos no esterificados (NEFA) (mmol/l), no presentó diferencias significativas entre tratamientos ($P > 0,05$).

La evolución en la concentración plasmática de NEFA se puede observar en la figura 5.4. Entre los 21 y 10 días antes de la IA (comienzo de la fase lútea) aumentó la concentración plasmática en los tres tratamientos. En el momento de la IA las mayores concentraciones en NEFA fueron las del tratamiento aceite de soja (0,441 mmol/l) frente a los tratamientos control y aceite de linaza (0,371 y 0,343 mmol/l).

Figura 5.4. Evolución de la concentración plasmática de ácidos grasos no esterificados (NEFA) (mmol/l), entre los 21 y 10 días antes de la IA y en el momento de la IA (46, 57 y 67 días post parto) para los tratamientos control, soja y linaza.



Tiempo 1: 21 días antes de la inseminación artificial (46 dpp)

Tiempo 2: 10 días antes de la inseminación artificial (57 dpp)

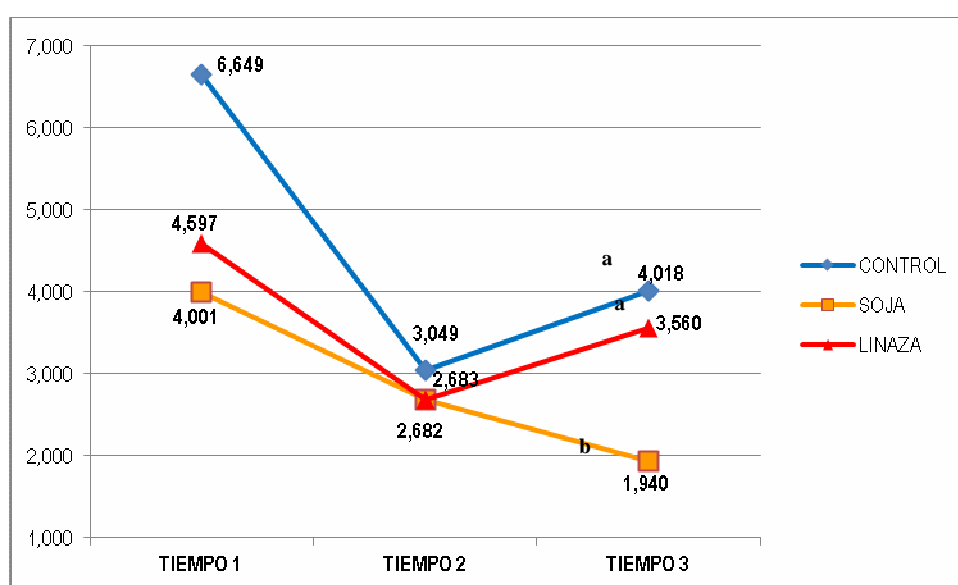
Tiempo 3: momento de la inseminación artificial (67 dpp)

La concentración plasmática de progesterona fue significativamente menor para los tratamientos con aceite de soja (2,876 ng/ml) y linaza (3,613 ng/ml) frente al tratamiento control (4,572 ng/ml) (tabla 5.6).

La figura 5.5 muestra la evolución en la concentración de progesterona. En los tres tratamientos experimentales la concentración de progesterona disminuye entre los 21 y 10 días antes de la IA. Sin embargo, en el momento de la IA, la concentración de progesterona aumenta en los tratamientos control y aceite de linaza, mientras que en el de soja disminuye. Los valores registrados 21 días antes de la inseminación fueron: 6,65 ng/ml, 4,00 ng/ml y 4,60 ng/ml en los tratamientos control, soja y linaza, respectivamente, y en el momento de la IA: 4,02 ng/ml, 1,94 ng/ml y 3,56 ng/ml en los tratamientos control, soja y linaza, respectivamente.

En la Tabla 5.7 se presentan los índices reproductivos de los diferentes tratamientos experimentales. Los valores se presentan como mediana con su correspondiente rango intercuartílico. Además, aparecen en la tabla los niveles de significación existente entre los tratamientos.

Figura 5.5. Evolución de la concentración plasmática de progesterona (ng/ml), entre los 21 y 10 días antes de la IA y en el momento de la IA (46, 57 y 67 días post parto) para los tratamientos control, soja y linaza.



Tiempo 1: 21 días antes de la inseminación artificial (46 dpp)

Tiempo 2: 10 días antes de la inseminación artificial (57 dpp)

Tiempo 3: momento de la inseminación artificial (67 dpp)

^{a, b} Superíndices distintos en el mismo tiempo indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

Tabla 5.7. Índices reproductivos en los diferentes tratamientos experimentales (mediana y rango intercuartílico).

	Tratamientos experimentales			Nivel sig.
	Control	Soja	Linaza	
Fertilidad a 1ª Inseminación ¹	2 ^a (2)	1 ^b (2)	1 ^b (2)	0,003
Días abiertos	123,5 ^a (132,0)	99,5 ^{ab} (119,0)	75,0 ^b (101,0)	0,020
Días a primera inseminación	68,00 ^a	57,44 ^{ab}	49,19 ^b	0,021
Porcentaje de detección de celos	46,00(25)	37,00(26)	40,00(25)	0,470
Porcentaje de vacas gestantes ²	56,25	48,80	43,80	0,269

¹ 1 significa animales preñados en la 1ª IA y 2 preñados en 2 o más IA. ², test Chi-Cuadrado. ^{a, b} Superíndices distintos en la misma fila indican diferencias significativas (P<0,05).

En la fertilidad a la primera inseminación, se observaron diferencias significativas (P=0,003) entre los tratamientos, presentando mejor fertilidad las vacas que consumieron aceites poliinsaturados en la ración, sin diferencias según el tipo de aceite empleado.

Los días abiertos fueron significativamente superiores (P=0,02) en el tratamiento control (123,5 días), cuando los comparamos con el de tratamiento aceite de linaza (75,0 días).

Los días a los que se insemina por primera vez a los animales, fueron significativamente superiores (P<0,021) en el tratamiento control (68 días) respecto al tratamiento linaza (49,19 días).

No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos en el porcentaje de detección de celos ni en el de porcentaje de vacas gestantes.

6. Discusión

6.1. Incorporación de aceites vegetales insaturados en raciones de vacas lecheras: Efectos sobre los parámetros productivos

Generalmente, el consumo de elevadas cantidades de aceites vegetales, se asocia con efectos negativos en la digestión ruminal, particularmente en la digestibilidad de los hidratos de carbono estructurales (Jenkins, 1994), lo que en el caso del vacuno lechero se traduciría en un menor consumo de materia seca y una reducción en la producción de leche (Chilliard y col, 2001a, Rego y col, 2005, Chilliard y col, 2009).

En nuestro estudio, a pesar del mayor consumo de grasa en las raciones con soja o linaza, no se observan diferencias estadísticamente significativas ($P > 0,05$) en el consumo de materia seca ni en la producción de leche de las vacas al inicio (prueba experimental 1) o media lactación (prueba experimental 2), lo que sugiere que el aceite de soja o linaza incorporados al 1,5% de la MF de la ración, en forma libre, no influyó negativamente sobre el consumo de alimento.

La bibliografía consultada muestra numerosos estudios que coinciden con nuestros resultados, donde tampoco se observan diferencias significativas en el consumo de materia seca ni en la producción de leche al incluir aceites vegetales insaturados, incluso con niveles de aceite en forma libre muy superiores a los empleados por nosotros.

Así, Dhiman y col., (2000), suministrando un 4 % de aceite de soja y un 1% de linaza, Loor y col., (2005), suplementando la ración con un 3% de aceite linaza, Zheng y col., (2005), incluyendo un 2% de aceites vegetales con distinto grado de saturación, Alzahal y col., (2008), con un 3,4 % de aceite de soja, Huang y col., (2008), con un 5% de aceite de soja, Flowers y col., (2008), con vacas en pastoreo, suplementado con distintas cantidades de aceite de linaza en el concentrado (hasta un 7%) y AbuGhazaleh (2008), también en pastoreo con aceite de pescado y girasol (5%), no observan diferencias en el consumo de materia seca ni en la producción de leche. Bu y col., (2007), suministrando un 4% de aceite de soja o linaza en forma libre no observan diferencias significativas en el consumo de MS, pero registra un aumento en la producción de leche. Sin embargo, en este estudio, a diferencia de los mencionados

anteriormente y de nuestro trabajo, las raciones con aceite presentaban un mayor contenido en ENI, lo que supone un mayor consumo de energía y justificaría la mayor producción de leche observada.

A pesar de que son comúnmente aceptados los efectos negativos de la incorporación de aceites sobre la digestión ruminal, los datos que aparecen en la literatura son contradictorios. En ocasiones se observa un efecto negativo (Ikwuegbu y Sutton, 1982; Sutton y col., 1983); numerosos trabajos no muestran ningún efecto (Ohajuruka y col., 1991, Pantoja y col., 1996, Weiss y Wyatt, 2004, Kim y col., 2008, Atkinson y col., 2009, Dschaak y col., 2011), mientras que otros indican un efecto positivo al suplementar con aceites tan insaturados como el aceite de pescado (Doreau y Chilliard, 1997) o de linaza (Ueda y col., 2003). Palmquist (1988), indica que la relación forraje:concentrado (F:C) parece influir en la respuesta a la suplementación con aceite. Ueda y col., (2003), en un estudio en vacas lecheras sobre los efectos de la suplementación con aceite de linaza (0 % y 3%) en raciones con alto contenido en forraje (F:C, 65:35) o alto contenido en concentrado (F:C, 35:65) sobre la digestión ruminal, observan una interacción significativa entre el efecto del aceite y la relación forraje:concentrado de la ración, de manera que el efecto de la suplementación con aceite de linaza sobre la digestión ruminal de la fibra pasa de ser positiva en las raciones con alto contenido en forraje, a negativa cuando las raciones contiene una alta proporción de concentrado o almidón. Con las raciones ricas en forraje aumenta la digestibilidad, tanto en la totalidad del aparato digestivo, como la ruminal. Sin embargo, con las raciones altas en concentrado, a pesar de la disminución observada en la digestión de la fibra a nivel ruminal, se produce también un aumento en la digestibilidad total. Concluyen que cuando las raciones contienen elevadas cantidades de concentrado, la digestión en el intestino compensa la reducción observada en la digestión de la fibra a nivel ruminal. Ikwuegbu y Sutton (1982), Sutton y col., (1983), y Faichney y col., (2002), también observan que la digestión en el intestino compensa parcialmente el efecto negativo de la suplementación con lípidos insaturados sobre la digestión ruminal. Además, Ikwuegbu y Sutton (1982), en su estudio, establecen que la compensación fue completa cuando el aceite de linaza se incorporó al 2,2 % pero no al 6,6%. En nuestro

caso, los niveles de aceite incorporados (1,5% de la MF) y la relación forraje concentrado empleada (40:60) pueden haber minimizado los efectos de la grasa sobre la digestión ruminal, y como consecuencia no se reduce el consumo ni la producción de leche. Cuando la producción de leche se corrige para el 4% de grasa se observa una reducción en los tratamientos con aceite debido a la disminución en el contenido en grasa en estos tratamientos.

La suplementación con aceites ricos en PUFA dio lugar a una reducción estadísticamente significativa ($P < 0,05$) en el contenido (%) y cantidad (kg/día) de grasa de la leche, tanto en inicio como en media lactación. No se observaron diferencias según el aceite incorporado (soja o linaza). Generalmente el contenido en grasa de la leche disminuye cuando se incorporan a las raciones aceites poliinsaturados en forma libre (Dhiman y col., 1999, Bell y col., 2006, Whitlock y col., 2006, Shingfield y col., 2006, Bu y col., 2007, Huang y col., 2008, Murphy y col., 2008). La reducción observada en el contenido en grasa es de un 34,7% para la soja y 24.5 % para la linaza en relación al grupo control en inicio de lactación (experimento 1) y de un 22% y 12% para la soja y linaza, respectivamente, en relación al grupo control, en media lactación (experimento 2). Esta reducción es considerable si se tiene en cuenta que la cantidad de aceite incorporado no parece ser suficiente como para alterar de forma importante la fermentación ruminal. Trabajos previos indican que para obtener una reducción significativa en la síntesis de grasa de la leche al suplementar con aceites, es necesario que las raciones provoquen alteraciones en la fermentación ruminal (Griinari y col., 1998). Sin embargo, el porcentaje y la cantidad de grasa de la leche dependen del balance entre la transferencia de ácidos grasos exógenos a la glándula mamaria y de la síntesis de *novo*. La suplementación con grasas disminuye la síntesis de *novo* en la glándula mamaria. Esta disminución puede ser por una reducción en la síntesis de acetato y butirato a nivel ruminal o por el efecto inhibitorio de determinados ácidos grasos sobre las enzimas lipogénicas en la glándula mamaria (Palmquist, 1984, Chilliard, 1993, Chilliard y col., 2007, Harvatine y col., 2009). Además, este efecto es mayor cuanto más insaturadas son las grasas, ya que estos compuestos se originan como productos intermediarios en la biohidrogenación de los ácidos grasos poliinsaturados, en

determinadas condiciones de fermentación ruminal (Bauman y col., 2008). En nuestro caso, podría haber ocurrido una menor lipogénesis en la glándula mamaria como resultado de incorporar aceites poliinsaturados, lo que coincide con los cambios que observamos en el perfil de ácidos grasos de la leche, particularmente el incremento en el contenido en C18:2 *trans-10 cis-12* CLA observado en las raciones con aceite de soja y de linaza, tanto en inicio (tabla 5.2) como media (tabla 5.4) lactación. Brent y col., (2008), indican que el C18:2 *trans-10 cis-12* CLA y el ácido α -linolénico disminuyen la actividad de la enzima *diacilglicerol aciltransferasa* en las células epiteliales de la glándula mamaria en el ganado vacuno, pero señalan que los mecanismos por los que se produce no están suficientemente establecidos. Otros estudios recientes (Bauman y col., 2008) también señalan al C18:2 *trans-10 cis 12* CLA como un potente inhibidor de la síntesis de grasa láctea en el ganado vacuno, que afecta a ácidos grasos de todas las longitudes de cadena, lo que implica rutas bioquímicas asociadas tanto con la síntesis *de novo* como las que utilizan ácidos grasos preformados. Debido a que casi todos los C4-C14 y aproximadamente la mitad de los C16 son sintetizados *de novo* en las células epiteliales de la glándula mamaria, la reducción en la grasa láctea observada en las raciones suplementadas con aceites, se podría relacionar con la inhibición de la síntesis *de novo*, lo que coincide con la disminución observada en el contenido en AG de cadena corta y media en las raciones con aceite (tablas 5.2 y 5.4), que se discutirá posteriormente.

Aunque presumiblemente, los principales inhibidores de la síntesis *de novo* proceden de la biohidrogenación ruminal del C18:2 n-6 (*trans-10, cis-12* y *trans-9 cis-12*) estudios recientes indican que aceites ricos en C18:3 n-3, suministrados en forma libre pueden también producir isómeros *trans* inhibidores de la síntesis *de novo*, e inducir respuestas similares a las de los aceites ricos en C18:2 n-6 (Glasser y col., 2008a, Brent y col., 2008).

El C18:2 *trans 10-cis 12* CLA, es el isómero que se señala como principal responsable de la reducción en la síntesis de grasa. Sin embargo, estudios recientes indican que otros isómeros como el C18:2 *cis-10, trans-12* CLA (Saebo y col., 2005) y

el C18:2 *trans-9, cis-11* CLA (Perfield y col., 2007) pueden ejercer un efecto similar, aunque de menor magnitud.

En inicio de lactación, la suplementación con aceite de soja o linaza no influyó sobre el contenido (%) ni la cantidad (g/día) de proteína, mientras que en mitad de lactación el contenido en proteína se redujo ($P=0,022$) un 7,2% y 7% al suplementar las raciones con soja o linaza, respectivamente.

Los trabajos publicados sobre la suplementación con aceites poliinsaturados sobre la proteína láctea son muy variables, con aumentos, (Corl y col., 2001, Flowers y col., 2008), sin cambios (Chouinard y col., 1998, Zheng y col., 2005, Mandebvu y col., 2003, Loor y col., 2005), o reducción en el contenido de proteína (Wu y Huber, 1994, Ward y col., 2002, Fearon y col., 2004, Shingfield y col., 2006, Alzahal y col., 2008). A pesar del efecto negativo sobre el porcentaje de proteína, generalmente, y de acuerdo con nuestros resultados, la cantidad de proteína no se ve afectada (Wu y Huber, 1994, Onetti y Grumer, 2004, Whitlock y col., 2006) o incluso aumenta (Offer y col., 1999, Alzahak y col., 2008).

Los mecanismos fisiológicos que explican la reducción en el contenido en proteína por la suplementación con grasa no están completamente establecidos. Algunos autores lo explican por una alteración en la fermentación ruminal que reduce la síntesis de proteína microbiana y por lo tanto los aminoácidos que llegan a la glándula mamaria para la síntesis proteica (Onetti y Grumer, 2004). Otros estudios indican que se produce un efecto de dilución, por un mayor aumento en la producción de leche, que de proteína (Wu y Huber, 1994, Garnsworthy, 1997, Schroeder y col., 2004).

En nuestro trabajo, la producción de leche no aumenta, mientras que sí se reduce el contenido en proteína. De Peters y Cant, (1992), indican que el efecto de dilución solo explica parcialmente la reducción en el contenido en proteína y que estudios como el nuestro donde la suplementación con grasa no afecta la producción de leche pero reduce el porcentaje de proteína apoyarían esta afirmación. Por otra parte, la reducción en el contenido en proteína se ha observado tanto con grasas inertes en el rumen (Sklan y col., 1992, Wu y col., 1993), como con aceites incorporados en forma libre

(Offer y col., 1999) o en la semilla (Solomon y col., 2000, Fearon y col., 2004, Shingfield y col., 2006) lo que sugiere que además de alteraciones en la fermentación ruminal están implicados otros fenómenos.

Algunos trabajos relacionan la respuesta a la suplementación con grasa con la fase de lactación. En la mayoría de los trabajos consultados, y de acuerdo con nuestros resultados, se observa una mayor respuesta en mitad-final de lactación que en inicio. Wu y col., (1993), obtiene un menor contenido en proteína al suplementar con grasa en mitad de lactación y sugieren que la respuesta a la suplementación es distinta en inicio o media lactación. Sklan y col., (1992), observaron que el efecto negativo de la suplementación con grasa fue evidente en mitad de lactación (>150 DEL), mientras que éste no se produjo en inicio. Schroeder y col., (2004), en una revisión sobre la suplementación con grasa en pastoreo observan una mayor respuesta en el contenido en proteína en mitad que en inicio de lactación. Concluyen que los mecanismos por los que se reduce el contenido en proteína al suplementar con grasas todavía no se conocen con exactitud.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el contenido o cantidad de lactosa. Muy pocos estudios han observado cambios en el porcentaje de lactosa en la leche. Jenkins y McGuire (2006), indican que éstos solo ocurren en situaciones poco usuales de alimentación muy extremas.

6.2. Incorporación de aceites vegetales insaturados en raciones de vacas lecheras: efectos sobre la composición en ácidos grasos de la leche.

La influencia de la suplementación con aceites sobre en la composición en ácidos grasos de la leche integra tanto el metabolismo ruminal (hidrólisis, isomerización y biohidrogenación de los ácidos grasos), que determina el flujo y composición duodenal de ácidos grasos, como el metabolismo de la vaca (movilización de lípidos, captación de ácidos grasos del plasma por la glándula mamaria, síntesis de *novo* de ácidos grasos).

En general, la suplementación con lípidos da lugar a un aumento en los C18 a expensas de los ácidos grasos de cadena corta y media, como resultado de un mayor flujo de ácidos grasos de cadena larga a la glándula mamaria procedentes de la absorción en el intestino, y una reducción en la síntesis de *novo*. Cuando la suplementación es con ácidos grasos insaturados en forma libre, a pesar de la hidrogenación que sufren en el rumen, su secreción en la leche aumenta, e inhiben la síntesis de ácidos grasos de cadena corta y media en la glándula mamaria (Grummer, 1991). Nuestros resultados corroboran estos hechos ya que en nuestro estudio, la proporción de ácidos grasos de cadena corta y media (C4 a C16) fue menor, y los de C18 fue mayor en la leche de los animales que consumieron aceite de soja o de linaza en relación al grupo control, tanto en inicio como en media lactación. La mayoría de los trabajos realizados con vacuno lechero muestran también una reducción en el contenido en ácidos grasos de cadena corta y media y un aumento en los C18 al suplementar con aceites ricos en PUFA (Dhiman y col., 2000, con aceite de soja o linaza, Bu y col., 2007, con aceite de soja o linaza, Huang y col., 2008, con aceite de soja, Chilliard y col., 2009 con aceite de linaza).

En media lactación, el ácido esteárico (C18:0) presentó un porcentaje más alto ($P=0,002$) en la grasa de la leche de los animales suplementados, independientemente del tipo de aceite (soja o linaza), mientras que el de oleico (C18:1 *cis*-9) presentó porcentajes distintos ($P=0,04$) entre los tres tratamientos, siendo la soja el valor más alto (20,06 %, 26,24 % y 23,20 % para los tratamientos control, soja y linaza, respectivamente). El C18:0 presente en la grasa de la leche procede del alimento, de la movilización de las reservas corporales y de la biohidrogenación ruminal de ácidos grasos con 18 carbonos mono y poliinsaturados. El C18:1 *cis*-9 procede del torrente sanguíneo y del ácido esteárico por acción de la Δ^9 desaturasa en la glándula mamaria. El mayor contenido en C18:0 de las raciones con aceite en relación al control podría relacionarse con el mayor contenido en ácidos grasos poliinsaturados que son hidrogenados a esteárico en el rumen y llegan en mayor cantidad a la glándula mamaria. Bu y col., (2007), obtuvieron mayor cantidad de ácido esteárico en los animales alimentados con aceite de soja o linaza comparados con una ración control, sin

embargo, a diferencia de nuestros resultados obtienen un mayor porcentaje de esteárico y oleico en las raciones con linaza en relación a las que contienen soja, que justifican por una biohidrogenación de los ácidos grasos insaturados más completa en las vacas que consumieron aceite de linaza. En nuestro estudio, el mayor contenido en ácido oleico en las raciones con soja podría relacionarse con la mayor actividad de la enzima Δ^9 desaturasa que se observa en este tratamiento. Igualmente, Chilliard y col., (2009), con aceite de linaza observó un mayor contenido en C18:0 y C18:1 en la leche de los animales suplementados con aceite de linaza, en relación a un control, sin grasa añadida.

Tanto en inicio como en media lactación, la suplementación con aceite de soja y de linaza aumentó significativamente el contenido en ácido linoleico (C18:2 *cis*-9, *cis*-12) y α -linolénico (C18:3 *cis*-9, *cis*-12, *cis*-15), en relación al grupo control. En las raciones con soja, el aumento en C18:2 *cis*-9, *cis*-12 fue mayor que en las de linaza, mientras que en las suplementadas con linaza el C18:3 *cis*-9, *cis*-12, *cis*-15 presentó una mayor proporción que en las de soja. A pesar del aumento significativo de estos ácidos grasos en relación al control, el contenido de estos ácidos grasos en la leche es relativamente pequeño debido a la intensa biohidrogenación de los ácidos grasos insaturados en el rumen, como se ha discutido previamente.

El índice desaturasa, calculado según Kelsey y col., (2003), como la relación entre el producto y la suma del producto y el sustrato, se utiliza como un posible indicador de la actividad de la Δ^9 desaturasa. En la glándula mamaria de los rumiantes existen cuatro productos, C14:1, C16:1, C18:1 *cis*-9 y C18:2 *cis*-9 *trans*-11, que se originan a partir de los C14:0, C16:0, C18:0, y C18:1 *trans*-11, por la actividad de esta enzima, respectivamente. De todos ellos, el mejor indicador de la actividad de la Δ^9 desaturasa es el que relaciona el C14:1 y C14:0, ya que en la grasa de la leche, la totalidad del C14:0 se produce vía síntesis de *novo* en la glándula mamaria, y por lo tanto la desaturación es la única fuente de C14:1 (Corl y col., 2001). Lock y Garnsworthy (2002), en un estudio en el que comparan los efectos de incorporar distintos niveles de ácido linoleico y linolénico en la ración no observan efecto del tipo de aceite (linoleico o linolénico) sobre la actividad de la Δ^9 desaturasa en la glándula mamaria. En nuestro estudio, en media lactación se observan índices superiores en el

tratamiento con soja en relación al de linaza, lo que indicaría una mayor actividad de esta enzima en la glándula mamaria de estos animales. Algunos estudios indican que la actividad de esta enzima es inhibida por ácidos grasos poliinsaturados (Jeffcoat y James, 1978, Sessler y Ntambi, 1998), más abundantes en el tratamiento con linaza. Sin embargo, Baumgard y col., (2000) en ganado vacuno lechero, así como otros estudios realizados en ratones (Park y col., 2000) han demostrado que el *trans-10, cis-12*, que en nuestro trabajo se presenta en mayor cantidad en la ración con soja, disminuye tanto la actividad, como la expresión genética de la Δ^9 desaturasa. Por otra parte, Chilliard y col. (2009), sorprendentemente, obtienen un valor más alto del índice desaturasa en la leche de los animales alimentados con aceite de linaza, en relación a un control sin grasa añadida, a pesar de que los ácidos grasos poliinsaturados inhiben la actividad de la Δ^9 desaturasa. Estos resultados, los explican por un mecanismo de adaptación de la glándula mamaria al supuesto aumento en el punto de fusión de los ácidos grasos disponibles para la síntesis de triglicéridos, debido a la disminución simultánea que observan en la concentración de los ácidos grasos saturados de cadena corta y media, y un aumento en la de C18:0, *trans* C18:1 y *trans* C18:2. En nuestro estudio, como se discutió anteriormente, las raciones suplementadas con aceite también dieron lugar a una reducción en el contenido en ácidos grasos de cadena corta y media y un aumento simultáneo en los de 18 C, pero de magnitud similar en el tratamiento con soja o linaza. Por lo tanto, el mecanismo de adaptación mencionado anteriormente no puede explicar la diferencia encontrada en el índice desaturasa que observamos entre estos tratamientos. Bu y col., (2007) en un trabajo muy similar al nuestro, no observan diferencias en este índice al comparar tres raciones: control, (sin grasa añadida), aceite de soja y aceite de linaza.

En inicio y media lactación, la suplementación con aceites ricos en PUFA, tanto el de soja, rico en C18:2, como el de linaza, rico en C18:3, aumentó el contenido en C18:1 *trans-11* (ácido vaccénico) y C18:2 *trans-9, cis-11* (ácido ruménico). En inicio de lactación, la suplementación con soja o linaza dio lugar a grasa con un 47,5% y 89% más de ácido vaccénico (C18:1 *trans-11*), y un 45% y 62% más de ácido ruménico (C18:2 *cis-9 trans-11*), respectivamente, en relación al control. En media lactación, los

aumentos en el contenido en vaccénico y ruménico fueron de un 16% y un 122 % para el ácido vaccénico y de un 41% y un 55% para el ácido ruménico, en las raciones con soja y linaza, respectivamente. Son numerosos los trabajos que reflejan un aumento en el contenido en ácido vaccénico y ruménico al suplementar con aceites ricos en ácido linoleico o linolénico (Dhiman y col., 2000, Lock y Garnsworthy, 2002, Bu y col., 2007, Fuentes y col., 2008, Flowers y col., 2008, Caroprese y col., 2010).

El ácido vaccénico se origina durante la biohidrogenación del C18:2 *cis-9 cis12* (ácido linoleico) y del C18:3 *cis-9, cis-12, cis-15* (ácido α linolénico), mientras que el C18:2 *cis-9, trans-11* solo se produce durante la biohidrogenación ruminal del C18:2 *cis-9 cis12* (ácido linoleico) (Harfoot y Hazlewood, 1997, Lock y Garnsworthy, 2002).

El C18:2 *cis-9, trans-11* presente en la leche procede de la biohidrogenación ruminal del ácido linoleico y de la síntesis endógena en la glándula mamaria a partir del C18:1 *trans-11* (ácido vaccénico). La desaturación del ácido vaccénico se considera la primera fuente de ácido ruménico en los tejidos (Bauman y col., 1999; Griinari y col., 2000, Piperova y col., 2002). Lock y Garnsworthy (2002), demuestran en ganado vacuno lechero que más del 80% del ruménico presente en la leche procede de la desaturación del C18:1 *trans-11* por la actividad de la Δ^9 desaturasa en la glándula mamaria. Corl y col., (2000), (Griinari y col., 2000) han estimado que la contribución de la síntesis endógena de ruménico a partir de vaccénico en la glándula mamaria es de aproximadamente un 78%. Por lo tanto, la cantidad de *cis-9, trans-11* CLA en la leche depende de las cantidades de *cis-9, trans-11* CLA (ácido Ruménico) y de *trans-11* C18:1 que se produzcan en el rumen, junto con la actividad de la Δ^9 desaturasa en el tejido mamario.

Nuestros resultados muestran un mayor aumento en el contenido en ácido vaccénico y ruménico en la leche de los animales suplementados con aceite de linaza en relación a los que consumieron aceite de soja. Estos resultados son distintos a los reportados por Bu y col., (2007) quienes al suplementar con un 4% de aceite de soja o de linaza obtiene mayores incrementos en el contenido en vaccénico y ruménico con la soja que con la linaza (un aumento de un 318% y un 105% en el contenido en vaccénico

y de un 273% y 150% en el de ruménico, para las raciones con soja o linaza, respectivamente), en relación a un grupo control (sin grasa). En la discusión justifican estos resultados por una biohidrogenación ruminal de los ácidos grasos insaturados más completa en las vacas alimentadas con linaza. Sin embargo, Doreau y Ferlay (1994) no encuentran ninguna relación entre concentración de ácido linoleico y el grado de biohidrogenación ruminal. La diferencia entre nuestro estudio y el de Bu y col., (2007) es la cantidad de aceite añadido (4% de la MS total en el estudio de Bu y col., (2007), frente a 1,5% en el nuestro) y la relación forraje:concentrado (50:50 frente a un 40:60), y es conocido que cambios en la ración, particularmente los que se asocian con una depresión en la grasa de la leche, inducen modificaciones en la población microbiana que podrían alterar las rutas en la biohidrogenación ruminal de los ácidos grasos mono y poliinsaturados, hacia la formación de otros isómeros (Griinari y col., 1998; Bauman y Griinari, 2003). Las raciones con niveles altos de concentrado o grasa darían lugar a esta situación.

Capoprese y col., (2010) indican que la síntesis endógena de C18:2 *cis-9,trans-11* CLA por la actividad de la Δ^9 desaturasa en la glándula mamaria está estrictamente conectada con el contenido en C18:1 *trans-11* y Fievez y col., (2003) han visto que los cambios en la concentración de CLA dependen fundamentalmente del contenido en vaccénico y en menor medida de la actividad de la Δ^9 desaturasa. Numerosos estudios, de acuerdo con nuestros resultados, establecen que altos niveles de ácido vaccénico se asocian con altos niveles de ruménico en la leche (Griinari y col., 2000, Lock y Garnsworthy, 2002, Bu y col., 2007, Chilliard y col., 2009, Caroprese y col., 2010).

Debido a la capacidad de la Δ^9 desaturasa en el tejido humano para transformar el ácido vaccénico en ruménico (Turpeinen y col., 2002), el aumento en el contenido en *trans* vaccénico de la leche supone una mejora de su perfil lipídico.

Uno de los objetivos principales de este trabajo fue evaluar los efectos de distintos tipos de aceites vegetales sobre la composición de la grasa, con el fin de obtener leche más saludable desde el punto de vista de la salud humana. En este sentido, la leche de los animales alimentados con aceite de soja o linaza presenta una mejora en

el perfil de ácidos grasos en relación a la de los animales del grupo control, ya que además de presentar un mayor contenido en ácido ruménico y vaccénico, se observa una reducción en el contenido en ácidos grasos de cadena corta y media, y de ácidos grasos saturados, un aumento en el de MUFA y PUFA y un mayor contenido en ácidos grasos de la serie n-3, tanto en inicio como en media lactación. Ulbricht y Southgate (1991), establecieron el índice de aterogenicidad, que relaciona el contenido de los ácidos grasos capaces de aumentar los niveles de colesterol sérico (ácidos láurico, mirístico y palmítico) y los ácidos grasos de acción protectora (mono y poliinsaturados). Según los valores observados en el índice de aterogenicidad, la leche de las vacas que consumieron aceite de soja o linaza en su ración fue ($P < 0,05$) mejor que la de las que no consumieron aceite.

Numerosos trabajos obtienen resultados similares con aceites ricos en ácido linoleico y linolénico (Dhiman y col., 2000, Lock y Garnsworthy, 2002, Bu y col., 2007, Flowers y col., 2008, Fuentes y col., 2008, Caporese y col., 2010).

En general, las variaciones que se producen en el perfil de ácidos grasos al suplementar con aceites siguen la misma tendencia en inicio y en media lactación, aunque se observa un mayor efecto en media lactación.

Kelsey y col., (2003) al estudiar el efecto de la raza, número de partos y estado de lactación sobre el perfil lipídico de la leche, concluyen, que el estado de lactación tiene muy poco efecto en el contenido en ácidos grasos de la leche. Stanton y col., (1997) no observaron efecto del estado de lactación sobre el contenido en CLA. Fuentes y col., (2008) de acuerdo con nuestros resultados, al suplementar con semilla de linaza, obtiene cambios más importantes a los 90 que a los 40 DEL.

6.3. Incorporación de aceites vegetales insaturados en raciones de vacas lecheras: efectos sobre la reproducción

6.3.1. Parámetros sanguíneos

Generalmente, niveles sanguíneos elevados de betahidroxibutirato (BHBA), se asocian con bajas concentraciones de insulina y del factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF-1). En nuestro estudio, los animales que consumieron aceite de linaza presentaron una mayor concentración de BHBA y menor de insulina e IGF-1 que los que consumieron soja (tabla 5.6).

Coincidiendo con lo observado en otros trabajos (Mandebvu y col., 2003; Ambrose y col., 2006; Castañeda-Gutiérrez y col., 2007; Fuentes y col., 2008), la concentración de NEFA no fue afectada por el tipo de grasa incluida en la ración, lo que sugiere que los ácidos grasos que componen las distintas fuentes de grasa fueron utilizados de forma similar en el metabolismo animal.

La mayor concentración de BHBA observada entre los 46 y 67 días post parto (ddp), en las vacas que consumieron la ración con aceite de linaza, podría estar relacionada con la mayor producción de leche en estos animales al alcanzar el pico de producción a los 57 DEL (44,04 kg/día para la linaza vs 38,99 a los 78 DEL y 39,25 kg/día a los 71 DEL, para los tratamientos control y soja, respectivamente) (tabla 5.5), ya que no existen diferencias estadísticamente significativas en la concentración plasmática de NEFA entre tratamientos. Además los valores de BHBA se encuentran muy por debajo de los considerados patológicos ($\geq 1.400 \mu\text{mol/l}$, Walsh y col., 2007), lo que nos hace pensar que las vacas asignadas en los distintos tratamientos mantienen un adecuado y parecido *status* energético postparto.

En numerosos trabajos se ha estudiado el patrón de secreción de IGF-1 durante el ciclo estral en ganado vacuno sin estrés nutricional y los datos obtenidos son bastante contradictorios. Aunque la causa de estas discrepancias no está clara, parece que las diferencias podrían ser debidas en parte, a la metodología de muestreo (intensidad de muestreo), ya que la concentración de IGF-1 medida diariamente durante el ciclo estral

permanece relativamente constante (Velazquez y col., 2008). En nuestro trabajo la toma de muestras fue cada 10 días. Nuestros resultados coinciden con los de Robinson y col., (2002), donde las concentraciones medias de IGF-1 durante el periodo experimental, fueron significativamente más altas en las vacas que consumieron raciones con alto contenido en C18:2, n-6 (aceite de soja) en comparación con las que consumieron raciones ricas en C18:3, n-3 (aceite de linaza). Sin embargo, son contradictorios con los obtenidos por Caldari-Torres y col., (2011), que observan una mayor concentración plasmática de IGF-1 ($P < 0,01$), en vacas Holstein alimentadas con C18:2, n-6 o C18:3, n-3 comparado con vacas que consumen una ración control rica en AGS.

Taylor y col., (2004), observaron que las vacas con mayor concentración plasmática de IGF-1 y por lo tanto en balance energético positivo a lo largo de las 12 primeras semanas postparto, presentaron mayor probabilidad de quedar gestantes que las que tenían baja concentración en IGF-1. En otro trabajo llevado a cabo por Spicer y col., (1993), comprobaron que vacas lecheras que se encontraban en balance energético positivo, durante las primeras 12 semanas postparto, tenían una concentración plasmática media de IGF-1 igual a $102,5 \pm 10,6$ ng/ml, mientras que vacas en balance energético negativo (BEN) presentaban una concentración de $78,8 \pm 9,7$ ng/ml. En nuestro trabajo, las concentraciones más bajas de IGF-1 corresponden al tratamiento aceite de soja (157,63 ng/ml) y linaza (129,41 ng/ml), concentraciones muy superiores a los 102,5 ng/ml, que junto a la ausencia de efecto de la fuente de grasa sobre la concentración de NEFA y su bajo valor, nos hacen pensar que todas las vacas, independientemente del tipo de ración que recibieron, se encontraban en balance energético positivo.

La concentración plasmática total de progesterona fue significativamente menor para los tratamientos con aceite de soja (2,876 ng/ml) y linaza (3,613 ng/ml) frente al tratamiento control (4,572 ng/ml) (tabla 5.6). 10 días antes de la inseminación (57 dpp), se produjo una disminución en la concentración de progesterona, independientemente del tratamiento (figura 5.5). Estos resultados coinciden con los obtenidos por Robinson y col., (2002) cuando evaluaron los efectos de raciones enriquecidas con PUFAs (C18:2, n-6 o C18:3, n-3) sobre los parámetros reproductivos en vacas lecheras y con los obtenidos por Hinckley y col., (1996), observando que la incorporación de PUFAs

en la ración produce una dispersión de las células luteales y en consecuencia una reducción en la secreción de progesterona. Los mecanismos que desencadenan este proceso se desconocen, aunque se piensa que podrían estar relacionados con alguna de las siguientes teorías:

a) Los PUFAs pueden alterar la síntesis de prostaglandinas por parte de las células luteales.

b) El ácido araquidónico puede actuar limitando la producción de progesterona.

c) A mayor concentración plasmática de colesterol mayor síntesis de progesterona.

d) Las vacas que consumen raciones ricas en PUFAs pueden retrasar la ovulación y en consecuencia, se produciría un retraso en el desarrollo de la fase lútea.

En otro trabajo llevado a cabo por Ambrose y col., (2006), en el que comparan una ración rica en C18:3 n-3 frente a otra con alto contenido en C18:2 n-6, sin que hubiese una ración control, no observaron diferencia alguna en la concentración plasmática de progesterona durante todo el periodo experimental entre ambos grupos.

En el momento de la inseminación artificial (67 ddp) los animales que consumieron las raciones control y aceite de linaza presentaron mayor concentración plasmática de progesterona (4,018 y 3,559 ng/ml, respectivamente) que los de la aceite soja (1,937 ng/ml, figura 5.5), estos datos coinciden con los observados por Ambrose y col., (2006) y Petit y Twagiramungu, (2006). La mayor concentración en ácidos grasos saturados de la ración control, favorecería una mayor concentración plasmática de colesterol y en consecuencia, una mayor concentración de progesterona (Staples y col., 1998). En el caso de aceite de linaza, el efecto inhibitorio del C18:3, n-3 sobre la síntesis de prostaglandinas y sobre todo el del EPA y DHA, explicaría la mayor concentración de progesterona

Aunque en nuestro trabajo no se midió la concentración plasmática de prostaglandinas, en otro similar llevado a cabo por Robinson y col., (2002), observaron que las vacas que consumieron raciones con alto contenido en C18:2, n-6, como es

nuestro caso en el tratamiento aceite de soja, tuvieron una mayor concentración de prostaglandinas, lo que explicaría la menor concentración de progesterona observada.

6.3.2. Parámetros reproductivos

No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos para el porcentaje de detección de celos (tabla 5.7), seguramente porque como señalan Burke y col., (1997) y Petit y Twagiramungu (2006) el comportamiento estral no esté afectado por la alimentación. Tampoco observamos diferencias significativas para el porcentaje de vacas gestantes al final del periodo experimental. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Burke y col., (1997) y McNamara y col., (2003).

Cerri y col., (2009), observaron que al suplementar la ración de vacas lecheras con fuentes de grasa insaturada, hubo una mejora en la fertilidad y en el desarrollo embrionario, a pesar de mantener similar *status* de indicadores metabólicos. En el presente trabajo, observamos que la mejor fertilidad a la primera IA fue para los animales que recibieron las raciones con aceite de soja y linaza ($P=0,003$). Probablemente esto tenga que ver con una mayor tasa de supervivencia embrionaria en los 24 días post-inseminación artificial y un descenso en las pérdidas de gestación, con raciones ricas en PUFAs (C18:3, n-3 y C18:2, n-6), como ya observaron otros autores (Burke y col., 1997; Ambrose y col., 2006; Petit y Twagiramungu, 2006; Silvestre y col., 2011), como consecuencia de un incremento en el número de blastómeros en la mórula de los embriones de las vacas que consumieron raciones ricas en C18:2 y C18:3 (Thangavelu y col., 2007). Puesto que la concentración plasmática de insulina no fue significativamente diferente entre tratamientos en este trabajo, el efecto de los PUFAs sobre la mayor viabilidad del embrión no puede atribuirse a esta hormona. Las mejoras en la fertilización y calidad del embrión no están relacionadas con respuestas de *status* energético, ya que los indicadores metabólicos del *status* no fueron afectados por las diferentes fuentes de grasa de la ración en un trabajo llevado a cabo por Cerri y col., (2009). Sin embargo, estos mismos autores señalan que el efecto beneficioso sobre la fertilización y la viabilidad del embrión probablemente esté más relacionado con el

incremento en la disponibilidad a nivel de útero, ovocito y embrión de los AG C18:2 y C18:3.

Los días abiertos fueron significativamente superiores ($P=0,02$) en el tratamiento control (123,5 días), cuando los comparamos con el de tratamiento aceite de linaza (75 días). Probablemente, porque las raciones con alto contenido en C18:3, n-3, como la ración con aceite de linaza reducen las pérdidas de gestación (Ambrose y col., 2006).

El intervalo parto primera inseminación depende del número de días que transcurren hasta la primera ovulación postparto. Igualmente, el intervalo parto primera ovulación está positivamente relacionado con los días en los que la vaca se encuentra en balance energético positivo y la presencia de folículos dominantes en el ovario, que mejoran la producción de estradiol. La suplementación de las raciones con grasas, manteniendo un extracto etéreo (EE) en torno al 5 % de la materia seca total, incrementó el diámetro de los folículos dominantes al comienzo del periodo postparto, mejorando los niveles de estradiol durante la primera onda folicular acortando así el periodo de anoestro (Beam y Butler, 1997). Estos mismos autores, observaron que altos niveles de colesterol (lipoproteínas de alta densidad) pueden ejercer un efecto positivo sobre la capacidad esteroidogénica de los folículos dominantes favoreciendo la ovulación. En nuestro trabajo, las vacas que consumieron la ración con aceite de linaza tuvieron un intervalo parto primera inseminación significativamente ($P=0,021$) más corto (49,19 días) que las de la ración control (68,00 días). Probablemente, el mayor contenido en C18:3 del tratamiento aceite de linaza, mejore la concentración de lipoproteínas de alta densidad y en consecuencia, como señalan Beam y Butler (1997), la mayor capacidad esteroidogénica de los folículos dominantes adelante la primera ovulación postparto.

7. Conclusiones

En las condiciones en las que se han realizado las pruebas experimentales, y a partir de los resultados obtenidos en la presente memoria, se pueden establecer las siguientes conclusiones:

1. La inclusión de un 1,5 % de aceite de soja o linaza en raciones para vacas lecheras, no influye sobre el consumo de materia seca ni la producción de leche, y reduce el contenido y producción de grasa, tanto en inicio como en media lactación

2. En media lactación, la suplementación con aceite de soja o linaza reduce el contenido en proteína de la leche sin modificar su producción

3. En inicio de lactación, la suplementación con un 1,5 % de aceite de soja da lugar a un aumento de un 47,5% en el contenido en ácido vaccénico y de un 45 % en el de ruménico y la suplementación con un 1,5% de aceite de linaza produce un aumento de un 89% en el contenido en ácido vaccénico y de un 62% en el de ruménico, en relación a una dieta control, sin aceite añadido

4. En media lactación, la suplementación con un 1,5% de aceite de soja da lugar a un aumento en el contenido en ácido vaccénico de un 16% y en el de ruménico de un 41% y la suplementación con un 1,5% de aceite de linaza produce un aumento de un 122% en el contenido en ácido vaccénico y de un 55% en el de ruménico, en relación a una dieta control, sin aceite añadido.

5. La suplementación con 1,5 % de aceite de soja o linaza reduce el contenido en ácidos grasos de cadena corta y media (C4 a C16), y de ácidos grasos saturados, pero aumenta el contenido en ácido vaccénico, ruménico, ácidos grasos polinsaturados, ácidos grasos de la serie n-3 y reduce el índice de aterogenicidad, lo que indica una leche más saludable desde el punto de vista de la salud humana.

6. A lo largo de los 67 días post parto (dpp), la concentración plasmática de indicadores metabólicos del *status* energético como Insulina y NEFAs, no fue afectada por el tipo de grasa incluida en las raciones.

7. la suplementación con aceite de soja o linaza reduce el contenido de progesterona en plasma durante las primeras 10 semanas postparto.

8. Las raciones con aceite de linaza al 1,5% reducen el intervalo parto primera inseminación y el número de días abiertos.

9. Las vacas que consumieron las raciones suplementadas con aceite de soja y linaza, tuvieron una mayor fertilidad a la primera inseminación.

9. Bibliografía

Abayasekara, D. R., y Wathes, D. C. (1999). Effects of altering dietary fatty acid composition on prostaglandin synthesis and fertility. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 61:275–287.

AbuGhazaleh, A. A., y Jenkins, T. C. (2004). Short communication: Docosaehaenoic acid promotes vaccenic acid accumulation in mixed ruminal cultures when incubated with linoleic acid. *J. Dairy Sci.* 87: 1047–1050.

AbuGhazaleh, A. A. (2008). Effect of fish oil and sunflower oil supplementation on milk conjugated linoleic acid content for grazing dairy cows. *Anim. Feed Sci. Tech.* 141: 220-232.

Albert, C.M., Hennekens C.H., y O'Donnell C.J. (1998). Fish consumption and risk of sudden cardiac death. *JAMA*, 279:23-8.

Allen, M.S. (2000). Effects of diet on short-term regulation of feed intake by lactating dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 83, 1598-1624.

Alzahal, O., Odongo, N.E., Mutsvanqwa, T., Or-Rashid, M.M., Duffield, T.F., Baqq, R., Dick, P., Vessie, G., y McBride, B.W. (2008). Effects of Monensin and Dietary Soybean Oil on Milk Fat Percentage and Milk Fatty Acid Profile in Lactating Dairy Cows. *J. Dairy. Sci.* 91 (3): 1166-1174.

Ambrose, D. J., Kastelic, J. P., Corbett, R., Pitney, P. A., Petit, H. V., Small, J. A., y Zlkovic, P. (2006). Lower pregnancy losses in lactating dairy cows fed a diet enriched in linoleic acid. *J. Dairy Sci.* 89:3066–3074.

Alzahal, O., Odongo, N.E., Mutsvanqwa, T., Or-Rashid, M.M., Duffield, T.F., Baqq, R., Dick, P., Vessie, G., y McBride, B.W. (2008). Effects of Monensin and Dietary Soybean Oil on Milk Fat Percentage and Milk Fatty Acid Profile in Lactating Dairy Cows. *J. Dairy. Sci.* 91 (3): 1166-1174.

AOAC., (2006). Official methods of analysis of the Association of Official Agricultural Chemists. 18th Edn. (1st revision). AOAC International, Gaithersburg, MD, USA.

Atkinson, R.L., Toone, C.D., Robinson, T.J., Harmon, D.L., y Ludden, P.A. (2009). Effects of ruminal protein degradability and frequency of supplementation

nitrogen retention, apparent digestibility, and nutrient flux across visceral tissues in lambs fed low-quality forage. *J. Anim Sci.* 10:2246-2257.

Aro, A., Mannisto, S., Salminen, I., Ovaskainen, M.L., Kataja, V., y Uusitupa, M. (2000). Inverse association between dietary and serum conjugated linoleic acid and risk of breast cancer in postmenopausal women. *Nutr. Cancer* 38: 151-157.

Barber, M.C., Clegg, R.A., Travers, M.T., y Vernon, R.G. (1997). Lipid metabolism in the lactating mammary gland. *Biochim. Biophys Acta* 1347:101-126 (1997).

Bauman, D. E., Baumgard, L. H., Corl, B. A., y Griinari, J. M. (1999). Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants. *J. Anim. Sci.* 77: 1-15.

Bauman, D. E., Corl, B. A., Baumgard, L. H. y Griinari, J. M. (2001). Conjugated linoleic acid (CLA) and the dairy cow. *En Recent Advances in Animal Nutrition*, pp 221-250 Garnsworthy, P. C. y Wiseman, J. (eds.). Nottingham University Press, Nottingham, UK.

Bauman, D.E. y Griinari, J.M. (2003). Nutritional regulation of milk fat synthesis. *Annu. Rev. Nutr.* 23:203-227.

Bauman, D.E., Perfield, J.W., Harvatine, K.J., y Baumgard, L.H. (2008). Regulation of fat synthesis by conjugated linoleic acid: Lactation and the ruminant model. *J. Nutr.* 138: 403-409.

Baumgard, L.H., Corl B.A., Dwyer D.A., Saebo, A., y Bauman, D.E. (2000). Identification of the conjugated linoleic acid isomer that inhibits milk fat synthesis. *AM J. Physiol.* 278:179-184.

Beam, S.W., y Butler, W.R. (1997). Energy balance and ovarian follicle development prior to the first ovulation postpartum in dairy cows receiving three levels of dietary fat. *Biol. Reprod.* 56, 133-142.

Beaulieu A.D., y Palmquist D.L. (1995). Differential effects of high-fat diets on fatty-acid composition in milk of Jersey and Holstein cows. *J. Dairy Sci.*, 78: 1336-1344.

Bell, J.A., Griinari, J.M., y Kennelly, J.J. (2006). Effect of safflower oil, monensin, and vitamin E on concentration of conjugated linoleic acid in bovine milk fat. *J. Dairy Sci.* 89:733-748.

Belury M.A. (2002a). Inhibition of carcinogénesis by conjugated linoleic acid: potential mechanisms of action. *J. Nutr.* 132:2995-2998.

Belury, M.A. (2002b). Dietary conjugated linoleic acid in health: physiological effects and mechanisms of action. *Annu. Rev. Nutr.* 22:505-531.

Belury, M.A., Mahon A, y Banni, S. (2003). The conjugated linoleic acid (CLA) isomer, t10c12-CLA, is inversely associated with changes in body weight and serum leptin in subjects with type 2 diabetes mellitus. *J. Nutr.* 133: 257-260.

Bilby, T. R., Block, J., do Amaral, B. C., Sa Filho, O., Silvestre, F. T., Hansen, P. J., Staples, C. R. y Thatcher, W. W. (2006). Effects of Dietary Unsaturated Fatty Acids on Oocyte Quality and Follicular Development in Lactating Dairy Cows in Summer. *J. Dairy Sci.* 89:3891–3903.

BOE (boletín Oficial del Estado) (2005). REAL DECRETO 1201/2005, de 10 de octubre, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.

Blankson, H., Stakkstad, J., Fagertun, H., Thorn, E., Wadstein, J., y Gudmundson, O. (2000). Conjugated linoleic acid reduces body fat mass in overweight and obese humans. *J. Nutr.* 130:2943-2948.

Bloor, W.R. (1943). *Biochemistry of the Fatty Acids and their compounds, the lipids.* American Chemical Society Monograph No. 93, p. 128. Reinhold Publishing Corp., New York.

Brent, M., Kazala, E.K., Murdoch, G.K. y Keating, A.F. (2008). Effect of CLA and other C18 unsaturated fatty acids on DGAT in bovine milk fat biosynthesis systems. *Lipids*, 43:903-912.

Broudiscou, L., Pochet, S., y Poncet, C. (1994). Effect of linseed oil supplementation on feed degradation and microbial synthesis in the rumen of ciliate-free and refaunated sheep. *Anim. Feed. Sci. Techn.* 49: 189-202.

Brunschwig, P., Hurtaud, C., Chilliard, Y. y Glasser, F. (2010). L'apport de lin dans la ration des vaches laitières : Effets sur la production, la composition du lait et des produits laitiers, les émissions de méthane et les performances de reproduction. *INRA Prod. Anim.* 23:307-318.

Brzoska, F. (2005). Effect of dietary vegetable oils on milk yield, composition and CLA isomer profile in milk from dairy cows. *J. Anim. Feed Sci.* 14:445-459.

Bu, D.P., Wang, J. Q., Dhiman, T.R., y Liu, S.J. (2007). Effectiveness of oils rich in linoleic and linolenic acids to enhance conjugated linoleic acid in milk from dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90:998-1007.

Budowski, P., Leighfield, M.J., y Crawford, M.A. (1987). Nutritional encephalomalacia in the chick: an exposure of the vulnerable period for cerebellar development and the possible need for both w6 and w3 fatty acids. *Br. J. Nutr.* 58:511-520.

Bulliyya, G. (2002). Influence of fish consumption on the distribution of serum cholesterol in lipoprotein fractions: Comparative study among fish-consuming and non-fish consuming populations. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 11 (2): 104-111.

Burke, J.M., Staples, C. R., Risco, C. A., De la Sota, R. L. y Thatcher, W. W. (1997). Effect of Ruminant Grade Menhaden Fish Meal on Reproductive and Productive Performance of Lactating Dairy Cows. *J Dairy Sci* 80:3386-3398.

Caldari-Torres, C., A.L. Lock, C.R. Staples, y Badinga, L. (2011). Performance, Metabolic and Endocrine Responses of Periparturient Holstein Cows Fed 3 Sources of Fat. *J Dairy Sci* 94:1500-10.

Cant, J.P., DePeters, E.J., y Baldwin, R.L. (1993). Mammary amino acid utilization in dairy cows fed fat and its relationship to milk protein depression. *J. Dairy Sci.* 76: 762-774.

Caroprese, M., Marzano, A., Marino, R., Gliatta, G., Muschio, A., y Sevi, A. (2010). Flaxseed supplementation improves fatty acid profile of cow milk. *J. Dairy Sci.* 93: 2580-2588.

Carrero, J.J., Bautista, M. E., Baró, L, Fonolla, J., Jiménez, J., Boza, J.J., y López-Huertas, E. (2005). Cardiovascular effects of omega-3 fatty acids and alternatives to increase their intake. *Nutr. Hosp.* 20:63-69.

Carroll, D.J., Grummer, R.R. y Mao, F.C. (1992). Progesterone production by cultured luteal cells in the presence of bovine low- and high-density lipoproteins purified by heparin affinity chromatography. *J. Anim. Sci.* 70: 2516-2526.

Castañeda-Gutierrez, E., Benefield, B.C., de Veth, M.J., Santos, N.R., Gilbert, R. O., Butler, W.R. y Bauman, D.E. (2007). Evaluation of the mechanism of action of conjugated linoleic acid isomers on reproduction in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90, 4253-4264.

Cerri, R.L.A., Juchem, S.O., Chebel, R.C., Rutigliano, H., Bruno, R.G.S., Galvaõ, K.N., Thatcher, W.W. y Santos, J.E. (2009). Effect of fat source differing in fatty acid profile on metabolic parameters, fertilization, and embryo quality in highproducing dairy cows. *J. Dairy Sci.* 92: 1520-1531.

Chilliard, Y. (1993). Dietary fat and adipose tissue metabolism in ruminants, pig and rodents: A review. *J. Dairy Sci.* 76, 3897-3931.

Chilliard, Y., Ferlay, A., Mansbridge, R.M., y Doreau, M. (2000). Ruminant milk fat plasticity nutritional control of saturated polyunsaturated trans and conjugated fatty acids, *Ann. Zootech.* 49: 181-205.

Chilliard, Y., Ferlay, A., y Doreau, M. (2001a). Effect of different types of forages, animal fat or marine oils in cow's diet on milk fat secretion and composition, especially conjugated linoleic acid (CLA) and polyunsaturated fatty acids. *Livest. Prod. Sci.* 70, 31-48.

Chilliard, Y., Ferlay, A., y Doreau, M. (2001b). Contrôle de la qualité nutritionnelle des matières grasses du lait par l'alimentation des vaches laitières: acides gras trans, polyinsaturés, acide linoléique conjugué. *INRA Prod. Anim.* 14 (5):323-335.

Chilliard, Y., Muriel, B., Carole D., Karine, L., Isabelle, G., Christine, L., y Jean, D., (2002). Mammary leptin synthesis, milk leptin and their putative physiological roles. *Reprod. Nutr. Dev.* 42(5):399-413.

Chilliard, Y., Ferlay, A., Rouel, J. y Lamberet, G. (2003). A review of nutritional and physiological factors affecting goat milk lipid synthesis and lipolysis. *J. Dairy Sci.* 86: 1751-1770.

Chilliard, Y., Glasser, F., Ferlay, A., Bernard, L., Rouel, J., y Doreau, M. (2007). Diet, rumen biohydrogenation, cow and goat milk fat nutritional quality: A review. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 109: 828-855.

Chilliard, Y., Martin, C., Rouel, J., y Doreau, M. (2009). Milk fatty acids in dairy cows fed whole crude linseed, extruded linseed, or linseed oil, and their relationship with methane output. *J. Dairy Sci.* 92 (10): 5199-5211.

Choi, Y., Kim, Y.C., Han, Y.B., Park, Y., Pariza, M.W., y Ntambi, J.M. (2001). The trans-10, cis-12 isomer of conjugated linoleic acid downregulates stearoyl-CoA desaturase 1 gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *J. Nutr.* 130: 1920-1924.

Chouinard, P.Y., Girard, V., Brisson, G.J. (1998). Fatty Acid Profile and Physical Properties of Milk Fat from Cows fed Calcium Salts of Fatty Acids with Varying Unsaturation. *J. Dairy Sci.* 81:471-481.

Christie, W. W. (1982). *Lipid Analysis: Isolation, separation, identification and structural analysis of lipids* (2nd ed.). Pergamon Press. Oxford. UK.

Clapperton, J.L. y Steele, W. (1983). Fat supplementation in animal production ruminants. *Proc. Nutr. Soc.* 42: 243.

Collomb, M., Sieber, R. y Bütikofer, U. (2004). CLA isomers in milk fat from cows fed diets with high levels of unsaturated fatty acids. *Lipids.* 39: 355-364.

Collomb, M., Schmida, A., Sieber, R., Wechsler, D. y Ryhänen, E. (2006). Conjugated linoleic acids in milk fat: Variation and physiological effects. *Inter. Dairy J.* 16: 1347-1361.

Cook, M.E., Miller, C.C., Park, Y. y Pariza, M.W. (1993). Immune modulation by altered nutrient metabolism: nutritional control of immune-induced growth depression. *Poultry Sci.* 72: 1301-1305.

Corl, B. A., Baumgard, L. H., Bauman, D. E. y Griinari, J. M. (2000). Role of delta 9 desaturase in the synthesis of the anticarcinogenic isomer of conjugated linoleic acid and other milk fatty acids, pp 203-212. Cornell University. Cornell Nutrition Conference. Rochester, New York.

Corl, B. A., Baumgard L. H., Dwyer D. A., Griinari J. M., Phillips B. S. y Bauman D. E. (2001). The role of Δ 9-desaturase in the production of *cis*-9, *trans*-11 CLA. J. Nutr. Biochem. 12: 622-630.

Dannenberger, D., Nuernberg, G., Scollan, N., Schabbel, W., Steinhart, H., Ender, K. y Nuernberg, K. (2004). Effect of Diet on the Deposition of *n*-3 Fatty Acids, Conjugated Linoleic and C18:1*trans* Fatty Acid Isomers in Muscle Lipids of German Holstein Bulls. J. Agric. Food Chem. 52 (21): 6607-6615.

Daviglus, M.L., Stamler, J. y Orenca, A.J. (1997). Fish consumption and the 30-years risk of fatal myocardial infarction. N. Engl. Med. 336: 1046-1053.

Dawson, R.M.C. y Kemp, P. (1970). Biohydrogenation of dietary fats in ruminants. Phillipson, A.T. (ed.). Oriol Press. Newcastle-upon-tyne. England.

De Blas, C., González, G. y Argamentería, A. (1987). Nutrición y alimentación del ganado, pp 451. Ed. Mundiprensa. Madrid.

De Fries, C.A., Neuendorff, D.A., y Randel, R.D. (1998). Fat supplementation influences postpartum reproductive performance in Brahman cows. J. Anim. Sci. 76: 864.

Demeyer, D. y Doreau, M. (1999). Targets and procedures for altering ruminant meat and milk lipids. Proc. Nutr. Soc. 58:593-607.

Demment, M.W. y Allen, L.H. (2004). Animal Source foods to improve Micronutrient Nutrition and Human Function in Developing Countries, J. Nutr. 133 (Suppl. 11-S II).

De Peters, E.J. y Cant, J.P. (1992). Nutritional factors influencing the nitrogen composition of bovine milk: A review. J. Dairy Sci. 75, 2043-2070.

Dewailly, E., Blanchet, C., Gingras, S., Lemieux, S., y Holub, B.J. (2003). Fish consumption and blood lipids in three ethnic groups of Quebec (Canada). *Lipids* 38 (4): 359-365.

Dhiman, T.R., Satter, L.D., Pariza, M.W., Galli, M.P. y Albright, K. (1997). Conjugated linoleic acid (CLA) content of milk from cows offered diets rich in linoleic and linolenic acid. *J. Dairy Sci.* 80 (1): 184.

Dhiman, T.R., Anand, G.R., Satter, L.D. y Pariza, M. (1999). Conjugated linoleic acid content of milk from cows fed different diets. *J. Dairy Sci.* 82:2146-2156.

Dhiman, T.R., Satter, L.D., Pariza, M.W., Galli, M.P., Albright, K. y Tolosa, M.X. (2000). Conjugated linoleic acid (CLA) content of milk from cows offered diets in linoleic acid. *J. Dairy Sci.*, 83. 1016-1027.

Doreau, M. y Chilliard, Y. (1992). Influence d'une supplementation de la ration en lipids sur la qualité du lait chez la vache. *INRA Prod. Anim.*, 5:103-111.

Doreau, M. y Ferlay, A. (1994). Digestion and utilization of fatty acids by ruminants. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 45, 379-396.

Doreau, M. y Chilliard, Y. (1997). Digestion and metabolism of dietary fat in farm animals. *Br. J. Nutr.*, 78, S15-S35.

Doreau, M., Chilliard, Y., Rulquin, H. y Demeyer, D.I. (1999). Manipulation of milk fat in dairy cows. En *Recent Advances in Animal Nutrition*, pp 81-109. Nottingham University Press. Nottingham, UK.

Drackley, J.K. (1999) Biology of dairy cows during the transition period: the final frontier *J. Dairy Sci.* 82:2259-2273.

Dschaak, C. M., Noviandi, C. T., Eun, J.-S., Fellner, V., Young, A. J., ZoBell, D. R., y Israelsen, C. E. (2011). Ruminant fermentation, milk fatty acid profiles, and productive performance of Holstein dairy cows fed 2 different safflower seeds. *J. Dairy Sci.* 94:5138–5150.

EFSA European Food Safety Authority (2010). Scientific opinion on dietary reference values for fats, including saturated fatty acids, polyunsaturated fatty acids, monounsaturated fatty acids, trans fatty acids, and cholesterol. *EFSA J* 8(3):1–107.

FAO/WHO (2003). Report of a Joint Expert Consultation: Diet, Nutrition and the prevention of chronic diseases. WHO Technical Report Series 916. Ginebra.

Faichney, G.J., Gordon, G.L.R., y Welch, R.J. (2002). Effect of dietary free lipid on anaerobic fungi and digestion in the rumen of sheep. *J. Agric. Res.* 53:519-527.

Fearon A.M., Mayne, C.S., Beattie, J.A.M. y Bruce, D.W. (2004). Effect of level of oil inclusion in the diet of dairy cows at pasture on animal performance and milk composition and properties. *J. Sci. Food Agric.* 84, 497-504.

Field, C.J. y Schley, P.D. (2004). Evidence for potential mechanisms for the effect of conjugated linoleic acid on tumor metabolism and immune function: lessons from n- fatty acids. *Am. J. Clin. Nutr.* 79:1190S-1198S.

Fievez, V., Vlaeminck, B., Dhanoa, M.S. y Dewhurst, R.J. (2003). Use of principal component analysis to investigate the origin of heptadecenoic and conjugated linoleic acids in milk. *J. Dairy Sci.* 86: 4047-4053.

Finstand, H.S., Devon, C.A., Kulseth, M.A., Synstad, A.V., Knudsen, E. y Kolset, S.O. (1998). Cell proliferation, apoptosis and accumulation of lipid droplets in U937-1 cell incubated with eicosapentaenoic acid. *Biochem. J.* 336: 451-459.

Flowers, G., Ibrahim, S.A. y AbuGhazaleh, A.A. (2008). Milk Fatty Acid Composition of Grazing Dairy Cows When Supplemented with Linseed Oil. *J. Dairy Sci.* 91:722-730.

Folch, J., Lees, M., y Stanley, G. H. S. (1957). A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 226: 497-508.

Friggens N.C., Disenhaus C. y Petit H.V. (2010). Nutritional sub-fertility in the dairy cow: towards improved reproductive management through a better biological understanding. *Animal*, 4: 1197-1213.

Fuentes, M.C., Calsamiglia, S.S., Sánchez, C., González, A., Newbold, J., Santos, J E.P., Rodríguez-Alcalá, L.M., y Fontecha, J. (2008). Effect of extruded linseed on productive and reproductive performance of lactating dairy cows. *Livest. Prod. Sci.* 113: 144-154.

Fuentes, M. C. (2009). Modificación del perfil de ácidos grasos de la leche a través de la manipulación nutricional en vacas lecheras: el papel del rumen (Tesis Doctoral), Departament de Ciència Animal i dels aliments. Universitat Autònoma de Barcelona. Bellaterra.

Gaines, W.L. (1927). Measures of persistency of lactation. *J. Agric. Res.* 34:373-383.

Gaullier JM, Breven G, Blankson H. y Gudmundsen O. (2002). Clinical trial results support a preference for using ALC preparations enriched with two isomers rather than four isomers in human studies. *Lipids* 37:1019-1025.

García Muriana, F.J. (2002). Metabolismo de los ácidos grasos. En: Libro blanco de los omega-3. Los ácidos grasos poliinsaturados omega-3 y monoinsaturados tipo oleico y su papel en la salud, pp. 36-47. Mataix, J. y Gil, A. (eds.). Instituto Omega3. Puleva Food Granada. España.

Garnsworthy P.C. (1997). Fats in dairy cow diets. En *Recent Advances in Animal Nutrition*, pp 87-13, Cole, D.J.A. (eds.). Nottingham University Press, Nottingham, UK.

Givens, D.I., Cottrill, B.R., Davies, M., Lee, P.A., Mansbridge, R.J. y Moss, A.R. (2000). Sources of n-3 polyunsaturated fatty acids additional to fish oil for livestock diets-a review. *Nutr. Abst. and Rev.* 70: 1-32.

Glasser, F., Ferlay, A., Doreau, M., Schmidely, P., Sauvant D. y Chilliard, Y. (2008a). Long-Chain Fatty Acid Metabolism in Dairy Cows: A Meta-Analysis of Milk Fatty Acid Yield in Relation to Duodenal Flows and De Novo Synthesis. *J. Dairy Sci.* 91: 2771-2785.

Glasser, F., Ferlay, A. y Chilliard, Y. (2008b). Oilseed Lipid Supplements and Fatty Acid Composition of Cow Milk: A Meta-Analysis. *J. Dairy Sci.* 91:4687-4703.

Goodman, M.G. y Weigle, W.O. (1980). Modulation of lymphocyte activation I. Inhibition by an oxidation product of arachidonic acid. *Am. J. Immunol.* 125:593-600.

Griinari, J.M., Dwyer, D.A., McGuire, M.A., Bauman, D.E., Palmquist, D.L., y Nurmela, K.V.V. (1998). Trans-octadenoic acids and milk fat depression in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 81:1251-1261.

Griinari J.M. y Bauman D.E. (1999). Biosíntesis of conjugated linoleic acid and it's incorporation into meat and milk ruminants, *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research vol 1*, 180-200. Yurawecz, M.P., Mossoba, M.M., Kramer, J.K.G., Pariza, M.W. and Nelson GJ (eds.). American Oil Chemist Society Press, Champaign. IL, USA.

Griinari, J. M., Corl, B. A., Lacy, S. H., Chouinard, P. Y., Nurmela, K. V. V. y Bauman, D. E. (2000). Conjugated Linoleic Acid Is Synthesized Endogenously in Lactating Dairy Cows by Δ^9 -Desaturase. *J. Nutr.* 130:2285-2291.

Grummer, R.R., Hatfield, M.L., y Dentine, M.R. (1990). Acceptability of fat supplementents in four dairy herds. *J. Dairy Sci.* 73: 852-857.

Grummer R.R. (1991). Effect of feed on the composition of milk fat. *J. Dairy Sci.* 74 :3244.

Ha, Y.L., Grimm, N.K. y Pariza, M.W. (1987). Anticarcinogens from fried ground beef: Heat altered derivates of linoleic acid. *Carcinogenesis* 8: 1881-1887.

Harfoot, C.G. y Hazlewood, G.P. (1988). Lipid metabolism in the rumen. In the *Rumen Microbial Ecosystem*, pp. 285-322. Hobson, P.N. (ed.). Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, The Netherlands.

Harfoot, C. G. y G. P. Hazlewood. (1997). Lipid metabolism in the rumen. En *The Rumen Microbial Ecosystem*. 2nd ed., p 382. Hobson, P. N. y Stewart, C. S. (eds.) Blackie Academic & Professional, New York.

Harvatine, K.J., Boisclair, Y.R. y Bauman, D.E. (2009). Recent advances in the regulation of milk fat synthesis. *Animal.* 3:40-54.

Henderson, L., Gregory, J. y Irving, K. (2003). The National Diet and Nutrition Survey: Adults Aged 19-64 years, Volume 2: Energy, Protein, Carbohydrate, Fat and Alcohol Intake. London, HMSO.

Hinckley, T., Clark, R.M., Bushmich, S.L. y Milvae, R.A. (1996). Long chain polyunsaturated fatty acids and bovine luteal cell function. *Biol. Reprod.* 55 (2): 445-449.

Hopper L., Ness A., Higgins J.P., Moore T. y Ebrahim S. (1999). GISSI Prevenzione trial. *Lancet.* 354:447-455.

Huang, Y., Schoonmaker, J.P., Bradford, B.J. y Beitz, D.C. (2008). Response of Milk Fatty Acid Composition to Dietary Supplementation of Soy Oil, Conjugated Linoleic Acid, or Both. *J. Dairy Sci.* 91: 260-270.

Hunter, J.E. y Applewhite, T.H. (1991). Reassessment of trans fatty acid availability in the U.S. diet. *Am. J. Clin. Nutr.* 54: 363-369.

IDF. (2000). International IDF standard 141c:2000. Determination of milk fat, protein and lactose content. Guidance on the operation of mid-infrared instruments. International Dairy Federation, Brussels, Belgium.

INRA (2007). Alimentation des bovins, ovins et caprins. Besoins des animaux-valeurs des aliments. Éditions Quae, Versailles Cedex.

Ikwuegbu, O. A., y Sutton, J.D. (1982). The effect of varying the amount of linseed oil supplementation on rumen metabolism in sheep. *Br. J. Nutr.* 48:365-375.

Ip, C., S.F. Chin, J. A. Scimeca y M. W. Pariza. (1991). Mammary cancer prevention by conjugated dienoic derivative of linoleic acid. *Cancer Res.* 51:6118-6124.

Jahreis, G., Fritsche, J., Mockel, P., Schbne, F., Moller, U. y Steinhart, H. (1999). The potential anticarcinogenic conjugated linoleic acid, cis-9,trans-11 C18-2 in milk of different species: cow, goat, ewe, sow, mare, woman. *Nutr. Res.* 19 (10): 1541-1549.

Jeffcoat R. y James A. T. (1978). The control of stearoyl-CoA desaturase by dietary linoleic acid. *FEBS Lett.* 85:114–118.

Jenkins, T.C. y Palmquist, D.L. (1984). Effects of fatty acids or calcium soaps on rumen and total nutrient digestibility of dairy rations. *J. Dairy Sci.* 67:978-986.

Jenkins, T.C. (1993). Lipid metabolism in the rumen. *J Dairy Sci.* 67:978-986.

Jenkins, T.C. (1994). Feeding fat to dairy cattle, pp. 100-109 *En Proceedings of the Dairy Herd Management Conference, University of Georgia, Athens, CA.*

Jenkins, T.C. (1998). Fatty acid composition of milk from Holstein cows fed oleamide or high-oleic canola oil. *J. Dairy Sci.* 81:794–800.

Jenkins, T.C. y McGuire, M.A. (2006). Mayor advances in Nutrition: Impact on milk composition. *J. Dairy Sci.* 89, 1302-1310.

Jenkins, T. C., y Bridges, Jr. W. C. (2007). Protection of fatty acids against ruminal biohydrogenation in cattle. *J. Dairy Sci.* 90, 4361-4367.

Kadegowda A.K.G., Piperova, L.S. y Erdman, R.A. (2008). Principal component and multivariate analysis of milk long-chain fatty acid composition during diet-induced milk fat depression. *J. Dairy Sci.*, 91:749-759.

Kaylegain, K.E. y Lindsay, R.C. (1995). *Handboock of Milk Fat Fractionation Technology and Applications*, AOCS Press, Champaign, IL.

Kelsey, J.A., Corl, B.A., Collier, R.J. y Bauman, D.E. (2003). The Effect of Breed, Parity, and Stage of Lactation on Conjugated Linoleic Acid (CLA) in Milk Fat from Dairy Cows *J. Dairy Sci.* 86:2588-2597.

Kelly, M. L., Berry, J. R., Dwyer, D. A., Griinari, JM., Chouinard, P. Y. y Van Amburgh, M. E. (1998). Dietary fatty acid sources affect conjugated linoleic acid concentrations in milk from lactating dairy cows. *J. Nutr.* 128: 881–885.

Kennelly, J.J. (1996). The fatty acid composition of milk fat as influenced by feeding oilseeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* 60:137-152.

Kim, E.J., Huws, S.A., Lee, M.R.F., Wood, J.D., Muetzel, S.M., Wallace, R.J., y Scollan, N.D. (2008). Fish Oil Increases the Duodenal Flow of Long Chain Polyunsaturated Fatty Acids and *trans*-11 18:1 and Decreases 18:0 in Steers via Changes in the Rumen Bacterial Community. *J. Nutr.* 138: 889-896.

Kindahl, H., Odensvik, K., Aiumlamai, S., y Fredriksson, G. (1992). Utero-ovarian relationship during the bovine post-partum period. *Anim. Reprod. Sci.*, 28, 363-369.

Kouba, M. y Mourot, J. (2010). A review of nutritional effects on fat composition of animal products with special emphasis on n-3 polyunsaturated fatty acids. *Biochimie* 93: 13-17.

Kramer, J.K.G., Parodi, P.W., Jensen, R.G., Mossoba, M.M., Yurawecz, M.P. y Adlof, R.O. (1998). Rumenic acid: a proposed common name for the major conjugated linoleic acid isomer found in natural products. *Lipids* 33: 835.

Kremer, J.M. (1996). Effects of modulation of inflammatory and immune parameters in patients with rheumatic and inflammatory disease receiving dietary supplementation of n-3 and n-6 fatty acids. *Lipids* 31: S243-247.

Kromhout, D., Bosschieter, E.B., y De Lezenne Coulander, C. (1985). The inverse relationship between fish consumption and 20-year mortality from coronary hearth disease. *N. Engl. Med.* 312: 1205-1209.

Lammoglia, M.A., Willard, S.T., Hallford, D.M., y Randel, R.D. (1997). Effects of dietary fat on follicular development and circulating concentrations of lipids, insulin, progesterone, estradiol-17b, 13,14-dihydro-15-keto-prostaglandin F2a, and growth hormone in estrous cyclic brahman cows. *J. Anim. Sci* 75: 1591.

Lawrence, R. y Sorrel, T. (1993). Eicosapentaenoic acid in cyst fibrosis: evidence of a pathogenetic rol for leukotriene B4. *Lancet* 342, 465-469.

Lee, K.N., Kritchevsky, D., y Pariza, M.W. (1994). Conjugated linoleic acid and atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis* 108:19-25.

Lee, M.R.F., Tweed, J.K.S., Moloney, A.P. y Scollan, N.D. (2005). The effect of fish oil supplementation on rumen metabolism and the biohydrogenation of unsaturated fatty acids in beef steers given diets containing sunflower oil. *Anim. Sci.* 80: 361-367.

Lee, M.R.F., Tweed, J.K.S., Dewhurst, R.J. y Scollan, N.D. (2006). Effect of forage: concentrate ratio on ruminal metabolism and duodenal flow of fatty acids in beef steers. *J. Anim. Sci.*, 82, 31-40.

Lin, J., Zhang, S. M., Cook, N. C. R., Lee, I.-M. y Buring, J. E. (2004). Dietary fat and fatty acids and risk of colorectal cancer in women. *Am. J. Epidemiol.* 160(10): 1011–1022.

Lock, A. L. y Garnsworthy, P. C. (2002). Independent effects of dietary linoleic and linolenic fatty acids on the conjugated linoleic acid content of cows' milk. *Animal Sci.* 74: 163-176.

Lock, A.L. y Bauman, E.D. (2004). Modifying milk fat composition of dairy cows to enhance fatty acids beneficial to human health. *Lipids*, 39: 1197-1206.

Lock, A. L., Corl, B. A., Barbano, D. M., Bauman, D. E., y Ip, C. (2004). The anticarcinogenic effect of trans-11 18:1 is dependent on its conversion to cis-9, trans-11 CLA by D9-desaturase in rats. *J. Nutr.* 134: 2698–2704.

Lock, A. L., Bauman, D. E. y Garnsworthy, P. C. (2005). Short communication: Effect of production variables on the cis-9,trans-11 conjugated linoleic acid content of cows' milk. *J. Dairy Sci.* 88: 2714–2717.

Loor, J.J., Ferlay, A., Ollier, A., Doreau y Chilliard, Y. (2005). Relationship Among *Trans* and Conjugated Fatty Acids and Bovine Milk Fat Yield Due to Dietary Concentrate and Linseed Oil. *J. Dairy Sci.* 88: 726-740.

Lucy, M.C., Staples, R.C. y Thatcher, W. W. (1993). Ovarian follicular populations in lactating dairy cows treated with recombinant bovine somatotropin or saline and fed diets differing in fat content and energy. *J. Dairy Sci.* 76:1014-1027

Maczulak, A.E., Dehority, B.A. y Palmquist, D.L. (1981). Effects of long chain fatty acids on growth of rumen bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 11:856-862.

Mandebvu, P., Ballard, C.S., Sniffen, C.J., Carter, M.P., Wolford, H.M., Sato, T., Yabuuchi, Y., Bolek, E. y Palmquist, D.L. (2003). Effect of feeding calcium salts of long-chain fatty acids, from palm fatty acid distillate or soybean oil, to high producing dairy cows on milk yield and composition, and on selected blood and reproductive parameters. *Anim. Feed Sci. and Tech.* 108:25-41.

Marshall, J.A., Hamman, R.F. y Baxter, J. (1991). High-fat, low-carbohydrate diet and the etiology of non-insulin-dependent diabetes mellitus: the San Luis Valley Diabetes Study. *Am. J. Epidemiol.* 134(6):590-603.

Mata, P., Alonso, R. y López-Farré, A. (1996). Effect of dietary fat saturation on LDL oxidation and monocyte adhesion to human endothelial cells in vitro. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 16:1347-1355.

Mata, P., Alonso, R. y Mata, N. (2002). Los omega-3 y omega-9 en la enfermedad cardiovascular. Libro Blanco de los omega-3: 5, 50-63. Mataix, J., y Gil, A. (eds.) Editorial Puleva Food Granada. España.

Mateos, G.G., Rebollar, P.G. y Medel, P. (1996). Utilización de grasas y productos lipídicos en alimentación animal: grasas puras y mezclas, pp. 1-21. XII Curso de Especialización FEDNA. Madrid. España.

Mattos, R., Staples, C.R., y Thatcher, W.W. (2000). Effects of dietary fatty acids on reproduction in ruminants. *Rev. Reprod.* 5:38-45.

Mattos, R., Staples C.R., Williams, J., y Amorcho, A. (2002). Uterine, Ovarian, and Production Responses of lactating dairy cows to increasing dietary concentrations of menhaden fish meal. *J. Dairy Sci.* 85:755-764.

Mattos, R., Guzeloglu, A, Badinga, L. Staples, C.R, y Thatcher, W.W. (2003). Polyunsaturated fatty acids and bovine interferon-tau modify phorbol ester-induced secretion of prostaglandine F2 and expression of prostaglandin endoperoxide synthase-2 and phospholipase A2 in bovine endometrial cells. *Biol. Repro.* 69:780-787.

Mattos, R., Staples, C.R., Arteche, A., Wiltbank, M.C., Diaz, F.J., Jenkins, T.C., y Thatcher, W.W. (2004). The effects of feeding fish oil on uterine secretion of PGF2, milk composition, and metabolic status of periparturient Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 87: 921-932.

McDonald, H.B. (2000). Conjugated Linoleic Acid and Disease Prevention: A Review of Current Knowledge. *J. Am. Coll. Nutr.* 19 (2): 111–118.

Mc Namara, S., Murphy, J.J., Rath, M., y O'Mara, F.P. (2003). Effects of different transition diets on energy balance, blood metabolites and reproductive performance in dairy cows. *Livest. Prod. Sci.* 84: 195-206.

Moate, P.J., Chalupa W., Boston, R.C. y Lean, I.J. (2008). Milk fatty acids II: prediction of the production of individual fatty acid in bovine milk. *J. Dairy Sci.* 91:1175-1188.

Mougiou, V., Matsakas, A., Petridou, A., Ring, S. y Sagredos A. (2001). Effect of supplementation with conjugated linoleic acid on human serum lipids and body fat. *J. Nutr. Biochem.* 12:585-594.

Murphy, J.J., McNeill, G.P., Connolly, J.F. y Gleeson, P.A. (1990). Effects on cow performance and milk fat composition of including full fat soyabeans and rapeseeds in the concentrate mixture for lactating dairy cows. *J. Dairy Res.* 57:295–306.

Murphy, J. J., Coakley, M. y Stanton, C. (2008). Supplementation of dairy cows with a fish oil containing supplement and sunflower oil to increase the CLA content of milk produced at pasture. *Livest. Prod. Sci.* 116: 332-337.

Murray, R.K., Mayes, P.A., Granner, D.K. y Rodwell, V.W. (2001). *Bioquímica de Harper*. Ed. El Manual Moderno. Santafé de Bogotá. Colombia.

Nacional Research Council. (1982). Committee on Diet, Nutrition and Cancer. National Academy Press, Washington, D.C.

Nacional Research Council. (1998). *Design Foods: Animal Product Options in the Marketplace*, National Academy Press, Washington, D.C.

Nacional Research Council. (1989). *Diet and Health: Implications for reducing chronic disease risk*. National Academy Press, Washington, D.C.

National Research Council. (2001). Nutrient Requirements of dairy cattle, Seventh Revised Edition, National Academy Press, Washington, D.C.

Nakamura, M.T. y Nara, T.Y. (2003). Essential fatty acid síntesis and its regulation in mammals. *Prostaglandins Leuk Essent Fatty Acids* 68: 145-150.

Navarro, F.J.R. (2007). Suplementación de la dieta con aceite de pescado rico en ácidos grasos poliinsaturados n-3. Estrategias a practicar para potenciar su consumo (Tesis Doctoral). Unidad de Nutrición Animal. Universidad de Granada. Granada.

Nettleton, J.A. (1991). N-3 fatty acids: comparison of plant and seafood source in human nutrition. *J. Am. Diet. Assoc.*, 91: 331-337.

Noone, E.J., Roche, H.M., Nugent, A.P., y Gibney, M.J. (2002). The effect of dietary supplementation using isomeric blends of conjugated linoleic acid on lipid metabolism in healthy human subjects. *Br. J. Nutr.* 88:243-251.

Offer, N.W., Marsden, M., Dixon J., Speake, B.K., y Thacker, F.E. (1999). Effect of dietary fat supplements on levels of n3 polyunsaturated fatty acids, trans acids and conjugated linoleic acid in bovine milk. *Anim. Sci.* 69: 613-625.

Ohajuruka, O.A., Wu, Z. y Palmquist, D.L. (1991). Ruminant metabolism, fiber, and protein digestion by lactating cows fed calcium soa por animal vegetable fat. *J. Dairy Sci.* 74, 2601-2609.

Onetti, S.G. y Grummer, R.R. (2004). Response of lactating cows to three supplemental fat sources as affected by forage in the diet and stage of lactation: A meta-analysis of literature. *Anim. Feed Sci. Technol.* 115:65-82.

Palmquist, D.L. y Jenkins, T.C. (1980). Fat in lactation rations: review. *J. Dairy Sci.* 63: 1-14.

Palmquist, D.L. (1984). Use of fats in diets for lactating dairy cows. Ch 18 en *Fats en Animal Nutrition*. Wiseman, J., (ed.). Butterworths, Londres, Inglaterra.

Palmquist, D.L. (1988). Effects of calcium salts of isoacids and palm fatty acid distillate on feed intake, rumen fermentation and milk yield in early lactation. *J. Dairy Sci.* 71 (Supl. 1):254.

Palmquist, D.L. (1990). Using fat strategically in dairy cattle rations. *Proceedings International Animal Nutrition Symposium.* 25 Sept. National Renderer's Association, pp. 24. Brussels, Belgium.

Palmquist, D.L., Beaulieu, A.D. y Barbano, D.M. (1993). Feed and animal factors influencing milk fat composition. *J. Dairy Sci.* 76: 1753–1771.

Palmquist, D.L. y Kinsey, D. (1994). Lipolysis and biohydrogenation of fish oil by ruminal microorganisms. *J. Dairy Sci.* 77 (1): 350.

Palmquist, D.L. (1996). Utilización de Lípidos en dietas de rumiantes, pp. 39-57. XII Curso de Especialización FEDNA. Madrid.

Palmquist, D.L. (2009). Omega-3 Fatty Acids in metabolism, Health, and Nutrition and for Modified Animal Product Foods. *PAS.* 25: 207-249.

Pantoja, J., Firkins, J.L. y Eastridge, M.L. (1996). Fatty acid digestibility and lactation performance by dairy cows fed fats varying in degree of saturation. *J. Dairy Sci.* 79: 429-437.

Pariza, M.W., Park, Y. y Cook, M.E. (2001). The biologically-active isomers of conjugated linoleic acid. *Prog. Lipid. Res.* 40: 283-298.

Pariza, M.W. (2004). Perspective on the safety and effectiveness of conjugated linoleic acid. *Am. J. Clin. Nutr.* 79 (6): 1132-1136.

Park, Y., Albright, K.J., Liu, W., Storkson, J.M., Cook, M.E. y Pariza, M.W. (1997). Effect of conjugated linoleic acid on body composition in mice. *Lipids* 32: 853-858.

Park, Y, Storkson, J.M., Albright, K.J., Liu, W. y Pariza, M.W. (1999). Evidence the trans-10, cis-12 isomer of conjugated linoleic acid induces body composition changes in mice. *Lipids* 34:235-241.

Park, Y., Storkson, J.M., Ntambi, J.M., Cook, M.E., Sih, C.J., y Pariza, M.W. (2000). Inhibition of hepatic stearyl-CoA desaturase activity by *trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid and its derivatives. *Biochim Biophys Acta*; 1486:285–92.

Perfield, J.W., Lock, A.L., Griinari, J.M., Saebo, A., Delmonte, P., Dwyer, D.A. y Bauman, D.E. (2007). *Trans*-9, *Cis*-11 conjugated linoleic acid reduces milk fat synthesis in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90:2211-2218.

Peterson, D. G., Kelsey, J. A. y Bauman, D. E. (2002). Analysis of variation in *cis*-9,*trans*-11 conjugated linoleic acid (CLA) in milk fat of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 85: 2164–2172.

Petit, H. V. (2003). Digestion, milk production, milk composition, and blood composition of dairy cows fed formaldehyde treated flaxseed or sunflower seed. *J. Dairy Sci.* 86:2637–2646.

Petit, H. V., Germiquet, C. y Lebel, D. (2004). Effect of feeding whole, unprocessed sunflower seeds and flaxseed on milk production, milk composition, and prostaglandin secretion in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 87:3889–3898.

Petit, H.V. y Twagiramungu, H. (2006). Conception Rate and reproductive function of dairy cows fed different fat sources. *Theriogenology.* 66:1316-1324.

Petit, H.V. (2010). Review: feed intake, milk production and milk composition of dairy cows fed flaxseed. *Can. J. Anim. Sci.* 90: 115-127.

Piperova, L.S., Sampugna, J., Teter, B.B., Kalscheur, K.F., Yurawecz, M.P., Ku, Y., Morehouse, K.M. y Erdman, R.A. (2002). Duodenal and milk *trans* octadecenoic acid and conjugated linoleic acid (CLA) isomers indicate that postabsorptive synthesis is the predominant source of *cis*-9- containing CLA in lactating cows. *J. Nutr.* 132, 1235–1241.

Pratoomyot, J., Srivilas, P. y Noiraksar, T. (2005). Fatty acids composition of 10 microalgal species. *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, 27: 1179-1187.

Pursley, J.R., Mee, M.O., Wiltbank, M.C. (1995). Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2a and GnRH, *Theriogenology* 44:915-923.

Rainer, L. y Heiss, C.J. (2004). Conjugated linoleic acid: health implications and effects on body composition. *J. Am. Diet Assoc.* 104: 963-968.

Ramirez, P.B. (2004). El ácido linoleico conjugado y su importancia en la dieta. *Agrofaz ISSN 1665-8892* 4 (1), 519-528.

Rego, O.A., Rosa, H.J.D., Paula, V., Portugal, P., Franco, T., Vouzela, C.M., Alfredo E.S. Borba, A.E.S. y Bessa, J.B. (2005). The effects of supplementation with sunflower and soybean oils on the fatty acid profile of milk fat from grazing dairy cows. *Anim. Res.* 54:17-24.

Ritzenthaler, K.L., McGuire, M.K., Roger, F., Shultz, T.D., Nairanjana D., y McGuire, M.A. (2001). Estimation of Conjugated Linoleic Acid Intake by Written Dietary Assessment Methodologies Underestimates Actual Intake Evaluated by Food Duplicate Methodology. *J. Nutr.*, 131:1548-1554.

Robinson, R.S., Pushpakumara, P.G.A., Cheng, Z., Peters, A.R., Abayasekara, D.R.E., y Wathes, D.C. (2002). Effects of dietary polyunsaturated fatty acids on ovarian and uterine function in lactating dairy cows. *Reproduction.* 124:119-131.

Saebo, A., Saebo, P.C., Griinari, J.M. y Shingfield, K.J. (2005). Effect of abomasal infusions of geometric isomers of 10,12 conjugated linoleic acid on milk fat synthesis in dairy cows. *Lipids*, 40:823-832.

Salinas, J., Ramírez, R.G., Domínguez, M.M., Reyes-Bernal, N., Trinidad-Lárraga, N., y Montaña, M.F. (2006). Effect of calcium soaps of tallow on growth performance and carcass characteristics of Pelibuey lambs. *Small Ruminant Res.* 66: 135-139.

Sanders, T.A. (2000). Polyunsaturated fatty acids in the food chain in Europe. *Am. J. Clin Nutr.* 71: 1765-1805.

Santos, J.E., Bilby, T.R., Thatcher, W.W., Staples, C.R. y Silvestre, F.T. (2008). Long chain fatty acids of diet as factors influencing reproduction in cattle. *Reprod. Domest. Anim.* 43: 23-30.

Schroeder, G.F., Gagliostro, G.A., Bargo, F., Delahoy, J.E., y Muller, D.L. (2004). Effects of fat supplementation on milk production and composition by dairy cows on pasture: a review. *Livest. Prod. Sci.* 86: 1-18.

Sessler, A.M. y Ntambi, J.M. (1998). Polyunsaturated fatty acids regulation of gene expression. *J. Nutr.* 128:923-926.

Silvestre, F.T., Carvalho, T.S.M., Crawford, P.C., Santos, J.E.P, Staples, C.R., Jenkins, T., y Thatcher, W.W. (2011). Effects of differential supplementation of fatty acids during the peripartum and breeding periods of Holstein cows: II. Neutrophil fatty acids and function, and acute phase proteins. *J. Dairy Sci.* 94:2285-2311.

Shingfield, K. J., Ahvenjarvi, S., Toivonen, V., Arola, A., Nurmela, K. V. V. y Huhtanen, P. (2003). Effect of dietary fish oil on biohydrogenation of fatty acids and milk fatty acid content in cows. *Anim. Sci.* 77: 165–179.

Shingfield, K. J., Reynolds, C. K., Hervas, G., Griinari, J. M., Grandison, A. S. y Beever, D. E. (2006). Examination of the persistency of milk fatty acid composition responses to fish oil and sunflower oil in the diet of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 89: 714–732.

Shingfield, K. J., Ahvenjarvi, S., Toivonen, V., Vanhatalo, A. y Huhtanen, P. (2007). Transfer of absorbed cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid into milk is biologically more efficient than endogenous synthesis from absorbed vaccenic acid in lactating cows. *J. Nutr.* 137:1154–1160.

Simopoulos, A.P. (2002). The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomed. Pharmacother.* 56 (8): 365-379.

Sklan, D., Ashkenazi, R., Braun, A., Devorin, A., y Tabori, K. (1992). Fatty acids, calcium soaps of fatty acids, and cottonseeds fed to high yielding cows. *J. Dairy Sci.* 75: 2463-2472.

Smedman, A. y Vessby, B. (2001). Conjugated linoleic acid supplementation in humans– metabolic effects. *J. Nutr.* 36:773-781.

Solomon, R., Chase, L.E., Ben-Ghedalia, D., y Bauman, D.E. (2000). The effect of nonstructural carbohydrate and addition of full fat extruded soybeans on the

concentration of conjugated linoleic acid in the milk fat of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 83: 1322-1329.

Spicer, L. J., Alpizar, E., y Echternkamp, S. E. (1993). Effects of insulin, insulin-like growth factor I, and gonadotropins on bovine granulosa cell proliferation, progesterone production, estradiol production, and(or) insulin-like growth factor I production in Vitro. *J. Anim. Sci.* 71, 1232–1241.

Stanton, C., Lawless, F., Kjellmer, G., Harrington, D., Devery, R. y Connolly, J. F. (1997). Dietary influences on bovine milk cis-9,trans-11-conjugated linoleic acid content. *J. Food Sci.* 62: 1083–1086.

Stanton, C., Murphy, J., McGrath, E. y Devery, R. (2003). Animal feeding strategies for conjugated linoleic acid enrichment of milk. En *Advances in conjugated linoleic acid research*, Vol. 2 (pp. 123–145). Se´be´dio, J.L., Christie, W. W. y Adlof, R. (Eds.). Champaign, IL, USA: AOAC Press.

Staples, C.R., Burke, J.M., y Thatcher, W.W. (1998). Symposium: optimizing energy nutrition for reproducing dairy cows. Influence of supplemental fats on reproductive tissues and performance of lactating cows. *J. Dairy Sci.* 81:856-871.

Staples, C.R. y Thatcher, W.W. (2006). Effects of fatty acids on reproduction in dairy cows. En *Recent Advances in Animal Nutrition*, pp 229-256. Garnsworthy, P.C. y Wiseman, J. (eds). Nottingham University Pres, Nottingham, U.K.

Stubbs, C.D. y Smith, A.D. (1984). The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty acid composition in relation to membrane fluidity and function. *Biochim. Biophys. Acta.* 779:89-137.

Sukhija, P. S. y Palmquist, D. L. (1988). Rapid method for determination of total fatty acid content and composition of feedstuffs and feces. *J. Agric. Food Chem.* 36:1202–1206.

Sutton, J. D., Knight, R., McAllan, A. B. and Smith, R. H. (1983). Digestion and synthesis in the rumen of sheep given diets supplemented with free and protected oils. *Br. J. Nutr.* 49: 419–432.

Swinburn, B.A., Boyce, V.L., Bergman, R.N., Howard, B.V. y Bogardus, C. (1991). Deterioration in carbohydrate metabolism and lipoprotein changes is induced by modern, high fat diet in Pima Indians and Caucasians. *J. Clin. Endocrin. Metab.* 1991. 73:1 156-165.

Tanaka, K. (2005). Occurrence of conjugated linoleic acid in ruminant products and its physiological functions. *J. Anim. Sci.*, 76, 291-303.

Taylor, V.J., Cheng, Z., Pushpakumara, P.G.A., Wathes, D.C. y Beever, D.E. (2004). Relationships between the plasma concentrations of insulin-like growth factor-I in dairy cows and their fertility and milk yield. *Vet. Rec.* 155:583-588.

Thangavelu, G., Colazo, M.G., Ambrose, D.J., Oba, M., Okine, E.K., y Dyck, M.K. (2007). Diets enriched in unsaturated fatty acids enhance early embryonic development in lactating Holstein cows. *Theriogenology* 68: 949-957

Terry, P.D., Rohan, T.E. y Wolk, A. (2003). Intakes of fish and marine fatty acids and the risks of cancers of the breast and prostate and of other hormone-related cancers: a review of the epidemiologic evidence. *Am. J. Clin. Nutr.* 77:532-543.

Tesfa, A. T., Tuori, M. y Syrjälä-Qvist, L. (1991). High rapeseed oil feeding to lactating dairy cows and its effect on milk yield and composition in ruminants. *J. Dairy Sci.* 49:65-81.

Thom, E., Wadstein, J. y Gudmundson, O. (2001). Conjugated linoleic acid reduces body fat in healthy exercising humans. *J. Int. Med. Res.* 29:392-396.

Tricon, S., Burdge, G.C., Kew, S., Banerjee, T., Russell, J.J., Jones, E.L., Grimble, R.F., Williams, C.M., Yaqoob, P. y Calder, P.C. (2004). Opposing effects of cis-9, trans-11 and trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid on blood lipids in healthy humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 80:614-620.

Turpeinen, A., Mutanen, M., Aro, A., Salminen, I., Basu, S., Palmquist, D. y Griinari, J.M. (2002). Bioconversion of vaccenic acid to conjugated linoleic acid in humans. *Am J. Clin. Nutr.* 76: 504-510.

Ueda, K., Ferlay, A., Chabrot, J., Looor , J.J. y Chilliard, Y. (2003). Effect of linseed oil supplementation on ruminal digestion in dairy cows fed diets with different forage:concentrate. *J. Dairy Sci.* 86: 3999-4007.

Ulbricht, T. L. V., y Southgate, D. A. T. (1991). Coronary heart disease: Seven dietary factors. *Lancet* 338: 985-992.

Van Nevel, C. y Demeyer, D. (1995). Feed additives and other interventions for decreasing methane emissions. *Biotechnology in Animal Feeds and Animal Feeding. Germany.* R. J. Wallace, and A. Chesson (Eds.). VCH, Pages 329-349.

Van Nevel, C. y Demeyer, D. (1996). Control of rumen methanogenesis. *Environ. Monit. Assess.* 42: 73-97.

Van Soest, P. J., Robertson, J. B. y Lewis, B. A. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74: 3583-3597.

Velazquez, M.A., Spicer, L.J. y Wathes, D.C. (2008). The role of endocrine insulin-like growth factor-I (IGF-1) in female bovine reproduction. *Domest. Anim. Endocrin.* 35: 325-342.

Von Schacky, C., Baumann, K. y Angerer, P. (2001). The effect of n-3 fatty acids on coronary atherosclerosis: results from SCIMO, an angiographic study, background and implications. *Lipids*, 36: 99S-102S.

Walsh, R.B., Walton, J.S., Kelton, D.F., LeBlanc, S.J., Leslie, K.E. y Duffield, T.F. (2007). The effect of Subclinical Ketosis in Early Lactation on Reproductive Performance of Postpartum Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 90:2788-2796.

Ward, A.T., Wittenberg, K.M. y Przybylski, R. (2002). Bovine Milk Fatty Acid Profiles Produced by Feeding Diets Containing Solin, Flax and Canola. *J. Dairy Sci.* 85:1191-1196.

Weiss, W. P. y Wyatt, D. J. (2004). Digestible energy values of diets with different fat supplements when fed to lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 87: 1446-1454.

Whitlock, L.A., Schingoethe, D.J., AbuGhazaleh, A.A., Hippen, A.R., y Kalscheur, K.R. (2006). Milk production and composition from cows fed small amounts of fish oil and extruded soybean. *J. Dairy Sci.* 89:3972-3980.

Wijesundera, Ch., Shen, Z., Wales, W.J. y Dalley, D.E. (2003). Effect of cereal grain and fibre supplements on the fatty acid composition of milk fat of grazing dairy cows in early lactation. *J. Dairy Sci.*, 70: 257-265.

Wonsil, B.J., Herbein, J.H. y Watkins, B.A. (1994). Dietary and ruminally derived trans 18:1 fatty acids alter bovine milk lipids. *J. Nutr.* 124: 556-565.

Woods, V.B. y Fearson, A.M. (2009). Dietary sources of unsaturated fatty acids for animals and their transfer into meat, milk and eggs: A review. *Livest. Prod. Sci.* 126:1-20.

Wu, Z., Huber, J.T., Sleiman, F.T., Simas, J.M., Chen, K.H., Chan, S.C., y Fontes, C. (1993). Effect of three supplemental fat sources on lactation and digestion in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 76: 3562-3570.

Wu, Z. y Huber, J.T. (1994). Relationship between dietary fat supplementation and milk protein concentration in lactating cows: A review. *Livest. Prod. Sci.* 39:141-155.

Zambell, K.L., Keim, N.L., Van Loan, M.D., Gale, B. y Benito, P. (2000). Conjugated linoleic acid supplementation in humans: effects on body composition and energy expenditure. *Lipids* 35:777-782.

Zheng, H.C., Liu, J.X., Yao, J.H., Yuan, Q., Ye, H.W., Ye, J.A., y Wu, Y.M. (2005). Effects of Dietary Sources of Vegetable Oils on Performance of High-Yielding Lactating Cows and Conjugated Linoleic Acids in Milk. *J. Dairy Sci.* 88 (6): 2037-2042.

