



Universidad Nacional del Litoral

Facultad de Ciencias Veterinarias

Área de Investigación en Producción Animal – Instituto de Investigación de la Cadena Láctea (IdICaL). Estación Experimental Agropecuaria Rafaela. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA).

Tesis presentada para optar por el grado académico de

Doctor en Ciencias Veterinarias

Efectos de la suplementación dietaria con derivados de ácidos grasos poliinsaturados omega-3 sobre el metabolismo y la función reproductiva de vacas lecheras en lactancia temprana

Autor: *Med. Vet. Pablo Matías Roskopf*

Director: *Dr. Eloy Eduardo Salado*

Codirector: *Dr. Gustavo Juan Hein*

“Si he visto más lejos, es porque estoy sentado sobre los hombros de gigantes”

(Isaac Newton)

Agradecimientos

- *A mis viejos, Raquel y Miguel, por el ejemplo.*
- *A mis hermanos, por su apoyo y comprensión.*
- *A mis sobrinas Cata, Mathi y Adelaida, por el cariño sincero, sus ocurrencias y la sencilla sabiduría que solo la niñez sabe enseñar.*
- *A mi ahijado Juani, por su afecto y por recordarme el valor de guiar con el ejemplo.*
- *A Eloy, por las posibilidades, la exigencia y la compañía.*
- *A Gustavo, por la templanza, el optimismo y la compañía.*
- *A Emma Angeli, por el acompañamiento y la guía.*
- *Al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por la beca que me permitió realizar este posgrado.*
- *A la Estación Experimental de Rafaela (INTA) y el Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (CONICET), por los medios brindados para el desarrollo de este trabajo de tesis.*
- *A la Facultad, por la posibilidad de vivirla como estudiante de grado y posgrado, y como docente.*
- *A todos los estudiantes (hoy algunos colegas) que realizaron una pasantía colaborando en este ensayo: Lucas, Mayka, Nadia, Antonella, Micaela, Salvador, Felipe, Juan, Rodrigo y Franco.*
- *A Martín Maciel, por la absoluta predisposición.*
- *A Gabriel Schmidt y Darío Arias, por su colaboración en el manejo de los animales.*
- *Al personal de campo, tamberos y personal de la Cooperadora del INTA Rafaela.*
- *A Ale Cuatrín y Chelo Signorini, por la ayuda estadística.*
- *A Gerardo Gagliostro y Mónica Gaggiotti, por sus valiosos aportes.*
- *A todos y cada uno de mis compañeros del Área de Investigación en Producción Animal del INTA Rafaela.*
- *A mis familiares, amigos y muchas personas muy especiales que acompañaron y acompañan, por perdonar ausencias y alentarme a seguir.*

Índice general

| | |
|--|------|
| Índice de Figuras | v |
| Índice de Tablas..... | vii |
| Abreviaturas..... | viii |
| Resumen | x |
| Abstract..... | xi |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 1.1. Revisión bibliográfica..... | 6 |
| 1.1.1. Lípidos en la nutrición de vacas lecheras..... | 6 |
| 1.1.2. Clasificación de los lípidos. | 7 |
| 1.1.3. Fuentes de lípidos en las dietas de rumiantes..... | 8 |
| 1.1.4. Digestión y metabolismo ruminal de los lípidos..... | 10 |
| 1.1.4.1 Protección ruminal de los lípidos (grasas pasantes)..... | 11 |
| 1.1.5. Digestión post-ruminal de los AG..... | 13 |
| 1.1.6. Metabolismo post-absortivo de los AG..... | 14 |
| 1.2. Suplementación con AG durante el PT..... | 17 |
| 2. OBJETIVOS..... | 19 |
| 2.1. Objetivo general..... | 19 |
| 2.2. Objetivos específicos. | 19 |
| CAPITULO 1. Efectos de la suplementación de derivados de ácidos grasos ω -3 sobre variables productivas y el desempeño reproductivo de vacas lecheras en inicio de lactancia..... | 20 |
| 1. 1. INTRODUCCIÓN..... | 21 |
| 1.1.1. Balance energético durante el PT..... | 21 |
| 1.1.2. Efectos de la suplementación con AG ω -3 sobre el CMS en vacas lecheras..... | 23 |
| 1.1.3. Efectos de la suplementación con AG ω -3 sobre la producción y composición de leche..... | 24 |

| | |
|--|----|
| 1.1.3.1. Influencia de la suplementación lipídica sobre la GB. | 25 |
| 1.1.3.2. Perfil de AG en la leche y salud humana..... | 26 |
| 1.1.3.3. Influencia de la suplementación lipídica sobre la proteína láctea. | 29 |
| 1.1.4. Relación entre la suplementación con AG ω -3 y la función reproductiva en el ganado lechero..... | 30 |
| 1.1.4.1. Reanudación del ciclo estral postparto. | 31 |
| 1.1.4.2. Tamaño del Folículo Preovulatorio. | 32 |
| 1.1.4.3. Función del Cuerpo Lúteo y Prostaglandinas..... | 33 |
| 1.1.4.4. Desarrollo embrionario..... | 34 |
| 1. 2. MATERIALES Y MÉTODOS | 37 |
| 1.2.1 Animales..... | 37 |
| 1.2.2. Alimentación. | 37 |
| 1.2.3. Manejo reproductivo. | 38 |
| 1.2.4. Muestreos | 39 |
| 1.2.4.1. Dieta y alimentos que la componen..... | 39 |
| 1.2.4.2. Producción y composición de leche. | 40 |
| 1.2.4.3. Consumo de MS y energía..... | 41 |
| 1.2.4.4. Balance energético..... | 41 |
| 1.2.4.5. PC y CC..... | 42 |
| 1.2.4.6. Parámetros reproductivos. | 42 |
| 1.2.5. Análisis estadístico..... | 43 |
| 1. 3. RESULTADOS | 45 |
| 1.3.1. Calidad de dieta..... | 45 |
| 1.3.2. Consumo de MS y energía. | 47 |
| 1.3.3. Producción y composición de leche..... | 48 |
| 1.3.4. Eficiencia de conversión. | 49 |
| 1.3.5. Perfil de AG de la leche. | 50 |

| | |
|--|----|
| 1.3.6. Peso y condición corporal. | 52 |
| 1.3.7. Parámetros reproductivos. | 53 |
| 1. 4. DISCUSIÓN. | 56 |
| 1.4.1. Respuesta productiva a la suplementación con derivados de AG ω -3 protegidos de la biohidrogenación ruminal. | 56 |
| 1.4.2. Respuesta reproductiva a la suplementación con derivados de AG ω -3 protegidos de la biohidrogenación ruminal. | 58 |
| CAPITULO 2. Efectos de la suplementación con derivados de ácidos grasos ω -3 sobre parámetros endócrinos y el metabolismo hepático de vacas lecheras en inicio de lactancia. | 61 |
| 2. 1. INTRODUCCIÓN. | 62 |
| 2.1.1. Movilización de NEFAs. | 63 |
| 2.1.1.1. Oxidación de AG. | 63 |
| 2.1.1.2. Cetogénesis. | 65 |
| 2.1.1.3. Reesterificación de AG para la síntesis de Tg. | 67 |
| 2.1.1.4. Regulación del metabolismo lipídico. | 67 |
| 2.1.1.5. Receptores PPAR: funciones metabólicas y mecanismos de activación. | 68 |
| 2.1.2. AGPI ω -3 como moduladores del metabolismo energético y hormonal. | 70 |
| 2.1.2.1. Metabolismo endócrino. | 70 |
| 2.1.2.2. Mecanismos moleculares del efecto hepático de los AG ω -3 en vacas lecheras. | 71 |
| 2. 2. MATERIALES Y MÉTODOS. | 74 |
| 2.2.1 Animales, manejo y alimentación. | 74 |
| 2.2.2. Muestreos y procesamiento de muestras. | 75 |
| 2.2.2.1. Extracción de sangre y obtención de plasma. | 75 |
| 2.2.2.2. Cuantificación de metabolitos y hormonas. | 75 |
| 2.2.2.3. Extracción de biopsias hepáticas. | 76 |
| 2.2.2.4. Procesamiento de muestras hepáticas. | 76 |

| | |
|--|-----|
| 2.2.2.5. Determinación del contenido de Tg hepáticos. | 76 |
| 2.2.2.6. Determinación de la abundancia proteica de enzimas hepáticas. | 76 |
| 2.2.3. Análisis estadístico. | 78 |
| 2. 3. RESULTADOS. | 79 |
| 2.3.1. Glucosa, urea y colesterol plasmáticos. | 79 |
| 2.3.2. Comportamiento de la insulina e IGF-1. | 80 |
| 2.3.3. Metabolismo energético: NEFAs y β HB. | 82 |
| 2.3.4. Tg y proteínas hepáticas relacionadas con el metabolismo lipídico. | 83 |
| 2.4. DISCUSIÓN. | 86 |
| 3. DISCUSIÓN GENERAL. | 90 |
| 4. CONCLUSIONES. | 94 |
| 5. BIBLIOGRAFÍA. | 96 |
| 6. ANEXO 1. | 121 |

Índice de Figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1: Representación esquemática del metabolismo de los lípidos en el rumen: lipólisis y biohidrogenación..... | 10 |
| Figura 2: Representación esquemática del metabolismo de los AGPI. | 15 |
| Figura 3: Representación de los principales efectos de la suplementación con AGPI ω -3 sobre el metabolismo, producción y reproducción en vacas lecheras. | 18 |
| Figura 4: Rutas metabólicas de la GB en vacas lecheras a partir de AL y ALA. | 28 |
| Figura 5: Diagrama del protocolo PSov utilizado para la sincronización de la ovulación. | 39 |
| Figura 6: Producción de leche en vacas lecheras suplementadas (O-3) o no (C) con sales cálcicas de AG ω -3. | 49 |
| Figura 7: Evolución del PC (a) y CC (b) en vacas lecheras suplementadas (O-3) o no (C) con sales cálcicas de AG ω -3. | 53 |
| Figura 8: Concentración de progesterona plasmática en vacas lecheras suplementadas (O-3) o no (C) con sales cálcicas de AG ω -3. | 55 |
| Figura 9: Función de la carnitina en el transporte de ácidos grasos de cadena larga a través de la membrana mitocondrial interna..... | 64 |
| Figura 10: Esquema representativo de la β -oxidación mitocondrial de AG. | 65 |
| Figura 11: Esquema representativo de la cetogénesis. | 66 |
| Figura 12: Activación transcripcional de PPAR. | 69 |
| Figura 13: Concentraciones plasmáticas de glucosa en vacas lecheras suplementadas (O-3) o no (C) con sales cálcicas de AG ω -3..... | 79 |
| Figura 14: Concentraciones plasmáticas de colesterol en vacas lecheras suplementadas (O-3) o no (C) con sales cálcicas de AG ω -3. | 80 |
| Figura 15: Concentraciones plasmáticas de insulina en vacas lecheras suplementadas (O-3) o no (C) con sales cálcicas de AG ω -3..... | 81 |
| Figura 16: Concentraciones plasmáticas de IGF-1 en vacas lecheras suplementadas (O-3) o no (C) con sales cálcicas de AG ω -3..... | 81 |
| Figura 17: Concentraciones plasmáticas NEFAs en vacas lecheras suplementadas (O-3) o no (C) con sales cálcicas de AG ω -3. | 82 |
| Figura 18: Concentraciones de β HB en vacas lecheras suplementadas (O-3) o no (C) con sales cálcicas de AG ω -3. | 83 |

Figura 19: Inmunomarcación representativa de la expresión proteica de enzimas que intervienen en la β -oxidación (ACOX1 y CPT1), la reesterificación (DGAT1), la cetogénesis (HMG-CoA sintasa) y su regulador génico (PPAR α) en vacas lecheras suplementadas (O-3) o no (C) con sales cálcicas de AG ω -3..... 84

Índice de Tablas

| | |
|---|----|
| Tabla 1: Composición química y digestibilidad de la PMR preparto, PMR de lactancia, balanceado de lactancia y reemplazo isoenergético (maíz molido) ofrecido a vacas lecheras suplementadas (O-3) o no (C) con sales cálcicas de AG ω -3..... | 45 |
| Tabla 2: CMS, energía y balance energético durante la lactancia en vacas lecheras suplementadas (O-3) o no (C) con sales cálcicas de AG ω -3..... | 47 |
| Tabla 3: Producción y composición de leche en vacas lecheras suplementadas (O-3) o no (C) con sales cálcicas de AG ω -3. | 48 |
| Tabla 4: Eficiencia de conversión en vacas lecheras suplementadas (O-3) o no (C) con sales cálcicas de AG ω -3. | 50 |
| Tabla 5: Perfil de AG de la leche en vacas lecheras suplementadas (O3) o no (C) con sales cálcicas de AG ω -3. | 51 |
| Tabla 6: Parámetros reproductivos en vacas lecheras suplementadas (O3) o no (C) con sales cálcicas de AG ω -3. | 54 |
| Tabla 7: Anticuerpos y condiciones utilizados en la técnica de Western blot. | 77 |
| Tabla 8: Concentración de Tg hepáticos y abundancia proteica de enzimas que intervienen en la β -oxidación (ACOX1 y CPT1), la reesterificación (DGAT1), la cetogénesis (HMG-CoA sintasa) y su regulador génico (PPAR α) en vacas lecheras suplementadas (O-3) o no (C) con sales cálcicas de AG ω -3..... | 85 |

Abreviaturas

- AA** = ácido araquidónico (C20:4 ω -6)
ACOX1 = acil-CoA oxidasa 1
AG = ácidos grasos
AGI = ácidos grasos insaturados
AGMI = ácidos grasos monoinsaturados
AGPI = ácidos grasos poliinsaturados
AGS = ácidos grasos saturados
AGV = ácidos grasos volátiles
AL = ácido linoleico (C18:2 ω -6)
ALA = ácido α -linolénico (C18:3 ω -3)
AR = ácido ruménico
ATP = adenosín trifosfato
AV = ácido vaccénico
BEN = balance energético negativo
C = tratamiento Control
CC = condición corporal
CLA = ácido linoleico conjugado
CL = cuerpo lúteo
CMS = consumo de materia seca
COX1 / COX2 = ciclooxigenasa 1 y 2
CPT1 / CPT2 = carnitina-palmitoiltransferasa 1 y 2
DEL = días en leche
DGAT1 / DGAT2 = diacilglicerol aciltransferasa 1 y 2
DHA = ácido docosaheptaenoico (C22:6 ω -3)
DIVMS = digestibilidad *in vitro* de la materia seca
ED = energía digestible
EE = extracto etéreo
ENL = energía neta de lactancia
ENM = energía neta de mantenimiento
ENP = energía neta de preñez
EPA = ácido eicosapentaenoico (C20:5 ω -3)
FDA = fibra detergente ácida

FDN = fibra detergente neutra
GB = grasa butirosa
GH = hormona de crecimiento
GnRH = hormona liberadora de gonadotrofinas
HMGCoA sintasa = 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa
HOT = teoría de oxidación hepática
IA = inseminación artificial
IATF = inseminación artificial a tiempo fijo
IFN- τ = interferón-tau
IGF-1 = factor de crecimiento similar a la insulina 1
IL = interleuquina
LDA = lignina detergente ácida
LEC = leche energía corregida
LGC4% = leche corregida por grasa
LH = hormona luteinizante
LOX = lipooxigenasa
MS = materia seca
NEFAs = ácidos grasos no esterificados
NUL = nitrógeno ureico en leche
O-3 = tratamiento suplementado con ácidos grasos omega-3
PB = proteína bruta
PC = peso corporal
PGF $_{2\alpha}$ = prostaglandina F $_{2\alpha}$
PMR = ración parcial mezclada
PPAR = receptor activado por proliferadores de peroxisomas
PSOv = protocolo de sincronización de la ovulación
PT = proteína total
RXR = receptor retinoide X
Tg = triglicéridos
TNF α = factor de necrosis tumoral α
Trat = tratamiento
VLDL = lipoproteínas de muy baja densidad
 β HB = β -hidroxibutirato

Resumen

El inicio de lactancia constituye una etapa especialmente desafiante para las vacas lecheras. El repentino incremento en la demanda de nutrientes para la lactogénesis activa mecanismos que predisponen al desarrollo de enfermedades, comprometiendo la producción, reproducción y rentabilidad del sistema. Con el objetivo de evaluar estrategias que favorezcan la adaptación a esta etapa, se estudió el efecto de la suplementación con sales cálcicas de ácidos grasos poliinsaturados omega-3 (AGPI ω -3) sobre el desempeño productivo, metabólico y reproductivo de vacas Holstein desde el parto hasta las primeras quince semanas de lactancia. Treinta y seis vacas fueron asignadas a dos tratamientos: Control (C) o suplementado (O-3).

La suplementación no modificó el consumo total de materia seca ni la ingestión de energía, pero mejoró la producción de leche durante nueve de las catorce semanas analizadas, resultando en una mayor eficiencia de conversión en el tratamiento O-3. Aunque no se observaron diferencias en el peso, condición corporal o concentraciones plasmáticas de glucosa, insulina e IGF-1, las vacas O-3 mostraron una tendencia a mayores concentraciones de NEFAs y un menor balance energético, junto con una mayor abundancia de enzimas que asociadas a la oxidación y cetogénesis hepática. En el plano reproductivo, las vacas O-3 tendieron a presentar incrementos en las concentraciones de progesterona y una mayor proporción de vacas preñadas a 130 los días en leche.

En conjunto, estos resultados indicarían que la suplementación estratégica con AGPI ω -3 mejoraría la función hepática, productiva y reproductiva en vacas lecheras en inicio de lactancia.

Abstract

The onset of lactation represents an especially challenging stage for dairy cows. The sudden increase in nutrient requirements to support lactogenesis triggers physiological mechanisms that predispose animals to disease, thereby compromising production, reproduction, and overall system profitability. To evaluate strategies that may enhance early- adaptation to this phase, this study examined the effects of supplementing calcium salts of omega-3 polyunsaturated fatty acids (ω -3 PUFA) on productive, metabolic, and reproductive performance in Holstein cows from the prepartum period through the first fifteen weeks of lactation. Thirty-six cows were assigned to one of two treatments: Control (C) or omega-3 supplemented (O-3).

Supplementation did not alter total dry matter intake or energy intake, but it improved milk yield during nine of the fourteen weeks evaluated, resulting in greater feed conversion efficiency in the O-3 treatment. Although body weight, body condition score, and plasma concentrations of glucose, insulin, and IGF-1 did not differ between treatments, O-3 cows showed a tendency toward higher NEFA concentrations and a lower energy balance, along with greater abundance of hepatic enzymes involved in oxidation and ketogenesis. Regarding reproduction, O-3 cows tended to exhibit increases in progesterone concentrations and higher pregnancy rates by 130 days in milk.

Overall, these findings suggest that strategic supplementation with ω -3 PUFA may enhance hepatic function and improve productive and reproductive performance in early-lactation dairy cows.

1. INTRODUCCIÓN.

El inicio de lactancia supone un desafío fisiológico de gran magnitud para las vacas lecheras, ya que coincide con una brusca elevación en las demandas energéticas, una disminución en el consumo de materia seca (CMS) y una profunda reorganización metabólica y endocrina (Goff y Horst, 1997). Este proceso ocurre dentro del denominado período de transición (PT), que abarca aproximadamente tres semanas previas y tres semanas posteriores al parto, y es reconocido como la etapa más crítica del ciclo productivo de la vaca lechera (Drackley, 1999). En líneas generales, días previos al parto las demandas de energía se cuadruplican y el CMS disminuye entre un 20 y 40 % (Caixeta y Omontese, 2021). Aunque luego del parto el CMS aumenta de forma marcada, este incremento presumiblemente no sería suficiente para satisfacer las mayores demandas de nutrientes del inicio de lactancia (Pérez-Báez *et al.*, 2021). El pico de lactancia se alcanza generalmente entre las 4 y 6 semanas posparto, mientras que la máxima capacidad de CMS se observa entre las 8 y 10 semanas (Martens, 2023). Este desfase genera un balance energético negativo (BEN) que persiste al menos durante los primeros 50 días posparto (Sammad *et al.*, 2022).

En respuesta al BEN, el organismo activa mecanismos mediante los cuales el sistema endócrino orquesta cambios hormonales que priorizan la lactogénesis por sobre otras funciones fisiológicas (Bauman y Currie, 1980). En este contexto, las concentraciones plasmáticas de insulina y la sensibilidad de los tejidos extramamarios a la acción de la insulina, principalmente el adiposo y el muscular, disminuyen en paralelo con el CMS (Allen y Piantoni, 2013). Esta reducción en la respuesta insulínica forma parte de un proceso fisiológico de resistencia a la insulina que limita la captación de glucosa por los tejidos extramamarios, favoreciendo así su disponibilidad para la glándula mamaria. Este mecanismo, conocido como *homeorresis*, implica una redistribución de nutrientes y energía, asegurando la provisión de glucosa y favorece los procesos anabólicos en la glándula mamaria, a expensas de los tejidos periférico (Meikle *et al.*, 2013; Qiao *et al.*, 2024). Debe entenderse además desde un contexto evolutivo, donde la especie prioriza la producción de leche y el cuidado del ternero recién nacido, aún en condiciones de ingesta limitada (Martens, 2023).

La hipoglucemia inducida por la demanda de glucosa por parte de la glándula mamaria, estimula una rápida movilización de las reservas corporales, principalmente a

través de la lipólisis del tejido adiposo, liberando ácidos grasos no esterificados (NEFAs, del inglés non-esterified fatty acids) al torrente sanguíneo. Este proceso es regulado por un entorno hormonal caracterizado por altas concentraciones de hormona de crecimiento (GH, del inglés growth hormone) y bajos niveles de insulina, que promueve un estado catabólico. Durante este período, la disminución del número de receptores hepáticos de GH genera un fenómeno conocido como “*desacople somatotrófico*”, que reduce la síntesis hepática de factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1) y elimina la retroalimentación negativa sobre la secreción de GH por el hipotálamo (Meikle *et al.*, 2013). En contraste, en el tejido adiposo aumenta la expresión de receptores de GH, potenciando su respuesta lipolítica y, por ende, la liberación de NEFAs (Rico y Barrientos-Blanco, 2024).

El hígado desempeña un papel central en esta etapa, procesando los lípidos provenientes de la circulación mediante diversas rutas metabólicas (Loor *et al.*, 2013; Angeli *et al.*, 2019a). Dentro del hepatocito, los NEFAs pueden oxidarse para generar trifosfato de adenosina (ATP) en la mitocondria, a través de la acción de la enzima carnitina-palmitoil-transferasa 1 (CPT1) o en los peroxisomas mediante la acil-CoA oxidasa 1 (ACOX1). Alternativamente, pueden empaquetarse junto a lipoproteínas para su exportación como triglicéridos (Tg) por acción de la enzima diacilglicerol aciltransferasa 1 (DGAT1), o almacenarse intracelularmente (Bionaz y Loor, 2012; Horst *et al.*, 2021). Cuando el BEN es intenso y sostenido, la lipólisis excede la capacidad hepática de oxidar o exportar Tg, lo que produce acumulación lipídica, aumento de la cetogénesis, donde interviene la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa (HMGCoA sintasa), lo cual favorece el desarrollo de hígado graso y cetosis, respectivamente (Pascottini *et al.*, 2022; Zachut *et al.*, 2022).

Aunque la movilización de reservas corporales es un mecanismo adaptativo, su exceso compromete la función hepática y la eficiencia reproductiva (Ribeiro y Carvalho, 2017). Arshad y Santos (2022), en un estudio cuyo objetivo fue evaluar las asociaciones entre el contenido de triglicéridos hepáticos y respuesta productiva, metabolitos en sangre, incidencia de enfermedades, comportamiento reproductivo y supervivencia en vacas Holstein de alta producción, reportaron que el 75 % de las vacas presentaron infiltraciones hepáticas moderadas a severas durante la primera semana posparto y observaron que este grupo de vacas presentó mayores concentraciones plasmáticas de NEFAs y β -hidroxibutirato (β HB), menor CMS, períodos de anestro más prolongados y

mayor riesgo de descarte con respecto al grupo que tuvo una menor acumulación de Tg en hígado. Una mayor capacidad oxidativa hepática favorecería una menor acumulación de Tg y una mejor adaptación metabólica posparto (Roche *et al.*, 2013; Pascottini *et al.*, 2022). En sintonía con lo anterior, vacas con menor intervalo parto-concepción presentaron mayor expresión de CPT1, menor contenido hepático de Tg y menores concentraciones de β HB (Roche *et al.*, 2013; Angeli *et al.*, 2019b; Pascottini *et al.*, 2022).

Las estrategias de manejo durante el PT juegan un papel clave en la adaptación de las vacas al inicio de la lactancia (Overton y Waldron, 2004; Nikkhah y Alimirzaei, 2023). Una correcta adaptación incluye una sucesión armónica de eventos que resultan en una lactancia exitosa con adecuado volumen de leche y persistencia, ovulaciones fértiles luego del período de espera voluntario y un sistema inmune competente capaz de limitar la presentación de enfermedades (Pascottini *et al.*, 2022).

Diversos estudios han demostrado que las vacas con mejor estado de salud durante el PT tienden a presentar un desempeño reproductivo superior, lo que sugiere una estrecha relación entre la salud y la eficiencia reproductiva del rodeo (Ribeiro *et al.*, 2016; Barletta *et al.*, 2017). Por el contrario, las vacas que no logran adaptarse adecuadamente al inicio de la lactancia presentan un BEN mayor asociado a la aparición de múltiples enfermedades metabólicas clínicas o subclínicas, que afectan la reproducción y la eficiencia productiva (McArt *et al.*, 2013; Caixeta y Omontese, 2021). De hecho, uno de los principales determinantes de la rentabilidad de los sistemas lecheros es el rendimiento reproductivo (Cattaneo *et al.*, 2015), siendo además, la causa más frecuente de descarte de vacas en los sistemas lecheros a nivel mundial (Dallago *et al.*, 2021).

Reportes nacionales e internacionales indican que alrededor del 60 % de los trastornos de salud de las vacas lecheras ocurren, durante el primer mes postparto (Bargo *et al.*, 2009; Compton *et al.*, 2017; Daros *et al.*, 2022; Masia *et al.*, 2022). Esta situación tiene importantes consecuencias sobre la eficiencia productiva y reproductiva del rodeo, al tiempo que plantea serias preocupaciones en términos de bienestar animal y sustentabilidad del sistema productivo (Beaudeau *et al.*, 2000; Warner *et al.*, 2022), ya que compromete la longevidad de los animales, incrementa las tasas de descarte involuntario y eleva los costos económicos y ambientales asociados.

Frente a este complejo escenario, resulta fundamental identificar estrategias de manejo nutricional que favorezcan una mejor adaptación de las vacas al inicio de la lactancia. En los últimos años, la incorporación de compuestos nutraceuticos en la dieta de vacas lecheras ha despertado creciente interés como herramientas potenciales para modular procesos metabólicos, inmunológicos y reproductivos durante el PT (Lopreiato *et al.*, 2020). En este sentido, la suplementación dietaria con ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) de la familia omega-3 (ω -3) se presenta como una estrategia promisoriosa debido a sus potenciales efectos antiinflamatorios, metabólicos, hepatoprotectores y sobre la eficiencia reproductiva (Kra *et al.*, 2022; Ulfina, 2023; Veshkini *et al.*, 2023).

Diversos autores han estudiado los efectos de la suplementación con AGPI ω -3 en vacas lecheras (Moallem, 2018; Carneiro *et al.*, 2021; Pereira, *et al.*, 2022; Fabjanowska *et al.*, 2023). La suplementación con semillas de lino (fuente de ácido α -linolénico, ALA, C18:3 ω -3), ha mejorado la tasa de concepción en vacas lecheras al atenuar la síntesis de prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) y evitar la luteólisis (Petit *et al.*, 2002a; Burdge y Calder, 2005; Ambrose *et al.*, 2006; Iorio *et al.*, 2024). El aceite de pescado constituye una fuente rica en AGPI ω -3, especialmente en los ácidos eicosapentaenoico (EPA, C20:5 ω -3) y docosahexaenoico (DHA, C22:6 ω -3). La suplementación con aceite de pescado, ha demostrado efectos luteotróficos similares o incluso superiores a los de la suplementación exclusiva con ALA (Moallem, 2018). Además, EPA y DHA, han mostrado efectos positivos sobre la función hepática al actuar como ligandos naturales de los receptores activados por proliferadores de peroxisomas alfa (PPAR- α), regulando la transcripción de genes involucrados en la β -oxidación, el transporte de ácidos grasos y la respuesta inflamatoria (Hein *et al.*, 2010; Bionaz *et al.*, 2020; Fabjanowska *et al.*, 2023). Resultados previos de nuestro grupo sugieren que la activación hepática de rutas oxidativas mediadas por PPAR- α ocurre en el postparto tardío, lo que podría comprometer la capacidad del hígado para procesar los lípidos movilizados durante el PT (Angeli *et al.*, 2019b). Dado que la conversión endógena del ALA en EPA y DHA es limitada, la suplementación con fuentes que aporten EPA y DHA preformados podría potenciar los efectos metabólicos y reproductivos de las dietas enriquecidas con ω -3.

Por otro lado, si bien el efecto favorable sobre la reproducción del ácido α -linolénico ha sido reportado en el extranjero (Ambrose *et al.*, 2006; Dirandeh *et al.*, 2013; Castro *et al.*, 2019) y recientemente en nuestro país (Iorio *et al.*, 2024), la combinación de los tres AG (ALA, EPA y DHA) en un solo producto no ha sido aún evaluada. En

efecto, en un estudio previo conducido por nuestro grupo (Iorio *et al.*, 2024), la suplementación con una sal cálcica a base de aceite de lino a vacas lecheras en primer tercio de lactancia se presentó como una estrategia promisoriosa y su efectividad podría ser mejorada con la inclusión de EPA y DHA preformados ya que parte de los efectos positivos del ALA podrían estar mediados por su elongación a EPA y DHA.

En este marco, se propone que la suplementación dietaria con sales cálcicas enriquecidas con ω -3 mejorará la función hepática y ovárica, promoviendo una mejor adaptación metabólica, productividad y eficiencia reproductiva en vacas lecheras durante la lactancia temprana.

A continuación y a modo de revisión bibliográfica, se describen generalidades de los lípidos dietarios en rumiantes, particularmente en la vaca lechera durante el PT, para luego abordar el desarrollo de los capítulos que integran esta tesis.

1.1. Revisión bibliográfica.

1.1.1. Lípidos en la nutrición de vacas lecheras.

Bajo el término “lípidos” se agrupa a un conjunto heterogéneo de compuestos orgánicos que comparten una característica común: su solubilidad en disolventes orgánicos no polares y su insolubilidad en agua. En los análisis de laboratorio de alimentos, esta fracción se cuantifica como extracto etéreo (EE), que representa la suma total de todos los compuestos liposolubles presentes en una muestra (NASEM, 2021). Desde el punto de vista analítico, el EE está compuesto mayoritariamente por Tg (80 - 95 % del total), los cuales constituyen la principal forma de almacenamiento de energía en semillas oleaginosas y grasas animales. En menor proporción se encuentran los ácidos grasos libres, que derivan de la hidrólisis parcial de los triglicéridos y pueden representar entre el 2 y el 10 % del EE, especialmente en productos procesados o almacenados por tiempos prolongados. Los fosfolípidos, que cumplen funciones estructurales en las membranas celulares, aportan entre el 1 y 5 % del EE, siendo más relevantes en ingredientes vegetales frescos como las pasturas. En proporciones menores (<1 %), se hallan los ésteres de colesterol, ceras, esteroides vegetales, vitaminas liposolubles (A, D, E, K), pigmentos (como los carotenoides) y otros compuestos bioactivos (Palmquist y Jenkins, 2003). Cabe destacar que la proporción de estos compuestos varía considerablemente según el tipo de alimento. En semillas oleaginosas como la soja, el lino o el girasol, los triglicéridos y AG libres son dominantes, mientras que, en pasturas frescas, predominan los fosfolípidos y pigmentos (Dewhurst *et al.*, 2007).

Las dietas tradicionales para vacas lecheras contienen una baja proporción de lípidos, generalmente cercana al 3 % de la materia seca (MS). Sin embargo, los crecientes requerimientos energéticos de las vacas de alto rendimiento han impulsado una mayor inclusión de concentrados en la dieta (Kolver y Muller, 1998). En estos sistemas más intensificados, el contenido total de lípidos puede alcanzar hasta un 5 % de la MS, debido al mayor aporte de concentrados energéticos y subproductos agroindustriales, incorporados para satisfacer las demandas nutricionales de las vacas de alta producción (Bionaz *et al.*, 2020). Las recomendaciones actuales indican que la inclusión total de lípidos en dietas para vacas lecheras no debe superar el 6,5 - 7 % de la MS, siendo prudente mantener el aporte de lípidos suplementarios por debajo del 3 % (Palmquist y Jenkins, 2017; NASEM, 2021). Desde el punto de vista nutricional, los lípidos son el

nutriente más concentrado en energía, aportando aproximadamente 2,25 veces más energía metabolizable que los carbohidratos lo que los convierte en una herramienta valiosa para aumentar la densidad energética de las raciones (Onetti y Grummer, 2004).

En su revisión, Palmquist y Jenkins (2017) describen las etapas que ha transitado la suplementación lipídica en bovinos lecheros durante los últimos 100 años: desde una visión inicial negativa (hasta 1940), en la que los lípidos eran considerados tóxicos, pasando por su reconocimiento como fuente energética (1940 - 1970); el desarrollo de tecnologías de protección ruminal (lípidos by-pass; 1980 - 1990); y la consolidación de su uso estratégico en vacas con alta producción (1990 - 2010). Más recientemente, la investigación se ha centrado en el valor nutracéutico de los lípidos suplementarios, más allá de su aporte nutricional (Lopreiato *et al.*, 2020). Según el tipo de AG que compone los lípidos, éstos pueden actuar como moléculas bioactivas que interactúan en diferentes niveles de la fisiología del animal (Moallem, 2018; Bionaz *et al.*, 2020). Estos efectos, dependen del tipo de AG suplementado, su dosis y el momento de administración (Santos *et al.*, 2008; Soydan *et al.*, 2017; Pereira *et al.*, 2022; Fabjanowska *et al.*, 2023).

Este cambio de enfoque ha impulsado la caracterización funcional de los lípidos según su estructura química y fisiológica, dando lugar a su clasificación basada en el grado de saturación, longitud de cadena y posición del primer doble enlace (Bordoni *et al.*, 2021). Comprender estas diferencias es fundamental para interpretar sus efectos sobre la fisiología de la vaca lechera y optimizar su uso en la formulación de dietas funcionales (Veshkini *et al.*, 2023).

1.1.2. Clasificación de los lípidos.

Los lípidos comprenden una amplia variedad de compuestos que incluyen a los AG, los cuales poseen un grupo ácido carboxílico (COOH) en un extremo, denominado α (alfa), y un grupo metilo (CH₃) en el otro extremo, denominado ω (omega). Pueden clasificarse según el número de carbonos de su estructura y dobles enlaces presentes en su cadena. De acuerdo con el número de carbonos, los AG se dividen en: cortos (menos de 6 carbonos), medianos (entre 6 y 12 carbonos), largos (entre 13 y 21 carbonos) y muy largos (más de 21 carbonos; Palmquist, 2009). Según la cantidad de dobles enlaces, se clasifican como ácidos grasos saturados (AGS) cuando no presentan enlaces dobles o ácidos grasos insaturados (AGI) cuando poseen al menos un doble enlace entre los carbonos de su estructura química (Wathes *et al.*, 2007). Estos enlaces dobles confieren

flexibilidad a la molécula, motivo por el cual los AGS son sólidos a temperatura ambiente, mientras que los AGI son más líquidos en las mismas condiciones (Paez Hurtado, 2023).

Los AGI pueden diferenciarse, además, según la configuración espacial de sus dobles enlaces, en isómeros *cis* o *trans*. Esta configuración influye notablemente en sus propiedades físicas, biológicas y nutricionales. En la forma *cis*, los átomos de hidrógeno adyacentes al doble enlace se ubican en el mismo lado de la cadena, generando una curvatura molecular que favorece la fluidez de las membranas celulares. En cambio, en la forma *trans*, los hidrógenos se sitúan en lados opuestos, produciendo una estructura más lineal y rígida. Sumado a lo anterior, los AGPI se subdividen en tres grupos: omega-3 (ω -3), omega-6 (ω -6) y omega-9 (ω -9) denominaciones que indican la posición del primer enlace doble comenzando desde el extremo metilo (Wathes *et al.*, 2007; Palmquist, 2009).

1.1.3. Fuentes de lípidos en las dietas de rumiantes.

Tradicionalmente, los sistemas de alimentación de las vacas lecheras se basaron en el pastoreo directo de forrajes frescos, que aseguraba un perfil lipídico dietario con un alto contenido de AGPI, especialmente del tipo ω -3 (Boufaïed *et al.*, 2003). Aunque en algunos países, como Irlanda o Nueva Zelanda el pastoreo continúa siendo la base de la alimentación (Kelly *et al.*, 2020), en otras regiones del mundo los sistemas productivos han incorporado progresivamente concentrados como cereales, oleaginosas y subproductos agroindustriales, particularmente durante el inicio de la lactancia o en períodos de baja oferta forrajera (Dillon *et al.*, 1997; McEvoy *et al.*, 2008). En este contexto, las raciones totalmente mezcladas (TMR, del inglés *total mixed ration*) presentan un uso cada vez más extendido (Bach, 2024). Se estima que actualmente sólo entre el 10 y 15 % de la producción de leche mundial proviene de sistemas exclusivamente pastoriles (Shalloo *et al.*, 2018; Moscovici Joubran *et al.*, 2021). Este cambio ha generado una modificación gradual pero significativa en el perfil de AG en las dietas, con una reducción relativa de los AG ω -3 de origen forrajero y un aumento en la proporción de AG procedentes de granos y subproductos agroindustriales, típicamente ricos en ω -6 (Moscovici Joubran *et al.*, 2021). La proporción entre AG ω -3 y ω -6 en la dieta de las vacas lecheras constituye un determinante fundamental de la composición lipídica de los tejidos y de la regulación de numerosos procesos fisiológicos (Silvestre *et al.*, 2011; Moallem, 2018). Ambos son considerados AG esenciales, ya que los mamíferos carecen

de las enzimas necesarias para sintetizarlos *de novo* y deben ser incorporados a través de la dieta (Bionaz *et al.*, 2020; Dyall *et al.*, 2022). Lean y Rabiee (2016), estimaron que las vacas alimentadas con dietas basadas en TMR disponen de aproximadamente la mitad de AGPI ω -3 en el duodeno en comparación con aquellas alimentadas con pasturas.

Actualmente, se dispone de una amplia variedad de suplementos lipídicos (Gadeyne *et al.*, 2016) utilizados en la formulación de dietas para vacas lecheras. Estos suplementos difieren en su origen y perfil de AG (Palmquist y Jenkins, 2017).

Según su origen, los suplementos lipídicos pueden provenir de:

- Fuentes vegetales: principalmente semillas de soja, girasol, lino, canola, colza, palma y sus derivados (aceites, harinas, expellers).
- Fuentes animales: sebo bovino, grasa porcina.
- Fuentes marinas: aceites de pescado y microalgas.
- Fuentes procesadas o comerciales: mezclas formuladas mediante tecnologías patentadas específicas para rumiantes.

Según su perfil de AG predominante, los suplementos pueden clasificarse en:

- Ricos en AGS: grasas animales y grasas hidrogenadas.
- Ricos en AGMI: aceite de palma, colza.
- Ricos en AGPI:
 - ✓ Omega-6 (ω -6): soja, maíz, girasol.
 - ✓ Omega-3 (ω -3): lino, pescado y algas marinas.

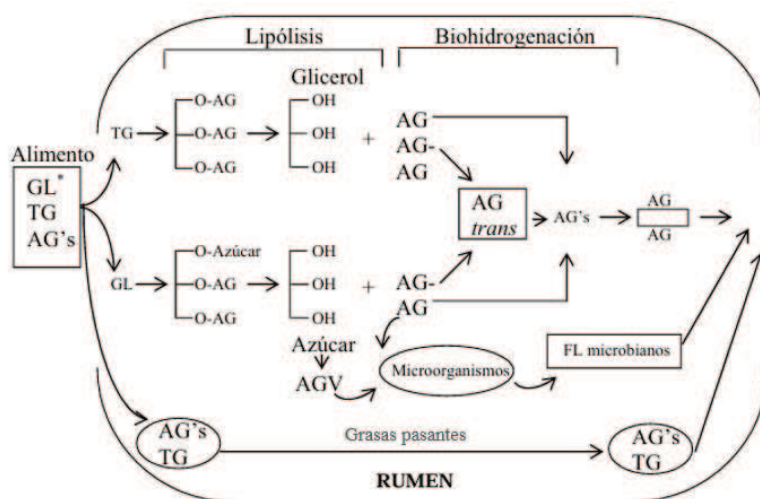
En general, los aceites vegetales y marinos (pescado y algas) son considerablemente más insaturados que las grasas de origen animal. Esto se debe a la presencia de cantidades variables de los ácidos linoleico (AL, C18:2 ω -6) y ALA (C18:3 ω -3) en estas fuentes más insaturadas, además del ácido oleico (C18:1 ω -9), presente en la mayoría de las grasas naturales (McDonanld *et al.*, 2002). Las fuentes marinas, además, contienen concentraciones significativas de AG altamente insaturados como el EPA

(C20:5 ω -3) y DHA (C22:6 ω -3). En cambio, las grasas animales presentan menores proporciones de AGI y mayores proporciones de AGS de alto peso molecular, como el ácido palmítico (C16:0) y el esteárico (C18:0), con menores cantidades de ácido láurico (C12:0) y mirístico (C14:0).

1.1.4. Digestión y metabolismo ruminal de los lípidos.

Los lípidos ingeridos a través de la dieta, sufren extensas transformaciones a nivel ruminal, lo que genera un marcado contraste entre el perfil de AG consumidos y el que finalmente alcanza el intestino delgado. El proceso se inicia con la *lipólisis ruminal* (**Figura 1**), catalizada principalmente por lipasas extracelulares producidas por bacterias como *Anaerovibrio lipolytica*, *Butyrivibrio fibrisolvens* y *Eubacterium* spp., además de ciertas especies de protozoos capaces de hidrolizar Tg, fosfolípidos y galactolípidos, liberando AG libres y glicerol. El glicerol es rápidamente fermentado a ácidos grasos volátiles (AGV), principalmente propionato y butirato, que pueden ser absorbidos por el hospedador como fuente de energía, o utilizados por la microbiota como precursores para la síntesis de sus propios compuestos (Palmquist y Jenkins, 2017).

Figura 1: Representación esquemática del metabolismo de los lípidos en el rumen: lipólisis y biohidrogenación.



GL: glucolípidos; TG: triglicéridos; AG's: mezcla de ácidos grasos; AG-: ácidos grasos insaturados; FL: fosfolípidos; AGV: ácidos grasos volátiles; □AG: ácidos grasos unidos a las partículas de alimento. Adaptado de Fuentes (2009).

Los AGI liberados en este proceso son sometidos a *biohidrogenación ruminal*, durante la cual los dobles enlaces son progresivamente reducidos hasta generar AGS. Este

mecanismo protege a la microbiota celulolítica de los efectos antimicrobianos de los AGI (Bauman *et al.*, 2003). En este proceso, los AGPI como el AL (C18:2, ω -6) y el ALA (C18:3, ω -3) se convierten finalmente en ácido esteárico (C18:0). En condiciones ruminales normales, una fracción de AG no es completamente hidrogenada, lo que favorece la acumulación de intermediarios trans, como el ácido vaccénico (AV; C18:1 trans-11) y distintos isómeros de ácido linoleico conjugado (CLA). La acumulación de estos isómeros trans en el rumen tiene implicancias directas sobre la composición y calidad de la grasa láctea (Gagliostro, 2004). El AV puede ser absorbido y posteriormente desaturado en la glándula mamaria por la enzima Δ 9-desaturasa, originando ácido ruménico (AR; cis-9, trans-11 CLA), el principal isómero, que representa entre el 75 y 90 % de los CLA presentes en la leche (Bauman y Griinari, 2003). Este compuesto ha sido asociado con potenciales beneficios para la salud humana, incluyendo efectos anticarcinogénicos y moduladores del metabolismo lipídico. Sin embargo, alteraciones en el ecosistema ruminal, como las inducidas por dietas altas en concentrados y bajo pH, pueden favorecer rutas de biohidrogenación alternativas, incrementando la producción de isómeros como trans-10, cis-12 CLA, que ejerce un potente efecto inhibitor sobre la síntesis de grasa láctea (Bauman y Griinari, 2003). Este fenómeno, conocido como *síndrome de depresión de grasa láctea*, se caracteriza por una reducción del contenido de grasa en leche sin afectar significativamente el volumen producido.

En este contexto, la suplementación con AGPI representa un desafío en la nutrición de rumiantes debido a la extensa biohidrogenación ruminal, que limita la llegada de estos compuestos al intestino delgado y, en consecuencia, su biodisponibilidad para funciones metabólicas específicas. Para mitigar estas consecuencias negativas, se recurre al uso de *grasas pasantes* (**Figura 1**), diseñadas para resistir parcialmente la degradación ruminal y liberar los AG en el intestino delgado, donde son absorbidos (Gadeyne *et al.*, 2017).

1.1.4.1 Protección ruminal de los lípidos (grasas pasantes).

La protección ruminal de los lípidos surge como una estrategia nutricional destinada a minimizar la hidrogenación microbiana de los AGI, en particular los AGPI de las series ω -3 y ω -6, con el fin de que alcancen el intestino delgado en su forma original y sean absorbidos de manera más eficiente. El principio consiste en reducir la disponibilidad física o química del lípido frente a la acción de lipasas e hidrogenasas

microbianas, garantizando al mismo tiempo su liberación y absorción en el tracto posterior.

Una revisión reciente ha descrito las principales técnicas de protección de la biohidrogenación ruminal (Gadeyne *et al.*, 2017), entre las que se encuentran:

Sales de calcio de AG: bloquean el grupo carboxilo libre mediante la formación de jabones cálcicos. Constituyen un método simple y ampliamente difundido, aunque su eficacia es variable y depende del grado de insaturación y del pH ruminal, ya que valores inferiores a 6,3 favorecen la disociación y exposición a las enzimas microbianas. Además, su producción requiere AGL como precursores, lo que incrementa los costos y limita la protección de aceites con alto contenido de insaturados.

Amidas acilo-grasas: en este método, los AG se enlazan a aminos mediante un enlace amida resistente a la hidrólisis ruminal. Este mecanismo otorga cierta protección frente a la biohidrogenación y ha demostrado ser más estable que las sales de calcio, aunque la transferencia de AGPI a leche no siempre resulta superior a la obtenida con aceites sin protección.

Encapsulación mediante aldehídos (principalmente formaldehído): es una de las técnicas más efectivas, con transferencias de AGPI a leche que pueden superar el 40% en algunos casos. El procedimiento consiste en emulsionar los lípidos en una matriz proteica y reticularla químicamente, generando cápsulas resistentes al ambiente ruminal y degradables en el abomaso. No obstante, el uso de formaldehído presenta limitaciones regulatorias y de inocuidad, además de posibles reacciones inespecíficas con otros nutrientes.

Extrusado o reacción de Maillard: esta estrategia combina proteínas y azúcares reductores sometidos a calor, generando una matriz que protege los lípidos. Aunque evita el empleo de compuestos tóxicos, su eficacia es limitada, requiere condiciones de procesamiento costosas y puede derivar en la formación de compuestos potencialmente dañinos por oxidación de los AGPI.

Geles lipídicos compuestos: consisten en emulsiones de lípidos dispersos en proteínas (por ejemplo, suero lácteo), que se gelifican por calor formando una matriz resistente a la degradación ruminal. Esta técnica ha mostrado elevadas eficiencias de

transferencia de AGPI hacia la leche (superiores al 30%), aunque su aplicación a gran escala enfrenta desafíos tecnológicos relacionados con la conservación y la estabilidad del producto.

La eficacia de estas tecnologías depende de factores como el tamaño de partícula, el punto de fusión, el grado de saturación, la interacción con otros compuestos de la dieta y la estabilidad del recubrimiento durante la mezcla y almacenamiento. Además de mejorar la eficiencia de utilización de los lípidos, estas estrategias reducen el impacto negativo de los AGI libres sobre la microbiota ruminal y sobre la digestibilidad de la fibra, lo que resulta particularmente importante en vacas de alta producción (Jenkins y Harvatine, 2014; Bionaz *et al.*, 2020).

De esta manera, tanto la protección ruminal de los lípidos como la comprensión de los procesos de lipólisis y biohidrogenación resultan esenciales para interpretar el metabolismo de los AG en rumiantes. Una vez que los AG escapan a la biohidrogenación o son transformados en productos intermedios y finales, pasan al intestino delgado, donde se inicia el proceso de emulsificación, digestión y absorción, dando paso al *metabolismo post-absortivo*, que se describe a continuación.

1.1.5. Digestión post-ruminal de los AG.

Los AG que alcanzan el intestino delgado, corresponden a una mezcla de productos intermedios y finales de la biohidrogenación, junto con una fracción que, por diversos motivos (entre ellos la protección ruminal) logra escapar sin ser modificada. Una vez en el duodeno, estos AG son sometidos a procesos de emulsificación y digestión enzimática, en los que las sales biliares y la lipasa pancreática desempeñan un papel central al promover la formación de micelas mixtas. Estas estructuras facilitan la solubilización de los AG, permitiendo su transporte hasta la membrana de los enterocitos, donde son absorbidos tanto por difusión pasiva como por mecanismos mediados por transportadores específicos (Palmquist y Jenkins, 2017).

En el interior del enterocito, los AG son activados a acil-CoA y posteriormente reesterificados, mayoritariamente en forma de Tg dentro del retículo endoplasmático. Estos Tg se empaquetan junto con fosfolípidos y colesterol esterificado en quilomicrones, que son liberados al sistema linfático y posteriormente ingresan a la circulación sistémica a través del conducto torácico (Palmquist y Mattos, 2006). De esta forma, los AG son

distribuidos hacia diferentes tejidos -principalmente el hígado, la glándula mamaria y tejido adiposo-, donde participan en diversos procesos fisiológicos (Bionaz *et al.*, 2020).

1.1.6. Metabolismo post-absortivo de los AG.

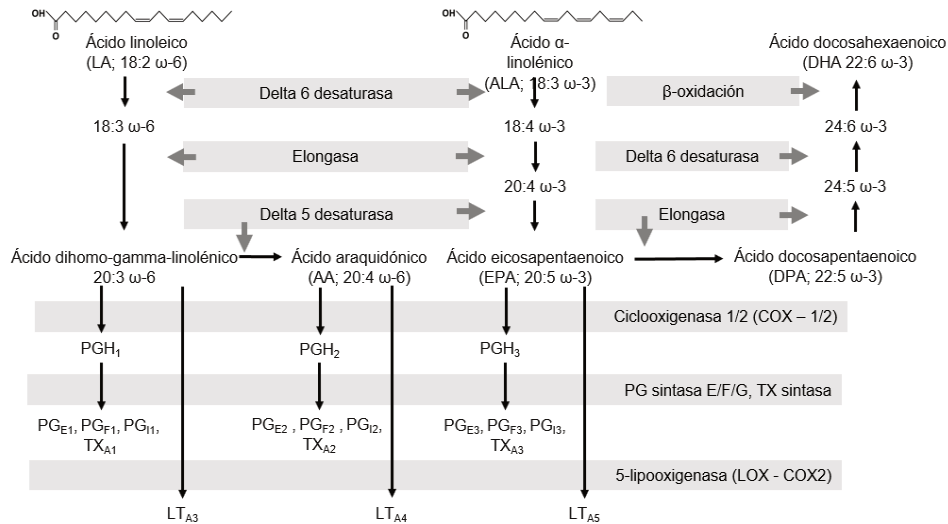
El metabolismo celular de los AG cumple un papel central en la *homeostasis energética* y en la síntesis de moléculas bioactivas que regulan múltiples funciones fisiológicas (Angeli *et al.*, 2021; Dyall *et al.*, 2022). En los mamíferos, algunos AG deben incorporarse a través de la dieta, ya que carecen de las enzimas necesarias para introducir dobles enlaces en determinadas posiciones de la cadena carbonada (Brenner, 2003). Por este motivo, el LA (18:2 ω -6) y el ALA (18:3 ω -3) se consideran esenciales. Además, estos AG pueden ser metabolizados hacia moléculas de cadena más larga y con mayor grado de insaturación (Mattos *et al.*, 2000) mediante reacciones de desaturación y elongación (**Figura 2**).

Así, el LA, tras varias reacciones de desaturación y elongación, puede dar origen al AA (20:4 ω -6). Por otro lado, el ALA, perteneciente a la familia omega-3, puede transformarse por acción de la enzima Δ -6 desaturasa en ácido esteáridónico (SDA, 18:4 ω -3), que posteriormente, mediante la acción de elongasas, se convierte en ácido eicosatetraenoico (ETA, 20:4 ω -3) y, por nuevas reacciones de desaturación, en EPA (20:5 ω -3). El EPA, a su vez, por acción de elongasas, origina el ácido docosapentaenoico (DPA, 22:5 ω -3) y finalmente el DHA (22:6 ω -3) mediante la acción de desaturasas (**Figura 2**).

Los ácidos grasos araquidónico y eicosapentaenoico cumplen un rol fundamental como precursores de *eicosanoides*, un grupo de mediadores lipídicos de gran relevancia fisiológica (Saini y Keum, 2018; Dyall *et al.*, 2022). Estos compuestos se liberan a partir de fosfolípidos de membrana por acción de la fosfolipasa A₂ y son metabolizados principalmente por las vías de la *ciclooxigenasa (COX)* y la *lipooxigenasa (LOX)* (**Figura 2**). En la vía de la COX, el AA se transforma en endoperóxidos inestables (PGH₂), que sirven como sustrato para distintas sintasas específicas que generan *prostaglandinas (PG)*, *tromboxanos (TX)* y *prostaciclina (PGI)*. Dentro de este grupo, las PG de la serie F₂, en particular la prostaglandina F₂ α (PGF₂ α), cumplen una función clave en bovinos: participan en la luteólisis al inducir la regresión del cuerpo lúteo (CL), regulan la motilidad uterina y modulan procesos inflamatorios en el aparato reproductor (Santos *et al.*, 2008). Paralelamente, el EPA puede dar origen a prostaglandinas de la serie 3 (por

ejemplo, $\text{PGF}_3\alpha$), con menor potencia biológica, lo que explica en parte los efectos moduladores de los AG ω -3 sobre la reproducción y la inflamación.

Figura 2: Representación esquemática del metabolismo de los AGPI.



PGH= endoperoxidos. PG= prostaglandinas. TX= tromboxanos. PGI= prostaciclina. LT= leucotrienos. Adaptado de Angeli *et al.* (2021).

Del mismo modo, los TX generados por la acción de la TX sintasa a partir del AA se caracterizan por ejercer un potente efecto vasoconstrictor y promotor de la agregación plaquetaria, con implicancias en la hemostasia y la circulación (TXA_2). En contraste, los AG ω -3 favorecen la síntesis de TXA_3 , cuya acción biológica es mucho más débil (Burdge y Calder, 2005). Por la vía de la LOX, el AA se convierte en hidroperóxidos que derivan en *leucotrienos* (LTB_4 , LTC_4 , LTD_4 y LTE_4), los cuales cumplen un rol proinflamatorio, promoviendo la quimiotaxis y la activación de leucocitos. En contrapartida, a partir del EPA se sintetizan *leucotrienos* de la serie 5 (por ejemplo, el LTB_5), caracterizados por una menor capacidad inflamatoria, lo que contribuye a los efectos antiinflamatorios atribuidos a los AG ω -3 (Calder, 2012; Angeli *et al.*, 2021).

De este modo, los derivados del metabolismo de los AGPI actúan como *moduladores de la reproducción, la inflamación y la respuesta inmune*. En este punto, es importante destacar que no existe posibilidad de interconversión entre las familias de AG ω -3 y ω -6, dado que los mamíferos carecen de las desaturasas necesarias para introducir dobles enlaces en las posiciones correspondientes (Brenner, 2003; Dyllal *et al.*, 2022). En consecuencia, cada serie depende de sus propios precursores dietarios, lo que confiere una importancia decisiva al perfil lipídico de la dieta en la determinación de la

disponibilidad tisular de estos compuestos. En este contexto, los AG dietarios adquieren particular relevancia, ya que las dietas de las vacas lecheras modernas suelen contener elevadas cantidades de LA y, lo que favorece la síntesis de derivados de los AGPI ω -6 (Ruxton *et al.*, 2004). Esta desproporción no solo limita la disponibilidad de AGPI ω -3 de cadena larga en los tejidos, sino que también puede afectar procesos fisiológicos clave, como la función inmune, la reproducción y el metabolismo energético. Además, una elevada ingesta dietaria de LA puede desplazar el uso de la Δ -6 desaturasa hacia la ruta ω -6, reduciendo así la conversión de ALA en AGPI ω -3 de cadena larga.

Por otro lado, en los bovinos la eficiencia de las transformaciones de AG es baja, especialmente en el hígado, donde las reacciones de elongación y desaturación son limitadas (Moallem, 2018). Las reacciones catalizadas por las desaturasas Δ -6 y Δ -5 representan pasos restrictivos en la ruta biosintética, lo que limita la formación de EPA, DPA, DHA y AA (Tosi *et al.*, 2014). En concordancia, diversos estudios han mostrado que la conversión de ALA a derivados de cadena larga es muy reducida. Chiu *et al.* (2008) la estimaron entre 2 y 10 %; Goyens *et al.* (2005) reportaron aproximadamente 7 % para EPA y apenas 0,013 % para DHA; mientras que Hussein *et al.* (2005) observaron valores aún menores (0,3 % para EPA y <0,01 % para DHA). En animales de carne y leche, la suplementación con semillas de lino (fuente de ALA) puede incrementar las concentraciones tisulares de EPA y DPA, pero no las de DHA, lo que indica que la ruta metabólica se encuentra parcialmente bloqueada a nivel de DPA (Nassu *et al.*, 2011; Shingfield *et al.*, 2013).

Finalmente, la actividad de las desaturasas es modulada por factores hormonales: el *glucagón*, la *adrenalina* y *tiroxina* ejercen un efecto inhibitorio, mientras que la *insulina* estimula su acción (Brenner, 2003). Este factor metabólico, sumado a la competencia enzimática, la imposibilidad de interconversión entre las familias de AGPI y la limitada capacidad de elongación y desaturación de los bovinos, determina una marcada dependencia del aporte exógeno de EPA y DHA para mantener concentraciones tisulares adecuadas (Raes *et al.*, 2004). Esta restricción cobra especial relevancia en vacas lecheras al inicio de la lactancia, donde la elevada demanda energética, la resistencia insulínica y los profundos cambios metabólicos incrementan la necesidad de suministrar AGPI preformados como estrategia nutricional para optimizar la función inmune, reproductiva y productiva.

1.2. Suplementación con AG durante el PT.

El PT representa una fase crítica y exigente para el metabolismo de la vaca lechera. Durante esta etapa, el crecimiento fetal y los cambios hormonales provocan una disminución del CMS hasta el momento del parto (Ingvarsen y Andersen, 2000). Posteriormente, el CMS comienza a aumentar de manera progresiva, aunque no lo suficiente como para cubrir los elevados requerimientos energéticos de la producción de leche, lo que genera un BEN durante las primeras semanas posparto (Grummer, 1995). Si el BEN es severo, puede comprometer la salud de la vaca y la concepción (Fricke *et al.*, 2023). Un estudio de relevamiento sobre 84.369 vacas lecheras provenientes de 1.748 rebaños del Reino Unido informó que el BEN durante el período preparto alcanzaba al 52 % de los animales y al 75 % durante los primeros 20 días en lactancia (Macrae *et al.*, 2019). Frente a este desafío, la suplementación con AG se presenta como una estrategia eficaz para incrementar el aporte energético dietario y mitigar los efectos del BEN en este período vulnerable.

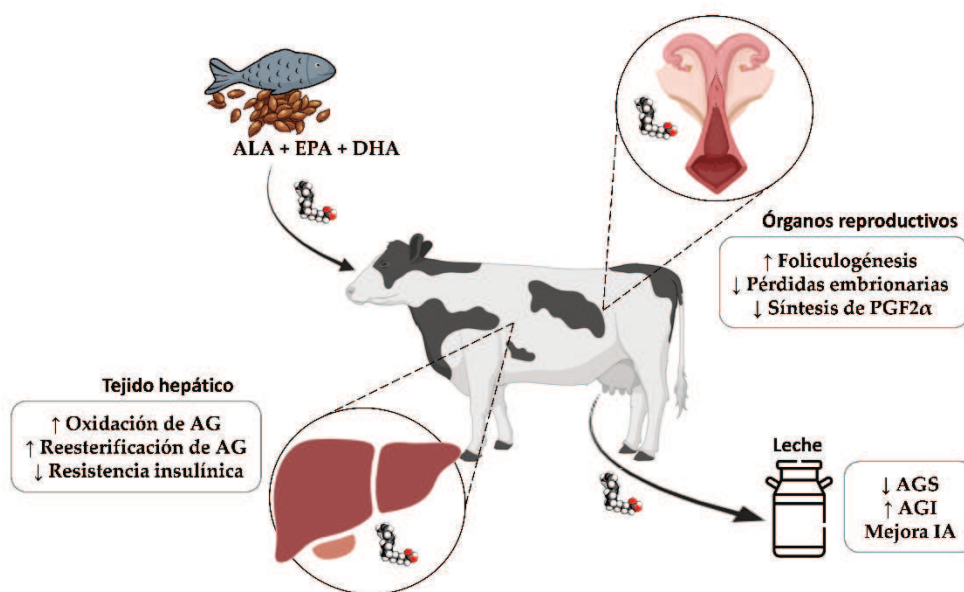
Más allá de su papel energético, el tipo de AG incluidos en la dieta puede influir diferencialmente en la salud y la función reproductiva de las vacas lecheras (Fabjanowska *et al.*, 2023; Zeng *et al.*, 2023). Los AG forman parte de todas las membranas celulares y participan en múltiples procesos biológicos esenciales. En la bicapa lipídica, el tipo de AG incorporado puede modificar la *fluidéz de la membrana*, afectando la actividad enzimática, la expresión de receptores y la funcionalidad de canales iónicos (Ribeiro *et al.*, 2016). Además, ciertos AG están implicados en la *regulación de la expresión génica* (Clarke, 2001; Hein *et al.*, 2010; Bionaz *et al.*, 2020). En particular, los AG ω -3 pueden activar los PPARs, induciendo la transcripción de genes involucrados en la captación de glucosa y AG, la elongación embrionaria y la regulación de diversas enzimas de rutas metabólicas (Bionaz *et al.*, 2013; Giller *et al.*, 2018; Angeli *et al.*, 2019b).

Por su carácter bioactivo, los AGPI ω -3 también ejercen efectos sobre el metabolismo y la función inmune. A nivel metabólico, pueden mejorar la eficiencia productiva al promover la oxidación de AG y limitar la acumulación de Tg en el hígado (), reduciendo el riesgo de trastornos metabólicos como la *cetosis* y la *esteatosis hepática* (Bougarne *et al.*, 2018). En cuanto al sistema inmune, la suplementación con fuentes de ALA, EPA y DHA durante el PT modula la producción de citocinas proinflamatorias como el *factor de necrosis tumoral alfa* (TNF- α), el *interferón gamma* (IFN- γ) y la *interleuquina 1* (IL-1), aumentando la capacidad de fagocitosis de leucocitos y

monocitos, y favoreciendo la proliferación de linfocitos y la producción de anticuerpos (Saini y Keum, 2018; Sordillo, 2018; Carneiro *et al.*, 2021).

En el ámbito reproductivo, los AGPI ω -3 regulan la síntesis de PG, reduciendo la liberación de $\text{PGF2}\alpha$ y favoreciendo la supervivencia embrionaria y la función luteal (Libera *et al.*, 2020; Carneiro *et al.*, 2021). Sin embargo, la magnitud de estos efectos depende en gran medida de las concentraciones de EPA y DHA alcanzadas en los tejidos, considerando que los rumiantes poseen una capacidad enzimática limitada para convertir ALA en EPA y DHA (Greco *et al.*, 2015; Pereira *et al.*, 2022). Este aspecto resalta la importancia de combinar distintas fuentes de AGPI para potenciar sus efectos beneficiosos en vacas lecheras.

Figura 3: Representación de los principales efectos de la suplementación con AGPI ω -3 sobre el metabolismo, producción y reproducción en vacas lecheras.



ALA= ácido α -linolénico. EPA= ácido eicosapentaenoico. DHA= ácido docosahexaenoico. AG= ácido graso. $\text{PGF2}\alpha$ = prostaglandina $\text{F2}\alpha$. AGS= ácidos grasos saturados. AGI= ácidos grasos insaturados. IA= índice de aterogenicidad.

Por todo lo anteriormente expuesto, ha crecido el interés en la suplementación con AGPI ω -3 en vacas lecheras, y se plantea como hipótesis general de este trabajo que: “*la suplementación dietaria con sales cálcicas enriquecidas con omega-3 mejorará la función hepática y ovárica, el estado metabólico y el desempeño productivo y reproductivo de vacas lecheras en lactancia temprana*”.

2. OBJETIVOS.

2.1. Objetivo general.

Estudiar los efectos de la suplementación con sales cálcicas de AG ω -3 (a base de ALA, EPA y DHA) sobre parámetros productivos, metabólicos hepáticos y reproductivos en vacas lecheras en inicio de lactancia.

2.2. Objetivos específicos.

1. Comparar los efectos de la suplementación dietaria con sales cálcicas enriquecidas con ω -3, sobre el consumo de materia seca (CMS) y energía, la producción, composición y perfil de AG en leche, la variación del peso corporal (PC) y la condición corporal (CC).

2. Estudiar los efectos de la suplementación dietaria sobre las concentraciones de β HB en sangre, de NEFAs, glucosa e insulina plasmática, y el contenido de Tg hepáticos en vacas lecheras.

3. Analizar los efectos de la suplementación dietaria sobre la expresión de proteínas relevantes en:

- a) la oxidación hepática de ácidos grasos (CPT1, ACOX1 y PPAR- α);
- b) la cetogénesis (3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa (HMGCoA sintasa)), y
- c) la reesterificación de Tg hepáticos (DGAT1).

4. Determinar si la suplementación dietaria afecta la función ovárica, a través de la dinámica folicular y seguimiento de la dinámica luteal mediante los niveles plasmáticos de progesterona.

5. Comparar los efectos de la suplementación dietaria sobre la relación entre parámetros reproductivos con el perfil metabólico de vacas lecheras.

CAPITULO 1.

Efectos de la suplementación de derivados de ácidos grasos ω -3 sobre variables productivas y el desempeño reproductivo de vacas lecheras en inicio de lactancia.

1. 1. INTRODUCCIÓN.

El inicio de la lactancia constituye una de las fases más desafiantes del ciclo productivo de la vaca lechera, caracterizada por un marcado desbalance entre la elevada demanda energética para la síntesis de leche y la limitada capacidad de consumo. Esta situación conduce a un marcado BEN, que promueve una intensa movilización de reservas corporales, profundas alteraciones metabólicas y una reorganización endocrina que repercute tanto en la eficiencia productiva como en el desempeño reproductivo (Caixeta y Omontese, 2021). En este contexto, la implementación de estrategias nutricionales que favorezcan la adaptación metabólica durante el PT resulta fundamental para preservar la salud, optimizar la producción y mejorar la eficiencia reproductiva del rodeo lechero (Lopreiato *et al.*, 2020; Nikkhah y Alimirzaei, 2023).

La suplementación lipídica se ha convertido en una herramienta común para aumentar la densidad energética de las dietas y minimizar los efectos del BEN en vacas de alto requerimiento (Palmquist y Jenkins, 2017; Bionaz *et al.*, 2020). No obstante, en algunos casos puede reducir el CMS, alterar la función del ruminal y originar isómeros de AG que deprimen la grasa butirosa de la leche (dos Santos Neto *et al.*, 2022; Pereira *et al.*, 2022). Más allá de su aporte energético, los AG también cumplen funciones fisiológicas relevantes, capaces de modular el metabolismo y la función inmunitaria (Moallem, 2018). En este contexto, la suplementación con AGPI de la serie ω -3, como los ALA (C18:3), EPA (C20:5) y DHA (C22:6), ha cobrado creciente interés en la nutrición de rumiantes. Estas moléculas, poseen reconocidos efectos moduladores sobre la producción, el metabolismo y la función reproductiva en bovinos lecheros (Moallem, 2018; Angeli *et al.*, 2021; Fabjanowska *et al.*, 2023).

1.1.1. Balance energético durante el PT.

El balance energético se define como la diferencia entre la energía consumida por el animal y aquella destinada a cubrir sus requerimientos de mantenimiento, gestación y/o producción láctea. En la etapa inmediatamente posterior al parto, las demandas energéticas del animal se incrementan de forma abrupta. Este aumento responde a décadas de mejoramiento genético orientado hacia una mayor productividad lechera, lo que ha generado que las vacas modernas produzcan volúmenes de leche hasta diez veces superiores a los necesarios para alimentar al ternero (Martens, 2023).

A este marcado incremento de los requerimientos energéticos se suma una disminución del apetito característica del periodo periparto, fenómeno observado también en otras especies de mamíferos. En las vacas lecheras, el consumo de materia seca (CMS) alcanza su punto mínimo dentro del ciclo gestación-lactancia (Onetti y Grummer, 2004). Como consecuencia, durante el postparto temprano el gasto energético supera la ingesta, provocando un balance energético negativo (Macrae *et al.*, 2019) y, por ende, una reducción de la condición corporal (CC). La magnitud de la caída en el CMS determina el grado de movilización de reservas lipídicas, evidenciada por el aumento plasmático de NEFAs y β HB, lo que eleva la susceptibilidad a desórdenes metabólicos, especialmente a la cetosis (Allen y Piantoni, 2013; Ospina *et al.*, 2013).

El consumo de alimento en vacas lecheras está determinado por una compleja interacción de factores, entre los que se incluyen la composición de la dieta, el manejo, las condiciones ambientales, el nivel de producción y el estado fisiológico del animal, particularmente la concentración de insulina y la sensibilidad de los tejidos a esta hormona (Ingvarsen y Andersen, 2000). Los mecanismos que regulan la ingesta son multifactoriales e integran múltiples vías de señalización y retroalimentación (Brown, 2021). El comportamiento alimentario se regula en centros hipotalámicos que reciben información periférica proveniente del hígado, del tracto gastrointestinal y de señales hormonales y metabólicas.

El efecto del llenado ruminal sobre la regulación del consumo ha sido ampliamente estudiado (Pérez-Báez *et al.*, 2021). La distensión del rumen, determinada principalmente por el contenido de fibra detergente neutra (FDN) de origen forrajero, es percibida por mecanorreceptores localizados en el retículo y en el saco craneal del rumen. No obstante, se ha comprobado que este mecanismo predomina en etapas de alta producción y no en el inicio de la lactancia, razón por la cual se han formulado dietas posparto con mayores proporciones de fibra (Allen y Piantoni, 2013). Además, el tránsito del contenido digestivo estimula la liberación de péptidos intestinales que también participan en la modulación del apetito, tales como ghrelina, colecistoquinina y el péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1; Relling y Reynolds, 2007).

En años recientes, Allen *et al.* (2009) propusieron la *Teoría de la Oxidación Hepática* (HOT, del inglés Hepatic Oxidation Theory) a partir de estudios en modelos experimentales, la cual plantea que el aumento en la oxidación de sustratos hepáticos inhibe la ingesta, mientras que su disminución la estimula mediante aferencias vagales hepáticas (Allen *et al.*, 2009). El grado de oxidación hepática depende del equilibrio entre

la producción y la utilización de enlaces fosfato de alta energía (ATP). En los rumiantes, los principales combustibles oxidados en el hígado son los NEFAs, glicerol, lactato y aminoácidos, provenientes tanto del catabolismo tisular como de la dieta, además de propionato y butirato generados por la fermentación ruminal. Dado que el hígado bovino presenta baja actividad enzimática para metabolizar acetato y glucosa, estos sustratos no son utilizados de manera significativa.

El incremento del flujo hepático de NEFAs durante el parto podría, por tanto, contribuir a la disminución de la ingesta observada, lo cual coincide con la correlación inversa entre las concentraciones plasmáticas de NEFAs y el CMS descrita en diversos estudios (Arshad y Santos, 2022). Asimismo, las infusiones de propionato han mostrado un efecto hipofágico en rumiantes. Este ácido graso volátil, generado principalmente por la fermentación del almidón, es captado por el hígado y utilizado preferentemente para la gluconeogénesis. Cuando su disponibilidad supera la demanda de esta vía, el propionato puede oxidarse hasta acetyl-CoA. En vacas en balance energético negativo, la acumulación de acetyl-CoA inhibe la oxidación del propionato, favoreciendo su uso como precursor glucogénico. Sin embargo, su entrada al ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) puede estimular la oxidación de acetyl-CoA, generando ATP y elevando la carga energética hepática. Estos mecanismos sustentan la formulación de dietas posparto con mayor proporción de fibra, destinadas a minimizar los efectos hipofágicos del propionato (Allen y Piantoni, 2013).

1.1.2. Efectos de la suplementación con AG ω -3 sobre el CMS en vacas lecheras.

La suplementación lipídica puede modificar el consumo voluntario de materia seca. Los resultados de la literatura son variables: algunos estudios reportan una disminución del CMS atribuida al aroma o sabor característico de los aceites ricos en ω -3 (Choi y Palmquist, 1996; Donovan *et al.*, 2000), especialmente a niveles superiores a 300-400 mL d (Doreau y Chilliard, 1997; Keady *et al.*, 2000). Otros autores, en cambio, informaron aumentos del CMS cuando se utilizaron fuentes vegetales como semilla de lino extrusada o se redujo la relación ω -6: ω -3 en la dieta (Ambrose *et al.*, 2006; Zachut *et al.*, 2010; Greco *et al.*, 2018). Por otro lado, numerosos ensayos no evidenciaron diferencias en el CMS con dietas enriquecidas en ω -3, incluso con altos niveles de inclusión (Petit *et al.*, 2002a; Gonthier *et al.*, 2005; Moallem *et al.*, 2013; Elis *et al.*, 2016; Sinedino *et al.*, 2017). Estas inconsistencias pueden atribuirse a factores

interrelacionados, como la forma de presentación del suplemento (aceites libres, semillas enteras o extrusadas, productos protegidos de la biohidrogenación ruminal), el perfil de AG aportados, la etapa fisiológica de los animales, el momento y la duración de la suplementación (Rabiee *et al.*, 2012; Moallem, 2018; Lashkari *et al.*, 2024).

A nivel fisiológico, diversos mecanismos podrían explicar los cambios en el consumo: aumento de las concentraciones plasmáticas de NEFAs, menor motilidad intestinal, alteraciones hormonales y una mayor oxidación hepática de los AG (Allen, 2000; Relling y Reynolds, 2007; Leduc *et al.*, 2017). Se ha propuesto que los AGPI ω -3 actúan como agonistas de los receptores FFAR4, induciendo la liberación de colecistoquinina, hormona que reduce el apetito (Albracht-Schulte *et al.*, 2018). Otros mediadores, como el GLP-1 y la grelina, también participarían en este efecto (Bradford *et al.*, 2008).

Más recientemente, se ha estudiado la participación del sistema endocannabinoide como modulador del consumo y del metabolismo energético. Este sistema, activo en hígado y tejido adiposo, depende del perfil dietario de AG; la suplementación con ω -3 puede reducir la síntesis de endocannabinoides proinflamatorios, modulando la señalización hipotalámica y periférica, y favoreciendo un balance energético más estable (Brown, 2021; Kra *et al.*, 2022; Zachut *et al.*, 2022).

El grado de protección del suplemento es otro aspecto clave. Los productos diseñados para resistir la biohidrogenación ruminal permiten que una mayor proporción de AGPI alcance el intestino delgado sin comprometer la digestibilidad de la fibra, evitando los efectos negativos de la fermentación ruminal y el CMS (Gadeyne *et al.*, 2017; Palmquist y Jenkins, 2017).

1.1.3. Efectos de la suplementación con AG ω -3 sobre la producción y composición de leche.

Los efectos de la suplementación con ω -3 sobre la producción y composición de la leche son variables. En un metaanálisis con 86 comparaciones, Rabiee *et al.* (2012) observaron una tendencia al aumento en la producción de leche ($P = 0,088$), atribuible principalmente a las fuentes ricas en ω -3. Estudios posteriores confirmaron incrementos en la producción de entre 2,7 y 6,4 % con aceite de semilla de lino y microalgas (Moallem *et al.*, 2010; Zachut *et al.*, 2010; Sinedino *et al.*, 2017; Amini *et al.*, 2023). Sin embargo, otros trabajos no detectaron diferencias significativas (Ambrose *et al.*, 2006; Elis *et al.*, 2016; Freret *et al.*, 2019; Hadadi *et al.*, 2021).

En conjunto, los resultados sugieren que la respuesta depende de múltiples factores, como la fuente lipídica, el nivel de protección ruminal y la composición de la dieta base.

1.1.3.1. Influencia de la suplementación lipídica sobre la GB.

La grasa butirosa (GB) constituye el componente más variable de la leche bovina, tanto en su concentración como en su composición (Bauman y Griinari, 2003). Además de su variabilidad, la síntesis de GB representa el proceso más demandante de energía dentro de la glándula mamaria, llegando a requerir hasta un 35 % de la energía ingerida y el 50 % de la energía utilizada en la lactogénesis (Bauman y Currie, 1980). En consecuencia, y tal como recomiendan las directrices del NASEM (2021), una reducción controlada de la síntesis de grasa láctea podría disminuir los requerimientos energéticos para la producción de leche. La suplementación dietaria con AG no solo puede modificar el contenido total de grasa, sino también el perfil de AG que la componen.

Diversos estudios han documentado una disminución en la concentración de grasa láctea tras la inclusión de semillas de lino en la dieta, aunque el rendimiento total no fue afectado debido a la mayor producción de leche observada en el grupo suplementado. (Moallem *et al.*, 2010; Zachut *et al.*, 2010). Asimismo, estudios que evaluaron niveles crecientes de lípidos provenientes del lino demostraron una reducción progresiva del porcentaje de grasa a medida que aumentó la suplementación (Hurtaud *et al.*, 2010; Ferlay *et al.*, 2013). Un patrón similar se observó con la suplementación de aceites y harinas de pescado, ricos en EPA y DHA. Donovan *et al.* (2000) informaron una disminución cuadrática del porcentaje de grasa al incrementar la inclusión de aceite de pescado, mientras que (Moallem *et al.*, 2013) confirmaron este efecto negativo en vacas suplementadas con aceite de pescado encapsulado al 2,9 % de la MS, en comparación con grasas saturadas.

No obstante, no todos los estudios han confirmado este efecto depresor ante la suplementación con AGPI ω -3 sobre la GB. Neveu *et al.* (2013) evaluaron la suplementación con semillas de lino extruidas bajo dos relaciones forraje/concentrado y observaron que la composición de la leche estuvo más influenciada por dicha relación que por la inclusión lipídica. Resultados comparables fueron reportados por Martin *et al.* (2008) y Petit *et al.* (2009), quienes tampoco detectaron reducciones significativas en la GB con inclusiones moderadas de lino. Estos hallazgos sugieren que la magnitud y

dirección de la respuesta dependen de la interacción entre el nivel de suplementación y la composición de la dieta basal.

Una fracción considerable de los AGPI suministrados, especialmente cuando administran como aceites libres o sales cálcicas, puede ser sometida a biohidrogenación en el rumen. Este proceso genera isómeros intermedios relacionados con la depresión del contenido graso de la leche (Piperova *et al.*, 2004). Por ello, el grado de protección ruminal del suplemento lipídico constituye un factor determinante para evaluar su impacto sobre la composición láctea (Gadeyne *et al.*, 2017). El perfil de AG de los suplementos también desempeña un papel crítico. Los AG de cadena muy larga, como el DHA, han sido identificados como posibles inhibidores de la síntesis *de novo* de AG mediante la supresión de enzimas clave de la lipogénesis de la glándula mamaria, proceso mediado por la proteína de unión al elemento regulador de esteroides (SREBP1, del inglés *Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1*), que regula la expresión de genes codificantes de la acetil-CoA carboxilasa (ACC) y la ácido graso sintasa (FAS) (Angulo *et al.*, 2012; Shingfield *et al.*, 2013).

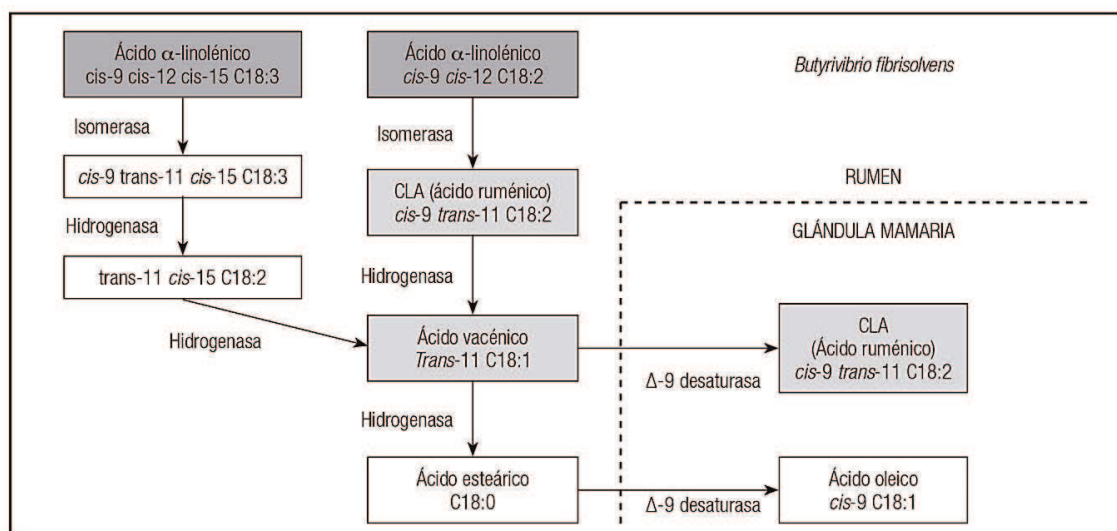
1.1.3.2. Perfil de AG en la leche y salud humana.

La leche bovina constituye una importante fuente de nutrientes en la dieta humana desde hace aproximadamente 10.000 años (Britt *et al.*, 2018). Sin embargo, en las últimas décadas se observa una tendencia a la disminución del consumo de leche líquida en ciertos países, debido a supuestos efectos negativos para la salud atribuidos, especialmente, a su alto contenido de AGS (Britt *et al.*, 2018). En particular, los AGS de como el láurico (C12:0), mirístico (C14:0) y palmítico (C16:0), se han asociado con incrementos en el colesterol total y en las lipoproteínas de baja densidad (LDL) consideradas aterogénicas. Sin embargo, los AGS de cadena corta (C4:0 a C10:0) no estarían asociados a afecciones coronarias (Lock y Bauman, 2004), por lo que las generalizaciones acerca de las grasas y los AG carecen de valor y con frecuencia generan percepciones erróneas en los consumidores. De hecho, algunos AG de cadena larga y muy larga pueden ejercer efectos antiinflamatorios y cardioprotectores (Gagliostro, 2004; Calder, 2012). Se ha demostrado que el consumo de AGPI, especialmente los de la serie ω -3, pueden modular la síntesis de eicosanoides, disminuir la producción de citoquinas proinflamatorias y mejorar la función endotelial, contribuyendo en conjunto a reducir el riesgo de aterosclerosis y enfermedades cardiovasculares en humanos (Mozaffarian y Wu, 2011).

La composición de la GB de la leche bovina puede modificarse a través de la dieta, siendo los AG de la serie ω -3, uno de los grupos de mayor interés por su relevancia para la salud humana (NASEM, 2021). Los AG presentes en la leche pueden originarse tanto de la captación de AG preformados del plasma ($> C16:0$) como de la síntesis *de novo* en la glándula mamaria ($< C16:0$). Adicionalmente, existe un grupo de AG mixtos (AG 16-C) que involucra ambos orígenes (Gallardo y Teixeira, 2023). La suplementación con AGPI se asocia consistentemente con una reducción de los AGS y un aumento en la proporción de AG de cadena larga en la estructura de los Tg de la leche (Plata-Pérez *et al.*, 2022). Cuando se suplementa con lípidos no protegidos de la biohidrogenación ruminal, la lipólisis de los Tg libera glicerol, que favorece una mayor producción de propionato y una menor síntesis de acetato, principal precursor de los AGS *de novo* de cadena corta y media. Aunque este cambio en la relación acetato/propionato no suele afectar el volumen de leche, sí modifica el ambiente ruminal y la población microbiana, generando condiciones que favorecen la síntesis y transferencia de AGI hacia la glándula mamaria (Shingfield *et al.*, 2013).

Los AGPI de cadena larga que escapan al proceso de biohidrogenación ruminal son absorbidos en el intestino y secretados en la leche, contribuyendo a elevar el contenido de AGPI en detrimento de los AGS. Este efecto puede estar mediado, en parte por la inhibición de SREBP1, esencial para la regulación de genes lipogénicos en la glándula mamaria (Angulo *et al.*, 2012), que controla la lipogénesis mamaria a través de las enzimas ACC y FAS (Shingfield *et al.*, 2013). Por otro lado, la suplementación con diferentes fuentes de AGPI eleva los niveles de ácido vaccénico (AV; trans-11 C18:1), cuyo origen está relacionado con la saturación incompleta del AL y ALA (**Figura 4**). El AV es un sustrato para la enzima Δ -9 desaturasa en la síntesis de los ácidos linolénicos conjugados (CLA) cuyo isómero más común es el ácido ruménico (AR) en la glándula mamaria (Bauman y Griinari, 2003). Estos AGs (AV y CLA) se han asociado con beneficios relevantes para la salud humana, entre ellos la menor incidencia de enfermedades crónicas, cardiopatía coronaria, aterosclerosis, hipertensión, diabetes tipo II y obesidad. Asimismo, al CLA se le atribuyen propiedades anticarcinogénicas en modelos animales y un potencial significativo para atenuar síntomas de la menopausia, mejorar la salud ósea y contribuir en la prevención de sarcopenia y obesidad sarcopénica (Plata-Pérez *et al.*, 2022).

Figura 4: Rutas metabólicas de la GB en vacas lecheras a partir de AL y ALA.



Fuente: Gómez-Cortés *et al.* (2018).

Las guías nutricionales para humanos recomiendan el consumo de alimentos que contengan un balance adecuado de lípidos, donde menos del 10 % de la energía total ingerida en la dieta provenga de AGS (USDA, 2025). En los lácteos, un método para definir una composición lipídica saludable considera parámetros como el porcentaje de AG trans, el contenido de CLA, la proporción ω -6/ ω -3 y el índice aterogénico (IA), basado en la relación entre AGS hipercolesterolémicos y AGI protectores (Ulbricht y Southgate, 1991).

En este sentido, la suplementación de vacas con AGPI ω -3 ha mostrado una importante tasa de pasaje a la leche, especialmente cuando los suplementos se suministran con algún grado de protección frente a la biohidrogenación ruminal (Glasser *et al.*, 2008). El aceite de lino, rico en ALA, se ha estudiado ampliamente como suplemento dietario por su potencial para incrementar los niveles de AR en la GB. González Moreno *et al.* (2020) observaron efectos favorables sobre la fracción aterogénica de la leche al suplementar con 0,7 kg d de sales cálcicas de aceite de lino en vacas lecheras. En este estudio, se registró una reducción en los AGS hipercolesterolémicos: C12:0 (-13,6 %), C14:0 (-7,4 %) y C16:0 (-9,0 %), respecto al grupo control, junto con un incremento del 108 % en la concentración de ALA en el grupo suplementado. Evidencia integrativa proviene del metaanálisis de Glasser *et al.* (2008), que mostró reducciones consistentes en los AG de cadena corta, mientras que aumentaban los AGMI y de cadena larga en comparación con dietas control. Además, se describieron aumentos lineales en los niveles

de CLA y trans-18:1 en la grasa láctea a medida que se incrementaba la inclusión de lino (Glasser *et al.*, 2008; Petit *et al.*, 2009).

El uso de otras fuentes de AGPI, como sales cálcicas de aceite de pescado (ricas en EPA y DHA), permite aumentar la concentración de estos AG bioactivos en la GB, aportando compuestos de reconocida acción antiinflamatoria y cardioprotectora (Moallem *et al.*, 2013; Hadadi *et al.*, 2021). Así, la suplementación con fuentes lipídicas ricas en ω -3 constituye una estrategia válida para modificar el perfil de AG de la leche bovina hacia una composición más favorable para la nutrición humana, en línea con las recomendaciones actuales de reducir grasas saturadas y aumentar grasas insaturadas en la dieta (USDA, 2025). Aunque los incrementos en el contenido de AGPI de la leche logrados mediante suplementación en bovinos son relativamente modestos, adquieren relevancia en el marco de dietas en las que los lácteos constituyen una fuente habitual de grasa (NASEM, 2021).

1.1.3.3. Influencia de la suplementación lipídica sobre la proteína láctea.

La suplementación con diferentes fuentes de lípidos en vacas lecheras ha mostrado un impacto más consistente sobre la GB que sobre la proteína de la leche (Chilliard, 1993; Drackley *et al.*, 2003). Diversos estudios han reportado una disminución en el porcentaje de proteína láctea tras la inclusión de AG en la dieta (Wu y Huber, 1994; Rabiee *et al.*, 2012). Se ha estimado que, por cada 100 g adicionales de grasa ingerida, la concentración de proteína en la leche se reduce, en promedio un 0,03 % (Jenkins y McGuire, 2006).

Los efectos negativos de la suplementación lipídica sobre la proteína de la leche podrían explicarse, en parte, por la presencia de AGI en el rumen, que conducen a una disminución relativa de la población microbiana. Este cambio puede comprometer la síntesis de proteína y, en consecuencia, reducir el suministro y la absorción de aminoácidos en el duodeno, esenciales para la síntesis proteica láctea (DePeters y Cant, 1992). Este efecto es particularmente importante cuando se utilizan fuentes insaturadas de lípidos que no han sido sometidas a procesos que limiten la biohidrogenación ruminal. Además, al comparar dietas ricas en hidratos de carbono con aquellas en las que parte de la energía proviene de lípidos, se ha observado que la sustitución de carbohidratos por grasa puede reducir la disponibilidad de precursores gluconeogénicos y, por ende, limitar la síntesis de lactoproteínas (Palmquist y Jenkins, 1980).

Sin embargo, estudios en los que se utilizaron fuentes de ω -3 como lino extrusado (Gonthier *et al.*, 2005; Martin *et al.*, 2008; Moallem *et al.*, 2010; Zachut *et al.*, 2010) o lino entero (Petit *et al.*, 2004; Akraim *et al.*, 2007) no evidenciaron efectos significativos sobre la proteína de la leche. De manera similar, González Moreno *et al.* (2020) reportaron un efecto nulo de la suplementación con ALA sobre el porcentaje y la producción de proteína láctea, en comparación con un grupo control alimentado con dietas isoenergéticas, en un experimento de 12 semanas de duración.

Otros investigadores evaluaron el efecto de la suplementación con diferentes fuentes de AG sobre la composición de leche. Por ejemplo, Petit (2002b) encontró una mayor concentración de proteína en las vacas suplementadas con semillas de lino (fuente de ALA), en comparación con aquellas alimentadas con semillas de girasol (fuente de LA), resultados consistentes con los de Ambrose *et al.* (2006). En un estudio reciente, Amini *et al.* (2023) evaluaron la suplementación con diferentes fuentes de AG protegidas de la biohidrogenación ruminal en vacas Holstein durante el PT. Las vacas que recibieron AGS o AGPI produjeron más leche que el grupo control y, aunque no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de proteína láctea, el mayor volumen de leche resultó en una mayor secreción diaria total de proteína.

1.1.4. Relación entre la suplementación con AG ω -3 y la función reproductiva en el ganado lechero.

Diversos autores han revisado el efecto de la suplementación con ω -3 sobre parámetros reproductivos en vacas lecheras (Moallem, 2018; Libera *et al.*, 2020; Carneiro *et al.*, 2021; Fabjanowska *et al.*, 2023). Aunque los resultados son en algunos casos inconsistentes, los AGPI ω -3 pueden influir positivamente en la función reproductiva afectando distintos niveles del eje hipotálamo-hipofisario-ovárico, además de modular la respuesta inflamatoria uterina y la síntesis de PG, en particular reduciendo la producción de PGF₂ α , compuesto clave en la luteólisis (Zeng *et al.*, 2023).

Asimismo, los AGPI ω -3 pueden regular la expresión de genes implicados en la esteroidogénesis afectando los procesos de crecimiento y diferenciación folicular, la maduración de ovocitos, la función luteal y el desarrollo embrionario. En conjunto, estos efectos contribuyen a acortar el anestro posparto y favorecer el restablecimiento de la ciclicidad ovárica (Fabjanowska *et al.*, 2023). Un adecuado suministro de ω -3 en la dieta de las vacas lecheras puede incrementar la tasa de concepción (Elis *et al.*, 2016) y reducir

el riesgo de pérdida de gestación (Dirandeh *et al.*, 2013), especialmente durante la lactancia temprana.

1.1.4.1. Reanudación del ciclo estral postparto.

Tras el parto, es fundamental que la vaca reinicie su ciclo estral para aumentar las probabilidades de preñez antes de los 130 días posparto (Middleton *et al.*, 2019). En este contexto, la suplementación con AG ω -3 pueden emplearse como una estrategia nutricional para acortar el anestro posparto, debido a su capacidad para modular la inflamación (Calder, 2012; Carneiro *et al.*, 2021), optimizar la función ovárica (Ambrose *et al.*, 2006; Moallem *et al.*, 2013; Hadadi *et al.*, 2021) y favorecer la síntesis de progesterona (Petit *et al.*, 2002a; Greco *et al.*, 2018; Fabjanowska *et al.*, 2023).

La suplementación de 750 g d de semilla de lino triturada (fuente de ALA) en vacas lecheras durante el PT acortó el tiempo hasta la primera ovulación postparto y la involución uterina luego de 30 días postparto, respecto a las vacas no suplementadas con lípidos (Ulfina *et al.*, 2015). De manera similar, Jolazadeh *et al.* (2019) compararon la suplementación preparto con 140 g d de sales cálcicas de aceite de pescado (fuente de EPA y DHA) frente a un grupo control (sin grasas añadidas) y observaron un acortamiento del intervalo hasta la primera ovulación postparto. En otro estudio, Matras *et al.* (2014) evaluaron la suplementación con dos variedades de semilla de lino (con alto y bajo ALA), en dosis del 3 y 6 % sobre el CMS en el pre y post parto, respectivamente. Comparadas con un concentrado isoenergético administrado desde las seis semanas previas a la fecha estimada de parto hasta las 17 semanas en lactancia, no se observaron diferencias significativas en los parámetros reproductivos al inicio de lactancia. Sin embargo, las vacas del tratamiento H-ALA presentaron una menor tasa de inseminación y un menor número de días hasta el primer celo en comparación con el grupo control y el grupo L-ALA. De forma similar, Pereira *et al.* (2022) suplementaron vacas lecheras desde los 11 días posparto y durante nueve semanas con una grasa protegida a base de aceite de lino frente a un suplemento isoenergético compuesto por AGS (control). La suplementación con ω -3 acortó el intervalo parto-concepción sin afectar la salud uterina ni la reanudación de la actividad ovárica postparto.

En conjunto, la evidencia indica que la suplementación con AG ω -3 durante el PT podría ser una estrategia prometedora para favorecer la reanudación de la actividad ovárica postparto (Moallem, 2018). No obstante, los resultados sugieren que la eficacia

de esta práctica depende en gran medida de factores como la fuente, la dosis y, especialmente, el momento de inicio de la suplementación. Se ha demostrado que, tras la suplementación con AGPI, las concentraciones tisulares tardan más tiempo en aumentar que las plasmáticas, lo que indica que iniciar el aporte de ω -3 en el preparto o al momento del parto podría ser más efectivo que posponerlo (Moallem, 2018; Pereira *et al.*, 2022). Esta estrategia permitiría una adecuada acumulación de AGPI en el endometrio, modulando de manera más eficiente la producción de citoquinas y favoreciendo la resolución de infecciones uterinas tempranas, las cuales comprometen el desarrollo folicular y la ovulación en vacas en inicio de lactancia (Sheldon *et al.*, 2002; Gilbert, 2016; Pascottini y LeBlanc, 2020).

1.1.4.2. Tamaño del Folículo Preovulatorio.

La concentración de ω -3 en el organismo influye en los procesos de maduración y competencia ovocitaria (Oseikria *et al.*, 2016). En este sentido, Ambrose *et al.* (2006) observaron un mayor tamaño de folículos preovulatorios en las vacas suplementadas con semilla de lino en comparación con aquellas que recibieron aceite de girasol (fuente de ω -6). Además, registraron un aumento del porcentaje de concepción al primer servicio (38,9 %) y una mayor supervivencia embrionaria (del día 0 al 24 post inseminación) en las vacas suplementadas con ω -3 respecto a las vacas del tratamiento ω -6.

El tamaño del folículo preovulatorio se relaciona directamente con la calidad del ovocito y la función del CL subsecuente (Yang y Fortune, 2015; Sharma *et al.*, 2020). De hecho, la suplementación dietética con ω -3 se ha asociado con un mayor tamaño del CL y concentraciones sanguíneas más altas de progesterona, lo que a su vez estimula el desarrollo folicular (Fabjanowska *et al.*, 2023). Ulfina *et al.* (2015) reportaron que las vacas que suplementadas con semilla de lino (750 g d) durante el PT presentaron un folículo dominante significativamente mayor y un CL más grande que las vacas del grupo control. Resultados comparables se describen en otros estudios donde emplearon distintas fuentes de AG ω -3, mostrando efectos positivos sobre el número de folículos, la dinámica ovárica y el tamaño del folículo preovulatorio (Zachut., 2010; Elis *et al.*, 2016; Freret *et al.*, 2019; Amini *et al.*, 2024).

Por el contrario, Sinedino *et al.* (2017) suplementaron vacas con 0 o 100 g/vaca/día de un producto de algas marinas (10 % DHA) desde el día 27 al 147 posparto y no observaron cambios en el diámetro folicular ni las concentraciones plasmáticas de

progesterona durante el protocolo Ovsynch. Sin embargo, la suplementación incrementó la tasa de preñez en un 39 % respecto al control, reduciendo en 22 días la mediana a la concepción. De manera similar, Moallem *et al.* (2013) demostraron que la suplementación con aceite de lino (rico en ALA) o con aceite de pescado (rico en EPA y DHA) desde el parto hasta los 60 días posparto aumentó el número de folículos recuperados por aspiración folicular y mejoró la tasa de clivaje y la formación de blastocistos *in vitro*, en comparación con una dieta con grasa saturada. Aunque no se detectaron diferencias en el diámetro folicular ni en las concentraciones de progesterona, ambos tratamientos con AGPI ω -3 mejoraron la foliculogénesis y la competencia ovocitaria.

Estos antecedentes sugieren que los AGPI ω -3 podrían influir sobre las características del folículo preovulatorio (Moallem, 2018). Este efecto podría estar mediado por la incorporación de ALA y sus metabolitos en el fluido folicular y en las células de la granulosa, desplazando la síntesis de eicosanoides hacia un perfil menos proinflamatorio (Zachut *et al.*, 2010; Moallem *et al.*, 2013). En contraposición, el AA (ω -6) y sus derivados desempeñan un papel clave en la regulación de la esteroidogénesis folicular, modulando la expresión de proteínas implicadas en la síntesis de estradiol, aunque los resultados reportados son variables (Zhang *et al.*, 2019).

En conjunto, diversos ensayos han documentado mejoras en la dinámica folicular y una tendencia hacia un mayor tamaño del folículo preovulatorio con dietas enriquecidas en ω -3 (Ambrose *et al.*, 2006; Wonnacott *et al.*, 2010). Esto indica que la respuesta a la suplementación con estos AG varía según la fuente utilizada, la cantidad administrada, el estado fisiológico del animal y el tiempo de aplicación. En suma, los datos respaldan que los ω -3 pueden favorecer una foliculogénesis más eficiente, aunque la magnitud de su efecto sobre el tamaño del folículo preovulatorio no es uniforme y requiere mayor investigación.

1.1.4.3. Función del Cuerpo Lúteo y Prostaglandinas.

Diversos estudios han documentado que la suplementación con AGPI, particularmente ALA, EPA y DHA modulan la fisiología luteal en vacas lecheras mediante la regulación de la síntesis de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Thatcher *et al.*, 2006; Sharma *et al.*, 2020). Mattos *et al.* (2000), (2004) y Santos *et al.* (2008) propusieron que la reducción en la secreción de $\text{PGF}_{2\alpha}$ asociada a la inclusión de AGPI ω -3 podría prolongar la vida

funcional del CL. Este efecto se atribuye a la competencia de ALA, EPA y DHA con el AA (C20:4 ω -6) por las enzimas desaturasas, elongasas y COX, lo que disminuye la síntesis de prostaglandinas de la serie 2 y favorece la formación de compuestos menos activos, como las prostaglandinas de la serie 3 (Saini and Keum, 2018). Coyne *et al.* (2008) indicaron que esta modificación del perfil eicosanoide uterino transforma el ambiente uterino de luteolítico a luteotrófico, favoreciendo la supervivencia embrionaria.

Estudios *in vitro* confirman este efecto: la incubación de células endometriales bovinas con EPA reduce significativamente la producción de PGF₂ α (Caldari-Torres *et al.*, 2006), y vacas con fuentes de ω -3 (EPA, DHA o ALA) presentan menores concentraciones plasmáticas de PGF₂ α en comparación con animales no suplementados (Mattos *et al.*, 2000; Petit *et al.*, 2004; Dirandeh *et al.*, 2013; Greco *et al.*, 2018). Esta respuesta se asocia con menor expresión de COX-2 y con la menor disponibilidad de AA como sustrato (Greco *et al.*, 2018).

Asimismo, los AGPI ω -3 modulan directamente la esteroidogénesis luteal y la producción de progesterona (Krum, 2020; Fabjanowska *et al.*, 2023). La incorporación de estos lípidos en las membranas del CL pueden alterar la expresión de proteínas involucradas en el transporte de colesterol hacia la mitocondria, como la StAR (del inglés *steroidogenic acute regulatory protein*) y la enzima citocromo P450_{scc} (Wathes *et al.*, 2007; Sharma *et al.*, 2020). En caprinos, la suplementación con aceite de pescado incrementó la expresión de la 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa y modificó la abundancia de StAR (Chaudhari *et al.*, 2020). En bovinos, la inclusión de ω -3 en la dieta elevó las concentraciones intraluteales y plasmáticas de progesterona (White *et al.*, 2012; Plewes *et al.*, 2018), sugiriendo una mayor capacidad biosintética del tejido. En conjunto, los ω -3 no solo reducen la señal luteolítica endometrial, sino que también estimulan directamente la síntesis de progesterona en el CL.

1.1.4.4. Desarrollo embrionario.

Una proporción considerable de las pérdidas embrionarias tempranas se asocia a una señalización deficiente del reconocimiento materno de la gestación. Normalmente, el embrión bovino secreta interferón- τ (IFN- τ), que inhibe la liberación pulsátil de PGF₂ α al suprimir los receptores endometriales de oxitocina. Cuando su producción es insuficiente, ocurre la luteólisis funcional y estructural del CL, reduciendo la secreción de progesterona

necesaria para mantener la gestación. Se estima que entre el 30 y el 50 % de los embriones se pierden antes del día 17 posfecundación (Szenci, 2021; Wiltbank *et al.*, 2023).

Varios trabajos muestran que la suplementación con AG ω -3 mejora la calidad embrionaria y la señalización del IFN- τ . Thangavelu *et al.* (2007) observaron mórulas con mayor número de blastómeros en vacas suplementadas con ω -3; Freret *et al.* (2019) registraron una mayor proporción de blastocistos, y Sinedino *et al.*, (2017) reportaron una mayor expresión génica relacionada con la síntesis de IFN- τ en vacas suplementadas con DHA. De forma similar, Giller *et al.* (2018) encontraron embriones más grandes y con mayor actividad de IFN- τ en vaquillonas alimentadas con aceite de pescado protegido. Este entorno disminuye la producción de PGF $_{2\alpha}$ y prolonga la funcionalidad luteal (Coyne *et al.*, 2008).

Hadadi *et al.* (2021) reportaron en vacas Holstein suplementadas con sales cálcicas de aceite de pescado una reducción significativa de los días abiertos y una mayor tasa de concepción, sugiriendo una acción combinada sobre la función luteal y la señalización embrionaria. De manera concordante, Iorio *et al.* (2024) y Amini *et al.* (2024) observaron incrementos en el tamaño del CL, mayores concentraciones de progesterona y mejores indicadores reproductivos en vacas suplementadas con AGPI respecto a los controles.

La evidencia reciente demuestra de forma consistente que la suplementación con AGPI ω -3 ejerce efectos beneficiosos sobre el desarrollo embrionario, la función luteal y las tasas de concepción en vacas lecheras. Estos efectos resultan de una compleja interacción entre en el metabolismo lipídico, la regulación hormonal y la señalización materno-embionaria.

En términos fisiológicos, los ω -3 compiten con el AA por las enzimas COX-1 y COX-2, reduciendo la producción de PGF $_{2\alpha}$ y generando un ambiente uterino luteotrófico que favorece la secreción de progesterona (Mattos *et al.*, 2004; Carneiro *et al.*, 2021). A nivel molecular, su acción antiinflamatoria atenúa la expresión de citoquinas proinflamatorias (IL-1 β , TNF- α) y de COX-2, reduciendo la inflamación uterina postparto (Ribeiro y Carvalho, 2017), además de incrementar la expresión de genes inducidos por interferón, mejorando la comunicación materno-embionaria (Fabjanowska *et al.*, 2023). En el embrión, su incorporación en las membranas celulares optimiza la

función mitocondrial y reduce el estrés oxidativo durante la división celular (Zeng *et al.*, 2023).

La acción combinada de progesterona, IFN- τ y ω -3 establece un círculo virtuoso que resfuerza la señal de reconocimiento embrionario, inhibe la luteólisis y mejora las condiciones para la implantación (Coyne *et al.*, 2008; Carneiro *et al.*, 2021). En este contexto, la suplementación estratégica con ALA, EPA y DHA durante el PT e inicio de lactancia se presenta como una herramienta prometedora para mejorar simultáneamente la eficiencia productiva y reproductiva de las vacas lecheras de alta producción. Cabe destacar que la magnitud de estos efectos puede variar según la fuente de AG, la dosis, la etapa fisiológica y la duración de la suplementación.

De esta forma, el propósito de este capítulo fue evaluar el efecto de la suplementación dietaria con sales cálcicas derivadas de aceites ricos en ω -3 sobre variables productivas y el comportamiento reproductivo en vacas lecheras durante el inicio de lactancia.

1. 2. MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los procedimientos efectuados en los animales se realizaron de acuerdo a las normativas vigentes en el tema (Guía para el cuidado y uso de animales agrícolas en Investigación y Docencia, Federación de Sociedades de Ciencia Animal, 2010), y fueron aprobados (4 de agosto de 2020) por el Comité de Ética y Seguridad Institucional de la FCV - UNL (Protocolo N° 614/20).

1.2.1 Animales

Se utilizaron 36 vacas de la raza Holstein seleccionadas del Tambo Experimental de la Estación Experimental Agropecuaria (EEA) Rafaela del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), provincia de Santa Fe, Argentina (31° 12' S, 61° 30' W). Las mismas fueron distribuidas en 18 bloques con dos animales cada uno según (valores expresados como el promedio \pm desvío estándar): fecha probable de parto (17/03/2022 \pm 16 días), número de lactancias (2,89 \pm 1,54 lactancias), peso corporal (708 \pm 99 kg), condición corporal (3,34 \pm 0,37) y nivel de producción en la lactancia previa (8392 \pm 1542 kg de leche); asignadas al azar a uno de dos tratamientos: Control (C) y Omega-3 (O-3).

El estudio comenzó a los 21 \pm 2 días previos a la fecha estimada del parto y finalizó a los 105 \pm 5 días en leche. Durante el experimento, todos los animales fueron alojados en galpones de cama fría, provisto de pasillos de alimentación cubiertos y acceso *ad libitum* al agua.

Durante el período preparto, los animales fueron separados según el tratamiento en dos corrales similares dentro de un galpón equipado con camas de arena para recibir los partos y sala de ordeño para la obtención del calostro. Ocurrido el parto, las vacas fueron ordeñadas y el calostro obtenido fue suministrado a su cría con sonda esofágica. Inmediatamente, luego del primer ordeño, las vacas fueron trasladadas al galpón de cama fría donde permanecieron en un mismo lote hasta el final del período experimental.

1.2.2. Alimentación.

Las dietas utilizadas durante el período experimental fueron diagramadas para cubrir el 100 % de los requerimientos de los animales, utilizando el software NASEM (2021) para su formulación. Durante el período preparto, los animales consumieron una

ración parcial mezclada (PMR, por sus siglas en inglés) constituida por (porcentajes promedio y expresados en base a MS): heno de paja de trigo (12,94 %), silaje de maíz (63,18 %), grano de maíz molido (3,81 %), harina de soja (16,87 %) y un paquete aniónico de vitaminas y minerales (3,20 %). Además, el tratamiento O-3 recibió 0,40 kg MS de sales cálcicas, mientras que el tratamiento Control recibió 0,70 kg MS de maíz molido (reemplazo isoenergético - equivalencia: 1 kg MS de sales cálcicas = 2 kg MS de maíz). Asumiendo 80% de digestibilidad de los AG y que para pasar de ED a EM se asume 100% ya que las pérdidas son prácticamente nulas, para el cálculo de la concentración energética de los lípidos se utilizó la siguiente ecuación: Energía digestible (ED) = 9,4 x digestibilidad AG x EE/100 (NRC, 2001). Este período fue utilizado como acostumbramiento a las dietas.

Durante la lactancia, ambos tratamientos fueron alimentados con una misma PMR que contenía heno de alfalfa (7,83 %), silaje de maíz (24,12 %), silaje de alfalfa (36,55 %), semilla de algodón (2,10 %), harina de soja (18,64 %), maíz molido (9,86 %) y un premix comercial de vitaminas y minerales (0,9 %). En la sala de ordeño y de manera individual, cada vaca recibió 4,48 kg de MS de un concentrado para vacas en lactancia sumado al tratamiento que le correspondía según su grupo. De este modo, el grupo O-3 fue suplementado con 0,65 kg de MS de sales cálcicas y al grupo control se le suministró 1,15 kg de MS de maíz molido en reemplazo isoenergético, repartido en partes iguales en cada turno de ordeño (04:00 y 15:00 horas).

El suministro de PMR (durante el parto y lactancia) se realizó una vez por día, aproximadamente a las 07:00 am utilizando un mixer vertical (Juarez 14 MTS3, equipado con balanza electrónica). Previo al suministro diario, se realizó lectura de comederos y se retiró el remanente del día anterior, asegurando al menos un 5 % de excedente diario.

1.2.3. Manejo reproductivo.

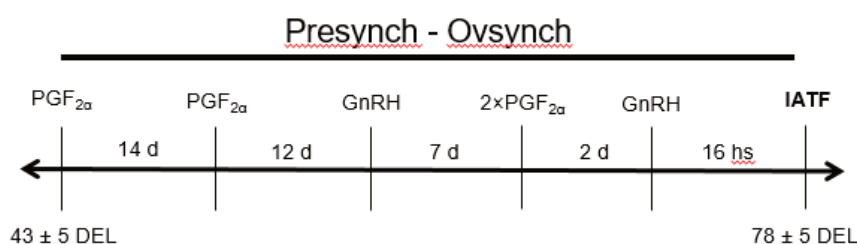
Luego del parto, dos veces por semana (lunes y jueves), todas las vacas fueron examinadas ginecológicamente para evaluar el puerperio y aptitud para la liberación a servicio para iniciar el protocolo de sincronización de la ovulación, para la inseminación artificial a tiempo fijo (IATF).

El examen ginecológico consistió en la evaluación clínica del aparato reproductor e incluyó maniobras de palpación acompañadas de ecografías transrectales (PROVETSCAN SR-2C, con transductor lineal transrectal de 6,5–8 MHz, en modo tiempo real B, BM, Color, PDI, PW; New VeTec, León, España) del útero y ovarios para

valorar la involución uterina, la presencia de estructuras ováricas y la detección de posibles alteraciones como endometritis, quistes ováricos, entre otras.

Todas las vacas cíclicas y liberadas a servicio fueron sincronizadas (43 ± 5 días en leche (DEL)) utilizando un protocolo Presynch–Ovsynch (PSOv) para la IATF (78 ± 5 DEL, día 0). El protocolo PSOv (**Figura 5**) consistió en la administración intramuscular de 2 mL de PGF_{2α} (150 µg de D-cloprostenol, Prostal, Over, Santa Fe, Argentina) a los -36 y -22 días, seguidos de la administración de 5 mL de GnRH (21 mg de acetato de buserelina, Gestar, Over, Santa Fe, Argentina) por vía intramuscular al día -10. El protocolo continuó con la administración de dos dosis consecutivas de PGF_{2α} (2 mL, 150 µg de D-cloprostenol, Prostal, Over, Santa Fe, Argentina) los días -3 y -2, con el objetivo de inducir la regresión del cuerpo lúteo. Posteriormente, se administró una dosis de GnRH (5 mL, 21 mg de acetato de buserelina, Gestar, Over, Santa Fe, Argentina) el día -1 para inducir la ovulación. La IATF se realizó 16 horas después de esta última aplicación de GnRH y se consideró como el día 0 del protocolo.

Figura 5: Diagrama del protocolo PSOv utilizado para la sincronización de la ovulación.



1.2.4. Muestras

1.2.4.1. Dieta y alimentos que la componen.

Muestras representativas de las raciones suministradas en parto y lactancia fueron tomadas semanalmente. Cada dos semanas, se muestrearon todos los ingredientes que componían las dietas y de ser necesario, se realizaron ajustes en la formulación.

Todas las muestras fueron secadas en estufa con circulación forzada de aire a 65 °C hasta peso constante para determinar el contenido de materia seca (MS; Protocolo PROMEFA-v2 AOAC, 1990 N° 130.15 y N° 167.03) y molidas en molino tipo Wiley (malla 1 mm). Luego, fueron ingresadas al laboratorio de Calidad de Forrajes de la EEA Rafaela del INTA, para determinación de FDN mediante el método ANKOM basado en la norma ISO 16472:2006; fibra detergente ácido (FDA) por el método ANKOM basado

en la norma ISO 13906:2008; lignina detergente ácido (LDA) mediante el protocolo PROMEFA v2 para equipo ANKOM; proteína bruta (PB) según AOAC, 1998 N° 976.05; extracto etéreo (EE) por AOAC, 1999, procedimiento 920.39 (modificado para extractor automático); cenizas (AOAC, 1990, procedimiento 942.05) y digestibilidad *in vitro* de la MS (DIVMS) según la técnica de fermentación en dos etapas de (Tilley y Terry, 1963). El contenido de almidón fue determinado mediante kit enzimático bajo el método AOAC 996.11 (AOAC, 2005). El perfil de AG de los alimentos fue determinado mediante cromatografía utilizando el protocolo AOCS Ce-1j-07, tal como se describe en Masson *et al.* (2015).

1.2.4.2. Producción y composición de leche.

La producción de leche fue registrada en forma individual y diaria mediante el sistema de ordeño computarizado DelPro (DelPro Farm Manager 6.60, DeLaval, Tumba, Suecia).

La composición de la leche fue evaluada en el Laboratorio de Calidad de Leche y Agroindustria de la EEA Rafaela de INTA, a partir de muestras individuales colectadas cada dos semanas. Se tomaron dos submuestras de leche de cada vaca en ordeños consecutivos (am y pm) utilizando muestreadores de leche (DeLaval, Tumba, Suecia), confeccionando luego una muestra compuesta por individuo, en la cual la participación de cada submuestra fue proporcional a la producción de cada ordeño. En cada muestra compuesta se determinó el contenido de grasa butirosa (GB), proteína total (PT), lactosa, sólidos totales (ST), sólidos no grasos (SNG) y urea por espectrofotometría infrarroja (MilkoScan™ Minor; FOSS Electric, Hilleroed, Dinamarca) según norma ISO 9622 IDF 141 (2013).

Para el cálculo de leche corregida por grasa (LGC 4%), se utilizó la fórmula descripta por Gaines y Davidson, (1923):

$$\text{LGC 4\%} = (0,4 + (0,15 \times \% \text{ GB})) \times \text{kg leche}$$

Para el cálculo de leche corregida por energía (LEC), se utilizó la fórmula propuesta por Tyrrell y Reid (1965)

$$\text{LEC} = (\text{kg leche} \times (383 \times \% \text{ GB}) + (242 \times \% \text{ PT}) + 783,2) / 3140$$

Para el análisis del perfil de AG en leche, se recolectaron muestras individuales de 100 mL de leche de cada vaca durante la quinta semana de lactancia, las cuales fueron

almacenadas a -24°C hasta su análisis mediante cromatografía gas-líquido en el Laboratorio de Bromatología y Nutrición de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral. Los ácidos grasos fueron convertidos a ésteres metílicos de ácidos grasos mediante transesterificación con una solución metanólica de hidróxido de potasio como paso intermedio previo a la saponificación (ISO 5509:2000). Luego, los ésteres metílicos fueron analizados mediante un cromatógrafo Shimadzu (GC 2014), equipado con un inyector automático (AOC-20i auto inyector, Shimadzu) y un detector de ionización de llama (SFID1), según lo indicado por Masson *et al.* (2015).

1.2.4.3. Consumo de MS y energía.

Durante el período preparto, el CMS fue evaluado mediante el método de la diferencia (ofrecido - rechazado), para lo cual, las vacas fueron alojadas en corrales individuales dentro del galpón durante períodos de 3 días consecutivos una vez por semana.

Del mismo modo durante la lactancia, el consumo individual diario de concentrado se determinó por la diferencia entre la cantidad ofrecida y la rechazada a lo largo de todo el período experimental. El consumo individual de PMR se determinó por la diferencia entre lo ofrecido y lo rechazado durante las semanas 5 y 15 de lactancia, para lo cual las vacas fueron alojadas en corrales individuales en el galpón de cama fría. El consumo total de MS se calculó como la suma del concentrado y PMR consumidos.

1.2.4.4. Balance energético.

El balance energético fue calculado en base a la Ecuación 4 (NASEM, 2021), donde:

$$\text{Balance energético (Mcal d}^{-1}\text{)} = \text{ENL consumida} - (\text{ENM} + \text{ENP} + \text{ENL}).$$

La ingesta de energía (ENL consumida) se calculó a partir del CMS total y el contenido de energía neta de lactancia de la MS consumida estimado de acuerdo con NASEM (2021), utilizando los datos de composición química obtenidos de los análisis de laboratorio.

La ENM (energía neta de mantenimiento; Mcal d^{-1}) fue determinada en base a la Ecuación 3-13 (NASEM, 2021):

$$\text{ENM} = 0,10 \times \text{PC}^{0.75}$$

La ENP (energía neta de preñez; Mcal d⁻¹) fue calculada mediante el uso de la Ecuación 3-17b (NASEM, 2021) para los requerimientos durante la involución uterina.

Finalmente, la energía para producción de leche (ENL; Mcal d⁻¹) fue calculada mediante la Ecuación 3-14a (NASEM, 2021):

$$\text{ENL} = \text{kg leche} \times [(0,0929 \times \% \text{ GB}) + (0,055 \times \% \text{ PT}) + (0,0395 \times \% \text{ lactosa})]$$

1.2.4.5. PC y CC.

Los animales fueron pesados individualmente mediante una balanza electrónica a los -21 y -7 días de la fecha probable de parto, el día del parto y a los 7, 21, 35, 60, 75 y 112 días posparto, inmediatamente después del ordeño de la mañana. En el mismo momento, dos evaluadores determinaron de manera independiente el score corporal usando una escala de 5 puntos (1: extremadamente flaca y 5: extremadamente gorda) con incrementos de 0,25 (Wildman *et al.*, 1982). El promedio de las determinaciones de ambos evaluadores fue utilizado para los análisis.

1.2.4.6. Parámetros reproductivos.

La primera ovulación postparto fue diagnosticada considerando de forma conjunta la dinámica ovárica, la presencia de una fosa ovulatoria o cuerpo hemorrágico y las concentraciones plasmáticas de progesterona. La actividad ovárica fue evaluada mediante ecografías transrectales seriadas utilizando un ecógrafo portátil (PROVETSCAN SR-2C, con transductor lineal transrectal de 6.5-8 MHz, en modo tiempo real B, BM, Color, PDI, PW; New VeTec, León, España), y se determinó el número y tamaño de las estructuras ováricas, incluyendo folículos y cuerpos lúteos (CL).

Se contabilizaron todos los folículos con un diámetro ≥ 3 -5 mm y se registró el diámetro de aquellos folículos mayores a 5 mm. La presencia de un CL, junto con un patrón compatible de crecimiento folicular previo, fue indicativa de ovulación reciente. Para confirmar la actividad lútea y validar funcionalmente la ovulación, se analizaron las concentraciones de progesterona en plasma (Quimioluminiscencia, Centaur XP, Siemens, EE. UU.) obtenidas el día 5 post confirmación de la ovulación. Se consideró como confirmación de la primera ovulación un valor de progesterona ≥ 1 ng mL, en

conjunto con la identificación ecográfica de un CL y/o evidencia de luteinización del folículo dominante.

A los 43 ± 5 días posparto se inició un protocolo PSOv. Durante el protocolo se realizaron ecografías ováricas para seguir la dinámica folicular (número y tamaño de folículos, diámetro del folículo preovulatorio, presencia del cuerpo lúteo y área luteal). Las vacas fueron inseminadas a tiempo fijo por un técnico experto. Los días 0, 5, 14, 22 y 28 respecto a la IATF, se extrajo sangre para determinar concentraciones plasmáticas de progesterona.

El diagnóstico de gestación se realizó por ecografía transrectal a los 32 días post-IATF y fue reconfirmado por palpación transrectal de los contenidos uterinos aproximadamente a los 60 días post-IATF. Adicionalmente, los días 28, 32, 42, 60 y 70 post-IATF se efectuaron evaluaciones ecográficas para determinar la presencia y viabilidad embrionaria.

A partir del día 32 post-IATF, el manejo reproductivo consistió en detección visual de celo e inseminación diaria. Las vacas que no concibieron fueron reinseminadas al detectar celo. Aquellas que no manifestaron celo y fueron diagnosticadas no gestantes 32 ± 3 días después de la última IA recibieron tratamiento con $\text{PGF}_{2\alpha}$ (150 μg de D-cloprostenol, Prostal, Over) en presencia de cuerpo lúteo, o una dosis de GnRH (21 mg de acetato de buserelina, Gestar, Over) seguida de $\text{PGF}_{2\alpha}$ siete días después, si no se evidenciaba cuerpo lúteo. La proporción de vacas gestantes fue evaluada en las vacas que lograron un diagnóstico de preñez hasta los 130 días en leche (DEL).

1.2.5. Análisis estadístico.

Los diferentes parámetros cuantificados fueron evaluados con el software R v4.2.2 (R Core Team, 2022), siguiendo las directrices metodológicas establecidas para garantizar la reproducibilidad y la validez de los resultados.

Los datos de producción y composición de leche, PC, CC, CMS, área luteal y hormonas fueron analizados de acuerdo con un diseño de bloques completos aleatorizados con observaciones repetidas en el tiempo, ajustado por covariable ($\alpha = 0.05$). El siguiente modelo fue utilizado: $Y_{ijkl} = \mu + T_i + B_j + A(B)_{k(j)} + W_1 + (T \times W)_{il} + \text{Cov} + E_{ijkl}$, donde: Y_{ijkl} = variable dependiente, μ = media general, T_i = efecto del tratamiento, B_j = efecto del bloque, $A(B)_{k(j)}$ = efecto aleatorio del animal anidado al

bloque, W_1 = efecto de la semana de muestreo, $(T \times W)_{il}$ = efecto de la interacción del tratamiento \times semana de muestreo, Cov = covariable, y E_{ijkl} = error residual.

El tamaño del folículo preovulatorio se analizó mediante un análisis de varianza estándar en un diseño de bloques completos aleatorizados. El modelo estadístico empleado fue $Y_{ijk} = \mu + T_i + B_j + E_{ijk}$, donde Y_{ijk} = representa la variable dependiente de la vaca k en el bloque j bajo el tratamiento i , μ = es la media general, T_i = es el efecto fijo del tratamiento, B_j = es el efecto aleatorio del bloque y E_{ijk} = es el error residual.

Los resultados de las vacas ovuladas para IATF y la concepción se analizaron mediante un modelo con un criterio de clasificación (tratamiento): $Y_{ijk} = \mu + T_i + B_j + A(B)_{k(j)} + E_{ijk}$, donde Y_{ijk} = variable dependiente, μ = media general, T_i = efecto del tratamiento, B_j = efecto del bloque, $A(B)_{k(j)}$ = efecto aleatorio del animal anidado en el bloque y E_{ijk} = error residual.

Para analizar la proporción de vacas preñadas a los 130 días, se aplicó el método no paramétrico de Kaplan-Meier para estimar la función de supervivencia de cada grupo de tratamiento. Las diferencias entre las curvas de supervivencia de los grupos de tratamiento se evaluaron mediante la prueba de log-rank, con un umbral de significancia de $p < 0,05$.

Todos los supuestos del modelo se verificaron mediante la prueba de normalidad de los residuos con la prueba de Anderson-Darling (paquete nortest). En todos los análisis, las variables explicativas y sus interacciones se consideraron significativas si $P \leq 0,05$, mientras que $0,05 < P \leq 0,10$ se consideró una tendencia.

1. 3. RESULTADOS

1.3.1. Calidad de dieta.

La composición química de las dietas PMR y concentrados utilizados durante el período experimental, se muestran en la **Tabla 1**. Las dietas fueron formuladas isoenergéticas utilizando el software NASEM (2021), reemplazando la energía aportada por los lípidos en el grupo O-3, con maíz molido (reemplazo isoenergético) en el tratamiento C.

Durante los 21 días previos al parto (acostumbramiento), las vacas consumieron una PMR preparto a la que se le adicionó el concentrado (sales cálcicas ó reemplazo isoenergético) según el tratamiento correspondiente. La dieta consumida durante este período fue formulada para aportar: 52,6 % MS, 14,3 % CP, 42,8 % FDN, -147 mEq kg de MS y 1,49 Mcal ENL. Las concentraciones de ácidos grasos y almidón diferían entre tratamientos durante el preparto (**Tabla 1**). Las vacas del grupo O-3 recibieron una dieta con mayor contenido de AG (4,6 % vs. 2,8 % sobre la MS) y menor concentración de almidón (19,5 % vs. 22,6 %) en comparación con el grupo Control.

Tabla 1: Composición química y digestibilidad de la PMR preparto, PMR de lactancia, balanceado de lactancia y reemplazo isoenergético (maíz molido) ofrecido a vacas lecheras suplementadas (O-3) o no (C) con sales cálcicas de AG ω -3.

| <i>Item¹</i> | <i>Preparto</i> | <i>PMR Lactancia</i> | <i>Balanceado lactancia</i> | <i>Reemplazo isoenergético</i> |
|-------------------------|-----------------|----------------------|-----------------------------|--------------------------------|
| n | 4 | 14 | 8 | 8 |
| MS | 50,38 ± 4,11 | 50,73 ± 2,98 | 89,63 ± 2,47 | 89,29 ± 1,46 |
| PB | 16,85 ± 2,42 | 18,68 ± 1,05 | 17,30 ± 1,31 | 9,02 ± 0,85 |
| Almidón | 20,06 ± 1,24 | 15,12 ± 1,32 | 41,73 ± 4,63 | 74,31 ± 3,08 |
| FDN | 41,62 ± 3,45 | 31,87 ± 4,34 | 13,32 ± 2,19 | 14,40 ± 2,85 |
| FDA | 24,13 ± 2,21 | 20,73 ± 3,42 | 4,70 ± 0,74 | 3,66 ± 0,37 |
| LDA | 2,72 ± 0,59 | 4,24 ± 1,04 | 0,98 ± 0,18 | 0,95 ± 0,32 |
| EE | 1,75 ± 0,43 | 3,05 ± 0,72 | 5,10 ± 0,77 | 4,12 ± 0,52 |
| Cenizas | 9,67 ± 0,73 | 8,26 ± 1,08 | 9,41 ± 0,45 | 1,69 ± 0,21 |
| NIDA | 0,09 ± 0,01 | 0,13 ± 0,04 | s/d | s/d |
| NIDIN | 0,17 ± 0,01 | 0,35 ± 0,26 | s/d | s/d |
| DIVMS | 63,36 ± 1,61 | 69,49 ± 4,80 | 82,50 ± 3,41 | 86,40 ± 1,12 |

¹Valores expresados a través del promedio ± desvío estándar. n= número de muestras analizadas. MS= materia seca. PB= proteína bruta. FDN= fibra detergente neutra. FDA= fibra detergente ácida. LDA= lignina detergente ácida. EE= extracto etéreo. NIDA= nitrógeno insoluble en detergente ácido. NIDIN= nitrógeno indisoluble en detergente neutro. DIVMS= digestibilidad *in vitro* de la MS.

Luego del parto, ambos grupos consumieron una misma PMR de lactancia y se le suministró una suplementación diferencial en sala de ordeño. Allí, cada vaca recibió 4,48 kg de MS de un balanceado de lactancia y 0,65 kg de MS de sales cálcicas de AGPI ω -3 en el grupo O-3, o bien 1,15 kg de MS de maíz molido en el grupo Control, como reemplazo isoenergético. Estos suplementos se distribuyeron en partes iguales en los ordeños de la mañana y la tarde. En promedio, la dieta de lactancia presentó un 53,5 % de MS, 18,3% de PC y 30,1% de FDN. Similar a la dieta utilizada en el período preparto, durante la lactancia, la dieta total del grupo O-3 presentó una mayor concentración de AG (5,0 % vs. 3,4 % sobre la MS) y una menor proporción de almidón (20,5 % vs. 23,3 % de la MS) en comparación con la del grupo C, aportando 1,7 Mcal ENL kg MS, manteniéndose el equilibrio energético entre tratamientos (**Tabla 1**).

El suplemento lipídico utilizado en este estudio correspondió a un jabón cálcico, formulado exclusivamente para este estudio a partir de una mezcla de aceite de lino (60 %) y aceite de pescado (40 %). El producto fue elaborado mediante un proceso de saponificación controlado, logrando una matriz de sales cálcicas con alta estabilidad ruminal. Desde el punto de vista composicional, el suplemento presentó una materia seca del 99,7 %, un contenido de extracto etéreo de 69,3 %, cenizas de 25,9 %, proteína bruta de 0,4 % y una digestibilidad *in vitro* del 91,7 %, sobre base de materia seca.

El perfil de AG del suplemento, se caracterizó por un alto contenido de AGI, dentro de los cuales los AGPI representaron el 57 % del total. Entre los ácidos grasos mayoritarios, se destacaron el ácido linoleico (AL; 23,1 %) y el ácido α -linolénico (ALA; 27,6 %). Asimismo, el suplemento presentó cantidades relevantes de ácidos grasos de la serie ω -3, incluyendo ácido eicosapentaenoico (EPA; 1,8 %), ácido docosapentaenoico (DPA; 0,4 %) y ácido docosahexaenoico (DHA, 3,7 %).

La evaluación de la protección ruminal del producto (sales cálcicas) utilizado en el presente estudio, se realizó mediante ensayos *in vitro* (**ANEXO 1**) en el Centro de Investigación y Servicios en Nutrición Animal (CISNA, FAUBA), según el protocolo de digestibilidad de Goering y van Soest (1970). Los parámetros determinados incluyeron la digestibilidad de la MS, la digestibilidad de la FDN a las 48 y 72 horas de incubación y la cinética de producción de gas a 3, 6, 9, 12, 24, 30, 36, 48 y 72 h de incubación. El agregado del suplemento graso a razón del 3 % de la MS, no modificó significativamente ($P > 0,05$) la digestibilidad de la MS ni de la FDN de los forrajes, ni afectó los parámetros de la producción de gas (**ANEXO 1**). Estos resultados demuestran que, en las condiciones

evaluadas, el suplemento no interfirió con la fermentación ni con la digestión de la fibra, lo que indica un adecuado grado de protección ruminal y confirma su carácter inerte a nivel del rumen.

1.3.2. Consumo de MS y energía.

Durante el período preparto, el CMS total fue similar entre los tratamientos ($P = 0,27$). El grupo control presentó un consumo promedio de $13,96 \pm 0,48$ kg MS día⁻¹, mientras que el grupo tratado (O-3) consumió $13,13 \pm 0,54$ kg MS día⁻¹.

Durante la lactancia, el CMS del concentrado ofrecido en la sala de ordeño fue mayor (+20,2 %; $P < 0,01$) en las vacas del grupo control (C) en comparación con las del grupo suplementado (O-3) (**Tabla 2**). En consecuencia, la ingesta de energía proveniente del concentrado fue significativamente menor en el grupo O-3 ($P < 0,01$). Esta diferencia podría atribuirse, en parte, a un mayor rechazo del concentrado observado en el grupo O-3 ($P < 0,01$) y también al hecho de que debido al diseño experimental del estudio (concentrados isoenergéticos), las vacas del grupo C recibieron una cantidad adicional de 0,5 kg MS día⁻¹ de concentrado (+ 9,7 %) en sala de ordeño, respecto al grupo O-3.

Tabla 2: CMS, energía y balance energético durante la lactancia en vacas lecheras suplementadas (O-3) o no (C) con sales cálcicas de AG ω -3.

| Item | Tratamiento ¹ | | EEM | <i>p</i> -valor ² | | |
|--|--------------------------|------|------|------------------------------|--------|---------------|
| | O-3 | C | | Trat | Tiempo | Trat × Tiempo |
| CONCENTRADO³ | | | | | | |
| Ofrecido, kg MS d ⁻¹ | 5,13 | 5,63 | | | | |
| Rechazado, kg MS d ⁻¹ | 0,73 | 0,33 | 0,08 | < 0,01 | < 0,01 | 0,20 |
| CMS, kg d ⁻¹ | 4,41 | 5,30 | 0,08 | < 0,01 | < 0,01 | 0,22 |
| ENL consumida ⁴ , Mcal d ⁻¹ | 10,0 | 11,5 | 0,22 | < 0,01 | < 0,01 | 0,11 |
| PMR | | | | | | |
| CMS, kg d ⁻¹ | 22,6 | 21,9 | 0,38 | 0,17 | < 0,01 | 0,43 |
| ENL consumida ⁴ , Mcal d ⁻¹ | 35,9 | 35,0 | 1,13 | 0,34 | < 0,01 | 0,43 |
| TOTAL | | | | | | |
| CMS, kg d ⁻¹ | 27,0 | 27,2 | 0,37 | 0,70 | < 0,01 | 0,59 |
| ENL consumida ⁴ , Mcal d ⁻¹ | 45,9 | 46,6 | 1,13 | 0,94 | < 0,01 | 0,14 |
| Balance energético ⁵ , Mcal d ⁻¹ | 6,15 | 7,89 | 0,69 | 0,06 | < 0,01 | 0,61 |

¹Valores expresados a través de las medias mínimas cuadráticas (LSMeans) y el error estándar de las LSMeans (EEM). ²Efectos del tratamiento (Trat), semana de lactancia (Tiempo) e interacción Trat × Tiempo. ³O-3: alimento balanceado + sales cálcicas O-3; C: alimento balanceado + maíz molido (reemplazo isoenergético). ⁴Estimado según NASEM (2021). ⁵Estimado según NASEM (2021) utilizando el CMS de los animales durante la 5^o y 15^o semana del período experimental.

A su vez, el CMS y la ingesta de energía proveniente de la PMR no difirieron entre los tratamientos ($P > 0,10$). En consecuencia, el consumo total de MS y energía (concentrado + PMR), resultaron similares entre tratamientos (**Tabla 2**). Estos resultados indican que la suplementación lipídica no afectó la ingesta global de materia seca ni el aporte energético total durante el periodo evaluado. Sin embargo, se observó una tendencia hacia un menor balance energético ($P < 0,06$) en el grupo O-3 en comparación con el grupo Control (**Tabla 2**).

1.3.3. Producción y composición de leche.

Se detectó interacción entre tratamiento y semana de lactancia para la producción de leche ($P < 0,01$; **Tabla 3**). La producción de leche fue significativamente mayor ($P < 0,05$) en las vacas suplementadas con O-3 en 6 de las 14 semanas de lactancia analizadas y tendió a ser mayor ($P < 0,10$) en el grupo O-3 durante las semanas 3, 4 y 7 de lactancia (**Figura 6**).

Tabla 3: Producción y composición de leche en vacas lecheras suplementadas (O-3) o no (C) con sales cálcicas de AG ω -3.

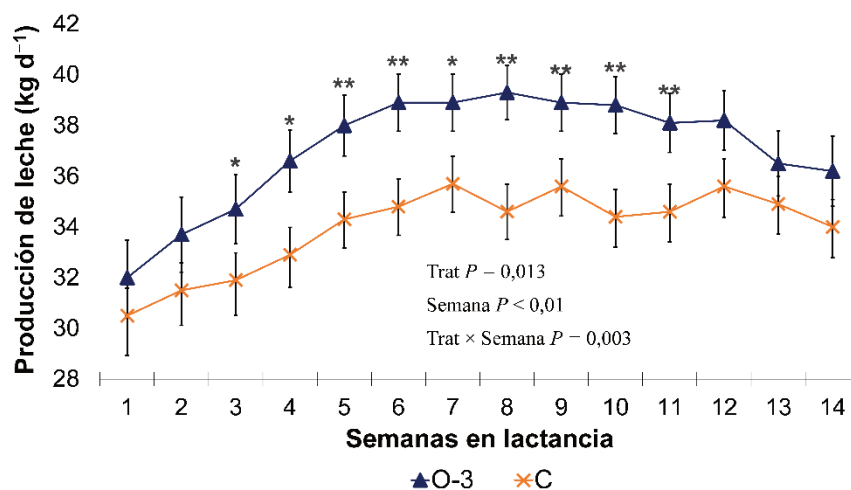
| Item | Tratamiento ¹ | | | <i>p</i> -valor ² | | |
|-----------------------------|--------------------------|------|------|------------------------------|--------|---------------|
| | O-3 | C | EEM | Trat | Tiempo | Trat × Tiempo |
| Leche, kg d ⁻¹ | 37,0 | 34,0 | 1,08 | 0,01 | < 0,01 | < 0,01 |
| LGC4%, kg d ⁻¹ | 35,1 | 33,3 | 1,31 | 0,31 | < 0,01 | 0,99 |
| LEC, kg d ⁻¹ | 34,9 | 32,5 | 1,24 | 0,17 | < 0,01 | 0,96 |
| GRASA BUTIROSA | | | | | | |
| % | 3,72 | 3,68 | 0,10 | 0,60 | 0,09 | 0,97 |
| Kg d ⁻¹ | 1,36 | 1,28 | 0,05 | 0,19 | < 0,01 | 0,63 |
| PROTEÍNA TOTAL | | | | | | |
| % | 3,19 | 3,13 | 0,04 | 0,18 | < 0,01 | 0,79 |
| Kg d ⁻¹ | 1,18 | 1,06 | 0,04 | 0,03 | < 0,01 | 0,41 |
| LACTOSA | | | | | | |
| % | 4,97 | 4,91 | 0,04 | 0,35 | < 0,01 | 0,05 |
| Kg d ⁻¹ | 1,82 | 1,70 | 0,07 | 0,09 | < 0,01 | 0,11 |
| Sólidos totales, % | 12,7 | 12,7 | 0,16 | 0,96 | <0,01 | 0,60 |
| Sólidos no grasos, % | 8,91 | 8,91 | 0,09 | 0,66 | < 0,01 | < 0,01 |
| NUL, mg 100mL ⁻¹ | 35,7 | 36,5 | 0,72 | 0,27 | < 0,01 | 0,13 |

¹Valores expresados a través de las medias mínimas cuadráticas (LSMeans) y el error estándar de las LSMs (EEM). ²Efectos del tratamiento (Trat), semana de lactancia (Tiempo) e interacción Trat × Tiempo. LGC4% = leche corregida por grasa; LEC = leche energía corregida; NUL = nitrógeno ureico en leche.

Las vacas del grupo O-3 mostraron un incremento sostenido en la producción láctea desde la primera semana (32,0 kg d⁻¹), alcanzando un pico máximo en la semana 8 (39,3 kg d⁻¹). Posteriormente, la producción se mantuvo relativamente estable durante aproximadamente cuatro semanas, seguida de una leve disminución hacia el final del estudio (semana 13: 36,5 kg d⁻¹; semana 14: 36,2 kg d⁻¹). En comparación, el grupo C presentó un pico de producción más bajo (35,7 kg d⁻¹) en la semana 7, seguido por un descenso progresivo hasta la semana 14 (34,0 kg d⁻¹). En resumen, el grupo O-3 no solo logró una producción máxima mayor, sino que también mantuvo niveles de producción más constantes a lo largo del tiempo en comparación con el grupo C (**Figura 6**). Esta mayor producción de leche en el grupo O-3 coincidió con una tendencia a mayor producción de lactosa (1,82 vs. 1,70 kg d⁻¹, $P < 0,10$).

Las producciones de LCG4% y LEC, el contenido de grasa butirosa, sólidos totales y NUL fueron similares ($P > 0,10$) entre tratamientos, mientras que la producción de proteína fue significativamente mayor (+11,3 %, $P < 0,05$) en las vacas del grupo O-3 (**Tabla 3**).

Figura 6: Producción de leche en vacas lecheras suplementadas (O-3) o no (C) con sales cálcicas de AG ω -3.



Tendencias expresadas como * $P < 0,10$ y diferencias significativas como ** $P < 0,05$. Las barras indican el EEM.

1.3.4. Eficiencia de conversión.

La eficiencia de conversión difirió entre los grupos de tratamiento, observándose un efecto positivo de la suplementación lipídica sobre la conversión del alimento en LEC (**Tabla 4**). Las vacas del grupo O-3 produjeron más ($P < 0,05$) LEC por kg de MS consumida (1,28 vs. 1,20 kg LEC/kg MS para O-3 y C, respectivamente) y además fueron

más eficientes ($P = 0,05$) en la conversión de la ENL ingerida (0,77 vs. 0,72 kg LEC/Mcal ENL para O-3 y C, respectivamente).

Tabla 4: Eficiencia de conversión en vacas lecheras suplementadas (O-3) o no (C) con sales cálcicas de AG ω -3.

| Eficiencia de conversión | Tratamiento ¹ | | EEM | <i>p</i> -valor ² | | |
|--------------------------|--------------------------|------|------|------------------------------|--------|---------------|
| | O-3 | C | | Trat | Tiempo | Trat × Tiempo |
| LEC / ENL | 0,77 | 0,72 | 0,02 | 0,05 | 0,18 | 0,74 |
| LEC / CMS | 1,28 | 1,20 | 0,03 | 0,02 | 0,89 | 0,71 |

¹Valores expresados a través de las medias mínimas cuadráticas (LSMeans) y el error estándar de las LSMs (EEM). ²Efectos del tratamiento (Trat), semana de lactancia (Tiempo) e interacción Trat × Tiempo. LEC/ENL = leche energía corregida / energía neta de lactancia consumida. LEC/CMS = leche energía corregida / consumo de materia seca.

1.3.5. Perfil de AG de la leche.

La suplementación con sales cálcicas ω -3 a vacas lecheras en inicio de lactancia modificó el perfil de AG de la grasa láctea (**Tabla 5**). En efecto, la leche del grupo de vacas O-3 presentó una reducción ($P < 0,01$) en la concentración de AG saturados (66,11 vs. 70,04 % para O-3 y C, respectivamente) y un incremento ($P < 0,01$) en la concentración de AG insaturados (33,89 vs. 29,96 % para O-3 y C, respectivamente).

La concentración de AG de cadena corta (C4:0 a C10:0) fue similar ($P > 0,10$) entre los grupos de tratamiento, mientras que la concentración de los AG pro-aterogénicos (C12:0, C14:0 y C16:0) resultó menor ($P < 0,05$) en las vacas suplementadas con sales cálcicas respecto al grupo Control (-8,2, -6,6 y -10,4 % para C12:0, C14:0 y C16:0, respectivamente). Esta diferencia en la concentración de AG pro-aterogénicos se refleja en una reducción significativa del IA en la leche del grupo O-3 (2,24 vs. 2,66; $P < 0,01$), equivalente a una disminución del 17,6 %.

El aporte suplementario (0,65 kg día⁻¹) de sales cálcicas tendió ($P = 0,08$) a modificar la concentración de ácido esteárico (C18:0) e incrementó significativamente la concentración de la mayoría de los AG de 18 carbonos de la GB ($P < 0,01$), a excepción de la concentración del AG oleico (*cis*-9 C18:1) y su isómero posicional (*cis*-12 C18:1) que resultaron similares entre los grupos de tratamiento (**Tabla 5**).

La concentración de AG monoinsaturados resultó mayor ($P = 0,02$) en la grasa de la leche proveniente de las vacas del tratamiento O-3 con respecto al grupo C (29,62 vs. 26,47 g 100 g AG); en el mismo sentido, el tratamiento O-3, mostró una mayor concentración de AG poliinsaturados (+18,6 %; $P < 0,01$) respecto al tratamiento Control.

Tabla 5: Perfil de AG de la leche en vacas lecheras suplementadas (O3) o no (C) con sales cálcicas de AG ω -3.

| Ácidos Grasos ¹ , g 100 g de AG | Tratamiento ² | | EEM | P-valor |
|---|--------------------------|-------|-------|---------|
| | O-3 | C | | Trat |
| C4:0 | 3,10 | 3,00 | 0,04 | 0,13 |
| C6:0 | 2,01 | 2,01 | 0,02 | 0,99 |
| C8:0 | 1,23 | 1,24 | 0,02 | 0,30 |
| C10:0 | 2,84 | 2,89 | 0,15 | 0,22 |
| C11:0 | 0,05 | 0,07 | 0,01 | 0,01 |
| C12:0 | 3,25 | 3,54 | 0,09 | 0,03 |
| C13:0 | 0,07 | 0,10 | 0,007 | < 0,01 |
| C14:0 | 10,62 | 11,37 | 0,16 | < 0,01 |
| cis-9 C14:1 | 0,57 | 0,68 | 0,04 | 0,07 |
| C15:0 | 0,81 | 0,95 | 0,04 | 0,01 |
| C16:0 | 29,37 | 32,63 | 0,36 | < 0,01 |
| C17:0 | 1,36 | 1,35 | 0,01 | 0,94 |
| C18:0 | 12,36 | 11,83 | 0,36 | 0,08 |
| trans-9 C18:1 | 0,57 | 0,36 | 0,02 | < 0,01 |
| cis-11 C18:1 | 1,07 | 0,88 | 0,04 | < 0,01 |
| trans-11 C18:1 (AV) | 2,04 | 1,19 | 0,12 | < 0,01 |
| C18:1 | 23,08 | 21,89 | 0,95 | 0,15 |
| trans-10 C18:1 | 0,68 | 0,43 | 0,04 | < 0,01 |
| C18:2 (LA) | 3,01 | 2,64 | 0,04 | < 0,01 |
| C18:3 ω -3 (ALA) | 0,89 | 0,59 | 0,02 | < 0,01 |
| cis-9, trans-11 CLA (AR) | 0,65 | 0,43 | 0,035 | < 0,01 |
| C20:0 | 0,12 | 0,13 | 0,001 | 0,34 |
| cis 11 C20:1 | 0,05 | 0,02 | 0,03 | < 0,01 |
| cis-11, 14, 17 20:3 | 0,07 | 0,03 | 0,005 | 0,04 |
| C20:5 (EPA) | 0,05 | 0,03 | 0,003 | < 0,01 |
| C22:0 | 0,08 | 0,06 | 0,002 | < 0,01 |
| C22:4 (AA) | 0,13 | 0,15 | 0,005 | < 0,01 |
| C22:5 (DPA) | 0,07 | 0,05 | 0,002 | < 0,01 |
| C 22:6 (DHA) | 0,05 | - | 0,005 | - |
| C24:0 | 0,03 | 0,03 | 0,002 | 0,49 |
| Saturados (AGS) | 66,11 | 70,04 | 0,69 | < 0,01 |
| Insaturados (AGI) | 33,89 | 29,96 | 0,69 | < 0,01 |
| Monoinsaturados (AGMI) | 29,62 | 26,47 | 0,611 | 0,02 |
| Polinsaturados (AGPI) | 4,27 | 3,60 | 0,09 | < 0,01 |
| Relación AG ω -6 : ω -3 | 3,08 | 4,17 | 0,13 | < 0,01 |
| IA ³ | 2,24 | 2,66 | 0,06 | < 0,01 |

¹Valores expresados como porcentajes del total de AG identificados. ²Valores expresados a través de las medias mínimas cuadráticas (LSMeans) y el error estándar de las LSMean (EEM). ³IA: índice de aterogenicidad (C12 + 4 × C14 + C16) / (Σ de AG insaturados).

Las vacas suplementadas con sales cálcicas ω -3 presentaron un mayor contenido de AG ω -3 (1,06 vs. 0,70 g 100 g AG; $P < 0,01$) y una menor ($P < 0,01$) relación AG ω -6: AG ω -3 (3:1 vs. 4:1, para O-3 y C, respectivamente). Las concentraciones de LA (C18:2 ω -6) y ALA (C18:3 ω -3) aumentaron (+14,0 y +50,8 %, respectivamente; $P < 0,01$) en las vacas del tratamiento O-3 comparado con el grupo Control. Del mismo modo, la concentración basal de CLA (*cis*-9, *trans*-11 CLA, AR) fue de 0,43 g 100 g AG y el consumo suplementario de las sales cálcicas implicó un aumento ($P < 0,01$) de su concentración del orden del 51,2%, alcanzando valores de 0,65 g 100 g AG en la GB del grupo O-3 (**Tabla 5**).

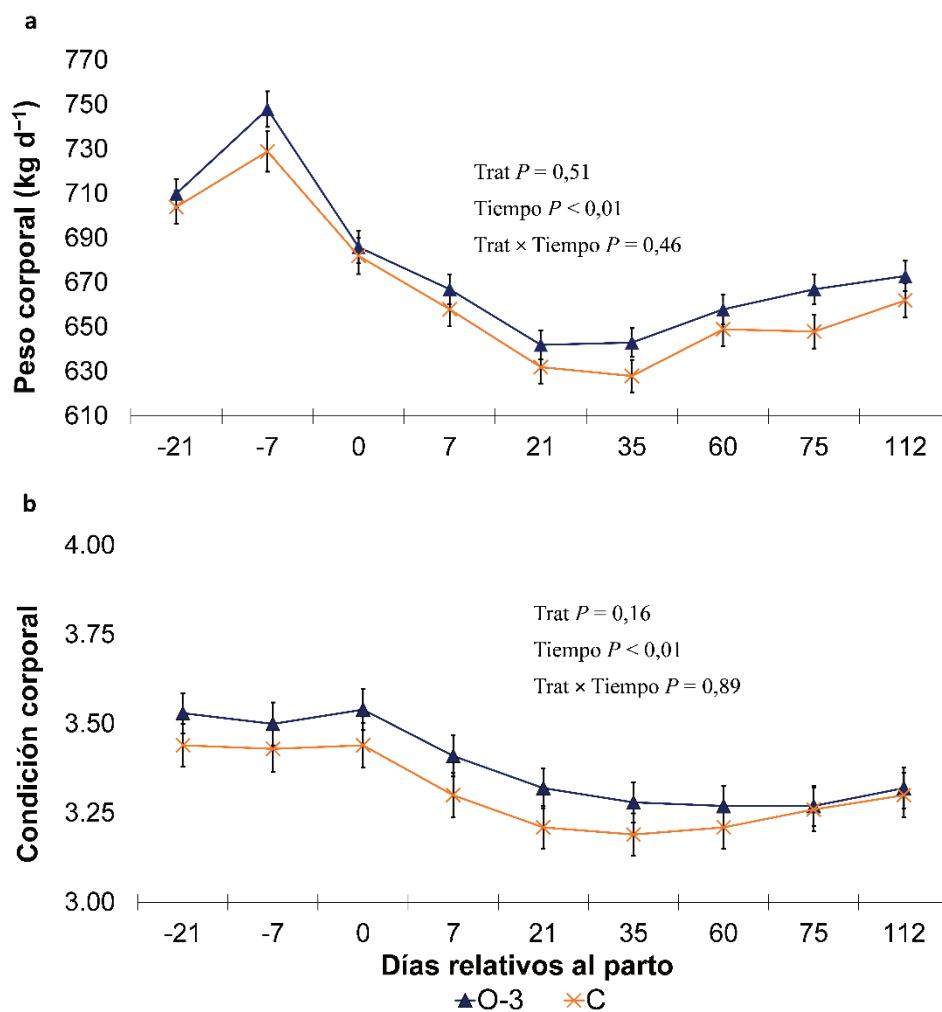
En cuanto a los ácidos grasos de cadena larga específicos del grupo O-3, se detectó un mayor contenido de ácido eicosapentaenoico (C20:5, EPA) en la leche de vacas del grupo O-3 (+66,6 %; $P < 0,01$) en comparación con el grupo Control (**Tabla 5**). Asimismo, el ácido docosahexaenoico (C22:6, DHA) fue detectado únicamente en la GB de la leche del grupo O-3 (0,05 g 100 g de AG).

1.3.6. Peso y condición corporal.

No se observaron diferencias significativas entre tratamientos en el PC durante el período experimental ($P = 0,51$; **Figura 7 a**). El PC promedio durante el parto fue de 726 kg, mientras que durante la lactancia fue de 655,5 kg. No se observó un efecto de la interacción tratamiento \times semana ($P = 0,46$). Sin embargo, era de esperar un efecto de la semana ($P < 0,01$), evidenciado por la evolución de las curvas de PC en ambos grupos; Al final de la gestación, las vacas aumentaron su PC y tras el parto, ambos tratamientos mostraron una marcada pendiente descendente, reflejando la pérdida de peso asociada al inicio de la lactancia (**Figura 7 a**). El valor mínimo de PC se alcanzó en el día 35 postparto para ambos grupos de tratamiento (643 vs. 628 kg para O-3 y C, respectivamente). En ese momento, el grupo suplementado con sales cálcicas tuvo una pérdida de 45,2 kg y el grupo Control una pérdida de 53,7 kg de PC respecto al día del parto. A partir de ese punto, ambas curvas comenzaron a ascender, evidenciando una progresiva recuperación del PC.

La CC mostró una evolución similar a la variable PC, con una disminución progresiva luego del parto seguida por una recuperación parcial luego del día 35 postparto (**Figura 7 b**). No se detectaron diferencias significativas entre tratamientos ($P = 0,16$), ni interacción significativa tratamiento \times semana ($P = 0,89$).

Figura 7: Evolución del PC (a) y CC (b) en vacas lecheras suplementadas (O-3) o no (C) con sales cálcicas de AG ω -3.



1.3.7. Parámetros reproductivos.

No se observaron diferencias entre tratamientos en los días hasta la primera ovulación ($18,9 \pm 5,6$ vs. $20,0 \pm 8,3$ días para O-3 y C, respectivamente; $P = 0,69$; $n = 19$) ni en la concentración de progesterona plasmática a la primera ovulación ($7,83 \pm 2,75$ vs. $5,64 \pm 1,92$ ng mL⁻¹ para el grupo O-3 y C, respectivamente; $P = 0,22$).

Tabla 6: Parámetros reproductivos en vacas lecheras suplementadas (O3) o no (C) con sales cálcicas de AG ω -3.

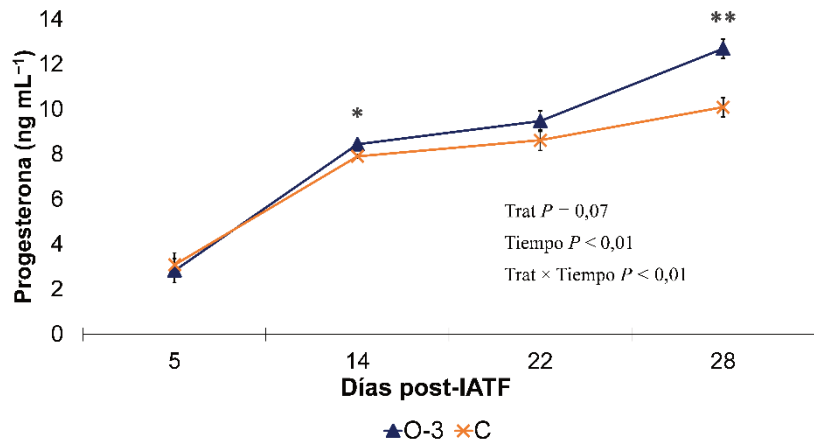
| | Tratamiento ¹ | | EEM | p-valor |
|--|--------------------------|-------|------|---------|
| | O-3 | C | | |
| Ovuladas a IATF (%) | 94,44 | 72,22 | 0,12 | 0,08 |
| Número de folículos | 3,27 | 2,54 | 0,32 | 0,11 |
| Tamaño del folículo preovulatorio (mm) | 16,18 | 16,21 | 0,99 | 0,97 |
| Preñeces por IA (%) | 55,55 | 38,88 | 0,09 | 0,33 |
| Preñadas a 130 DEL (%) | 76,47 | 56,25 | 0,12 | 0,02 |

¹Valores expresados a través de las medias mínimas cuadráticas (LSMeans) y el error estándar de las LSMean (EEM).

Finalizado el protocolo de sincronización de la ovulación (protocolo PSOV), todas las vacas fueron inseminadas a tiempo fijo a los 78 ± 5 DEL. La proporción de vacas que ovularon al momento de la IATF tendió a ser mayor ($P < 0,10$) en el grupo O-3 (94,4 %, 17/18 vacas) con respecto al grupo Control (72,2%, 13/18 vacas). No se encontraron diferencias ($P > 0,10$) en el número de folículos por ovario ni en el tamaño del folículo preovulatorio luego del protocolo de sincronización (**Tabla 6**).

La proporción de preñeces a primo IA no se vio afectada por los tratamientos ($P > 0,10$; **Tabla 6**). Sin embargo, se observaron diferencias significativas ($P < 0,05$) en la evolución de las preñeces a los 130 días posparto a favor de las vacas suplementadas con sales cálcicas. Se registró un solo caso de pérdida temprana de la gestación (entre los 32 y 60 días post-IATF) en el grupo O-3, mientras que no hubo casos en el grupo C.

Figura 8: Concentración de progesterona plasmática en vacas lecheras suplementadas (O-3) o no (C) con sales cálcicas de AG ω -3.



Tendencias expresadas como * $P < 0,10$ y diferencias significativas como ** $P < 0,05$. Las barras indican el EEM.

Las concentraciones séricas de progesterona post-IATF mostraron una interacción significativa entre el tratamiento y el tiempo ($P < 0,01$; **Figura 8**). Aunque no se detectaron diferencias en los días 5 y 22, las vacas del grupo O-3 tendieron a presentar mayores concentraciones de progesterona el día 14 (8,45 vs. 7,91 ng mL⁻¹; $P = 0,056$) y mostraron niveles de progesterona significativamente más altos el día 28 en comparación con el grupo C (12,7 vs. 10,1 ng mL⁻¹; $P = 0,04$).

No se observaron diferencias significativas entre tratamientos ($P > 0,10$) en el área luteal. En promedio, el área luteal fue de $24,5 \pm 1,51$ mm², $24,4 \pm 1,38$ mm² y $24,7 \pm 1,71$ mm² para los días 14, 22 y 28 post-IATF para el grupo O-3, respectivamente, mientras que para el grupo C los valores fueron de $23,6 \pm 1,39$ mm², $23,0 \pm 1,04$ mm² y $23,5 \pm 1,52$ mm² para los mismos días.

1. 4. DISCUSIÓN.

1.4.1. Respuesta productiva a la suplementación con derivados de AG ω -3 protegidos de la biohidrogenación ruminal.

Según los hallazgos de la presente investigación, la suplementación de vacas lecheras en inicio de lactancia con sales cálcicas de AGPI ω -3, a razón de 0,65 kg d, aumentó la producción de leche sin afectar el CMS, el consumo de energía, el peso corporal ni la condición corporal de las vacas.

Diversos estudios han reportado la ausencia de efectos significativos de la suplementación lipídica sobre el CMS en vacas lecheras (Petit *et al.*, 2002b; Gonthier *et al.*, 2005; Moallem *et al.*, 2013; Neveu *et al.*, 2013; Elis *et al.*, 2016; Sinedino *et al.*, 2017). Entre los factores que determinan el efecto de la suplementación con AG sobre la ingesta voluntaria, se destacan las características físicas y químicas del suplemento, el grado de protección frente a la biohidrogenación ruminal y el nivel de suplementación (Rabiee *et al.*, 2012).

En este estudio, dos factores podrían haber contribuido a la ausencia de efecto sobre el CMS total. En primer lugar, el producto utilizado mostró un grado de protección suficiente para mitigar los posibles efectos negativos de los lípidos sobre la degradabilidad ruminal de la fibra. En segundo término, el nivel de suplementación empleado nunca superó el 3 % de la MS consumida. De acuerdo con Weld y Armentano (2017), las sales cálcicas de AG aumentan la digestibilidad de la fibra sin afectar el CMS, mientras que los efectos depresivos sobre la ingesta se observan con inclusiones al 5-6 % de la MS (Block y Evans, 2010; dos Santos Neto *et al.*, 2022).

En nuestro caso, las dietas fueron formuladas conforme a las recomendaciones del NASEM (2021) para evitar excesos de EE que pudieran comprometer la ingestión. Sin embargo, el consumo de concentrado fue mayor ($P < 0,01$) en las vacas control, posiblemente debido a la mayor cantidad ofrecida (+0,5 kg MS d⁻¹) y a la menor palatabilidad del concentrado experimental. El olor característico del aceite de pescado, fuente de AG ω -3, podría haber limitado el consumo (Moallem, 2018). Aun así, el CMS total y energía fue similar entre tratamientos, lo que reviste especial importancia durante el inicio de la lactancia, etapa en la que mantener una alta ingestión es clave para mitigar el BEN.

Las vacas del grupo O-3 produjeron más leche (+8,8 %) y proteína (+11,3 %) que las del grupo control. Este resultado coincide con la literatura, donde la suplementación

con fuentes de AG ω -3 ha mostrado incrementos de entre 2,7 y 18,5 % en la producción de leche (Moallem *et al.*, 2010; Zachut *et al.*, 2010; Amini *et al.*, 2023). El efecto positivo sobre la producción puede explicarse por una mayor eficiencia energética. Los AG proporcionan más ATP por mol oxidado que la glucosa o los aminoácidos, favoreciendo la partición de nutrientes hacia la síntesis de leche (dos Santos Neto *et al.*, 2022). Además, un mayor aporte de AG de cadena larga (C16-C22) reduce la necesidad de energía para la síntesis *de novo* en la glándula mamaria, ya que estos AG preformados se incorporan directamente a la GB (Palmquist y Jenkins, 1980; Jenkins, 1993). Coincidentemente, la leche de las vacas suplementadas presentó una mayor proporción de AG preformados ($> C16:0$) y una menor AG sintetizados *de novo* ($< C16:0$) respecto al grupo control. Este ahorro energético incrementa la disponibilidad de glucosa para la síntesis de lactosa, lo que podría explicar la tendencia a mayor producción de lactosa ($P < 0,10$) y el consecuente aumento del volumen de leche. Dos mecanismos principales podrían explicar la mejora productiva observada: a) *energético*, por el reemplazo parcial de carbohidratos fermentables por AG, lo que reduce la producción de metano y mejora la eficiencia de utilización de energía metabolizable (Plata-Pérez *et al.*, 2022), y b) *metabólico-inmunitario*, ya que los AG ω -3 poseen propiedades antiinflamatorias que pueden atenuar la respuesta sistémica típica del posparto y redirigir nutrientes hacia la síntesis de leche (Lopreiato *et al.*, 2020). Durante esta etapa, la activación inmunitaria implica un alto costo energético; la modulación de dicha respuesta por los ω -3 podría liberar energía adicional para funciones productivas

La producción de LEC por kg MS y por Mcal ENL consumida fue significativamente mayor en el grupo de vacas O-3, lo que respalda una mejor eficiencia global. dos Santos Neto *et al.* (2022), informaron un aumento similar en la eficiencia de conversión (80 g de LEC kg^{-1} MS consumida), comparable al observado en nuestro estudio.

En cuanto a la composición, no se detectó depresión en el porcentaje de proteína láctea, resultado atribuible a la ausencia de reducción de CMS total y a una síntesis microbiana de proteína estimada similar entre tratamientos (2,06 $kg d^{-1}$ según NASEM (2021). La mayor cantidad total de proteína secretada (+11,3 %) concuerda con lo descrito por Wu y Huber (1994) y podría explicarse por un ahorro en la utilización de aminoácidos para lipogénesis (de Souza y Lock, 2018).

La suplementación lipídica también modificó el perfil de AG de la GB. Las vacas del grupo O-3 presentaron una menor proporción de AGS (-5,6 %) y un aumento de AGI (+13,1 %), especialmente ALA, EPA y DHA, además de una reducción del IA. Estos cambios, ya reportados por Glasser *et al.* (2008) y Plata-Pérez *et al.* (2022), se asocian con la inhibición de enzimas lipogénicas ACC y FAS mediada por el factor de transcripción SREBP1 (Shingfield *et al.*, 2013). Asimismo, el aumento del AV y AR evidencia una biohidrogenación parcial de los AG dietarios y su conversión endógena por acción de la $\Delta 9$ -desaturasa (Bauman and Griinari, 2003; Glasser *et al.*, 2008).

Sin embargo, algunos estudios informan respuestas neutras o incluso negativas a la suplementación con ω -3, lo que podría atribuirse a diferencias en la fuente, el nivel de inclusión, el grado de protección ruminal y la etapa fisiológica de las vacas (dos Santos Neto *et al.*, 2022; Pereira *et al.*, 2022; Fabjanowska *et al.*, 2023). Esta variabilidad sugiere que los efectos de los ω -3 sobre la producción dependen de un equilibrio delicado entre su función energética, estructural y bioactiva.

En conjunto, los resultados de este estudio confirman que la suplementación con AG ω -3 protegidos puede mejorar la eficiencia energética y la calidad de la leche sin comprometer la ingestión, contribuyendo además a generar un alimento más saludable para el consumidor.

1.4.2. Respuesta reproductiva a la suplementación con derivados de AG ω -3 protegidos de la biohidrogenación ruminal.

Según los resultados del presente estudio, la suplementación con sales cálcicas de AGPI ω -3 no modificó significativamente los parámetros ováricos (número y tamaño de los folículos preovulatorios, ni área luteal). Sin embargo, la proporción de vacas ovuladas y la tasa acumulada de preñez hasta los 130 DEL fueron mayores en el grupo suplementado, lo que sugiere un ambiente endócrino y uterino más propicio para la gestación temprana.

Estos resultados coinciden con estudios previos que describen mejoras en la fertilidad y la tasa de preñez con la inclusión de fuentes de ω -3 (Mattos *et al.*, 2004; Ambrose *et al.*, 2006; Bilby *et al.*, 2006; Sinedino *et al.*, 2017; Hadadi *et al.*, 2021; Iorio *et al.*, 2024). Aunque el tamaño muestral constituye una limitante metodológica, la tendencia observada apunta a un efecto biológicamente relevante.

El principal factor que afecta la reanudación del ciclo ovárico postparto es el balance energético (Wathes *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2008). Un BEN más pronunciado

retrasa la ovulación, reduce los pulsos de GnRH y LH, y disminuye la producción de estradiol (Furukawa *et al.*, 2020). En nuestro estudio, las vacas del grupo O-3 tendieron a mostrar una mejor adaptación metabólica pese a un BEN ligeramente menor, lo que sugiere una modulación positiva del ambiente endócrino (Ulfina *et al.*, 2015; Jorazadeh *et al.*, 2019).

Los AG ω -3 compiten con el AA (ω -6) por la enzima COX-2, reduciendo la síntesis de PGF₂ α y favoreciendo la persistencia del CL (Staples *et al.*, 1998; Mattos *et al.*, 2000; Bilby *et al.*, 2003). Aunque no se observaron diferencias en el área luteal, se registró una tendencia a mayores concentraciones séricas de progesterona en el grupo O-3, posiblemente asociadas a una mayor capacidad biosintética del CL y a mayores concentraciones de colesterol plasmático, precursor de la hormona (Verma *et al.*, 2018).

En relación con la sincronización de la ovulación, la proporción de vacas ovuladas al momento de la IATF tendió a ser mayor en el grupo O-3 con respecto a C (94,4 vs. 72,2 %), lo que indica una respuesta más consistente a los tratamientos hormonales. Esta mejor sincronía puede interpretarse como reflejo de un eje hipotálamo-hipófisis-ovario más receptivo y de una función luteal más estable, condiciones que aumentan la probabilidad de ovulación efectiva y, por ende, de concepción. En tal sentido, aunque las tasas de preñez por IA no difirieron entre tratamientos (55,5 vs. 38,9 %, para O-3 y C, respectivamente), el grupo suplementado alcanzó una mayor proporción de vacas preñadas a los 130 días posparto (76,5 vs. 56,3 %), lo que sugiere un mejor desempeño reproductivo global. Esta mayor tasa acumulada de preñez observada en el grupo O-3 concuerda con los hallazgos de Hadadi *et al.* (2021), Iorio *et al.* (2024) y Amini *et al.* (2024) quienes demostraron una reducción en las pérdidas gestacionales tempranas y una mayor proporción de vacas preñadas cuando se incluyeron sales cálcicas de aceite de pescado o de lino en la dieta.

El aumento de la tasa de preñez en las vacas del grupo O-3 podría estar vinculado a mejoras en la calidad ovocitaria y embrionaria. La composición de ácidos grasos del fluido folicular está influenciada por la dieta y desempeña un papel clave en la maduración ovocitaria y en la competencia del embrión temprano (Moallem *et al.*, 2013; Verma *et al.*, 2018). Se ha demostrado que la suplementación con aceites de lino o pescado aumenta las concentraciones de ALA, EPA y DHA en el fluido folicular, promoviendo un entorno metabólicamente favorable para la maduración ovocitaria y el desarrollo embrionario (Zeng *et al.*, 2023). En este contexto, los AG ω -3 pueden potenciar la señal de reconocimiento materno de la gestación al favorecer la secreción de IFN- τ por

parte del embrión, lo que inhibe la liberación de $\text{PGF}_{2\alpha}$ endometrial y previene la luteólisis (Giller *et al.*, 2018; Freret *et al.*, 2019).

CAPITULO 2.

Efectos de la suplementación con derivados de ácidos grasos ω -3 sobre parámetros endócrinos y el metabolismo hepático de vacas lecheras en inicio de lactancia.

2. 1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, el nivel de producción de las vacas lecheras se ha incrementado notablemente (Bruinjé y Leblanc, 2025). Este aumento ha exigido que los animales adapten su metabolismo para satisfacer mayores requerimientos de nutrientes, particularmente durante las primeras semanas de lactancia, cuando las necesidades energéticas para producción de leche son de tres a cinco veces superiores a las de mantenimiento (Martens, 2023). En consecuencia, muchas vacas de alto potencial productivo no logran equilibrar sus requerimientos y permanecen un tiempo prolongado en BEN, movilizando sus reservas corporales y generando una sobrecarga metabólica (Pascottini *et al.*, 2022; Sammad *et al.*, 2022). Esta situación induce una intensa lipomovilización, con la consecuente liberación de NEFAs hacia la circulación (Drackley, 1999).

El hígado, órgano central del metabolismo, debe procesar este flujo elevado de lípidos movilizados mediante tres vías principales: la β -oxidación para la obtención de energía, la conversión de acetyl-CoA en cuerpos cetónicos y la reesterificación a Tg. Sin embargo, cuando la afluencia de NEFAs supera la capacidad oxidativa y secretora hepática, se favorece la acumulación de Tg en el parénquima hepático, aumentando el riesgo de cetosis y esteatosis, con consecuencias negativas sobre la salud, la productividad y la reproducción (Andjelić *et al.*, 2022; Arshad y Santos, 2022). El metabolismo hepático de los lípidos movilizados está finamente coordinado (Angeli *et al.*, 2019a) y una activación adecuada de ciertas vías puede favorecer una utilización más eficiente de los lípidos y prevenir su acumulación, contribuyendo así al mantenimiento de la homeostasis metabólica durante el inicio de lactancia. En paralelo, las adaptaciones endocrinas, caracterizadas por resistencia a la insulina y desacople somatotrófico, reflejan el esfuerzo del organismo por priorizar la disponibilidad de glucosa hacia tejidos esenciales como la glándula mamaria y sostener la producción de leche (Pérez-Báez *et al.*, 2021). En este contexto, los AGPI de la familia ω -3 han despertado creciente interés por su capacidad para modular la expresión génica y la función metabólica en distintos tejidos (Xu *et al.*, 2015; Albracht-Schulte *et al.*, 2018).

2.1.1. Movilización de NEFAs.

Durante el posparto, la elevada lipólisis en el tejido adiposo provoca un aumento en la concentración sistémica de NEFAs (Drackley *et al.*, 2005). Este fenómeno se asocia con una mayor activación de la lipasa sensible a hormonas, regulada por el entorno endocrino característico de esta etapa que incluye una disminución de la insulina y un incremento de la GH (Sordillo y Raphael, 2013). En consecuencia, se eleva la concentración plasmática de NEFAs, los cuales se transportan unidos a la albúmina. Estos AG, junto con aquellos incorporados en lipoproteínas, pueden ingresar al interior celular por diferentes mecanismos. Los AG de cadena corta (< 12 carbonos) penetran en los hepatocitos por difusión simple, mientras que los de cadena más larga utilizan proteínas transportadoras específicas localizadas en la membrana. Una vez dentro del citoplasma, los AG se conjugan rápidamente con la coenzima A (CoA) para formar acil-CoA, ya que su acumulación libre podría resultar citotóxica. Este paso es esencial para su posterior participación en las diversas rutas metabólicas.

2.1.1.1. Oxidación de AG.

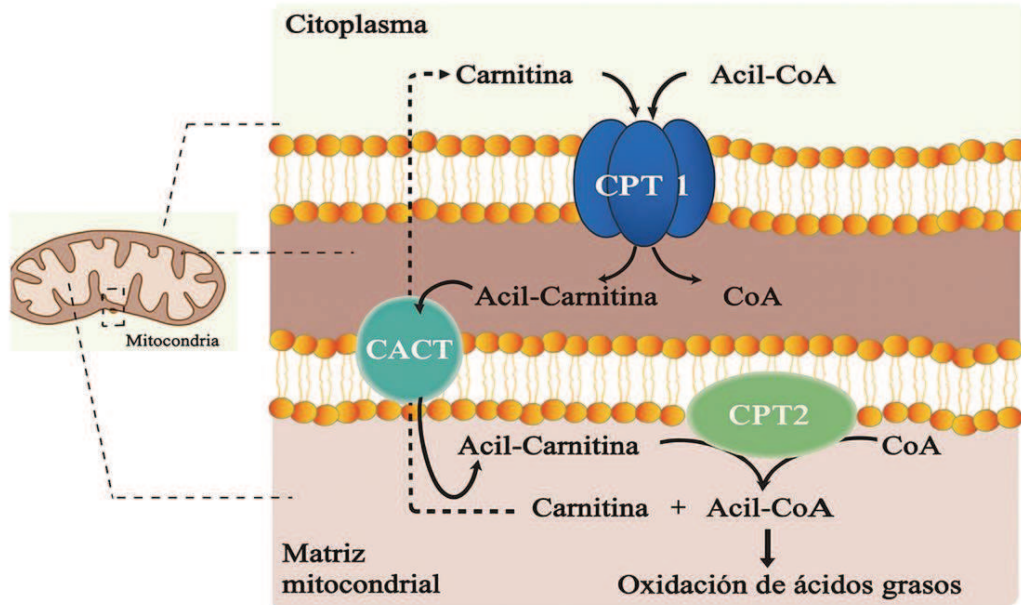
En el interior celular, los AG se degradan mediante un proceso oxidativo que culmina en la formación de acetil-CoA. Este mecanismo constituye una vía catabólica específica que tiene lugar principalmente en las mitocondrias y los peroxisomas. En los rumiantes, ambas organelas participan de manera prácticamente equitativa en la oxidación lipídica, mientras que, en los no rumiantes, alrededor del 75 % del proceso ocurre en las mitocondrias (Grum *et al.*, 1994).

La *oxidación mitocondrial* depende de la acción de la enzima *CPT1*, localizada en la membrana mitocondrial externa, que cataliza la conversión de los acil-CoA de cadena larga en acilcarnitinas, permitiendo su ingreso a la mitocondria (**Figura 9**). Una vez dentro, la *CPT2* regenera el acil-CoA, que es posteriormente oxidado en el sistema enzimático de la β -oxidación (**Figura 10**). La *CPT1* ejerce un papel regulador clave, con una actividad reducida tras la ingesta y aumentada durante el ayuno, cuando la demanda energética se incrementa (Drackley *et al.*, 2005). Además, la acumulación de *malonil-CoA* en el citoplasma actúa como inhibidor alostérico de *CPT1*, limitando el ingreso de AG a la mitocondria y, por tanto, la β -oxidación (Grum *et al.*, 1994).

Durante la β -oxidación mitocondrial, los acil-CoA se degradan mediante reacciones cíclicas que liberan fragmentos de dos carbonos, generando progresivamente

moléculas de acetil-CoA (**Figura 10**). Por ejemplo, la oxidación completa del palmitoil-CoA (C16) origina ocho unidades de acetil-CoA.

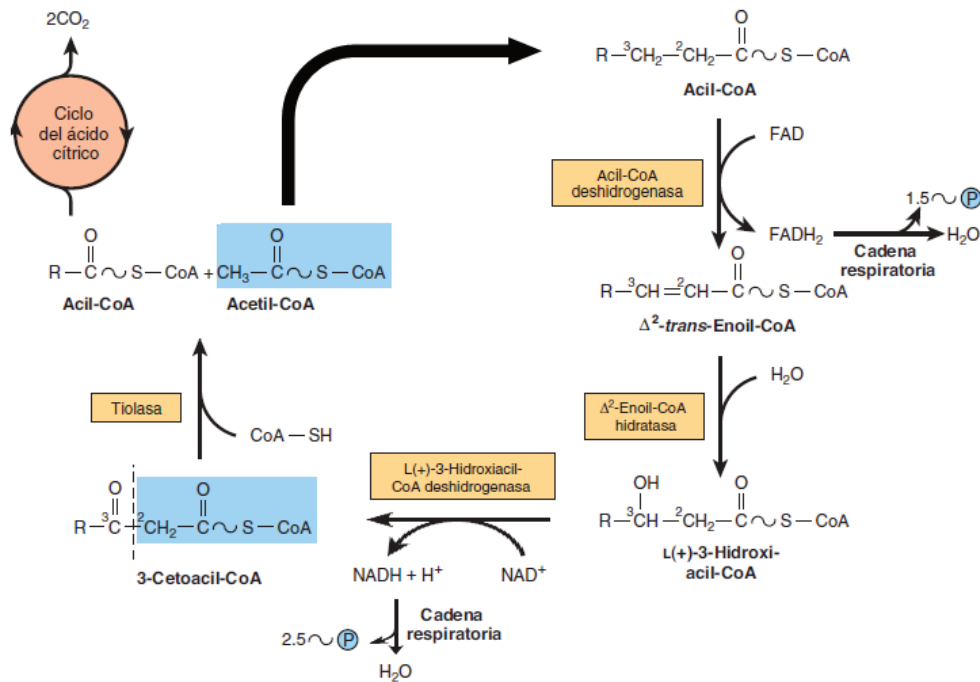
Figura 9: Función de la carnitina en el transporte de ácidos grasos de cadena larga a través de la membrana mitocondrial interna.



CPT1 y CPT2= enzima carnitina palmitoiltransferasa 1 y 2. CACT= translocasa de carnitina-acilcarnitina. Adaptado de Wang *et al.* (2021).

En paralelo, los *peroxisomas* desarrollan una β -oxidación alternativa que actúa principalmente sobre los AG de cadena muy larga (> 20 carbonos), acortándolos hasta productos de ocho carbonos que luego son transferidos a las mitocondrias para completar su degradación. Aunque las etapas metabólicas son análogas a las mitocondriales, difieren en algunas enzimas clave. En los peroxisomas, la primera reacción está catalizada por la *ACOX1*, que cumple una función semejante a la de la deshidrogenasa mitocondrial, con la diferencia que el $FADH_2$ no transfiere electrones a la cadena respiratoria, sino que reduce directamente el oxígeno molecular, generando peróxido de hidrógeno. Por ello, esta vía no produce energía directamente, aunque genera especies reactivas de oxígeno que deben ser neutralizadas por la enzima *catalasa*, también presente en los peroxisomas (Wang *et al.*, 2021). La *ACOX1* constituye el paso limitante de esta ruta y ha sido objeto de múltiples investigaciones en especies no rumiantes, dada su relevancia en patologías metabólicas y su potencial como blanco terapéutico (Cherkaoui-Malki *et al.*, 2012; Zeng *et al.*, 2017).

Figura 10: Esquema representativo de la β -oxidación mitocondrial de AG.



Adaptado de Botham y Mayes (2013).

Niveles excesivos de NEFAs en circulación pueden ejercer efectos tóxicos sobre las células, fenómeno conocido como *lipotoxicidad* (Leroy *et al.*, 2012; Arshad y Santos, 2022). Por este motivo, la caracterización de las enzimas involucradas en la oxidación lipídica ha adquirido gran relevancia en el estudio del metabolismo de los rumiantes, especialmente durante el período posparto, cuando el aumento de la captación hepática de NEFAs puede comprometer la función hepática y afectar el estado de salud y el rendimiento productivo de las vacas lecheras (Goff y Horst, 1997; Drackley *et al.*, 2005; Loor *et al.*, 2007).

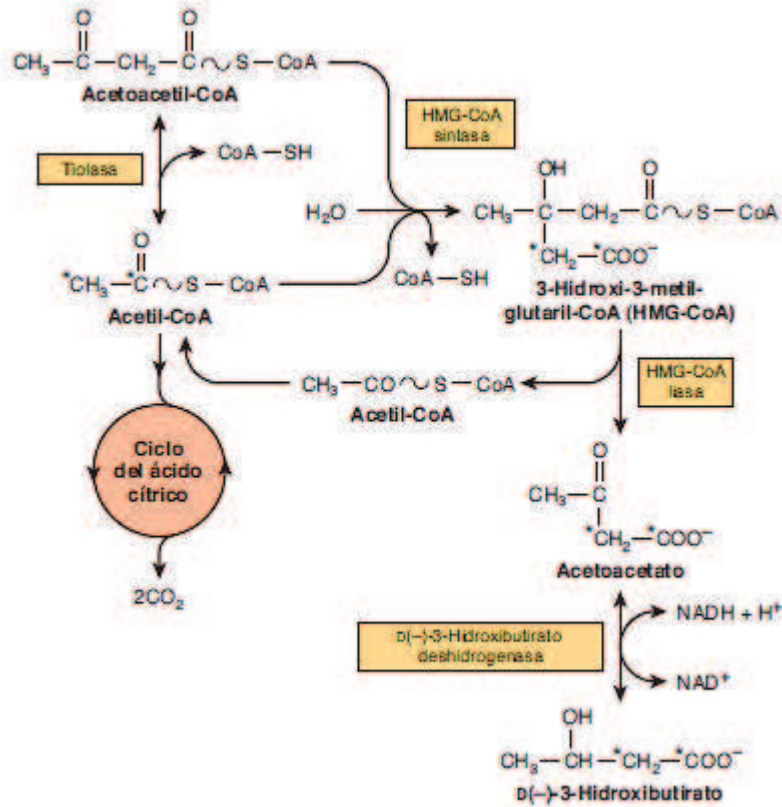
2.1.1.2. Cetogénesis.

Una vez que los AG son oxidados hasta acetil-CoA, este metabolito puede seguir dos rutas principales: incorporarse al *ciclo del ácido cítrico* (TCA) para la producción directa de energía en el hígado, o bien ser utilizado para la formación de *cuerpos cetónicos*, que constituyen una fuente energética alternativa para otros tejidos (**Figura 11**). Entre estos compuestos, el β HB se reconoce como el principal marcador bioquímico de la cetogénesis hepática (Lean, 2020).

Cuando el BEN es pronunciado, la movilización de reservas grasas se intensifica y el flujo de AG hacia el hígado aumenta, favoreciendo tanto su oxidación como la síntesis de cuerpos cetónicos. Se ha demostrado que la inhibición de la enzima CPT1,

responsable del ingreso de AG a la mitocondria, reduce significativamente la producción de estos compuestos (Foster, 2012).

Figura 11: Esquema representativo de la cetogénesis.



Adaptado de Botham y Mayes (2013).

La cetogénesis también depende de la disponibilidad de oxalacetato, ya que este metabolito es esencial para la condensación con el acetil-CoA y su posterior incorporación al ciclo del ácido cítrico (White, 2015). El oxalacetato se genera a partir de intermediarios gluconeogénicos y su principal precursor en los rumiantes es el propionato, resultante de la digestión ruminal del almidón dietario. Durante el posparto, la elevada demanda de glucosa destinada a la síntesis de lactosa en la glándula mamaria, junto con la limitada disponibilidad de precursores gluconeogénicos, restringe la formación de oxalacetato y promueve la derivación del acetil-CoA hacia la producción de cuerpos cetónicos (Ingvarsen y Andersen, 2000). En estas circunstancias, un incremento en el succinil-CoA -intermediario del ciclo de Krebs derivado de metabolitos glucogénicos- puede ejercer un efecto inhibitorio sobre la enzima *3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa mitocondrial (HMG-CoA sintasa)*, modulando de manera directa la velocidad de la cetogénesis (**Figura 11**).

2.1.1.3. Reesterificación de AG para la síntesis de Tg.

Una vía metabólica alternativa para los AG que llegan al hígado consiste en su conversión nuevamente a Tg mediante procesos de reesterificación. Esta ruta involucra la acción coordinada de diversas enzimas, entre ellas: la *glicerol-3-fosfato aciltransferasa*, la *1-acilglicerol-3-fosfato aciltransferasa*, la *fosfatidato fosfohidrolasa* y la *diacilglicerol aciltransferasa (DGAT)*. Esta última cataliza la etapa final del proceso y constituye el único paso exclusivamente comprometido con la síntesis de Tg, por lo que se considera el punto limitante de la reesterificación en la mayoría de las condiciones metabólicas (Botham y Mayes, 2013).

Existen dos isoformas funcionales de la DGAT, denominadas DGAT1 y DGAT2, que difieren tanto en su localización subcelular como en su afinidad por los sustratos. Se ha observado que DGAT2 es más activa cuando las concentraciones de acil-CoA son bajas -situación típica de la síntesis endógena de AG-, mientras que DGAT1 alcanza su máxima eficiencia en condiciones de aporte de AG externos o intensa lipólisis (Yen *et al.*, 2008). Durante el BEN, la lipólisis incrementa la circulación de NEFAs y su posterior captación hepática. El exceso de estos AG intensifica la reesterificación y la acumulación intracelular de Tg, favoreciendo la aparición del *síndrome de hígado graso*, una de las patologías metabólicas más frecuentes del periparto, caracterizada por el acúmulo excesivo de Tg en los hepatocitos (Sordillo y Raphael, 2013; Arshad y Santos, 2022).

El aumento del contenido lipídico hepático compromete la funcionalidad del órgano, afectando procesos esenciales como la gluconeogénesis, la síntesis proteica y la secreción de lipoproteínas. Como resultado, se deteriora el estado general de salud y disminuye la eficiencia reproductiva de las vacas lecheras (Leblanc, 2010; Arshad y Santos, 2022).

2.1.1.4. Regulación del metabolismo lipídico.

La regulación del metabolismo lipídico implica una compleja red de mecanismos que aseguran el mantenimiento de la *homeostasis energética* y la adaptación metabólica a diferentes estados fisiológicos. En términos generales, esta regulación puede clasificarse en tres niveles principales: *alostérico*, *covalente* y *transcripcional* (Bougarne *et al.*, 2018).

El *control alostérico* se refiere a la modulación directa de la actividad enzimática mediante la unión reversible de metabolitos o efectores específicos a distintos sitios del centro catalítico, lo que permite aumentar o disminuir la velocidad de la reacción según

las necesidades metabólicas de la célula. El *control covalente*, por su parte, involucra modificaciones químicas postraduccionales de las enzimas, como *fosforilación*, *proteólisis limitada*, *glucosilación o acetilación*, capaces de alterar la conformación tridimensional, la estabilidad o el equilibrio entre las formas activa e inactiva, ajustando así su participación en las rutas metabólicas. Finalmente, la *regulación transcripcional* se ejerce a través del control de la expresión génica, modulando la cantidad de enzimas disponibles en función de las demandas metabólicas del organismo. Este tipo de control requiere la acción de factores de transcripción que, activados por señales intracelulares o extracelulares, se unen a regiones específicas del ADN para promover o inhibir la transcripción de genes metabólicamente relevantes (Soares *et al.*, 2021).

Entre los mecanismos más destacados en la regulación génica asociada al metabolismo lipídico se encuentran los *receptores nucleares*, proteínas que actúan como sensores de metabolitos lipídicos y hormonas, modulando la transcripción de genes implicados en la oxidación, síntesis y transporte de AG (Bionaz *et al.*, 2013; Hassan *et al.*, 2021). Estos receptores presentan dos características esenciales: (a) su activación depende de la unión con ligandos específicos, y (b) su acción se ejerce mediante la interacción con elementos de respuesta localizados en los promotores de genes blanco. En el hígado, uno de los principales receptores nucleares implicados en la regulación génica del metabolismo lipídico es el *PPAR α* , reconocido por su papel central en la coordinación de las vías oxidativas de los AG y la homeostasis energética sistémica (Hein *et al.*, 2010).

2.1.1.5. Receptores PPAR: funciones metabólicas y mecanismos de activación.

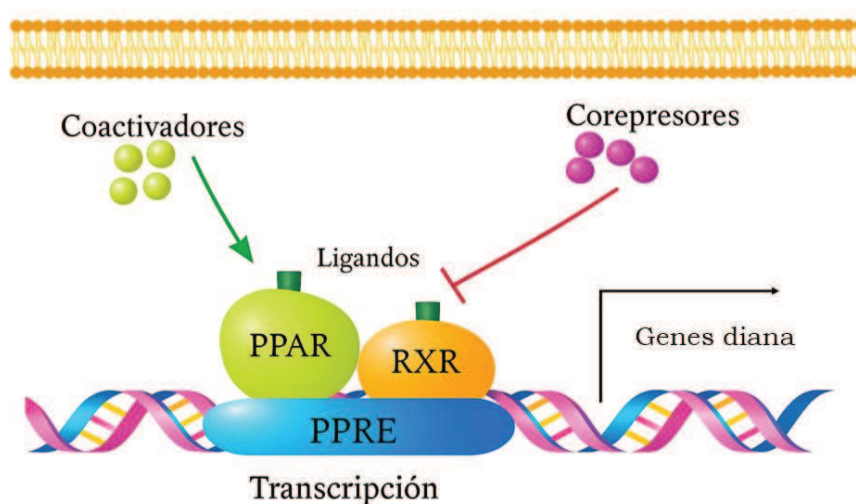
Los PPAR pertenecen a la *superfamilia de receptores nucleares*, que cumplen un papel fundamental en la regulación de la expresión génica asociada al metabolismo energético. Esta familia comprende tres isoformas principales -*PPAR α* , *PPAR γ* y *PPAR β/δ* -, con distribución tisular diferenciada y funciones específicas dentro del control metabólico (Grygiel-Górniak, 2014; Bougarne *et al.*, 2018).

Diversos estudios han demostrado que los PPAR actúan como reguladores clave de procesos metabólicos complejos, incluyendo la *homeostasis de lípidos y carbohidratos*, la *diferenciación de adipocitos* y la *respuesta inflamatoria*. Su disfunción se ha vinculado con numerosas patologías metabólicas y sistémicas, tales como

dislipidemias, resistencia a la insulina, diabetes mellitus tipo 2, obesidad, y ciertos trastornos cardiovasculares y neurodegenerativos (Tyagi *et al.*, 2011).

La activación de estos receptores ocurre tras la unión con sus ligandos específicos, promoviendo la formación de *heterodímeros* con los *receptores retinoides X (RXR)*. Dichos complejos *PPAR/RXR* reconocen y se unen a secuencias específicas del ADN denominadas *elementos de respuesta a proliferadores de peroxisomas (PPRE)*, localizadas en las regiones promotoras de genes diana. Esta interacción puede inducir o reprimir la transcripción de genes que codifican proteínas involucradas en la oxidación de AG, el transporte de lípidos y la señalización metabólica (**Figura 12**).

Figura 12: Activación transcripcional de PPAR.



PPAR= receptores activados por proliferadores de peroxisomas. RXR= receptores retinoides X. PPRE= elementos de respuesta a proliferadores de peroxisomas. Adaptado de Wu *et al* (2022).

La distribución diferencial de las isoformas de PPAR le confiere una función fisiológica particular y una sensibilidad distinta frente a ligandos y cofactores de activación. En el hígado, el PPAR α es la isoforma predominante y se reconoce como un regulador maestro del metabolismo lipídico hepático (Tyagi *et al.*, 2011; Bionaz *et al.*, 2013). Su activación promueve la expresión de genes implicados en la β -oxidación mitocondrial y peroxisomal, así como en la cetogénesis y la homeostasis energética general.

En el ámbito farmacológico, los *fibratos* (como el clofibrato o el WY-14643) son conocidos agonistas sintéticos de PPAR α , utilizados ampliamente en el tratamiento de dislipidemias y en la reducción de Tg plasmáticos (Grygiel-Górniak, 2014). De manera

complementaria, ciertos AGPI de las familias ω -3 y ω -6 actúan como ligandos endógenos naturales de los PPAR, activando rutas transcripcionales que incrementan la expresión de enzimas como la ACOX1 y la CPT1, ambas esenciales para la oxidación de AG (Hein *et al.*, 2010; Bionaz y Loor, 2012).

2.1.2. AGPI ω -3 como moduladores del metabolismo energético y hormonal.

2.1.2.1. Metabolismo endócrino.

Diversos estudios han demostrado que los AGPI ω -3 pueden modular positivamente la sensibilidad a la insulina en distintas especies. En ratones y bovinos, la suplementación con estos AG mejora la respuesta insulínica periférica (Pires y Grummer, 2008; Fortin *et al.*, 2010; Fan *et al.*, 2020). A nivel metabólico, los AGPI ω -3 estimulan el almacenamiento de glucógeno (Clarke, 2001) y regulan la expresión de enzimas gluconeogénicas, lo que sugiere que actúan como moduladores directos de la homeostasis energética (White *et al.*, 2012).

El PT de las vacas lecheras se caracteriza por un estado de *resistencia insulínica* inducido por el BEN, cuyo objetivo fisiológico es redirigir la glucosa hacia tejidos esenciales, como el sistema nervioso central y la glándula mamaria (Qiao *et al.*, 2024). No obstante, cuando esta resistencia se exagera, puede comprometer la función ovárica, el metabolismo hepático y la salud general del animal. En este contexto, los AGPI ω -3 podrían contribuir a atenuar dicha resistencia y mejorar la señalización insulínica tanto a nivel periférico como hepático. Delarue *et al.* (2004) demostraron que en roedores alimentados con AGPI ω -3, se logró prevenir la ocurrencia de alteraciones típicas de la resistencia a la insulina. En particular, estos AG evitan la disminución de la actividad de la *fosfatidil inositol 3-quinasa (PI3K)* y la reducción de transportadores *GLUT4* en músculo, al tiempo que preservan su expresión en tejido adiposo. En el hígado, inhiben la actividad de la *glucosa-6-fosfatasa*, disminuyendo la producción hepática de glucosa. Además, reducen la acumulación de Tg hepáticos mediante la inhibición de enzimas lipogénicas dependientes de SREBP-1c y la activación de PPAR α , promoviendo así una mayor oxidación de AG (Delarue *et al.*, 2004). Estos hallazgos concuerdan con los de Kra *et al.* (2022), quienes reportaron que en bovinos suplementados con EPA y DHA se evidenció una mayor utilización de glucosa y aminoácidos inducida por insulina, sugiriendo un efecto anabólico y una mejora de la sensibilidad periférica. Asimismo, una infusión intravenosa de ALA en vacas lecheras sometidas a restricción alimentaria redujo

las concentraciones plasmáticas de NEFAs y β HB, además de disminuir la acumulación de Tg hepáticos en comparación con emulsiones basadas en AGS (Pires y Grummer, 2008). Este efecto podría estar mediado por una mayor actividad de la lipoproteína lipasa (LPL) en el tejido adiposo y una potenciación de la acción antilipolítica de la insulina.

Más allá de sus efectos sobre la sensibilidad insulínica y la lipomovilización, diversos estudios han demostrado que los AGPI ω -3 y otros AG esenciales también pueden modular de manera directa el eje somatotrófico en vacas lecheras. En este sentido, (Dirandeh *et al.*, 2016) compararon raciones conteniendo soja tostada (fuente de AG ω -6), aceite de lino (fuente de AG ω -3) o aceite de palma (control) y observaron que las concentraciones plasmáticas de glucosa, insulina e IGF-1 resultaron mayores en las vacas consumiendo la ración con aceite de lino. Por su parte, (Vogel, 2021) reportó los efectos de la infusión abomasal de ALA y CLA en vacas Holstein durante las últimas nueve semanas preparto y las primeras nueve semanas posparto y describió que la infusión de CLA aumentó las concentraciones plasmáticas de glucosa, insulina e IGF-1, lo que sugiere una estimulación del eje somatotrófico. Por el contrario, la infusión de ALA no mejoró de forma evidente la expresión hepática de genes asociados al eje GH/IGF-1. Estos resultados indican que el tipo de AG, su forma de administración y el estado fisiológico del animal son factores determinantes para la respuesta del eje somatotrófico.

2.1.2.2. Mecanismos moleculares del efecto hepático de los AG ω -3 en vacas lecheras.

Los AGPI ω -3 pueden ejercer efectos beneficiosos sobre el metabolismo hepático a través de su acción como ligandos del receptor PPAR α (Tyagi *et al.*, 2011). Este receptor desempeña un papel determinante en la regulación de la β -oxidación mitocondrial y peroxisomal de los AG, al inducir la expresión de enzimas como la CPT1 y la ACOX1, respectivamente, así como de la HMG-CoA sintasa, enzima limitante de la cetogénesis (Lean, 2020; Rico y Barrientos-Blanco, 2024). En modelos murinos, la activación de PPAR α ha demostrado reducir la acumulación de lípidos hepáticos y prevenir la esteatosis (Stienstra *et al.*, 2007). En las vacas lecheras, la esteatosis hepática constituye una alteración metabólica frecuente al inicio de la lactancia y se asocia con importantes pérdidas productivas (Arshad y Santos, 2022). En este contexto, la funcionalidad de PPAR α observada en especies no rumiantes podría representar un

mecanismo protector relevante para evitar la lipidosis hepática en bovinos de alta producción.

Estudios *in vitro* con líneas celulares bovinas han mostrado que la exposición a AGPI ω -3 induce un aumento en la expresión génica de PPAR α y de sus genes diana involucrados en la oxidación lipídica (MacLaren *et al.*, 2006; Abou-Rjeileh *et al.*, 2025), demostrando la capacidad de estos AG para activar directamente esta vía transcripcional. Aunque la función de PPAR α está bien caracterizada en especies monogástricas (Varga *et al.*, 2011; Bougarne *et al.*, 2018), su papel en el metabolismo hepático de los bovinos ha sido menos explorado, y los resultados disponibles son heterogéneos, probablemente debido a diferencias en el tipo de grasa suplementada, el estado energético y la etapa fisiológica evaluada. En este sentido, Palin y Petit (2004) suplementaron vacas durante el PT con distintas fuentes lipídicas -grasa saturada, aceite de lino o una dieta sin grasa añadida- y evaluaron la expresión hepática de PPAR α junto con parámetros metabólicos plasmáticos. Las vacas alimentadas con aceite de lino presentaron mayores concentraciones de glucosa y una correlación positiva entre la expresión génica de PPAR α y la glucemia, en comparación con los otros tratamientos, lo que sugiere una mejor eficiencia energética y una activación del metabolismo oxidativo hepático mediado por PPAR α . En contraste, Carriquiry *et al.* (2009) y Akbar *et al.* (2013) no observaron cambios significativos en la expresión hepática de este receptor tras la suplementación con diferentes fuentes de AG ω -3, evidenciando la variabilidad en la respuesta fisiológica y la posible influencia de factores nutricionales y hormonales.

Por su parte, Smith *et al.* (2009) demostraron que el tratamiento con 2,4-tiazolidinediona, un agonista clásico de PPAR, en vacas posparto redujo linealmente las concentraciones plasmáticas de NEFAs, posiblemente mediante una mayor sensibilidad insulínica en el tejido adiposo. Este tratamiento se asoció con menor acumulación de lípidos hepáticos, mayor CMS y reducción del intervalo parto-concepción, reforzando la participación de los receptores PPAR en la coordinación del metabolismo energético y reproductivo durante la lactancia temprana. Complementariamente, (Angeli *et al.*, 2019b) evaluaron la expresión génica y proteica de PPAR α y de enzimas oxidativas hepáticas en vacas lecheras durante el PT, observando que la expresión génica de CPT1 y ACOX1 aumentó significativamente de manera inmediata tras el parto, lo que sugiere una respuesta transcripcional temprana del hígado frente al incremento de NEFAs circulantes.

Sin embargo, la expresión proteica de PPAR α y ACOX1 se incrementó recién hacia el día 28 posparto, cuando el hígado ya ha enfrentado el pico de lipomovilización característico del BEN. Este desfase temporal entre la respuesta génica y proteica sugiere que la estimulación de PPAR α en bovinos depende de señales metabólicas y hormonales postparto, más que de un control transcripcional inmediato. Además, el aumento en la abundancia proteica de PPAR α y CPT1 coincidió con una disminución en el contenido hepático de Tg, lo que indica que la activación retardada de las vías oxidativas contribuye a la recuperación del equilibrio lipídico hepático. En conjunto, los hallazgos de Angeli *et al.* (2019b) ponen de manifiesto que la estimulación natural de PPAR α durante el PT ocurre tardía, cuando el desafío metabólico ya está instaurado, lo que justifica la necesidad de estrategias nutricionales que promuevan su activación temprana para favorecer una adaptación metabólica más eficiente durante el inicio de la lactancia.

En este marco, el presente capítulo se orienta a evaluar el efecto de la suplementación dietaria con sales cálcicas derivadas de aceites ricos en ω -3 sobre el metabolismo hepático de vacas lecheras durante el inicio de la lactancia.

2. 2. MATERIALES Y MÉTODOS.

Todos los procedimientos efectuados en los animales se llevaron a cabo conforme a las normativas vigentes (Guía para el cuidado y uso de animales agrícolas en Investigación y Docencia, Federación de Sociedades de Ciencia Animal, 2010) y fueron aprobados el 4 de agosto de 2020 por el Comité de Ética y Seguridad Institucional de la FCV - UNL (Protocolo N° 614/20).

2.2.1 Animales, manejo y alimentación.

Para este estudio, se utilizaron las mismas vacas de raza Holstein descritas en el capítulo anterior (n = 36), pertenecientes al Tambo Experimental de la EEA Rafaela del INTA. Los animales se agruparon en 18 bloques con dos vacas cada uno y fueron asignados al azar a los tratamientos: Control (C) u Omega-3 (O-3), según los criterios detallados en el capítulo previo.

El período experimental se extendió desde 21 ± 2 días previos al parto hasta 105 ± 5 días posparto. Durante el período preparto, los animales se alojaron en corrales separados según tratamiento, dentro de un mismo galpón con camas de arena equipado como paridera. Tras el parto, las vacas fueron ordeñadas para la extracción del calostro y trasladadas a un galpón de cama fría con libre acceso a bebederos y comederos, donde permanecieron hasta finalizar el período experimental.

Las dietas utilizadas durante el ensayo fueron descritas en el capítulo anterior. Brevemente, durante el preparto las vacas recibieron una PMR compuesta (base MS) por: heno de paja de trigo (12,9 %), silaje de maíz (63,2 %), maíz molido (3,8 %), harina de soja (16,9 %) y suplemento mineral aniónico (3,2 %). Adicionalmente, el grupo O-3 recibió $0,40 \text{ kg MS d}^{-1}$ de sales cálcicas de AG, mientras que el grupo control recibió $0,70 \text{ kg MS d}^{-1}$ de maíz molido como reemplazo isoenergético.

Durante la lactancia, ambos grupos fueron alimentados con la misma PMR compuesta (base MS) por: heno de alfalfa (7,8 %), silaje de maíz (24,1 %), silaje de alfalfa (36,6 %), semilla de algodón (2,1 %), harina de soja (18,6 %), maíz molido (9,9 %) y premezcla vitamínico-mineral (0,9 %). En la sala de ordeño, cada vaca recibió $4,48 \text{ kg MS}$ de concentrado, junto con el suplemento correspondiente a su tratamiento: $0,65 \text{ kg MS}$ de sales cálcicas (O-3) o $1,15 \text{ kg MS}$ de maíz molido (C), distribuidos en partes iguales en los ordeños a.m. y p.m. (04:00 h y 15:00 h).

2.2.2. Muestreos y procesamiento de muestras.

2.2.2.1. Extracción de sangre y obtención de plasma.

Se extrajeron aproximadamente 20 mL de sangre por punción de la vena coccígea los días -21 y -7 respecto a la fecha probable de parto, el día del parto y los días 7, 21, 35, 60, 75 y 112 posparto, inmediatamente después del ordeño matutino (junto con el registro del PC y la evaluación de la CC, descrito en el capítulo anterior). Una pequeña alícuota de sangre fue inmediatamente utilizada para la determinación de β HB. El resto se dividió en dos tubos: uno contenía fluoruro de sodio (2 mg mL) y oxalato de potasio (2 mg mL) y se mantuvo a temperatura ambiente hasta su envío al laboratorio; el otro contenía heparina sódica (5 UI mL) y se mantuvo refrigerado hasta su centrifugado (2000 \times g, 15 min, 4°C). El plasma obtenido se colocó en tubos plásticos de 2 mL y se almacenó en ultrafreezer (-80°C) hasta su análisis para urea y colesterol total.

A partir de las muestras plasmáticas obtenidas los días -21, -7, 7, 21 y 35, se determinaron las concentraciones de insulina, del IGF-1 y NEFAs.

2.2.2.2. Cuantificación de metabolitos y hormonas.

Las concentraciones de β HB se determinaron mediante tiras reactivas (FreeStyle Optium β -Ketone, Abbott Diabetes Care Ltd., Reino Unido) a partir de una gota de sangre fresca. Las determinaciones de glucosa, urea y colesterol total fueron procesadas en el laboratorio BiovetLab S.A. (Rafaela, Santa Fe, Argentina) utilizando kits enzimáticos comerciales (Wiener Lab, Argentina).

La concentración de NEFAs se determinó mediante kits comerciales (FA115, Randox Laboratories Ltd., Reino Unido) en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular Aplicada (LBCMA) del Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (ICiVet-Litoral, Esperanza, Argentina). Las determinaciones de insulina e IGF-1 se realizaron en el Laboratorio de Endocrinología del Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME, Buenos Aires, Argentina). La insulina plasmática se determinó mediante radioinmunoanálisis, utilizando anticuerpos anti-insulina bovina (Sigma, St Louis, EEUU) y una insulina estándar humana provista por Laboratorios Beta (Buenos Aires, Argentina). Las concentraciones de IGF-1 se determinaron también por radioinmunoanálisis, tras una extracción con ácido-etanol (UB2-495, Hormone Distribution Program, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, EEUU).

2.2.2.3. Extracción de biopsias hepáticas.

Se obtuvieron biopsias hepáticas en simultáneo con los muestreos de los días -21, 7 y 21 respecto al parto. La intervención se realizó en el undécimo espacio intercostal derecho, a nivel del trocánter mayor del fémur, previa incisión en la piel y bajo anestesia local con lidocaína al 2 %. Se utilizó una aguja de biopsia percutánea, descrita por Buckley *et al.* (1986) y modificada *ad hoc*, guiada por ecografía hasta alcanzar el hígado y perforar su cápsula. Se recolectaron aproximadamente 500 mg de tejido hepático, que se fraccionaron en dos tubos destinados a diferentes análisis. Las muestras se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su procesamiento.

2.2.2.4. Procesamiento de muestras hepáticas.

Las muestras fueron procesadas en el LBCMA del ICiVet-Litoral. A continuación, se detallan las determinaciones realizadas en las correspondientes biopsias de tejido hepático.

2.2.2.5. Determinación del contenido de Tg hepáticos.

La extracción de lípidos totales a partir de homogenizados hepáticos se realizó siguiendo el método descrito por Folch *et al.* (1957). Los lípidos presentes se aislaron empleando una mezcla extractante de cloroformo y metanol (2:1, v/v). El extracto se filtró y lavó con soluciones salinas y solventes adecuados: primero con una solución de CaCl₂ al 0,02 % en una mezcla cloroformo/metanol/agua (3:48:47, v/v/v), y luego con la misma mezcla sin CaCl₂, para eliminar componentes no lipídicos y residuos acuosos. Finalmente, los fosfolípidos se separaron mediante adsorción en ácido silícico, y los Tg se disolvieron en isopropanol para su cuantificación espectrofotométrica mediante un kit enzimático comercial (Wiener Lab, Argentina).

2.2.2.6. Determinación de la abundancia proteica de enzimas hepáticas.

2.2.2.6.1. Preparación de muestras.

Aproximadamente 50 mg de tejido hepático congelado se homogeneizó con buffer de lisis e inhibidores de proteasas y fosfatasa (Thermo Fisher Scientific Company, Finlandia), mediante un homogeneizador manual (Ultra Turrax[®], IKA[®], EEUU). La muestra se centrifugó a 12.000 × g durante 20 min en centrífuga refrigerada. La concentración proteica se determinó mediante el método de Lowry, utilizando el kit Bio-

Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, EEUU), y las muestras se almacenaron a -80°C hasta su análisis.

2.2.2.6.2. Análisis por Western blot.

Las muestras se acondicionaron con buffer en condiciones reductoras para electroforesis en geles discontinuos de poliacrilamida al 10 % (p/v) en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE), y se incubaron en baño termostatzado, en ebullición durante 5 min. Se sembraron 40 μg de proteína/línea para PPAR α , CPT1, ACOX1 y DGAT1. Las proteínas se separaron en geles SDS-PAGE (10 %) y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se bloquearon durante 1 h a temperatura ambiente con solución salina tamponada con Tris que contenía 0,05 % (v/v) de Tween-20 (TBST; Sigma-Aldrich, EEUU) y 5 % (p/v) de leche descremada en polvo. Luego, se incubaron durante la noche a 4°C con los anticuerpos primarios (**Tabla 7**) correspondientes.

Tabla 7: Anticuerpos y condiciones utilizados en la técnica de Western blot.

| <i>Anticuerpos</i> | <i>Tipo</i> | <i>Proveedor</i> | <i>Dilución</i> |
|---------------------------------------|--------------------------------------|--|-----------------|
| <i>Anticuerpos Primarios</i> | | | |
| PPAR α | Rabbit Polyclonal H-98: sc-9000 | Santa Cruz Biotechnology. Inc. CA, EEUU | 1/1000 |
| CPT1-L | Rabbit Polyclonal H-95:sc-20669 | Santa Cruz Biotechnology. Inc. CA, EEUU | 1/3000 |
| ACOX1 | Rabbit Polyclonal H-140: sc-98499 | Santa Cruz Biotechnology. Inc. CA, EEUU | 1/3000 |
| DGAT1 | Rabbit Polyclonal ab54037 | Abcam. Cambridge, Reino Unido | 1/3000 |
| HMGCoA sintasa | Mouse Monoclonal: sc-393256 | Santa Cruz Biotechnology. Inc. CA, EEUU | 1/20000 |
| Vinculina | Mouse monoclonal V284:MCA465GA | Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, EEUU | 1/10000 |
| <i>Anticuerpos Secundarios</i> | | | |
| Mouse anti- rabbit IgG | Polyclonal sc-2357 | Santa Cruz Biotechnology. Inc. CA, EEUU | 1/10000 |
| Mouse IgG κ binding protein | Binding protein: sc-516102 | Santa Cruz Biotechnology. Inc. CA, EEUU | 1/10000 |

Tras los lavados con TBST, las membranas se incubaron durante 90 min a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios (**Tabla 7**) conjugados con peroxidasa. Las bandas inmunorreactivas específicas se visualizaron mediante un reactivo quimioluminiscente (ECL Prime Western Blotting System, GE Healthcare, Alemania) y

se revelaron sobre Hyperfilm ECL (GE Healthcare, Alemania). La vinculina se utilizó como control de carga y se procesó en paralelo con el mismo protocolo y anticuerpos.

Las señales obtenidas por Western blot mostraron una respuesta lineal en el rango de 20 y 80 μg y tiempos de exposición crecientes. Las intensidades de las bandas se cuantificaron utilizando el software IMAGE PROPLUS 3.0.1 (Media Cybernetics, MD, EEUU). Para corregir la variabilidad entre membranas, se utilizó un pool de extracto hepático de seis animales como control.

2.2.3. Análisis estadístico.

Los datos referidos a la concentración de metabolitos y hormonas se analizaron con el software R v4.2.2 (R Core Team, 2022), de acuerdo con un diseño en bloques completos aleatorizados con medidas repetidas en el tiempo y ajuste por covariable (día -21). El modelo utilizado fue:

$$Y_{ijkl} = \mu + T_i + B_j + A(B)_{k(j)} + W_l + (T \times W)_{il} + \text{Cov} + E_{ijkl}$$

donde: Y_{ijkl} = variable dependiente, μ = media general, T_i = efecto del tratamiento, B_j = efecto del bloque, $A(B)_{k(j)}$ = efecto aleatorio del animal anidado al bloque, W_l = efecto del tiempo, $(T \times W)_{il}$ = efecto de la interacción del tratamiento \times tiempo, Cov = covariable, y E_{ijkl} = error residual. Los supuestos del modelo se verificaron mediante la prueba de normalidad de los residuos (Anderson-Darling, paquete nortest en R).

Los datos referidos a la abundancia proteica y Tg hepáticos se analizaron con el software SPSS v. 22.0 (SPSS Inc.), mediante un modelo lineal generalizado mixto (GLMM, por sus siglas en inglés). La normalidad de los residuos se comprobó mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. En ausencia de normalidad, se aplicó una distribución gamma con función de enlace logarítmica; en caso contrario, un modelo lineal general (GLM) con enlace identidad. Los efectos fijos considerados fueron el tratamiento (Trat), el muestreo (Tiempo) y su interacción (Trat \times Tiempo), incluyendo el animal como efecto aleatorio. Cuando la interacción Trat \times Tiempo fue significativa, se realizaron comparaciones múltiples entre tratamientos dentro de cada momento de muestreo, utilizando medias marginales ajustadas y corrección de Bonferroni.

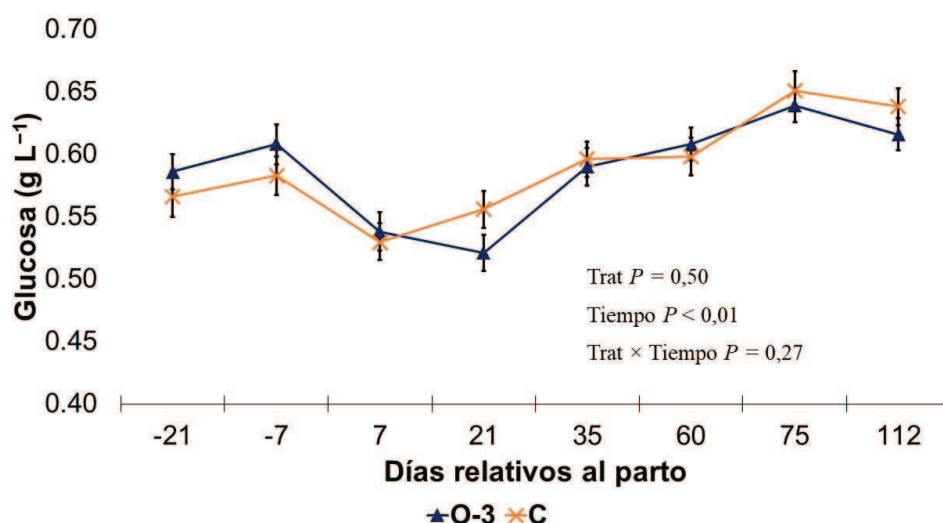
En todos los análisis, se consideraron significativos los efectos con $P \leq 0,05$ y tendenciales aquellos con $0,05 < P \leq 0,10$. Los resultados se expresaron como media \pm error estándar de la media (EEM).

2. 3. RESULTADOS.

2.3.1. Glucosa, urea y colesterol plasmáticos.

No se observó un efecto significativo del tratamiento ($P = 0,39$) ni de la interacción $\text{Trat} \times \text{Tiempo}$ ($P = 0,50$) sobre las concentraciones plasmáticas de glucosa durante el período experimental. Sin embargo, se detectó un efecto del Tiempo ($P < 0,01$), evidenciado por la evolución de las curvas de glucemia (**Figura 13**). Durante el preparto (días -21 y -7), las concentraciones promedio de glucosa fueron de $0,60 \pm 0,01$ y $0,57 \pm 0,01$ g L⁻¹ para las vacas de los grupos O-3 y C, respectivamente; mientras que durante el posparto (días 7 a 112), la glucemia promedio fue similar en ambos grupos tratamiento ($0,59 \pm 0,01$ g L⁻¹).

Figura 13: Concentraciones plasmáticas de glucosa en vacas lecheras suplementadas (O-3) o no (C) con sales cálcicas de AG ω -3.



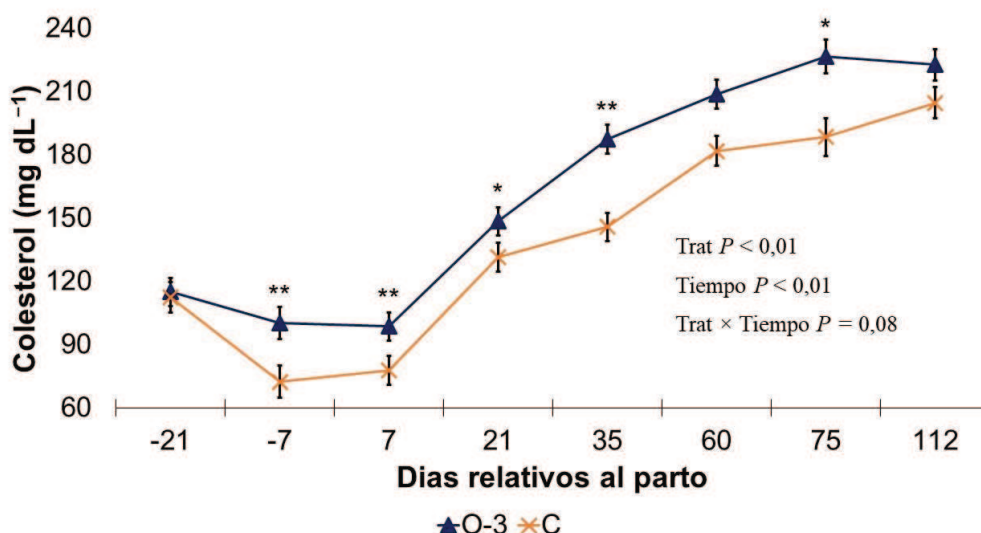
A su vez, en las etapas iniciales del estudio, los valores de glucosa se mantuvieron relativamente estables, observándose una leve disminución en el posparto inmediato, reflejo del aumento en la captación de glucosa por la glándula mamaria para la síntesis de lactosa. El valor mínimo de glucosa se registró en el día 7 posparto para el grupo C ($0,53 \pm 0,07$ g L⁻¹) y en el día 21 posparto para el grupo O-3 ($0,52 \pm 0,05$ g L⁻¹). A partir de esos puntos, ambas curvas mostraron una recuperación progresiva de la glucemia, alcanzando valores similares hacia el final del período de lactancia (**Figura 13**).

Las concentraciones plasmáticas de urea no difirieron entre tratamientos ($P = 0,64$) y no se detectó interacción $\text{Trat} \times \text{Tiempo}$ ($P = 0,86$), pero se observaron variaciones significativas de la uremia a lo largo del tiempo ($P < 0,01$). Los valores de uremia

promedio fueron similares en ambos grupos tratamiento ($0,39 \pm 0,01 \text{ g L}^{-1}$), tanto en el preparto como durante la lactancia, reflejando una homeostasis proteica relativamente estable.

En cuanto al colesterol plasmático, la interacción *Trat* × *Tiempo* tendió ($P = 0,08$) a ser significativa, indicando que la respuesta a la suplementación lipídica varió en función del tiempo (**Figura 14**). En efecto, los niveles circulantes de colesterol promedio durante el período experimental resultaron mayores en las vacas del grupo O-3 ($134 \pm 5,14$ vs. $112 \pm 5,42 \text{ mg dL}^{-1}$), con diferencias significativas detectables ($P < 0,10$) en 5 de los 7 muestreos realizados (días -7, 7, 21, 35 y 75 relativos al parto).

Figura 14: Concentraciones plasmáticas de colesterol en vacas lecheras suplementadas (O-3) o no (C) con sales cálcicas de AG ω -3.

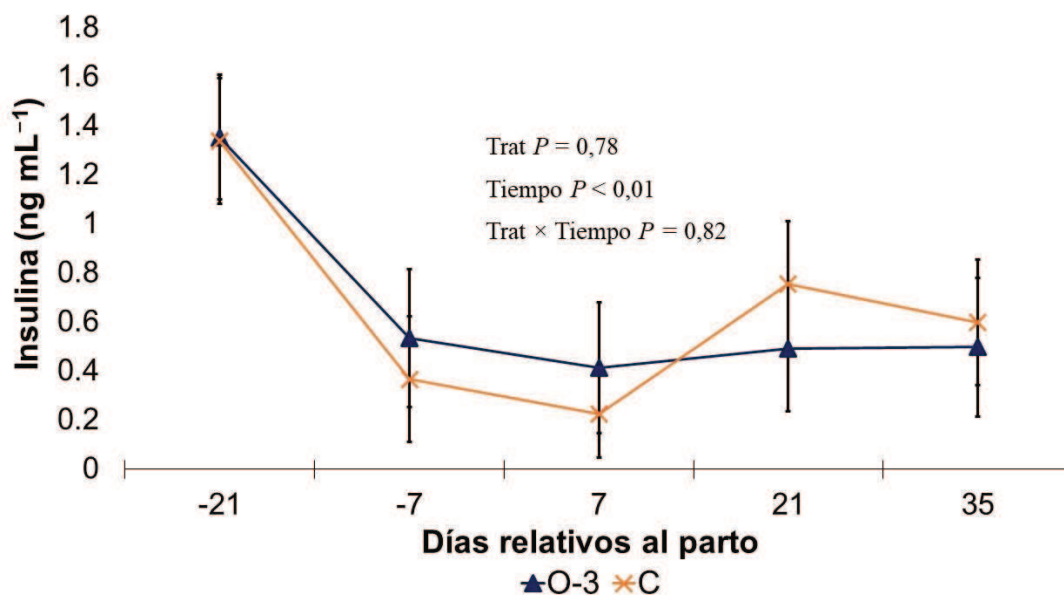


Tendencias expresadas como * $P < 0,10$ y diferencias significativas como ** $P < 0,05$. Las barras indican el EEM.

2.3.2. Comportamiento de la insulina e IGF-1.

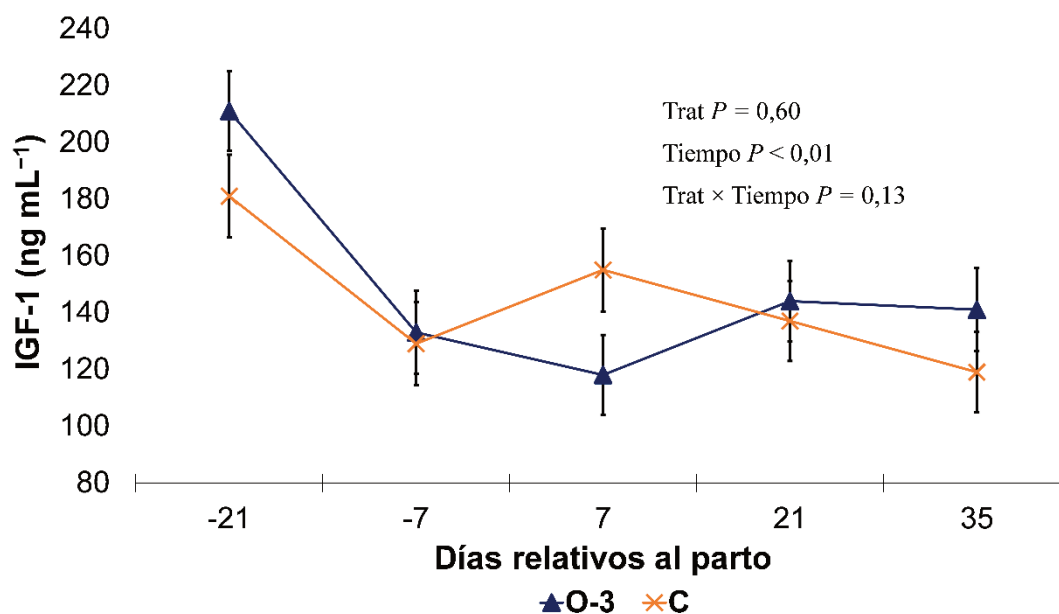
No se detectó interacción *Trat* × *Tiempo* significativa ($P > 0,10$) para las dos hormonas estudiadas. Las concentraciones plasmáticas de insulina resultaron similares entre tratamientos ($P = 0,78$; **Figura 15**), resultado compatible con los similares valores basales de glucosa circulante. El efecto tiempo resultó significativo ($P < 0,01$) para esta hormona. Durante el preparto (días -21 y -7), los valores promedio de insulina fueron $0,74 \pm 0,12$ vs. $0,59 \pm 0,11 \text{ ng mL}^{-1}$ para O-3 y C, respectivamente. Tras el parto, las concentraciones descendieron en ambos grupos, alcanzando su valor mínimo el día 7 ($0,41 \pm 0,08$ vs. $0,23 \pm 0,06 \text{ ng mL}^{-1}$ para O-3 y C, respectivamente), luego del cual aumentaron levemente.

Figura 15: Concentraciones plasmáticas de insulina en vacas lecheras suplementadas (O-3) o no (C) con sales cálcicas de AG ω -3.



De manera similar a lo descrito para insulina, tampoco se evidenciaron efectos del tratamiento en las concentraciones plasmáticas de IGF-1 ($P = 0,60$; **Figura 16**), pero sí se observaron variaciones significativas ($P < 0,01$) a lo largo del período experimental. En tal sentido, la evolución de IGF-1 reflejó un patrón fisiológico típico del PT, con concentraciones más bajas en el postparto temprano y una recuperación gradual conforme avanzaron los DEL.

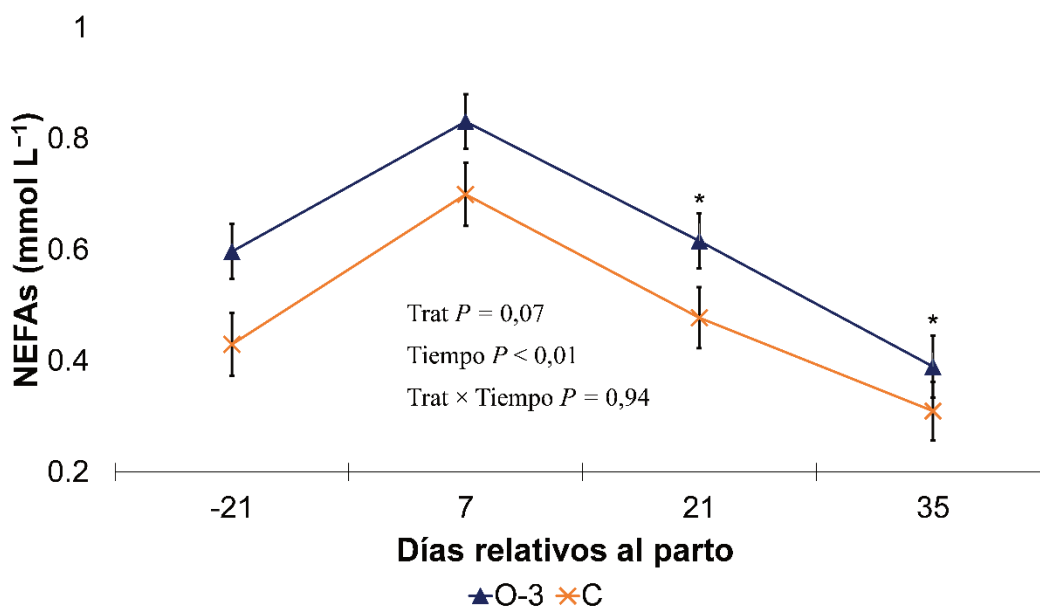
Figura 16: Concentraciones plasmáticas de IGF-1 en vacas lecheras suplementadas (O-3) o no (C) con sales cálcicas de AG ω -3.



2.3.3. Metabolismo energético: NEFAs y β HB.

Las vacas del tratamiento O-3 tendieron ($P = 0,07$) a presentar concentraciones plasmáticas de NEFAs más elevadas (**Figura 17**). El efecto tiempo resultó significativo ($P < 0,01$) para este metabolito. En ambos tratamientos, las concentraciones de NEFAs aumentaron notablemente en el posparto temprano, alcanzando su pico el día 7 ($0,83 \pm 0,05$ vs. $0,70 \pm 0,06$ mmol L⁻¹ para O-3 y C, respectivamente), seguido de un descenso progresivo durante las semanas siguientes. Los niveles circulantes de NEFAs promedio fueron $0,73 \pm 0,05$ y $0,65 \pm 0,05$ mmol L⁻¹ para los tratamientos O-3 y C, respectivamente, reflejando una movilización lipídica más intensa en las vacas suplementadas.

Figura 17: Concentraciones plasmáticas NEFAs en vacas lecheras suplementadas (O-3) o no (C) con sales cálcicas de AG ω -3.

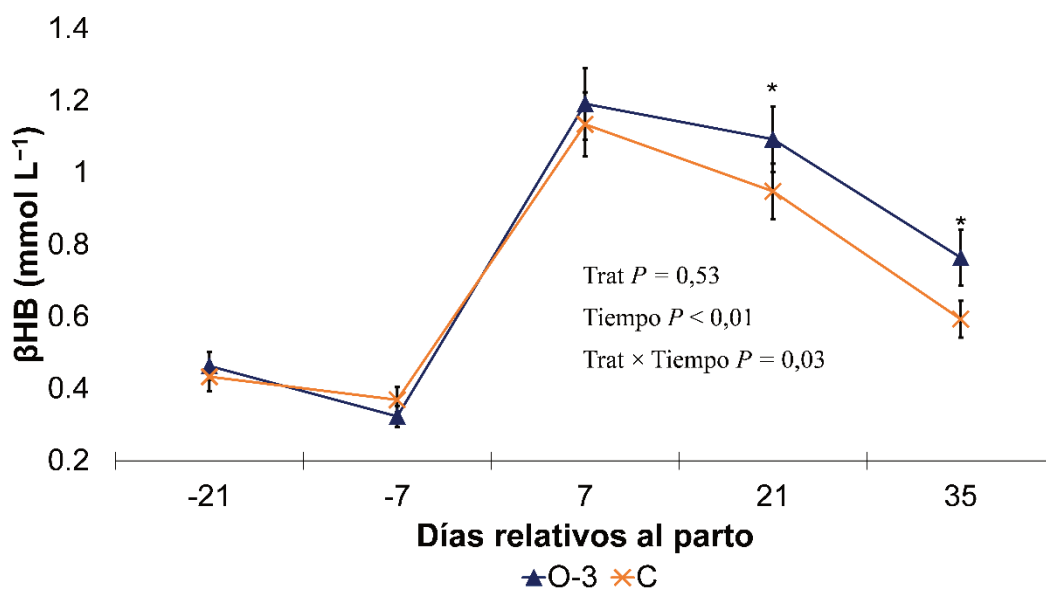


Tendencias expresadas como * $P < 0,10$ y diferencias significativas como ** $P < 0,05$. Las barras indican el EEM.

La interacción Trat x Tiempo resultó significativa ($P = 0,03$) para β HB, indicando que el efecto de la suplementación lipídica sobre la concentración plasmática de este metabolito fue afectado por el momento de muestreo (**Figura 18**). En efecto, en los muestreos de los días 21 y 35 posparto, las vacas del grupo O-3 tendieron ($P < 0,10$) a presentar concentraciones más elevadas de β HB respecto al grupo C, lo que sugiere un ligero aumento en la generación de cuerpos cetónicos asociados a la suplementación con AGPI ω -3. Al igual que para NEFAs, el efecto tiempo resultó significativo ($P < 0,01$) para β HB. En ambos grupos de vacas, las concentraciones fueron bajas una semana antes

del parto y tras el parto, los valores aumentaron de manera marcada, alcanzando un máximo el día 7 ($1,19 \pm 0,10$ vs. $1,13 \pm 0,09$ mmol L⁻¹ para O-3 y C, respectivamente), luego del cual disminuyeron progresivamente.

Figura 18: Concentraciones de β HB en vacas lecheras suplementadas (O-3) o no (C) con sales cálcicas de AG ω -3.



M.

2.3.4. Tg y proteínas hepáticas relacionadas con el metabolismo lipídico.

Los resultados correspondientes a la concentración de Tg hepáticos y a la abundancia relativa de proteínas involucradas en el metabolismo lipídico hepático se presentan en la **Tabla 8**. La inmunomarcación representativa de cada enzima y su control (vinculina), se muestran en la **Figura 19**.

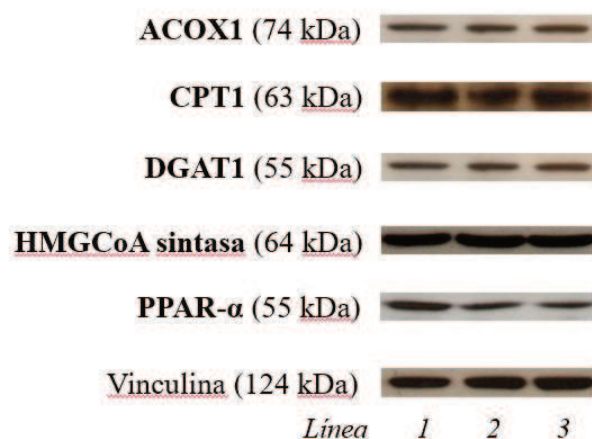
La interacción Trat x Tiempo resultó no significativa ($P > 0,05$) para todos los parámetros analizados. Las concentraciones de Tg en hígado resultaron similares entre tratamientos ($P = 0,62$), pero variaron ($P = 0,05$) en función del momento de muestreo, aumentando del preparto al posparto temprano.

En cuanto a las enzimas hepáticas evaluadas, la abundancia promedio de ACOX1 resultó mayor ($P = 0,02$) en las vacas del grupo O-3 y mostró un incremento ($P = 0,05$) durante el posparto; sin embargo, la abundancia relativa de CPT1 no fue afectada por los tratamientos ($P = 0,55$). A su vez, la abundancia de DGAT1 resultó menor ($P = 0,02$) en el grupo de vacas O-3, lo que podría reflejar una menor reesterificación de AG en el hígado. En contraste, la enzima HMG-CoA sintasa presentó valores más altos ($P = 0,04$) en el grupo suplementado y su abundancia relativa se redujo con el avance del período de

muestreo ($P = 0,05$). Finalmente, la abundancia de PPAR α fue significativamente mayor ($P = 0,04$) en el grupo O-3, sin variaciones relevantes a lo largo del Tiempo ($P = 0,83$).

Estos resultados sugieren que la suplementación con AGPI ω -3 favorecería una modulación positiva del metabolismo hepático, estimulando la oxidación de lípidos y la regulación de genes asociados a la β -oxidación y al transporte de AG.

Figura 19: Inmunomarcación representativa de la expresión proteica de enzimas que intervienen en la β -oxidación (ACOX1 y CPT1), la reesterificación (DGAT1), la cetogénesis (HMG-CoA sintasa) y su regulador génico (PPAR α) en vacas lecheras suplementadas (O-3) o no (C) con sales cálcicas de AG ω -3.



Cada línea corresponde a los muestreos: 1= día -21; 2 y 3 = días 7 y 21, respectivamente. El peso molecular (kDa) se indica a la derecha de cada proteína.

Tabla 8: Concentración de Tg hepáticos y abundancia proteica de enzimas que intervienen en la β -oxidación (ACOX1 y CPT1), la reesterificación (DGAT1), la cetogénesis (HMG-CoA sintasa) y su regulador génico (PPAR α) en vacas lecheras suplementadas (O-3) o no (C) con sales cálcicas de AG ω -3.

| Item | Tratamientos | Días relativos al parto | | | <i>p</i> -valor ¹ | | |
|--------------------------------|--------------|-------------------------|------------------|------------------|------------------------------|--------|----------------------|
| | | -21 | 7 | 21 | Trat | Tiempo | Trat \times Tiempo |
| Tg (mg g TH ⁻¹) | O-3 | 8,81 \pm 1,42 | 13,98 \pm 2,34 | 13,57 \pm 2,40 | 0,62 | 0,05 | 0,67 |
| | C | 11,36 \pm 1,30 | 14,63 \pm 2,15 | 12,87 \pm 2,27 | | | |
| ACOX1 (ua) | O-3 | 0,89 \pm 0,08 | 1,29 \pm 0,12 | 1,14 \pm 0,11 | 0,02 | 0,05 | 0,18 |
| | C | 0,84 \pm 0,09 | 0,84 \pm 0,14 | 1,01 \pm 0,12 | | | |
| CPT1 (ua) | O-3 | 1,13 \pm 0,09 | 1,04 \pm 0,11 | 1,02 \pm 0,12 | 0,55 | 0,68 | 0,25 |
| | C | 0,92 \pm 0,10 | 0,94 \pm 0,12 | 1,17 \pm 0,13 | | | |
| DGAT1 (ua) | O-3 | 0,97 \pm 0,11 | 1,07 \pm 0,12 | 0,84 \pm 0,11 | 0,02 | 0,57 | 0,53 |
| | C | 1,15 \pm 0,12 | 1,21 \pm 0,13 | 1,21 \pm 0,12 | | | |
| HMG-CoA sintasa (ua) | O-3 | 1,33 \pm 0,08 | 1,12 \pm 0,09 | 1,00 \pm 0,09 | 0,04 | 0,05 | 0,09 |
| | C | 1,07 \pm 0,09 | 0,86 \pm 0,09 | 1,08 \pm 0,09 | | | |
| PPAR α (ua) | O-3 | 1,36 \pm 0,24 | 1,14 \pm 0,13 | 1,13 \pm 0,10 | 0,04 | 0,83 | 0,44 |
| | C | 0,90 \pm 0,17 | 0,94 \pm 0,11 | 1,07 \pm 0,09 | | | |

Valores expresados a través de las medias mínimas cuadráticas (LSMeans) \pm el error estándar de las LSMean (EEM). ¹Efectos del tratamiento (Trat), muestreo (Tiempo) e interacción Trat \times Tiempo. Tg = triglicéridos hepáticos (mg g tejido húmedo⁻¹). ACOX1 = acil-CoA oxidasa 1. CPT1 = carnitina palmitoiltransferasa 1. DGAT = diacilglicerol aciltransferasa 1. HMG-CoA sintasa = 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa. PPAR α = receptor activado por proliferadores de peroxisomas α . ua = unidades arbitrarias.

2.4. DISCUSIÓN.

El perfil metabólico y endocrino de las vacas observado en el presente estudio refleja los profundos ajustes fisiológicos característicos del PT (Meikle *et al.*, 2013). Como era esperable, las variaciones registradas en las concentraciones plasmáticas de glucosa, insulina, IGF-1, NEFAs y β HB durante el período experimental (**Figura 13**, **Figura 15**, **Figura 16**, **Figura 17** y **Figura 18**) confirman la existencia de un BEN, que se inicia al final de la gestación y se mantiene durante el inicio de lactancia (Sammad *et al.*, 2022), con una progresiva recuperación alrededor de la tercera semana postparto, cuando las concentraciones de insulina comienzan a aumentar de forma concomitante con la glucemia mientras descienden los valores de NEFAs y β HB (Pérez-Báez *et al.*, 2019).

Si bien la suplementación con AGPI ω -3 no afectó de manera significativa la mayoría de estos parámetros, se observaron tendencias relevantes, particularmente en los perfiles de NEFAs y β HB. En este sentido, se evidenció una tendencia hacia un menor balance energético en el grupo O-3 con respecto al grupo C. Sin embargo, estas diferencias no se reflejaron en el PC ni en la CC promedio, en coincidencia con hallazgos previos que sugirieron que dichas variables no serían indicadores sensibles ni confiables de la lipomovilización en vacas en transición (Ospina *et al.*, 2013). En vacas en inicio de lactancia, concentraciones plasmáticas de NEFAs y de cuerpos cetónicos menores a 0,7 y 1,2 mmol L⁻¹, respectivamente, son consideradas normales y reflejan la lipomovilización y la cetogénesis hepática asociadas al BEN (LeBlanc, 2010; Ospina *et al.*, 2013). En este estudio, las vacas suplementadas con sales cálcicas de AGPI ω -3 tendieron a presentar mayores concentraciones de NEFAs y β HB, con picos en el día 7 postparto. Este patrón podría explicarse en parte, como reflejo de una mayor movilización del tejido adiposo para soportar la mayor producción de leche registrada en el grupo de vacas O-3. Adicionalmente, podría intervenir un segundo mecanismo independiente de la lipólisis. Los AG de cadena larga aportados por la dieta son absorbidos en el intestino delgado, reesterificados a Tg en los enterocitos e incorporados a quilomicrones y VLDL. Durante su metabolismo periférico, la LPL hidroliza estos Tg y libera AG; sin embargo, una fracción de estos AG no es completamente captada por los tejidos y retornan a la circulación unidos a albúmina, aumentando el pool plasmático de NEFAs (Bionaz *et al.*, 2020; Lashkari *et al.*, 2024).

La suplementación lipídica ha mostrado efectos inconsistentes sobre los niveles de glucosa e insulina circulantes (Staples *et al.*, 1998). Sin embargo, cuando los lípidos sustituyen al almidón en la dieta, puede reducirse el aporte de propionato, limitando la gluconeogénesis hepática y la secreción de insulina. A pesar de ello, en el presente estudio no se observaron diferencias entre tratamientos en las concentraciones plasmáticas de glucosa e insulina. El mantenimiento de la glucemia sugiere un cierto ahorro del metabolito en el metabolismo oxidativo para producción de ATP (el que sería producido a partir de la oxidación de los AG exógenos) y como dador de NADPH al reducirse la síntesis *de novo* (mamaria y adiposa) de ácidos grasos ante el suministro de lípidos (Gagliostro y Chilliard, 1992).

Aunque la disponibilidad de NEFAs al inicio de la lactancia constituye un mecanismo adaptativo esencial para cubrir los elevados requerimientos energéticos, cuando su liberación excede la capacidad hepática de oxidación y exportación puede producirse infiltración de Tg en el tejido hepático, predisponiendo a cetosis o hígado graso (Arshad y Santos, 2022; Pascottini *et al.*, 2022). No obstante, en este estudio no se observó un aumento en la concentración de Tg hepáticos en las vacas del grupo O-3, a pesar de las mayores concentraciones plasmáticas de NEFAs registradas en este grupo de vacas. Este hallazgo sugiere que el hígado de las vacas suplementadas podría haber tenido una mayor capacidad para oxidar los AG o exportarlos en forma de VLDL, evitando su acumulación intracelular (Angeli *et al.*, 2019a; Barcarolo *et al.*, 2024). De hecho, las vacas suplementadas con AGPI ω -3 presentaron un incremento en las concentraciones plasmáticas de colesterol total, lo que podría interpretarse como un reflejo de una mayor exportación hepática de lípidos en forma de lipoproteínas, ya que el colesterol constituye parte de las VLDL (Bionaz *et al.*, 2020). Este incremento en la colesterolemia también reviste interés endocrino, dado que el colesterol es precursor de hormonas esteroideas (Childs *et al.*, 2008; Freret *et al.*, 2019) por lo que su disponibilidad podría estar vinculada a los efectos benéficos sobre la función reproductiva descrito en el capítulo anterior.

Asimismo, las vacas suplementadas con AGPI ω -3 mostraron modificaciones en la abundancia de enzimas clave del metabolismo lipídico hepático, especialmente aquellas involucradas en la oxidación, la cetogénesis y la reesterificación. En rumiantes, la β -oxidación de AG ocurre tanto en mitocondrias -mediada por la CPT1- como en peroxisomas, donde la ACOX1 regula el proceso oxidativo (Grum *et al.*, 1994). Estudios previos de nuestro grupo han demostrado una mayor abundancia de la CPT1 en vacas con

menor contenido hepático de Tg (Angeli *et al.*, 2019a; Barcarolo *et al.*, 2024). En el presente estudio no se observaron diferencias entre tratamientos en la abundancia de CPT1. Sin embargo, el incremento en la abundancia de ACOX1 en las vacas suplementadas con AGPI ω -3 podría representar una adaptación funcional que facilitó la metabolización de la mayor afluencia de NEFAs en este grupo de vacas y, en consecuencia, evitó un aumento en la acumulación de Tg en el parénquima hepático (Pinedo y Melendez, 2022). Diversos estudios han destacado la importancia de la capacidad oxidativa -tanto mitocondrial como peroxisomal- para prevenir la acumulación de Tg en los hepatocitos (Pinedo *et al.*, 2022; Li *et al.*, 2022; Zhang *et al.* 2022).

Como se mencionó en la introducción del capítulo, luego de la β -oxidación, el acetil-CoA generado puede seguir dos destinos metabólicos principales: su completa oxidación por fosforilación oxidativa o su conversión a cuerpos cetónicos. En este sentido, la mayor abundancia de HMG-CoA sintasa (enzima limitante de la cetogénesis) en el grupo de vacas O-3 sugiere un incremento en la capacidad cetogénica hepática (Rico y Barrientos-Blanco, 2024). La tasa de cetogénesis depende en gran medida del flujo de sustratos oxidables hacia el hígado (Rico y Barrientos-Blanco, 2024). Por lo tanto, el aumento observado en la abundancia de HMG-CoA sintasa podría explicarse por la mayor disponibilidad de NEFAs y su captación hepática. Esta vía está regulada indirectamente por el estado lipolítico sistémico. En no rumiantes, la actividad de esta enzima se ve influenciada por hormonas, siendo inhibida por la insulina y estimulada por el glucagón a nivel transcripcional (Rico y Barrientos-Blanco, 2024). Sin embargo, su regulación en rumiantes ha sido menos estudiada y los efectos del glucagón sobre la lipólisis parecerían ser menos evidentes, mientras que la insulina desempeñaría un papel predominante (She *et al.*, 1999). En consecuencia, el glucagón podría tener un impacto limitado en la cetogénesis, mientras que la insulina probablemente ejerza una mayor influencia, especialmente considerando la resistencia a la insulina comúnmente evidenciada durante el parto (Angeli *et al.*, 2021b). Además, la cetogénesis no solo evita la acumulación de acetil-CoA cuando la oxidación hepática alcanza su límite, sino que también asegura la disponibilidad de energía a través de los cuerpos cetónicos. Por lo tanto, el incremento en la abundancia de HMG-CoA sintasa en las vacas suplementadas con AGPI ω -3 no necesariamente indica un desbalance metabólico, sino una *respuesta homeorrética* destinada a preservar glucosa para funciones prioritarias, como la síntesis de lactosa en la glándula mamaria (Lean, 2020; Rico y Barrientos-Blanco, 2024).

Complementariamente, la menor abundancia de DGAT1 observada en las vacas del tratamiento O-3, sugiere una reducción en la síntesis de Tg hepáticos. Resultados similares se han descrito en modelos murinos (Xu *et al.*, 2015) y en cultivos de hepatocitos (Berge *et al.*, 1999), donde la suplementación con EPA y DHA promovió la oxidación lipídica e inhibió la acción de la DGAT1, como así también en estudios *in vivo* como el de Greco *et al.* (2015), quienes reportaron una menor acumulación de Tg hepáticos en vacas suplementadas con AGPI ω -3. Este mecanismo adquiere particular relevancia en bovinos debido a su limitada capacidad de síntesis de VLDL, especialmente durante el PT, cuando la lipomovilización es intensa, incrementando el riesgo de esteatosis hepática (Andjelić *et al.*, 2022; Arshad y Santos, 2022).

En conjunto, estos resultados reflejan una reorientación metabólica del hígado hacia la oxidación de AG y una menor síntesis de Tg en las vacas suplementadas con AGPI ω -3. Este patrón podría atribuirse a la mayor abundancia del receptor nuclear PPAR α detectada en este grupo de vacas. Dicho receptor actúa como un regulador maestro de genes involucrados en la β -oxidación y su activación es inducida por los AGPI, especialmente EPA y DHA, reconocidos agonistas naturales de PPAR α (Zúñiga *et al.*, 2011). En sintonía con los resultados observados *in vivo* en el presente trabajo, estudios *in vitro* con líneas celulares bovinas han mostrado un aumento en la expresión génica de este receptor tras la exposición a AGPI ω -3 (MacLaren *et al.*, 2006; Abou-Rjeileh *et al.*, 2025). Aunque la función de PPAR α está bien caracterizada en modelos no rumiantes (Varga *et al.*, 2011; Bougarne *et al.*, 2018), su rol en bovinos ha sido menos explorado. En este sentido, estudios previos de nuestro grupo con vacas suplementadas con minerales antioxidantes y vitaminas no detectaron diferencias en la abundancia de este receptor ni una asociación con una mayor eficiencia reproductiva (Angeli *et al.*, 2019a; Barcarolo *et al.*, 2024). Por lo tanto, este estudio constituye, hasta donde sabemos, el primer reporte de un incremento en la abundancia hepática de PPAR α inducido por suplementación con un agonista natural, reforzando la hipótesis de que los AGPI ω -3 pueden modular el metabolismo hepático mediante la activación de rutas oxidativas reguladas por este receptor.

3. DISCUSIÓN GENERAL.

El inicio de la lactancia constituye una de las etapas más desafiantes para la vaca lechera, debido al marcado desbalance energético y a la intensa reorganización metabólica que exige la lactogénesis (Drackley, 1999; Sammad *et al.*, 2022). Durante este período, el hígado adquiere un rol central al regular la disponibilidad energética y la homeostasis de nutrientes, mientras múltiples tejidos coordinan respuestas para compensar el déficit nutricional. Este proceso, que incluye resistencia a la insulina, catabolismo tisular y movilización de reservas, incrementa la vulnerabilidad a enfermedades, con efectos negativos sobre la productividad, la fertilidad y longevidad del rodeo (Pascottini *et al.*, 2022).

En este contexto, los resultados obtenidos en esta tesis aportan evidencia integradora sobre el impacto de la suplementación dietaria con sales cálcicas enriquecidas en AGPI ω -3 como estrategia nutricional para favorecer la adaptación metabólica, preservar la salud hepática y mejorar la eficiencia reproductiva de las vacas lecheras. La interpretación conjunta de los hallazgos de ambos capítulos permite vincular de manera coherente los efectos metabólicos y endocrinos con las respuestas productivas y reproductivas observadas, ofreciendo una comprensión fisiológica más completa del comportamiento de las vacas lecheras en el inicio de la lactancia.

El característico BEN del inicio de la lactancia depende de distintos factores, entre ellos, la capacidad de consumo, la producción de leche y la CC de las vacas. En el presente estudio, la suplementación con AGPI ω -3 mejoró la producción de leche en nueve de las catorce semanas analizadas y aumentó la producción de proteína, sin afectar el consumo total de MS, la ingestión de ENL, el PC y la CC. Este efecto favorable sobre la producción de leche coincide con resultados reportados previamente (Petit, 2002a, Gonthier *et al.*, 2005, Sinedino *et al.*, 2017). La ausencia de efectos sobre el CMS podría explicarse por el nivel moderado de suplementación ($< 3\%$ de la MS total) y por la adecuada protección ruminal del producto utilizado (Rabiee *et al.*, 2012; Weld y Armentano, 2017). Así, los resultados confirman que la inclusión de sales cálcicas ricas en ω -3 representa una alternativa segura para incrementar la densidad energética de la dieta sin alterar la función ruminal (Relling y Reynolds, 2007). Adicionalmente, observamos una mayor eficiencia de conversión medida como LEC por kg MS y por Mcal ENL consumida en el grupo de vacas suplementadas con AGPI ω -3. Estas respuestas pueden ser explicadas por una

mayor eficiencia de utilización de la energía consumida y una reducción de la energía necesaria para la síntesis *de novo* de AG por la glándula mamaria (dos Santos Neto *et al.*, 2022; Plata-Pérez *et al.*, 2022). De hecho, observamos una modificación del perfil de AG en la GB, donde las vacas suplementadas presentaron una menor proporción de AG sintetizados *de novo* y un aumento de la concentración de AG preformados provenientes de la dieta, además de una reducción del IA y un aumento de moléculas bioactivas como el AV y el AR. Este efecto resulta de gran interés, ya que contribuye al desarrollo de productos lácteos con mayor valor funcional y potencial beneficio para la salud de los consumidores (Glasser *et al.*, 2008; Mozaffarian y Wu, 2011).

Desde la perspectiva metabólica, los resultados de esta tesis refuerzan la noción que los AGPI ω -3 ejercen un efecto modulador sobre la función hepática y endócrina de las vacas lecheras en inicio de lactancia. Aunque las concentraciones plasmáticas de glucosa, insulina e IGF-1 fueron similares entre los tratamientos, se observaron variaciones en metabolitos como NEFAs y β HB. Las concentraciones de NEFAs circulantes durante el inicio de lactancia suelen utilizarse como un indicador principal de lipólisis en respuesta al BEN (Ospina *et al.*, 2013) y cuando la movilización del tejido adiposo excede la capacidad oxidativa hepática suele producirse hígado graso, por acumulación de Tg, afectando la salud, la producción y la reproducción de las vacas lecheras (Angeli *et al.*, 2019; Arshad y Santos, 2022). En este sentido, la mayor concentración de NEFAs y la tendencia a un menor balance energético en el grupo O-3, no se tradujo en una mayor acumulación de Tg hepáticos, lo que podría indicar una mejor adaptación metabólica, particularmente por una mayor capacidad para la oxidación o exportación de los AG vehiculizados por medio de las VLDL, evitando su acumulación intracelular (Angeli *et al.*, 2019a). La mayor expresión proteica de enzimas involucradas en la β -oxidación peroxisomal (ACOX1) y la menor abundancia de enzimas de la reesterificación (DGAT1), sugieren un mecanismo adaptativo del tejido hepático estratégico para la utilización de los AG movilizados durante la lipólisis (MacLaren *et al.*, 2006; Zúñiga *et al.*, 2011; Bougarne *et al.*, 2018). Estudios previos han demostrado que el EPA y el DHA actúan como agonistas naturales de PPAR α , promoviendo la oxidación de AG y reduciendo la lipogénesis (Angeli *et al.*, 2019; Abou-Rjeileh *et al.*, 2025), lo que concuerda con la respuesta observada en este trabajo de tesis. Asimismo, la mayor abundancia proteica de HMG-CoA sintasa en las vacas suplementadas sugiere un incremento de la capacidad cetogénica en el tejido hepático (Pinedo *et al.*, 2022; Rico y Barrientos-Blanco, 2024). Esta respuesta podría interpretarse como una estrategia

adaptativa frente al exceso de NEFAs movilizados durante el BEN, favoreciendo su utilización como fuente de energía y previniendo la lipidosis hepática (Bruinjé y Leblanc, 2025). En conjunto, los resultados sugieren que los AGPI ω -3 favorecen una reorientación metabólica hacia la oxidación de lípidos, en consonancia con la activación de PPAR α descrito en estudios previos en bovinos y no rumiantes (Varga *et al.*, 2011; Angeli *et al.*, 2021b).

Por otro lado, los resultados de esta tesis mostraron una mejor respuesta reproductiva en las vacas suplementadas con ω -3, lo que concuerda con las revisiones de Moallem (2018), Lashkari *et al.* (2021) y Fabjanowska *et al.* (2023). Si bien la suplementación con sales cálcicas de AGPI ω -3 no modificó significativamente parámetros estructurales ováricos tales como el número y tamaño de los folículos o el área luteal, se observó una tendencia a mayores concentraciones de progesterona plasmática y una mayor proporción de vacas preñadas a los 130 DEL. El efecto sobre la progesterona podría atribuirse a la mayor concentración plasmática de colesterol observada en el grupo O-3, dado que este es el principal precursor para la síntesis de progesterona en el cuerpo lúteo (Sharma *et al.*, 2020). Una mayor disponibilidad de colesterol, asociada a la suplementación lipídica, podría incrementar la capacidad biosintética del tejido luteal sin necesidad de cambios en su tamaño aparente, favoreciendo así la proliferación, supervivencia y viabilidad embrionaria. Por otro lado, los AG ω -3 compiten con el AA (ω -6) por la COX-2, reduciendo la síntesis de PGF $_{2\alpha}$ y promoviendo la persistencia del CL, lo que contribuye a sostener concentraciones de progesterona adecuadas durante la ventana crítica de reconocimiento materno de la gestación (Thangavelu *et al.*, 2007; Sinedino *et al.*, 2017). Asimismo, se ha demostrado que dietas enriquecidas con aceites de lino o pescado aumentan las concentraciones de ALA, EPA y DHA en el fluido folicular, generando ovocitos más competentes y mejorar la señal de reconocimiento materno de la gestación a través de una mayor secreción de IFN- τ y una menor liberación de PGF $_{2\alpha}$ endometrial (Moallem, 2018; Sharma *et al.*, 2020). En este marco, los hallazgos de la presente tesis refuerzan la hipótesis de que la suplementación con sales cálcicas de AGPI ω -3 actuaría simultáneamente sobre el metabolismo energético y la función ovárica (Bionaz *et al.*, 2020; Fabjanowska *et al.*, 2023), contribuyendo a establecer un entorno metabólico y endócrino más favorable para la ovulación efectiva, la función luteal, la supervivencia embrionaria y, en definitiva, a un mejor desempeño reproductivo del rodeo (Carneiro *et al.*, 2021). Aunque algunas de

las variables estudiadas no alcanzaron significancia estadística, probablemente debido al tamaño reducido de los grupos experimentales ($n = 18$), la magnitud de los cambios y su coherencia fisiológica permiten considerar estos efectos como biológicamente relevantes.

Finalmente, nuestros hallazgos integran la nutrición, el metabolismo y la reproducción de las vacas lecheras en inicio de lactancia, evidenciando la interdependencia funcional entre la salud hepática y la eficiencia reproductiva. Las respuestas productivas observadas, junto con los efectos metabólicos y endocrinos asociados, poseen una relevancia fisiológica significativa, ya que reflejan una mejor adaptación metabólica durante el parto y se traducen en una mayor cantidad de vacas preñadas durante la lactancia temprana. En conjunto, estos resultados amplían el conocimiento sobre el rol de los AGPI en la fisiología bovina, consolidando su valor como compuestos nutracéuticos y como herramientas dentro de la nutrición de precisión orientada a mejorar la eficiencia, la salud y la sostenibilidad de los sistemas lecheros (Lopreatto *et al.*, 2020; Fabjanowska *et al.*, 2023).

4. CONCLUSIONES.

Los resultados obtenidos en esta tesis demuestran que la suplementación con sales cálcicas enriquecidas en AGPI ω -3 constituye una estrategia nutricional eficaz para favorecer la adaptación de las vacas al inicio de lactancia. En un contexto fisiológico caracterizado por una intensa movilización lipídica y un elevado riesgo de desbalances energéticos, el suministro de fuentes lipídicas protegidas conteniendo AGPI esenciales demostró favorecer una respuesta metabólica más equilibrada, sostenida por un funcionamiento hepático más eficiente, que se tradujo en mejor desempeño productivo y reproductivo.

En este trabajo se confirma que la combinación de AG como ALA, EPA y DHA, actúa modulando rutas metabólicas claves a través de la activación del PPAR α y otros factores transcripcionales relacionados con la β -oxidación. Este efecto se tradujo en una mayor capacidad de oxidación de AG, reduciendo así el riesgo de lipidosis y mejorando la eficiencia energética global del animal. Tales respuestas reflejan una mejora en la homeostasis hepática, que constituye un factor determinante para el rendimiento y la salud durante el PT. La evidencia generada refuerza, además, la importancia del hígado como órgano integrador del metabolismo energético y la reproducción, especialmente bajo condiciones de alta exigencia metabólica.

En el ámbito reproductivo, la suplementación con AGPI ω -3 promovió una mejor respuesta reproductiva y un perfil luteal más estable, asociado a mayores concentraciones plasmáticas de progesterona. Este efecto sugiere que los AGPI ω -3 no solo influyen sobre el metabolismo energético, sino que también regulan la comunicación endocrina entre el hígado, los ovarios y el útero, mejorando la calidad del ambiente uterino y la supervivencia embrionaria.

De esta forma, los AGPI ω -3 actuarían como verdaderos moduladores fisiológicos, capaces de sincronizar los procesos metabólicos y reproductivos que determinan la eficiencia del ciclo productivo. En términos productivos, la ausencia de efectos sobre el CMS y la respuesta favorable sobre la producción, confirma el uso de sales cálcicas enriquecidas en ω -3 como una herramienta nutricional en un contexto de altos desafíos fisiológicos. La modificación del perfil de AG en la leche, con un incremento la proporción de moléculas bioactivas, la reducción del IA y de la relación ω -

6:ω-3, representa un valor agregado para la industria láctea, al generar productos con mayor calidad nutricional y potencial beneficio para la salud humana, posicionando la suplementación con AGPI ω-3 como una estrategia de diferenciación funcional en sistemas lecheros modernos.

Los resultados de este trabajo respaldan el uso de suplementos lipídicos insaturados protegidos de la biohidrogenación ruminal como una herramienta nutricional estratégica dentro de programas de nutrición de precisión, capaces de responder a las demandas contemporáneas de sustentabilidad, eficiencia y bienestar animal mediante la promoción de la salud sistémica y la longevidad productiva de las vacas lecheras. En este sentido, la evidencia generada en esta tesis demuestra que la suplementación con sales cálcicas enriquecidas en AGPI ω-3 constituye una alternativa de alto valor fisiológico y tecnológico para la nutrición de vacas en transición, dada su capacidad para modular de manera simultánea la función hepática, el metabolismo energético y la actividad ovárica. No obstante, el uso de este suplemento, aunque promisorio, plantea la necesidad de futuras investigaciones que incluyan ensayos de dosis-respuesta y el desarrollo de tecnologías de protección más eficientes que aseguren una mayor llegada de AG ω-3 al duodeno, permitiendo así optimizar la dosis efectiva y maximizar su impacto fisiológico. De este modo, los resultados aquí presentados no solo amplían la comprensión científica sobre el rol de los lípidos funcionales en la fisiología bovina, sino que también ofrecen un aporte tangible para el diseño de sistemas lecheros más eficientes, resilientes y sostenibles, en consonancia con los desafíos de la producción animal del siglo XXI.

5. BIBLIOGRAFÍA

- Abou-Rjeileh U, Gouveia K, Lock AL, Contreras GA. 2025.** Graduate Student Literature Review: Precision nutrition meets cellular insight—The mechanistic role of oleic acid in dairy cow metabolism. *J Dairy Sci.* 108:12678-12688.
- Akbar H, Schmitt E, Ballou MA, Corrêa MN, DePeters EJ, Loor JJ. 2013.** Dietary lipid during late-pregnancy and early-lactation to manipulate metabolic and inflammatory gene network expression in dairy cattle liver with a focus on PPARs. *Gene Regul Syst Bio.* 7:1-GRSB-S12005
- Akraim F, Nicot MC, Juaneda P, Enjalbert F. 2007.** Conjugated linolenic acid (CLnA), conjugated linoleic acid (CLA) and other biohydrogenation intermediates in plasma and milk fat of cows fed raw or extruded linseed. *Animal.* 1:835-843.
- Albracht-Schulte K, Kalupahana NS, Ramalingam L, Wang S, Rahman SM, Robert-McComb J, Moustaid-Moussa N. 2018.** Omega-3 fatty acids in obesity and metabolic syndrome: a mechanistic update. *J Nutr Biochem.* 58:1-16.
- Allen MS. 2000.** Effects of diet on short-term regulation of feed intake by lactating dairy cattle. *J Dairy Sci.* 83:1598-1624.
- Allen MS, Bradford BJ, Oba M. 2009.** BOARD-INVITED REVIEW: The hepatic oxidation theory of the control of feed intake and its application to ruminants. *J Anim Sci.* 87:3317-3334.
- Allen MS, Piantoni P. 2013.** Metabolic control of feed intake: implications for metabolic disease of fresh cows. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 29:279-297.
- Ambrose DJ, Kastelic JP, Corbett R, Pitney PA, Petit HV, Small JA, Zalkovic P. 2006.** Lower pregnancy losses in lactating dairy cows fed a diet enriched in α -linolenic acid. *J Dairy Sci.* 89:3066-3074.
- Amini MR, Babazadeh D, Razavi SA, Valizadeh R, Dirandeh E, Baghshahi H. 2023.** Effects of polyunsaturated fatty acids supplementation on biochemical parameters, milk fatty acid composition and production performance of Holstein dairy cows around parturition. *Res Sq.* 1-16.
- Amini MR, Naserian AA, Valizadeh R, Dirandeh E, Baghshahi H, Razavi SA. 2024.** The effects of saturated and polyunsaturated fatty acids on reproductive performance and hormonal changes in dairy cows at the transition period. *World Vet J.* 14:184-193.

Andjelić B, Djoković R, Cincović M, Bogosavljević-Bošković S, Petrović M, Mladenović J, Čukić A. 2022. Relationships between milk and blood biochemical parameters and metabolic status in dairy cows during lactation. *Metabolites*. 12:733-733.

Angeli E, Barcarolo D, Ribas L, Marelli BE, Roskopf PM, Salado EE, Ortega HH, Hein GJ. 2021. Relevant aspects of dietary n-3 polyunsaturated fatty acids in the adaptation of dairy cattle to the transition period. *Livest Sci*. 244:1-42.

Angeli E, Rodríguez FM, Rey F, Santiago G, Matiller V, Ortega HH, Hein GJ. 2019a. Liver fatty acid metabolism associations with reproductive performance of dairy cattle. *Anim Reprod Sci*. 208:1-11.

Angeli E, Trionfini V, Gareis NC, Matiller V, Huber E, Rey F, Salvetti NR, Ortega HH, Hein GJ. 2019b. Protein and gene expression of relevant enzymes and nuclear receptor of hepatic lipid metabolism in grazing dairy cattle during the transition period. *Res Vet Sci*. 123:223-231.

Angulo J, Mahecha L, Nuernberg K, Nuernberg G, Dannenberger D, Olivera M, Boutinaud M, Sena P, Albrecht E, Bernard L. 2012. Effects of polyunsaturated fatty acids from plant oils and algae on milk fat yield and composition are associated with mammary lipogenic and SREBF1 gene expression. *Animal*. 6:1961-1972.

Guía para el cuidado y uso de animales agrícolas en investigación y docencia. 2010. Federación de Sociedades de Ciencia Animal. https://www.fass.org/images/science-policy/Ag_Guide_3rd_ed.pdf

Arshad U, Santos JEP. 2022. Hepatic triacylglycerol associations with production and health in dairy cows. *J Dairy Sci*. 105:5393-5409.

Bach A. 2024. Back to basics: Precision while mixing total mixed rations and its impact on milking performance. *JDS Commun*. 5:102-106.

Barcarolo D, Angeli E, Etchevers L, Ribas LE, Matiller V, Rey F, Ortega HH, Hein GJ. 2024. Effect of parenteral supplementation of minerals and vitamins on oxidative stress biomarkers and hepatic fatty acid metabolism in dairy cows during the transition period. *Biol Trace Elem Res*. 202:1582-1593.

Bargo F, Busso F, Corbellini CN, Grigera JM, Lucs V, Podetti V, Vissio C, Taddeo H. 2009. Organización y análisis de un sistema de registros de enfermedades del periparto en vacas lecheras: su incidencia e impacto económico sobre las empresas. Informe final. INTA, Argentina.

Barletta RV, Maturana Filho M, Carvalho PD, Del Valle TA, Netto AS, Rennó FP, Mingoti RD, Mourão GB, Fricke PM. 2017. Association of changes among body condition score during the transition period with NEFA and BHBA concentrations, milk production, fertility, and health of Holstein cows. *Theriogenology*. 104:30-36.

Bauman DE, Currie BW. 1980. Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: a review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. *J Dairy Sci*. 63:1514-1539.

Bauman DE, Griinari JM. 2003. Nutritional regulation of milk fat synthesis. *Annu Rev Nutr*. 23:203-227.

Bauman DE, Perfield JW II, De Veth MJ, Lock AL. 2003. New perspectives on lipid digestion and metabolism in ruminants. *Proc Cornell Nutr Conf*. 2003:175-189.

Beaudeau F, Seegers H, Ducrocq V, Fourichon C, Bareille N. 2000. Effect of health disorders on culling in dairy cows: a review and a critical discussion. *Anim Res*. 49:293-311.

Bilby TR, Block J, Do Amaral BC, Sa Filho O, Silvestre FT, Hansen PJ, Staples CR, Thatcher WW. 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.

Bionaz M, Chen S, Khan MJ, Loor JJ. 2013. Functional role of PPARs in ruminants: potential targets for fine-tuning metabolism during growth and lactation. *PPAR Res*. 2013:684159.

Bionaz M, Loor JJ. 2012. Ruminant metabolic systems biology: reconstruction and integration of transcriptome dynamics underlying functional responses of tissues to nutrition and physiological state. *Gene Regul Syst Bio*. 6:109-125.

- Bionaz M, Vargas-Bello-Pérez E, Busato S. 2020.** Advances in fatty acids nutrition in dairy cows: from gut to cells and effects on performance. *J Anim Sci Biotechnol.* 11:110.
- Bordoni L, Petracci I, Zhao F, Min W, Pierella E, Assmann TS, Cognolato S, et al. 2021.** Nutrigenomics of dietary lipids. *Antioxidants.* 10:994-1018.
- Botham KM, Mayes PA. 2013.** Metabolismo de acilgliceroles y esfingolípidos. En: Harper Bioquímica Ilustrada, 29° ed. McGraw-Hill, Madrid. p. 229-236.
- Boufaïed H, Chouinard PY, Tremblay GF, Petit HV, Michaud R, Bélanger G. 2003.** Fatty acids in forages. *Can J Anim Sci.* 83:501-511.
- Bougarne N, Weyers B, Desmet SJ, Deckers J, Ray DW, Staels B, et al. 2018.** Molecular actions of PPAR α in lipid metabolism and inflammation. *Endocr Rev.* 39:760-802.
- Bradford BJ, Harvatine KJ, Allen MS. 2008.** Dietary unsaturated fatty acids increase plasma glucagon-like peptide-1 and cholecystokinin and may decrease premeal ghrelin in lactating dairy cows. *J Dairy Sci.* 91:1443-1450.
- Brenner RR. 2003.** Hormonal modulation of $\Delta 6$ and $\Delta 5$ desaturases: case of diabetes. *Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids.* 68:151-162.
- Britt JH, Cushman RA, Dechow CD, Dobson H, Humblot P, Hutjens MF, et al. 2018.** Invited review: Learning from the future—A vision for dairy farms and cows in 2067. *J Dairy Sci.* 101:3722-3741.
- Brown WE. 2021.** Invited review: Mechanisms of hypophagia during disease. *J Dairy Sci.* 104:9418-9436.
- Bruinje TC, Leblanc SJ. 2025.** Inflammation and health in the transition period influence reproductive function in dairy cows. *J Dairy Sci.* (en prensa).
- Buckley WT, Eigendorf GK, Dorward WJ. 1986.** A liver biopsy instrument for large animals. *Can J Anim Sci.* 66:1137-1140.

Burdge GC, Calder PC. 2005. Conversion of alpha-linolenic acid to longer-chain polyunsaturated fatty acids in human adults. *Reprod Nutr Dev.* 45:581-597.

Burdge GC, Calder PC. 2005. α -Linolenic acid metabolism in adult humans: effects of gender and age on conversion to long-chain polyunsaturated fatty acids. *Eur J Lipid Sci Technol.* 107:426-439.

Caixeta LS, Omontese BO. 2021. Monitoring and improving the metabolic health of dairy cows during the transition period. *Vet Sci Res.* 1-17.

Caldari-Torres C, Rodriguez-Sallaberry C, Greene ES, Badinga L. 2006. Differential effects of n-3 and n-6 fatty acids on prostaglandin F₂ α production by bovine endometrial cells. *J Dairy Sci.* 89:971-977.

Calder PC. 2012. Mechanisms of action of n-3 fatty acids. *J Nutr.* 142:592S-599S.

Carneiro LC, Williams EJ, Saut JPE, Dos Santos RM, Celeghini ECC. 2021. The effect of n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation on immune and reproductive parameters in dairy cows: a review. *Braz J Vet Res Anim Sci.* 58:1-13.

Carriquiry M, Weber WJ, Fahrenkrug SC, Crooker BA. 2009. Hepatic gene expression in multiparous Holstein cows treated with bovine somatotropin and fed n-3 fatty acids in early lactation. *J Dairy Sci.* 92:4889-4900.

Castro T, Martinez D, Isabel B, Cabezas A, Jimeno V. 2019. Vegetable oils rich in polyunsaturated fatty acids supplementation of dairy cows' diets: effects on productive and reproductive performance. *Animals.* 9:205-220.

Cattaneo L, Baudracco J, Lazzarini B, Ortega H. 2015. Methodology to estimate the cost of delayed pregnancy for dairy cows: an example for Argentina. *Rev Bras Zootec.* 44:226-229.

Chaudhari RK, Mahla AS, Singh SK, Pawde AM, Badasara SK, Kumar H, et al. 2020. Effect of dietary n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation on expression of genes involved in progesterone biosynthesis in the corpus luteum of goats. *Reprod Domest Anim.* 55:1263-1266.

Cherkaoui-Malki M, Surapureddi S, El Hajj HI, Vamecq J, Andreoletti P. 2012. Hepatic steatosis and peroxisomal fatty acid β -oxidation. *Curr Drug Metab.* 13:1412-1421.

Childs S, Lynch CO, Hennessy AA, Stanton C, Wathes DC, Sreenan JM, et al. 2008. Effect of dietary enrichment with n-3 or n-6 fatty acids on systemic metabolites, hormones and ovarian function in heifers. *Animal.* 2:883-893.

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

Chiu CC, Su KP, Cheng TC, Liu HC, Chang CJ, Dewey ME, et al. 2008. Effects of omega-3 fatty acids monotherapy in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a randomized placebo-controlled study. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 32:1538-1544.

Choi BR, Palmquist DL. 1996. High fat diets increase plasma cholecystokinin and pancreatic polypeptide and decrease insulin and feed intake in lactating cows. *J Nutr.* 126:2913-2919.

Clarke SD. 2001. Molecular mechanisms for polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 281:G865-G869.

Compton CWR, Heuer C, Thomsen PT, Carpenter TE, Phyn CVC, McDougall S. 2017. A systematic literature review and meta-analysis of mortality and culling in dairy cattle. *J Dairy Sci.* 100:1-16.

Coyne GS, Kenny DA, Childs S, Sreenan JM, Waters SM. 2008. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids alter expression of genes involved in prostaglandin biosynthesis in the bovine uterus. *Theriogenology.* 70:772-782.

Dallago GM, Wade KM, Cue RI, McClure JT, Lacroix R, Pellerin D, et al. 2021. Keeping dairy cows for longer: a review on dairy cow longevity. *J Dairy Sci.* 104:1-25.

Daros RR, Weary DM, von Keyserlingk MAG. 2022. Risk factors for transition-period disease in intensive grazing and housed dairy cattle. *J Dairy Sci.* 105:4734-4748.

Delarue J, LeFoll C, Corporeau C, Lucas D. 2004. n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids: a nutritional tool to prevent insulin resistance associated with type 2 diabetes and obesity? *Reprod Nutr Dev.* 44:289-299.

DePeters EJ, Cant JP. 1992. Nutritional factors influencing the nitrogen composition of bovine milk: a review. *J Dairy Sci.* 75:2043-2070.

Dewhurst RJ, Scollan ND, Lee MRF, Ougham HJ, Humphreys MO. 2003. Forage breeding and management to increase the beneficial fatty acid content of ruminant products. *Proc Nutr Soc.* 62:329-336.

Dillon P, Crosse S, O'Brien B. 1997. Effect of concentrate supplementation of grazing dairy cows in early lactation on milk production and milk processing quality. *Irish J Agric Food Res.* 36:145-159.

Dirandeh E, Towhidi A, Ansari Z, Zeinoaldini S, Ganjkhanlou M. 2016. Effects of dietary supplementation with different polyunsaturated fatty acids on hepatic somatotrophic axis gene expression, blood metabolites, milk yield and milk fatty acids in dairy cows. *Ann Anim Sci.* 16:1045-1058.

Dirandeh E, Towhidi A, Zeinoaldini S, Ganjkhanlou M, Ansari Pirsaraei Z, Fouladi-Nashta A. 2013. Effects of different polyunsaturated fatty acid supplementations postpartum on milk yield, metabolic responses and reproductive performance of dairy cows. *J Anim Sci.* 91:713-721.

Donovan DC, Schingoethe DJ, Baer RJ, Ryali J, Hippen AR, Franklin ST. 2000. Influence of dietary fish oil on conjugated linoleic acid and other fatty acids in milk fat of lactating dairy cows. *J Dairy Sci.* 83:2620-2628.

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

Drackley JK. 1999. Biology of dairy cows during the transition period: the final frontier? *J Dairy Sci.* 82:2259-2273.

Drackley JK, Cicela TM, LaCount DW. 2003. Responses of primiparous and multiparous Holstein cows to additional energy from fat or concentrate during summer. *J Dairy Sci.* 86:1306-1314.

Drackley JK, Dann HM, Douglas N, Guretzky NAJ, Litherland NB, Underwood JP, Garrett JE. 2005. Physiological and pathological adaptations in dairy cows that may increase susceptibility to periparturient diseases and disorders. *Ital J Anim Sci.* 4:323-344.

Dyall SC, Balas L, Bazan NG, Brenna JT, Chiang N, da Costa Souza F, et al. 2022. Polyunsaturated fatty acids and fatty acid-derived lipid mediators: recent advances in biosynthesis, structures, and functions. *Prog Lipid Res.* 86:101165.

Block E, Evans E. 2010. A model to compare effects of supplemental fat sources on performance and dry matter intake in dairy cows: effects of fat inclusion level. *J Dairy Sci.* 93:440-450.

Elis S, Freret S, Desmarchais A, Maillard V, Cognié J, Briant E, Duranthon V, Constant F, Dupont J, Uzbekova S. 2016. Effect of a long-chain n-3 PUFA-enriched diet on production and reproduction variables in Holstein dairy cows. *Anim Reprod Sci.* 164:121-132.

Fabjanowska J, Kowalczyk-Vasilev E, Klebaniuk R, Milewski S, Gümüş H. 2023. N-3 polyunsaturated fatty acids as a nutritional support of the reproductive and immune system of cattle—a review. *Animals.* 13:3589-3590.

Fan R, Kim J, You M, Giraud D, Toney AM, Shin SH, Chung S. 2020. α -Linolenic acid-enriched butter attenuated high fat diet-induced insulin resistance and inflammation through bioconversion of n-3 PUFA and oxylipin formation. *J Nutr Biochem.* 76:108285-108295.

Ferlay A, Doreau M, Martin C, Chilliard Y. 2013. Effects of incremental amounts of extruded linseed on milk fatty acid composition of dairy cows receiving hay or corn silage. *J Dairy Sci.* 96:6577-6595.

Folch J, Lees M, Sloane-Stanley GHS. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem.* 226:497-509.

Fortin M, Julien P, Couture Y, Dubreuil P, Chouinard PY, Latulippe C, Gagnon C, Laforest JP, Proulx JG. 2010. Regulation of glucose and protein metabolism in growing steers by long-chain n-3 fatty acids in muscle membrane phospholipids is dose-dependent. *Animal*. 4:89-101.

Foster DW. 2012. Malonyl-CoA: the regulator of fatty acid synthesis and oxidation. *J Clin Invest*. 122:1958-1959.

Freret S, Oseikria M, Le Bourhis D, Desmarchais A, Briant E, Desnoes O, Humblot P, Uzbekova S. 2019. Effects of an n-3 polyunsaturated fatty acid-enriched diet on embryo production in dairy cows. *Reproduction*. 158:71-83.

Fricke PM, Wiltbank MC, Pursley JR. 2023. The high fertility cycle. *JDS Commun*. 4:127-131.

Fuentes M. 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*. Universidad de Zaragoza. 235 p.

Gadeyne F, De Neve N, Vlaeminck B, Fievez V. 2017. State of the art in rumen lipid protection technologies and emerging interfacial protein cross-linking methods. *Eur J Lipid Sci Technol*. 119:1600345-1600362.

Gagliostro GA. 2004. Nutritional control of conjugated linoleic acid (CLA) content in milk and natural functional foods: production of CLA-enriched milk in dairy cows. *Rev Argent Prod Anim*. 24:137-163.

Gagliostro GA, Chilliard Y. 1992. Utilización de lípidos protegidos en la nutrición de vacas lecheras. II. Efectos sobre la concentración plasmática de metabolitos y hormonas, movilización de lípidos corporales y actividad metabólica del tejido adiposo. *Rev Argent Prod Anim*. 12:17-32.

Gaines WL, Davidson FA. 1923. Relation between percentage fat content and yield of milk: correction of milk yield for fat content. *Bull Univ Illinois Agric Exp Stn*. 245:275-620.

Gallardo WB, Teixeira IAMA. 2023. Associations between dietary fatty acid profile and milk fat production and fatty acid composition in dairy cows: a meta-analysis. *Animals*. 13:2063-2080.

Gilbert RO. 2016. Management of reproductive disease in dairy cows. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*. 32:387-410.

Giller K, Drews B, Berard J, Kienberger H, Schmicke M, Frank J, Rupp H, Bauman D, Kanzler S, Sauerwein H. 2018. Bovine embryo elongation is altered due to maternal fatty acid supplementation. *Biol Reprod*. 99:600-610.

Glasser F, Ferlay A, Doreau M, Schmidely P, Sauvant D, Chilliard Y. 2008. Long-chain fatty acid metabolism in dairy cows: a meta-analysis of milk fatty acid yield in relation to duodenal flows and de novo synthesis. *J Dairy Sci*. 91:2771-2785.

Goering HK, Van Soest PJ. 1970. Forage fiber analyses (apparatus, reagents, procedures, and some applications). *USDA Agric Handbook*. 379:1-20.

Goff JP, Horst RL. 1997. Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders. *J Dairy Sci*. 80:1260-1268.

Gómez-Cortés P, de la Fuente MA, Juárez M. 2018. Ácidos grasos trans y ácido linoleico conjugado en alimentos: origen y propiedades biológicas. *Nutr Hosp*. 35:1-12.

Gonthier C, Mustafa AF, Ouellet DR, Chouinard PY, Berthiaume R, Petit HV. 2005. Feeding micronized and extruded flaxseed to dairy cows: effects on blood parameters and milk fatty acid composition. *J Dairy Sci*. 88:748-756.

González Moreno Y, Iorio J, Olmeda MF, Curletto D, Scandolo D, Maciel MG, Arroquy JI, Rearte DH, Gagliostro GA. 2020. Feeding calcium salts of linseed oil on productive performance and milk fatty acid profile in grazing dairy cows. *Open J Anim Sci*. 10:761-781.

Goyens PLL, Spilker ME, Zock PL, Katan MB, Mensink RP. 2005. Compartmental modeling to quantify α -linolenic acid conversion after longer-term intake of multiple tracer boluses. *J Lipid Res*. 46:1474-1484.

Greco LF, Neto JTN, Pedrico A, Ferrazza RA, Lima FS, Bisinotto RS, Gomes GC, Martinez N, Garcia M, Risco CA, Galvão KN, Santos JEP. 2015. Effects of altering the ratio of dietary n-6 to n-3 fatty acids on performance and inflammatory responses to a lipopolysaccharide challenge in lactating Holstein cows. *J Dairy Sci.* 98:602-617.

Greco LF, Neto JTN, Pedrico A, Lima FS, Bisinotto RS, Martinez N, Ribeiro ES, Staples CR, Thatcher WW, Santos JEP. 2018. Effects of altering the ratio of dietary n-6 to n-3 fatty acids on spontaneous luteolysis in lactating dairy cows. *J Dairy Sci.* 101:10536-10556.

Grum DE, Hansen LR, Drackley JK. 1994. Peroxisomal β -oxidation of fatty acids in bovine and rat liver. *Comp Biochem Physiol B.* 109:281-292.

Grummer RR. 1995. Impact of changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition dairy cow. *J Anim Sci.* 73:2820-2833.

Grygiel-Górniak B. 2014. Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications—a review. *Nutr J.* 13:17-35.

Hadadi M, Alamouti AA, Alizadeh A, Mohammadi-Sangcheshmeh A. 2021. A two-step feeding of calcium salts of fish oil improves reproductive performance in Holstein cows. *Vet Med Sci.* 19:1-10.

Hassan FU, Nadeem A, Li Z, Javed M, Liu Q, Azhar J, Rehman MS, Khan Y, Yu J, Chen L, Yang W. 2021. Role of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in energy homeostasis of dairy animals: exploiting their modulation through nutrigenomic interventions. *Int J Mol Sci.* 22:12463-12480.

Hein GJ, Bernasconi AM, Montanaro MA, Pellon-Maison M, Finarelli G, Chicco A, Lombardo YB, Cruzado M, Relling AE, Mattioli S. 2010. Nuclear receptors and hepatic lipogenic enzyme response to a dyslipidemic sucrose-rich diet and its reversal by fish oil n-3 polyunsaturated fatty acids. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 298:E429-E439.

Horst EA, Kvidera SK, Baumgard LH. 2021. Invited review: the influence of immune activation on transition cow health and performance—a critical evaluation of traditional dogmas. *J Dairy Sci.* 104:8380-8410.

Hurtaud C, Faucon F, Couvreur S, Peyraud JL. 2010. Linear relationship between increasing amounts of extruded linseed in dairy cow diets and milk fatty acid composition and butter properties. *J Dairy Sci.* 93:1429-1440.

Hussein N, Ah-Sing E, Wilkinson P, Leach C, Griffin BA, Millward DJ. 2005. Long-chain conversion of [¹³C]linoleic acid and α -linolenic acid in response to marked changes in dietary intake in men. *J Lipid Res.* 46:269-280.

Ingvartsen KL, Andersen JB. 2000. Integration of metabolism and intake regulation: a review focusing on periparturient animals. *J Dairy Sci.* 83:1573-1597.

Iorio JD, González YM, Olmeda MF, Curletto D, Scandolo DE, Maciel MG, Arroquy JI, Rearte DH, Gagliostro GA. 2024. Feeding calcium salts of linseed oil on metabolic status and reproductive traits in grazing dairy cows. *Open J Anim Sci.* 14:219-233.

Jenkins TC. 1993. Lipid metabolism in the rumen. *J Dairy Sci.* 76:3851-3863.

Jenkins TC, Harvatine KJ. 2014. Lipid feeding and milk fat depression. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 30:623-642.

Jenkins TC, McGuire MA. 2006. Major advances in nutrition: impact on milk composition. *J Dairy Sci.* 89:1302-1310.

Jolazadeh AR, Mohammadabadi T, Dehghan-Banadaky M, Chaji M, Garcia M. 2019. Effect of supplementing calcium salts of n-3 and n-6 fatty acids to pregnant nonlactating cows on colostrum composition, milk yield, and reproductive performance. *Anim Feed Sci Technol.* 247:127-140.

Keady TWJ, Sinclair MC, Fitzpatrick DA. 2000. Effects of supplementation of dairy cattle with fish oil on silage intake, milk yield and milk composition. *J Dairy Res.* 67:137-153.

Kelly P, Shalloo L, Wallace M, Dillon P. 2020. The Irish dairy industry: recent history and strategy, current state and future challenges. *Int J Dairy Technol.* 73:309-323.

Kolver ES, Muller LD. 1998. Performance and nutrient intake of high-producing Holstein cows consuming pasture or a total mixed ration. *J Dairy Sci.* 81:1403-1411.

Kra G, Daddam JR, Moallem U, Kamer H, Kočvarová R, Nemirovski A, Zachut M. 2022. Effects of omega-3 supplementation on endocannabinoid system components and metabolic and inflammatory responses in adipose and liver of peripartum dairy cows. *J Anim Sci Biotechnol.* 9:1-16.

Krum B. 2020. Effects of omega-3 fatty acids and hypoxia on progesterone biosynthesis and mitochondrial morphology in the corpus luteum. *Master's Thesis.* University of Northern Colorado. 120 p.

Lashkari S, Weisbjerg MR, Foldager L, Børsting CF. 2024. Fat supplement for dairy cows during early lactation: potentials, challenges, and risks—a meta-analysis. *J Appl Anim Res.* 52:1-19.

Lean IJ. 2020. Non-infectious disease: ketosis. En: *Elsevier Encyclopedia of Dairy Sciences.* Elsevier, Londres. p. 23038-23045.

Lean IJ, Rabiee AR. 2016. Quantitative metabolic and epidemiological approaches to fertility of the dairy cow. *Proc Dairy Cattle Reprod Counc.* 2016:115-131.

LeBlanc S. 2010. Monitoring metabolic health of dairy cattle in the transition period: associations with reproduction. *J Reprod Dev.* 56:29-35.

Leduc M, Gervais R, Chouinard PY. 2017. Effect of dietary flaxseed and oil on milk yield, gross composition, and fatty acid profile in dairy cows: a meta-analysis and meta-regression. *J Dairy Sci.* 100:8906-8927.

Leroy JLMR, Rizos D, Sturmeijer R, Bossaert P, Gutierrez-Adan A, Van Hoeck V, Valckx S, Bols PEJ. 2012. Intrafollicular conditions as a major link between maternal metabolism and oocyte quality in dairy cows. *Reprod Fertil Dev.* 24:1-12.

Libera K, Warzych E, Jankowiak T, Lechniak D. 2020. Reproductive performance of dairy cows fed a diet supplemented with n-3 polyunsaturated fatty acids. *Acta Agric Scand Anim Sci.* 20:1169-1183.

Lock AL, Bauman DE. 2004. Modifying milk fat composition of dairy cows to enhance fatty acids beneficial to human health. *Lipids.* 39:1197-1206.

Loor JJ, Bionaz M, Drackley JK. 2013. Systems physiology in dairy cattle: nutritional genomics and beyond. *Annu Rev Anim Biosci.* 1:365-392.

Loor JJ, Everts RE, Bionaz M, Dann HM, Morin DE, Oliveira R, Harty HM, Rodriguez-Zas SL, Lewin HA, Drackley JK. 2007. Nutrition-induced ketosis alters metabolic and signaling gene networks in liver of periparturient dairy cows. *Physiol Genomics.* 32:105-116.

Lopreiato V, Mezzetti M, Cattaneo L, Ferronato G, Minuti A, Trevisi E. 2020. Role of nutraceuticals during the transition period of dairy cows: a review. *Anim Nutr.* 6:1-18.

MacLaren LA, Guzeloglu A, Michel F, Thatcher WW. 2006. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) expression in cultured bovine endometrial cells and response to omega-3 fatty acids and growth hormone. *Domest Anim Endocrinol.* 30:155-169.

Macrae AI, Burrough E, Forrest J, Corbishley A, Russell G, Shaw DJ. 2019. Prevalence of excessive negative energy balance in commercial dairy herds in the United Kingdom. *Vet J.* 248:51-57.

Martens H. 2023. Invited review: increasing milk yield and negative energy balance—A Gordian knot for dairy cows? *J Dairy Sci.* 106:1-20.

Martin C, Rouel J, Jouany JP, Doreau M, Chilliard Y. 2008. Methane output and diet digestibility in response to feeding dairy cows crude linseed, extruded linseed, or linseed oil. *J Anim Sci.* 86:2642-2652.

Masia F, Molina G, Vissio C, Balzarini M, de la Sota RL, Piccardi M. 2022. Quantifying the negative impact of clinical diseases on productive and reproductive performance of dairy cows in central Argentina. *Livest Sci.* 259:104894-104903.

Masson L, Alfaro T, Camilo C, Carvalho A, Illesca P, Torres R, Galdámez M, Uribe S. 2015. Fatty acid composition of soybean/sunflower mix oil, fish oil and butterfat using AOCS Ce 1j-07 with modified temperature program. *Grasas Aceites*. 66:1-9.

Matras J, Kowalczyk-Vasilev E, Klebaniuk R, Grela ER. 2014. Influence of two flaxseed varieties differing in fatty acid profile on blood indices and reproduction in dairy cows. *Med Weter*. 70:422-427.

Mattos R, Staples CR, Arteche A, Wiltbank MC, Diaz FJ, Jenkins TC, Thatcher WW. 2004. The effects of feeding fish oil on uterine secretion of PGF₂ α , milk composition, and metabolic status in periparturient Holstein cows. *J Dairy Sci*. 87:921-932.

Mattos R, Staples CR, Thatcher WW. 2000. Effects of dietary fatty acids on reproduction in ruminants. *Rev Reprod*. 5:38-45.

McArt JAA, Nydam DV, Oetzel GR, Overton TR, Ospina PA. 2013. Elevated non-esterified fatty acids and β -hydroxybutyrate and their association with transition cow performance. *Vet J*. 198:560-570.

McDonald P, Edwards RA, Greenhalgh JFD, Morgan CA, Sinclair LA, Wilkinson RG. 2002. *Animal Nutrition*. 7th ed. Prentice Hall, Harlow. 693 p.

McEvoy M, Kennedy E, Murphy JP, Boland TM, Delaby L, O'Donovan M. 2008. The effect of herbage allowance and concentrate supplementation on milk production and dry matter intake of spring-calving dairy cows in early lactation. *J Dairy Sci*. 91:1258-1269.

Meikle A, Cavestany D, Carriquiry M, Adrien ML, Picasso V, Isabel P, Chilbroste P, Mattiauda DA. 2013. Advances in knowledge of the dairy cow during the transition period in Uruguay: a multidisciplinary approach. *Agrociencia Uruguay*. 17:141-152.

Middleton EL, Minela T, Pursley JR. 2019. The high-fertility cycle: how timely pregnancies in one lactation may reduce body condition loss and health issues in the next. *J Dairy Sci*. 102:5577-5587.

Moallem U. 2018. Invited review: roles of dietary n-3 fatty acids in performance, milk fat composition, and reproductive and immune systems in dairy cattle. *J Dairy Sci.* 101:8641-8661.

Moallem U, Altmark G, Lehrer H, Arieli A. 2010. Performance of high-yielding dairy cows supplemented with fat or concentrate under hot and humid climates. *J Dairy Sci.* 93:3192-3202.

Moallem U, Shafran A, Zachut M, Dekel I, Portnick Y, Arieli A. 2013. Dietary α -linolenic acid from flaxseed oil improved folliculogenesis and IVF performance in dairy cows, similar to EPA and DHA from fish oil. *Reproduction.* 146:603-614.

Moscovici Joubran A, Pierce KM, Garvey N, Shalloo L, O'Callaghan TF. 2021. Invited review: a 2020 perspective on pasture-based dairy systems and products. *J Dairy Sci.* 104:7364-7382.

Mozaffarian D, Wu JHY. 2011. Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol.* 58:2047-2067.

NASEM. 2021. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle.* 8th ed. National Academies Press, Washington, DC. 502 p.

Nassu RT, Dugan MER, He ML, McAllister TA, Aalhus JL, Aldai N, Kramer JKG. 2011. Effects of feeding flaxseed to beef cows on fatty acids of longissimus thoracis and backfat. *Meat Sci.* 89:469-477.

Neveu C, Baurhoo B, Mustafa A. 2013. Effect of feeding extruded flaxseed with different forage:concentrate ratios on dairy cow performance. *J Dairy Sci.* 96:3886-3894.

Nikkhah A, Alimirzaei M. 2023. Management updates on prepartal stress effects on transition cow and calf health. *World Vet J.* 13:250-257.

NRC. 2001. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle.* 7th ed. National Research Council, Washington, DC. 381 p.

Onetti SG, Grummer RR. 2004. Response of lactating cows to three supplemental fat sources as affected by forage in the diet and stage of lactation: a meta-analysis. *Anim Feed Sci Technol.* 115:65-82.

Oseikria M, Elis S, Maillard V, Corbin E, Uzbekova S. 2016. N-3 polyunsaturated fatty acid DHA during IVM affects oocyte competence in cattle. *Theriogenology.* 85:1625-1634.

Ospina PA, McArt JAA, Overton TR, Stokol T, Nydam DV. 2013. Using NEFA and β -hydroxybutyrate concentrations during the transition period for herd-level monitoring of disease risk and reproductive and milking performance. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 29:387-412.

Overton TR, Waldron MR. 2004. Nutritional management of transition dairy cows: strategies to optimize metabolic health. *J Dairy Sci.* 87:E105-E119.

Paez Hurtado SA. 2023. Diet supplementation with omega-3 affects reproductive traits and milk yield of lactating dairy cows. *Tesis de Maestría.* Universidad Nacional de Colombia. 120 p.

Palin MF, Petit HV. 2004. Effects of polyunsaturated fatty acids on hepatic PPAR α mRNA levels in transition cows. *J Anim Physiol Anim Nutr.* 88:445-448.

Palmquist DL. 2009. Omega-3 fatty acids in metabolism, health, and nutrition and for modified animal product foods. *Prof Anim Sci.* 25:207-249.

Palmquist DL, Jenkins TC. 2017. A 100-year review: fat feeding of dairy cows. *J Dairy Sci.* 100:10061-10077.

Palmquist DL, Jenkins TC. 2003. Challenges with fats and fatty acid methods. *J Anim Sci.* 81:3250-3254.

Palmquist DL, Jenkins TC. 1980. Fat in lactation rations: review. *J Dairy Sci.* 63:1-14.

Palmquist DL, Mattos WRS. 2006. Metabolismo de lípidos. En: *Nutrición de rumiantes.* Ed. Rocca, Buenos Aires. p. 1-30.

Pascottini OB, LeBlanc SJ. 2020. Modulation of immune function in the bovine uterus peripartum. *Theriogenology*. 150:193-200.

Pascottini OB, Leroy JLMR, Opsomer G. 2022. Maladaptation to the transition period and consequences on fertility of dairy cows. *Reprod Domest Anim*. 57:21-32.

Pereira G, Simões P, Bexiga R, Silva E, Mateus L, Fernandes T, Carvalho SM, Payan-Carreira R. 2022. Effects of feeding rumen-protected linseed fat to postpartum dairy cows on plasma n-3 PUFA, metabolic parameters, and reproduction. *J Dairy Sci*. 105:361-374.

Pérez-Báez J, Risco CA, Chebel RC, Gomes GC, Greco LF, Tao S, Santos JEP, Bicalho RC. 2021. Investigating the use of dry matter intake and energy balance prepartum as predictors of digestive disorders postpartum. *Front Vet Sci*. 8:1-17.

Petit HV, Dewhurst RJ, Scollan ND, Proulx JG, Khalid M, Haresign W, Twagiramungu H, Mann GE. 2002a. Milk production, milk composition, ovarian function and prostaglandin secretion of dairy cows fed omega-3 fats. *J Dairy Sci*. 85(4):889-899.

Petit HV, Germiquet C, 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 HV, Gagnon N, Mir PS, Cao R, Cui S. 2009. Milk enterolactone concentration, milk production, milk fatty acid profile and digestibility in dairy cows fed whole flaxseed or flaxseed meal. *J Dairy Res*. 76:257-264.

Petit HV. 2002b. Digestion, milk production, milk composition and blood composition of dairy cows fed formaldehyde-treated flaxseed or sunflower seed. *J Dairy Sci*. 85(6):1482-1490.

Piperova LS, Moallem U, Teter BB, Sampugna J, Yurawecz MP, Morehouse KM, Erdman RA. 2004. Changes in milk fat in response to dietary supplementation with calcium salts of trans-18:1 or conjugated linoleic acids in lactating dairy cows. *J Dairy Sci*. 87:3836-3844.

Pires JAA, Grummer RR. 2008. Specific fatty acids as metabolic modulators in the dairy cow. *Rev Bras Zootec.* 37:287-298.

Plata-Pérez G, Angeles-Hernández JC, Morales-Almaráz E, Del Razo-Rodríguez OE, López-González F, Peláez-Acero A, Hernández-Mendo O, Sánchez-López E. 2022. Oilseed supplementation improves milk composition and fatty acid profile of cow milk: a meta-analysis and meta-regression. *Animals.* 12:1-16.

Plewes MR, Burns PD, Graham PE, Bruemmer JE, Engle TE. 2018. Influence of omega-3 polyunsaturated fatty acids from fish oil or meal on the structure of lipid microdomains in bovine luteal cells. *Anim Reprod Sci.* 193:40-57.

Qiao K, Jiang R, Contreras GA, Xie L, Pascottini OB, Opsomer G, Leblanc SJ, Baumgard LH, Drackley JK, Loor JJ. 2024. The complex interplay of insulin resistance and metabolic inflammation in transition dairy cows. *Animals.* 14:1-17.

R Core Team. 2022. *R: A language and environment for statistical computing.* R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 1-409.

Rabiee AR, Breinhild K, Scott W, Golder HM, Block E, Lean IJ. 2012. Effect of fat additions to diets of dairy cattle on milk production and components: a meta-analysis and meta-regression. *J Dairy Sci.* 95:3225-3247.

Raes K, De Smet S, Demeyer D. 2004. Effect of dietary fatty acids on incorporation of long-chain polyunsaturated fatty acids and conjugated linoleic acid in lamb, beef and pork meat: a review. *Anim Feed Sci Technol.* 113:199-221.

Relling AE, Reynolds CK. 2007. Feeding rumen-inert fats differing in degree of saturation decreases feed intake and increases plasma gut peptides in lactating dairy cows. *J Dairy Sci.* 90:1506-1514.

Ribeiro ES, Carvalho MR. 2017. Impact and mechanisms of inflammatory diseases on embryonic development and fertility in cattle. *Anim Reprod.* 14:589-600.

Ribeiro ES, Gomes G, Greco LF, Cerri RLA, Vieira-Neto A, Monteiro PLJ, Lima FS, Bisinotto RS, Thatcher WW, Santos JEP. 2016. Carryover effects of postpartum

inflammatory diseases on developmental biology and fertility in lactating dairy cows. *J Dairy Sci.* 99:2201-2220.

Rico JE, Barrientos-Blanco MA. 2024. Invited review: ketone biology—The shifting paradigm of ketones and ketosis in the dairy cow. *J Dairy Sci.* 107:3367-3388.

Roche JR, Kay JK, Friggens NC, Loor JJ, Berry DP. 2013. Assessing and managing body condition score for the prevention of metabolic disease in dairy cows. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 29:323-336.

Ruxton CHS, Reed SC, Simpson MJA, Millington KJ. 2004. The health benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids: a review of the evidence. *J Hum Nutr Diet.* 17:449-459.

Saini RK, Keum YS. 2018. Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: dietary sources, metabolism and significance—a review. *Life Sci.* 203:255-267.

Sammad A, Khan MZ, Abbas Z, Hu L, Ullah Q, Wang Y, Huang X, Wang Y. 2022. Major nutritional metabolic alterations influencing the reproductive system of postpartum dairy cows. *Vet Med Sci.* 8:1-15.

Santos JEP, Bilby TR, Thatcher WW, Staples CR, Silvestre FT. 2008. Long-chain fatty acids of diet as factors influencing reproduction in cattle. *Reprod Domest Anim.* 43:23-30.

dos Santos Neto JM, Silva JO, Meschiatti MAP, de Souza J, Negrão JA, Lock AL, Santos JEP. 2022. Increasing levels of calcium salts of palm fatty acids affect production responses during the immediate postpartum and carryover periods in dairy cows. *J Dairy Sci.* 105:9652-9665.

Shalloo L, O'Donovan M, Leso L, Werner J, Ruelle E, Geoghegan A, Delaby L. 2018. Review: grass-based dairy systems, data and precision technologies. *Animal.* 12:S262-S271.

Sharma A, Baddela VS, Roettgen V, Vernunft A, Viergutz T, Dannenberger D, Vanselow J. 2020. Effects of dietary fatty acids on bovine oocyte competence and granulosa cells. *Front Endocrinol.* 11:87-100.

She P, Hippen AR, Young JW, Lindberg GL, Beitz DC, Richardson LF, Santos JEP. 1999. Metabolic responses of lactating dairy cows to 14-day intravenous infusions of glucagon. *J Dairy Sci.* 82:1118-1127.

Sheldon IM, Noakes DE, Rycroft AN, Pfeiffer DU, Dobson H. 2002. Influence of uterine bacterial contamination after parturition on ovarian follicle selection and growth in cattle. *Reproduction.* 123:837-845.

Shingfield KJ, Bonnet M, Scollan ND. 2013. Recent developments in altering the fatty acid composition of ruminant-derived foods. *Animal.* 7:132-162.

Silvestre FT, Carvalho TSM, Francisco N, Santos JEP, Staples CR, Jenkins TC, Thatcher WW. 2011. Effects of differential supplementation of fatty acids during the peripartum and breeding periods of Holstein cows: I. Uterine and metabolic responses, reproduction and lactation. *J Dairy Sci.* 94:189-204.

Sinedino LDP, Honda PM, Souza LRL, Lock AL, Boland MP, Staples CR, Thatcher WW. 2017. Effects of supplementation with docosahexaenoic acid on reproduction of dairy cows. *Reproduction.* 153:707-723.

Smith KL, Butler WR, Overton TR. 2009. Effects of prepartum 2,4-thiazolidinedione on metabolism and performance in transition dairy cows. *J Dairy Sci.* 92:3623-3633.

Soares RAN, Vargas G, Muniz MMM, Soares MAM, Cánovas A, Schenkel F, Fonseca PAS, Siqueira LG, Bragança GM. 2021. Differential gene expression in dairy cows under negative energy balance and ketosis: a systematic review and meta-analysis. *J Dairy Sci.* 104:602-615.

Sordillo LM. 2018. Symposium review: oxylipids and the regulation of bovine mammary inflammatory responses. *J Dairy Sci.* 101:5629-5641.

Sordillo LM, Raphael W. 2013. Significance of metabolic stress, lipid mobilization and inflammation on transition cow disorders. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 29:267-278.

- de Souza J, Lock AL. 2018.** Short communication: comparison of a palmitic acid-enriched triglyceride supplement and calcium salts of palm fatty acids on dairy cow performance. *J Dairy Sci.* 101:3110-3117.
- Soydan E, Şen U, Şirin E. 2017.** Relationship between dietary fatty acids and reproductive functions in dairy cattle. *Turk J Agric Sci Technol.* 5:1575-1579.
- Staples CR, Burke JM, Thatcher WW. 1998.** Influence of supplemental fats on reproductive tissues and performance of lactating cows. *J Dairy Sci.* 81:856-871.
- Stienstra R, Mandard S, Patsouris D, Maass C, Kersten S, Müller M. 2007.** Peroxisome proliferator-activated receptor α protects against obesity-induced hepatic inflammation. *Endocrinology.* 148:2753-2763.
- Szenci O. 2021.** Recent possibilities for the diagnosis of early pregnancy and embryonic mortality in dairy cows. *Animals.* 11:1666-1679.
- Thangavelu G, Colazo MG, Ambrose DJ, Oba M. 2007.** Diets enriched in unsaturated fatty acids enhance early embryonic development in lactating Holstein cows. *Theriogenology.* 68:949-957.
- Thatcher WW, Bilby TR, Bartolome JA, Silvestre F, Staples CR, Santos JEP. 2006.** Strategies for improving fertility in the modern dairy cow. *Theriogenology.* 65:30-44.
- Tilley JMA, Terry RA. 1963.** A two-stage technique for in vitro digestion of forage crops. *Grass Forage Sci.* 18:104-111.
- Tosi F, Sartori F, Guarini P, Olivieri O, Martinelli N. 2014.** Delta-5 and Delta-6 desaturases: crucial enzymes in polyunsaturated fatty acid-related pathways with pleiotropic influences in health and disease. En: *Polyunsaturated Fatty Acid Metabolism.* Springer, Cham. p. 61-81.
- Tyagi S, Gupta P, Saini A, Kaushal C, Sharma S. 2011.** The peroxisome proliferator-activated receptor: a family of nuclear receptors with roles in various diseases. *J Adv Pharm Technol Res.* 2:236-240.

Tyrrell HF, Reid JT. 1965. Prediction of the energy value of cow's milk. *J Dairy Sci.* 48:1215-1223.

Ulbricht TLV, Southgate DAT. 1991. Coronary heart disease: seven dietary factors. *Lancet.* 338:985-992.

Ulfina GG. 2023. Changes in hormonal profile, uterine involution and postpartum reproductive performance of crossbred dairy cows supplemented with omega-3 rich feed during the transition period. *East Afr J Vet Anim Sci.* 7:97-104.

Ulfina GG, Kimothi SP, Oberoi PS, Baithalu RK, Kumaresan A, Mohanty TK, Singh G, Manik RS. 2015. Modulation of postpartum reproductive performance in dairy cows through supplementation of long- or short-chain fatty acids during the transition period. *J Anim Physiol Anim Nutr.* 99:1056-1064.

USDA. 2025. *National Agricultural Statistics Service.* United States Department of Agriculture. Washington, DC. <https://www.nass.usda.gov/>

Varga T, Czimmerer Z, Nagy L. 2011. PPARs are a unique set of fatty-acid regulated transcription factors controlling both lipid metabolism and inflammation. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 1812:1007-1022.

Verma AK, Mahla AS, Chaudhari RK, Singh AK, Khatti A, Singh SK, Kumar H, Krishnaswamy N, Jerome A, Kumaresan A. 2018. Effect of different levels of n-3 polyunsaturated fatty acids-rich fish oil supplementation on ovarian and endometrial functions in the goat (*Capra hircus*). *Anim Reprod Sci.* 195:153-161.

Veshkini A, Ceciliani F, Bonnet M, Hammon HM. 2023. Effect of essential fatty acids and conjugated linoleic acid on the adaptive physiology of dairy cows during the transition period. *Animal.* 17:100757-100770.

Vogel L. 2021. Effects of essential fatty acids and conjugated linoleic acid on performance and energy metabolism in dairy cows from late gestation to early lactation. *PhD Dissertation.* University of Veterinary Medicine, Hannover, Germany. 150 p.

Wang M, Wang K, Liao X, Hu H, Chen L, Meng L, Liu X, Yan X, Jiang H. 2021. Carnitine palmitoyltransferase system: a target for anti-inflammatory and anticancer therapy? *Front Pharmacol.* 12:760581-760600.

Warner D, Dallago GM, Dovoedo OW, Lacroix R, Delgado HA, Cue RI, Pellerin D, Charbonneau É. 2022. Keeping profitable cows in the herd: a lifetime cost-benefit assessment to support culling decisions. *Animal.* 16:100628-100640.

Wathes DC, Abayasekara DRE, Aitken RJ. 2007. Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction. *Biol Reprod.* 77:190–201.

Weld KA, Armentano LE. 2017. Effects of adding fat to diets of lactating dairy cows on total-tract neutral detergent fiber digestibility: a meta-analysis. *J Dairy Sci.* 100:1766-1779.

White H. 2015. The role of TCA cycle anaplerosis in ketosis and fatty liver in periparturient dairy cows. *Animals.* 5:793-802.

White NR, Burns PD, Cheatham RD, Romero RM, Nozykowski JP, Bruemmer JE, Engle TE. 2012. Fish meal supplementation increases bovine plasma and luteal tissue omega-3 fatty acid composition. *J Anim Sci.* 90:771-778.

Wildman EE, Jones GM, Wagner PE, Boman RL, Troutt HF, Lesch TN. 1982. A dairy cow body condition scoring system and its relationship to selected production characteristics. *J Dairy Sci.* 65:495-501.

Wiltbank MC, Monteiro PLJ, Domingues RR, Andrade JPN, Mezera MA. 2023. Review: maintenance of the ruminant corpus luteum during pregnancy: interferon-tau and beyond. *Animal.* 17:100827-100846.

Wonnacott KE, Kwong WY, Hughes J, Salter AM, Lea RG, Garnsworthy PC, Sinclair KD. 2010. Dietary omega-3 and -6 polyunsaturated fatty acids affect granulosa cell, oocyte and embryo composition and development in sheep. *Reproduction.* 139:57-69.

Wu Z, Huber JT. 1994. Relationship between dietary fat supplementation and milk protein concentration in lactating cows: a review. *Livest Prod Sci.* 39:141-155.

Xu P, Wang H, Kayoumu A, Wang M, Huang W, Liu G. 2015. A diet rich in docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids ameliorates hepatic steatosis and insulin resistance in seipin-deficient lipodystrophic mice. *Nutr Metab.* 12:1-10.

Yang MY, Fortune JE. 2015. Changes in the transcriptome of bovine ovarian cortex during follicle activation in vitro. *Physiol Genomics.* 47:600-611.

Yen CLE, Stone SJ, Koliwad S, Harris C, Farese RV. 2008. DGAT enzymes and triacylglycerol biosynthesis. *J Lipid Res.* 49:2283-2301.

Zachut M, Arieli A, Lehrer H, Livshitz L, Yakoby S, Moallem U. 2010. Effects of increased supplementation of n-3 fatty acids to transition dairy cows on performance and fatty acid profiles in plasma, adipose and milk fat. *J Dairy Sci.* 93:5877-5889.

Zachut M, Dekel I, Lehrer H, Arieli A, Arav A, Livshitz L, Moallem U. 2010. Effects of dietary fats differing in n-6:n-3 ratio on ovarian fatty acid composition, follicular status and oocyte quality in high-yielding dairy cows. *J Dairy Sci.* 93:529-545.

Zachut M, Tam J, Contreras GA. 2022. Modulating immunometabolism in transition dairy cows: the role of inflammatory lipid mediators. *Anim Front.* 12:37-45.

Zeng J, Deng S, Wang Y, Li P, Tang L, Pang Y. 2017. Specific inhibition of acyl-CoA oxidase-1 improves hepatic lipid and reactive oxygen species metabolism in rats fed a high-fat diet. *J Biol Chem.* 292:3800-3815.

Zeng X, Li S, Liu L, Cai S, Ye Q, Xue B, Lin X, Liu J. 2023. Role of functional fatty acids in modulation of reproductive potential in livestock. *J Anim Sci Biotechnol.* 14:1-19.

Zhang N, Wang L, Luo G, Tang X, Ma L, Zheng Y, Li Y, Guo G, Liu G. 2019. Arachidonic acid regulation of intracellular signaling pathways and gene expression in bovine ovarian granulosa cells. *Animals.* 9:374-387.

Zúñiga J, Cancino M, Medina F, Varela P, Vargas R, Tapia G, Videla LA, Fernández V. 2011. N-3 PUFA supplementation triggers PPAR- α activation and PPAR- α /NF- κ B interaction: anti-inflammatory implications in liver ischemia-reperfusion injury. *PLoS One.* 6:e28502-28512.

6. ANEXO 1

Evaluación de suplemento graso inerte en rumen

Informe

Gustavo Jaurena
20 agosto 2022

INTRODUCCIÓN

La inclusión de grasa en las raciones de vacas lecheras presenta considerables ventajas derivadas de su alta densidad energética, por lo que son ideales para suplir el déficit energético de principios de la lactancia, aumentar la eficiencia de utilización de la energía y mejorar el cociente lipogénico: glucogénico. Sin embargo estos beneficios pueden verse contrarrestados por los efectos depresores de los lípidos sobre la fermentación ruminal (Ferguson et al., 1990) con consecuencias sobre la digestión de la fracción fibrosa.

OBJETIVOS

Evaluar el impacto del agregado de un suplemento graso (**SG**) sobre la digestión de la fracción fibrosa en un sistema de digestión *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Durante el estudio se empleó una muestra de **SG** suministrada por el fabricante y se utilizaron como sustratos heno (muestra patrón N° 52/18) y silaje de planta entera de maíz (muestra PROMEFA N° M 052).

Evaluación del impacto del agregado del suplemento graso sobre la digestión de la materia seca y de la fibra

Con el propósito de evaluar el impacto del SG sobre la digestión ruminal se realizó una evaluación *in vitro* de acuerdo con un arreglo factorial de fuente de forraje (heno o silaje) y suplemento (con o sin SG; Tabla 1). Los forrajes y el SG fueron pesados por separado y agregados en forma independiente a los vasos de fermentación.

Tabla 1. Arreglo experimental de factores

| Fuente de forraje | Suplemento graso (SG) | |
|-------------------|-----------------------|------------------|
| | Sin | Con ¹ |
| Heno | X | X |
| Silaje | X | X |
| Sin Sustrato | No | X |

¹ El suplemento fue agregado a razón de 3% (g SG / 100 g materia tal cual).

Análisis fisicoquímicos

Los ingredientes (heno y silaje) se caracterizaron por el contenido de materia seca (**MS**) y Cenizas (AOAC, 1984), proteína bruta (**PB**, N total x 6,25; método Kjeldahl AOAC, 1984) en un equipo Pro-Nitro® (J. P. Selecta, Barcelona, España) y el extracto etéreo (**EE**) por Soxhlet

(AOAC, 1990). Las fracciones de fibra insoluble en detergente neutro (**aFDN_{mo}**, con alfa-amilasa y libre de cenizas) se determinaron de acuerdo con Van Soest *et al.* (1991) con un equipo ANKOM® (modelo 220) y ácido (**FDAmo**, libre de cenizas).

El contenido de cenizas del SG se caracterizó según AOAC (2015).

Digestibilidad *in vitro*

Preparación de animales como donantes de licor ruminal

Los animales donantes fueron acostumbrados a una dieta estándar de heno y grano (60/70: 40/30) durante aprox. una semana previa a la colección del licor ruminal.

Incubación *in vitro*

La incubación *in vitro* se realizó en frascos de ca. 120 ml incubándolos en un baño termostático a 39°C durante 48 y 72 horas (manteniendo la relación sustrato/inóculo de la técnica original de Theodorou). La técnica aplicada permitió determinar simultáneamente la digestibilidad verdadera *in vitro* (**ivDVMS**; Goering y Van Soest, 1970), y la producción de gas (**PG**).

La ivDVMS y de la FDN (**DFDN**) de los sustratos se determinó a las 48 horas de incubación a partir de la recuperación de los residuos no digeridos en bolsas filtrantes ANKOM F57. Para la determinación de la cinética de digestión se registró la presión en cada unidad a las 3, 6, 9, 12, 24, 30, 36, 48 y 72 h de incubación empleando un transductor de presión tipo 443 A (Bailey y Mackey Ltd., Birmingham, Gran Bretaña) conectado a un panel digital (Data Track, Christchurch, Gran Bretaña).

Los registros de presión y volumen registrados sobre el 30% de las botellas incubadas se emplearon para ajustar una curva de calibración para la PG en función de la presión. A partir de los resultados de PG estimados para cada horario, se calculó la PG acumulada bruta (**PGAB**) y posteriormente se corrigió por la PGAB de los blancos y por la masa incubada para calcular la PG acumulada neta (**PGAN**, ml g⁻¹ MS). A partir de los valores de PGAN se calcularon las tasas horarias de producción de gas (**THPG**, ml g⁻¹ MS h). En simultáneo con las muestras se corrieron muestras patrón para monitorear el desarrollo de la fermentación, y se verificó el pH (potenciómetro Corning Ltd, Halstead, Essex, UK) final en la solución del licor ruminal.

Análisis estadísticos

Los resultados fueron analizados de acuerdo con un diseño en bloques completos aleatorizados (3 bloques por mezcla de licores ruminales). Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas cuando $P \leq 0.05$.

RESULTADOS

La composición de los ingredientes utilizados en el ensayo se presenta en la Tabla 2.

Tabla 2. Composición química de los ingredientes expresados en g kg⁻¹ materia seca (salvo Materia seca que se expresó en g kg⁻¹ materia húmeda, MH)

| Número de muestra → | 22-167 | 22-169 | 22-168 |
|-------------------------------------|--|--------------|-------------------------------|
| Determinaciones* | Silaje de Planta entera de maíz (M052) | Heno (52-18) | Sales cálcicas (INTA Rafaela) |
| Materia seca, g kg ⁻¹ MH | 898 | 917 | 1006 |
| Cenizas | 68.3 [†] | 94.7 | 247 |
| Proteína bruta | 66,1 | 54,5 | --- |
| Extrácto etéreo | 18,4 | 8,6 | 702 [‡] |
| aFDNmo | 546 | 742 | --- |
| FDAmo | 301 | 434 | --- |
| Lignina en detergente ácido | 31 [†] | 111 | --- |

* aFDNmo, fibra insoluble en detergente neutro libre de cenizas y con alfa amilasa; FDAmo, fibra insoluble en detergente ácido libre de cenizas.

[†] Determinado en PROMEFA

[‡] Basado en el resultado LF/22/0159

La ivDVMS para el SG arrojó un valor medio de 917 g kg⁻¹ MS (S= 19; Coef. Var= 2%) y su agregado sobre los forrajes testeados no produjo efectos directos o interacciones detectables (Tabla 3). Los forrajes utilizados como sustrato difirieron en la ivDVMS y en la DFDN, pero no se detectaron diferencias en la fibra detergente neutro digestible (FDNd, g FDN g⁻¹ MS).

Las diferencias entre los patrones de PGAN entre heno y silaje se presentan en la Figura 2, donde no se apreció efectos del agregado del SG. El análisis de los parámetros de la cinética de la PGAN no encontró diferencias en los parámetros “a” y B asociadas con los sustratos o con el agregado de SG; pero mostró que la tasa de producción de gas media del Silaje fue superior a la del Heno (respectivamente 0,05 y 0,02 h⁻¹).

El silaje de planta entera de maíz mostró un pulso de PGAN durante las primeras 12 h de incubación significativamente mayor que la del heno como probable respuesta a la mayor disponibilidad de sustancias rápidamente fermentables (Figura 2).

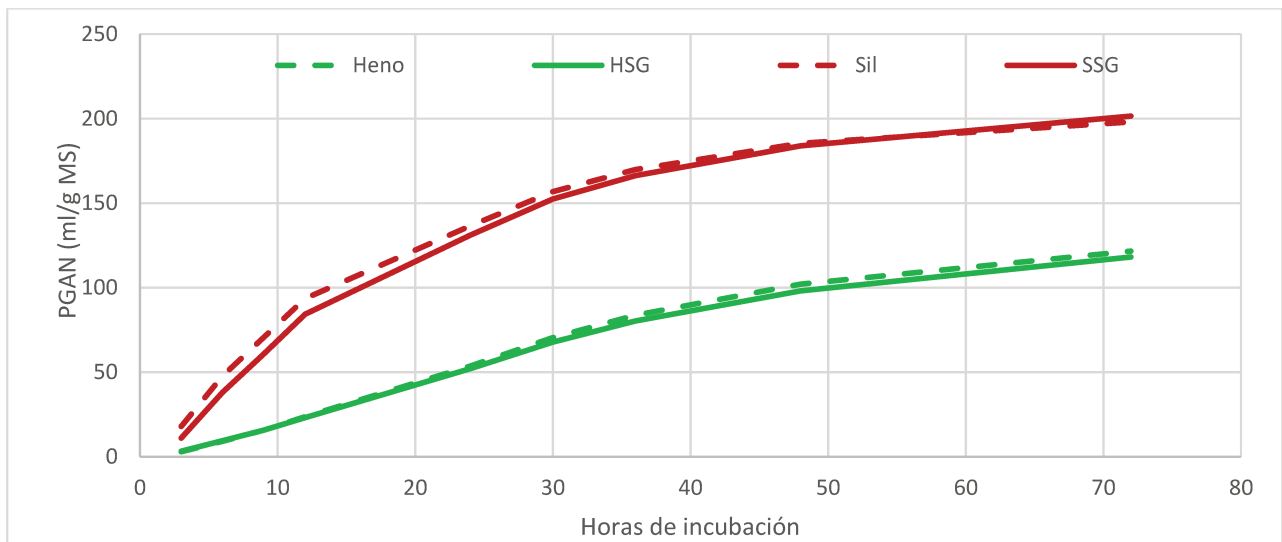
Tabla 3. Valores medios estimados para digestibilidad verdadera *in vitro* de la materia seca (ivDVMS), la FDN digestible (FDNd) y la digestibilidad de la FDN (DFDN).

| Variable | Heno ¹ | | Silaje | | EE ² | Bq | p-valores ³ | | |
|---|-------------------|--------|--------|--------|-----------------|-------|------------------------|------|------|
| | Sin SG | Con SG | Sin SG | Con CG | | | F | SG | FxSG |
| ivDVMS, g kg ⁻¹ MS | 529 | 537 | 722 | 728 | 3,74 | 0,026 | <0,0001 | 0,10 | 0,76 |
| FDNd, g kg ⁻¹ MS | 271 | 279 | 268 | 274 | 3,74 | 0,026 | 0,34 | 0,10 | 0,76 |
| DFDN, g kg ⁻¹ FDN | 365 | 376 | 491 | 502 | 5,16 | 0,020 | <0,0001 | 0,09 | 0,97 |
| Parámetros del modelo PGAN = a + B × (1 - e^{-ct}) | | | | | | | | | |
| a, ml g ⁻¹ | -12 | -9 | -10 | -17 | 1.7 | 0.08 | 0.16 | 0.28 | 0.06 |
| B, ml g ⁻¹ | 180 | 201 | 212 | 228 | 17.9 | 0.82 | 0.19 | 0.38 | 0.89 |
| c, h ⁻¹ | 0.02 | 0.02 | 0.05 | 0.05 | 0.004 | 0.19 | 0.0007 | 0.47 | 0.83 |

¹ Sin SG, sin suplemento graso; Con SG, con suplemento graso

² Error estándar

³ Bq, bloque; F, Tipo de forraje (Heno vs. Silaje); SG, Suplemento Graso (sin o con SG).



| Tratamiento | Horas de incubación | | | | | | | | |
|---------------------------------|---------------------|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 3 | 6 | 9 | 12 | 24 | 30 | 36 | 48 | 72 |
| Heno | 3 | 9 | 16 | 24 | 54 | 71 | 84 | 102 | 122 |
| Heno + Suplemento graso | 3 | 10 | 16 | 23 | 52 | 68 | 80 | 98 | 118 |
| Silaje (Sil) | 18 | 48 | 71 | 94 | 136 | 157 | 170 | 185 | 198 |
| Silaje + Suplemento graso (SSG) | 11 | 38 | 61 | 84 | 131 | 152 | 166 | 184 | 201 |

Figura 1. Producción de gas acumulada neta (PGAN, ml g⁻¹ materia seca) de heno solo (Heno) o con suplemento graso (HSG), y de silaje de maíz sólo (Sil) o con suplemento graso (SSG).

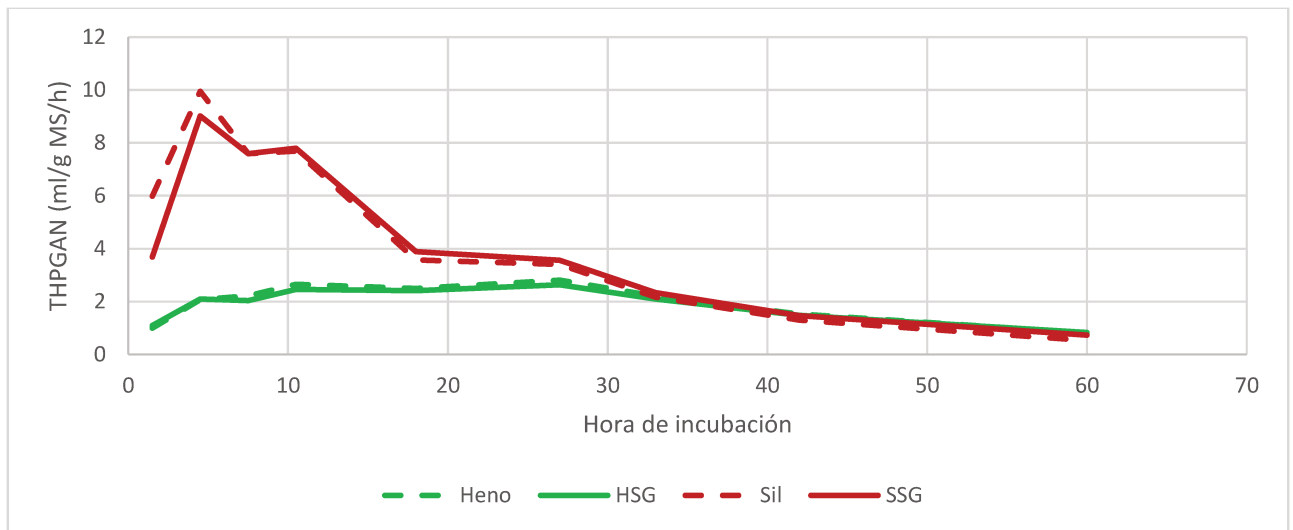


Figura 2. Tasa horaria de producción de gas acumulada neta (THPGAN)

CONCLUSIONES

Se puede concluir que el agregado del SG a razón de un 3 g SG (tal cual) 100 g⁻¹ sustrato (base seca) no produjo modificaciones sobre la digestión de la MS o de la FDN de las muestras de heno y silaje.

LISTA BIBLIOGRÁFICA

- AOAC, 2015. Determinación de ceniza en jabones calcicos - AOAC Cd-18-90.
- AOAC, 1990. Determination of ashes in feedstuffs, in: Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA.
- AOAC, 1984. Association of Oficial Analytical Chemists. Official Methods of Analysis (14th Ed.), in: AOAC (Ed.), . Washington, DC.
- Ferguson, J.D., Sklan, D., Chalupa, W.. V, Kronfeld, D.S., 1990. Effects of Hard Fats on In Vitro and In Vivo Rumen Fermentation Milk Production, and Reproduction in Dairy Cows. J. Dairy Sci. 73, 2864–2879. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(90\)78974-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(90)78974-6)
- van Soest, P.J.J., Robertson, J.B.B., Lewis, B. a. A., 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. J. Dairy Sci. 74, 3583–3597. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78551-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2)