

“Estudio sobre la fisiología aplicada del bienestar animal del ganado ovino alimentado a base de nuevos cereales (Tritordeum y DDRR) frente a cereales tradicionales”

“Applied animal welfare physiology study of sheep fed new cereals (Tritordeum and DDRR) versus traditional cereals”

Lucía Requena Domenech

Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología

Directores: Estrella I. Agüera Buendía y Francisco Requena Domenech

Córdoba, 22 de noviembre 2023



**Programa de Doctorado Biociencias y
Ciencias Agroalimentarias**

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Tesis doctoral

TITULO: *Estudio sobre la fisiología aplicada del bienestar animal del ganado ovino alimentado a base de nuevos cereales (Tritordeum y DRR) frente a cereales tradicionales*

AUTOR: *Lucía Requena Domenech*

© Edita: UCOPress. 2024
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

<https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/>
ucopress@uco.es



Esta tesis doctoral ha sido financiada con el Proyecto Feder-Innterconecta
*“Utilización de nuevas especies de cereales y forrajes más eficientes para
la alimentación animal y producción de alimentos más seguros para el
ganado” (Anfora).*





TESIS DOCTORAL

“Estudio sobre la fisiología aplicada del bienestar animal del ganado ovino alimentado a base de nuevos cereales (Tritordeum y DDDR) frente a cereales tradicionales”

“Applied animal welfare physiology study of sheep fed new cereals (Tritordeum and DDDR) versus traditional cereals”

Memoria de Tesis Doctoral presentada por la licenciada en Veterinaria y Máster en Medicina, Sanidad y Mejora Animal Lucía Requena Domenech para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Córdoba.

VºBº Los Directores

Prof. Dra. Estrella I. Agüera Buendía Prof. Dr. Francisco Requena Domenech

Córdoba a 22 de noviembre de 2023

Lucía Requena Domenech



TÍTULO DE LA TESIS: “Estudio sobre la fisiología aplicada del bienestar animal del ganado ovino alimentado a base de nuevos cereales (Tritordeum y DDDR) frente a cereales tradicionales”

“Applied animal welfare physiology study of sheep fed new cereals (Tritordeum and DDDR) versus traditional cereals”

DOCTORANDA: Lucía Requena Domenech

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS

La presente Tesis Doctoral se ha realizado dentro del Programa de Doctorado de “*Biociencias y Ciencias Agroalimentarias*” de la Universidad de Córdoba. Cumple con los requisitos de la legislación vigente en cuanto a su relación con el programa de doctorado y originalidad. La metodología empleada es la adecuada y los resultados alcanzados relevantes desde la perspectiva científica.

La doctoranda Lucía Requena Domenech ha realizado su actividad investigadora con un alto grado de implicación e interés, cumpliendo tanto con el Plan de Investigación como el de Formación (actividades obligatorias y opcionales) tal y como exige la actual normativa de los Estudios de Doctorado de la Universidad de Córdoba.

Como consecuencia de su trabajo se ha publicado en la revista científica *Animal (Animal Welfare section, Sp Physiological Indices and Behavioural Indicators for the Evaluation of Animal Health and Welfare under the Changing Climate Scenarios)*:

Agüera, E.I.; **Requena, L.**; García-Moreno, M.B.; Pérez-Priego, M.A.; Requena, F. Promotion of Pregnant Merino Ewes’ Welfare with the Introduction of a Drought- and High-Temperature-Resistant Cereal into Their Diet: Analysis of Tritordeum Meadow. *Animals* 2023, *13*, 3155. <https://doi.org/10.3390/ani13193155>

Animals está indexada en Journal Citation Report (JCR) en Q1-D1 en Veterinary Sciences 13/143 y Q1 Agriculture, Dairy & Animal Science 12/62.

Asimismo posee otras publicaciones que se relacionan a continuación:

Requena F.; Escribano, B.M.; Requena, F.D.; Montes, F.; Hernández M.; Serrano, A.; Cardoso; F., **Requena, L.**; Agüera, E.I. (2016) Mejora de bienestar animal asociada a una alimentación basada en nuevos piensos y forrajes más seguros y digestibles dentro del “Proyecto Ánfora”: presentación de los primeros resultados. *Anales de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental* 2016, *28* (1), 269-299.

Requena, F.; **Requena, L.**; Escribano, B.M.; Martínez-Marín, A.L.; Agüera, E.I. Influencia de la alimentación con forrajes con alta carga de micotoxinas en parámetros fisiológicos de bienestar animal y lesiones orgánicas en ovinos. *Anales de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental* 2017, 115-122.

Requena, F.; Escribano, B.M.; Martínez-Marín, A.L.; Alcalde, M.J.; **Requena, L.**; Agüera, E.I. Alteración de índices fisiológicos de bienestar animal y lesiones orgánicas en ovejas alimentadas con alta cantidad de ensilado de maíz con micotoxinas frente a ensilado de tritordeum. XLIII Congreso Nacional y XIX Congreso Internacional de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia SEOC, Zaragoza, 19 al 21 septiembre 2018.

Requena, L.; Agüera, E.I.; y Requena, F. Cambios fisiopatológicos en ovejas por consumo de ensilados con micotoxinas frente a nuevos forrajes ensilados. *Creando Redes Doctorales* 2019, 207.

Agüera, E.I.; García-Moreno, M.B.; Pérez-Priego, M.A.; Serrano-Valero, B.; **Requena, L.**, Escribano, B.M.; Requena, F. Calves' welfare after weaning can be affected by how they behave when housed. Segundas Jornadas Red CIBA, 13-14 Julio, 2023. León.

Por ello, informamos, que debido a la calidad de la tesis y reuniendo los requerimientos científicos obligatorio para conseguir el Grado de Doctor por la Universidad de Córdoba se autoriza a la presentación y defensa.

Fdo. Prof. Dra. Estrella I. Agüera Buendía

Fdo. Prof. Dr. Francisco Requena Domenech

AGRADECIMIENTOS

Quien me iba a decir, que unos años después de finalizar la carrera, la cosa no iba a acabar ahí y seguiría adelante realizando una tesis doctoral, ¡para ser doctora en veterinaria!

La verdad que yo no tenía pensamientos de tesis... Pero hoy en día, me alegro de que me convencieran para ello.

Como es sabido, es de bien nacida ser agradecida y por ello me gustaría agradecer en primer lugar, con mención especial y en mayúsculas, a mis directores de tesis: D^a Estrella Agüera Buendía y D. Francisco Requena Domenech, todo lo que han hecho por mí y por esta tesis. Sin vosotros esta tesis no se hubiera hecho realidad. ¡¡¡MUCHÍSIMAS GRACIAS DE CORAZÓN!!!

Que decir de Estrella, conocida como Yeyi, hija de D. Rafael Agüera (D.E.P.), veterinario que fue de mi abuelo Curro (D.E.P). (Gracias a eso y a la famosa historia de encontrarse mi hermano Paco y mi abuelo en el centro con su padre, comenzó ese cariño especial que tiene Yeyi a los hermanos Requena). Yeyi siempre se ha preocupado por "los Requena". Quizás yo he sido siempre la hermana más calladita, pero ahora que tengo oportunidad me gustaría agradecerte todo lo que has hecho por mí. Mucho antes de que pusiera un pie en nuestra tan apreciada carrera de Veterinaria, ya empezaste a preocuparte por mí. Me refiero al verano del año 2007, año en el que acabé el instituto, hice la selectividad... En primera adjudicación no me dieron Veterinaria por lo que tenía que esperarme a septiembre para ver si conseguía entrar. Como mi sueño era ser veterinaria, y respaldada por el apoyo de mis hermanos, eché también la matrícula en la Universidad de Murcia. Tampoco logré plaza en junio y tenía que esperar a septiembre para ver qué pasaba. Ese verano lo pasé regular porque mi futuro estaba en el limbo. No sabía si conseguiría entrar en Veterinaria o de lo contrario tendría que conformarme con estudiar Magisterio en Córdoba. Llegó septiembre y seguía el proceso de adjudicación de plazas. Recuerdo perfectamente cómo me llamaste para darme ánimos. Me decías que estabas en la secretaría con Nicolás y que había subido bastante en la lista de espera. ¡¡Tú súper positiva!! (Tenía por delante nada más y nada menos que a ciento y pico personas!!! Jajajaja).

Seguiste preocupándote por mí en Murcia. Gracias a ti, fui Tutora Erasmus, hice prácticas de oftalmología en el Hospital Arruzafa, y siempre has seguido mi paso por la Facultad. De verdad muchísimas gracias por todo.

Ahora es el turno de agradecerle a mi hermano Paco. Choca un poco que tu hermano mayor sea el director de tu tesis, a la vez que es todo un orgullo. En primer lugar, gracias por involucrarte tanto con esta tesis, por convencerme y animarme a hacerla. Aparte de esta tesis, también tengo que agradecerte el haber sido mi faro, mi guía, desde que escogí esta carrera tan bonita y a la vez tan dura como es Veterinaria. Fuiste quién me apoyó desde primera hora a hacer la carrera. Aún recuerdo el "consejo de gobierno" que hicimos en casa cuando nos enteramos de que tenía plaza en Murcia. Tú estuviste ahí y me dijiste: "Si es lo que quieres, vamos para adelante".

Siempre pendiente de mí y ayudándome durante toda la carrera (y fuera de ella). ¡¡También tengo que decir que has sido cascarrabias y estricto, tela!! ¡¡No todo van a ser flores!! Jajaja.

Ojalá llegue a ser la mitad de la mitad de lo que eres tú. Eres mi ejemplo a seguir. Gracias por todo.

Gracias también a mi familia: a mis padres, a los que ya no están, a los que estuvieron pero ahora no quieren estar y a los nuevos y futuros integrantes de la familia.

Gracias a mis amigas que siempre de una forma u otra están ahí: Natalia, Ana José, Isabela y Marian.

Gracias a María Baños García Moreno y Manuel Pérez Priego por asesorarme en el estudio estadístico y por sus consejos a la hora de redactar los resultados.

Por último, y no menos importante, quiero mostrar mi agradecimiento a los propietarios del ganado por la provisión de los animales, por dar su consentimiento para la inclusión de tritordeum en la dieta de sus ovejas y por permitir que su personal participara en este estudio. Asimismo, agradezco a las empresas Gen-Ova Veterinaria S.L., Agrasys S.L. y COVAP SA por confiar en mí para realizar esta investigación.

ABREVIATURAS

ACTH: hormona adenocorticotropa
AFB₁: aflatoxina B₁
AFM₁: aflatoxinaAM₁
AST: aspartato aminotransferasa
ATP: adenosín trifosfato
BA: bienestar animal
CC: condición corporal
CHCM: concentración media de hemoglobina celular
CO₂: dióxido de carbono
COVAP: Cooperativa Ganadera del Valle de los Pedroches
CPK: creatin fosfoquinasa
CRH: hormona liberadora de corticotropina
CSIC: Consejo Superior de Investigaciones Científicas
CT: Centro de Tipificación de Corderos
DDRR: triticale tetraploide
DON: deoxinivalenol
EDTA: ácido etilendiaminatetraacético
FAL: fosfatasa alcalina
Fe: hierro
GB: glóbulos blancos
GDH: glutamato deshidrogenasa
GLU: transportador de glucosa
GMD: ganancia media diaria
GR: glóbulos rojos
H⁺: protón
Hb: hemoglobina
HCM: hemoglobina celular media
HHA: eje hipotálamo-hipófisis-glándula adrenal
Hto: hematocrito
IC: índice de conversión
Igs: inmunoglobulinas
IgA: inmunoglobulina A
IgD: inmunoglobulina D
IgE: inmunoglobulina E
IgG: inmunoglobulina G
IgM: inmunoglobulina M
IPR: índice de producción de reticulocitos
LDH: lactato deshidrogenasa
MHz: megahercios
NAD: nicotinamida adenina dinucleótido
NADP: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NET: trampa extracelular de neutrófilos
O₂: oxígeno
PPT: proteínas plasmáticas totales
SPSS: Statistical Package for the Social Sciences
UV: ultravioleta
VCM: volumen corpuscular medio

MEDIDAS

fL: fentolitros

g/dL: gramos por decilitro

Kg: kilogramo

mg/kg: miligramos por kilogramo

mg/dL: miligramos por decilitro

mg/L: miligramos por litro

mm³: milímetro cúbico

pg: picogramos

ppb: partes por billón

UI/L: unidades internacionales por litro

µg/d: microgramo por decilitro

µl/L: microlitro por litro.

µm: micra

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	9
2	OBJETIVOS E HIPÓTESIS	15
2.1	OBJETIVO GENERAL	15
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
2.2.1	Ensayo 1	15
2.2.2	Ensayo 2	15
2.3	HIPÓTESIS	15
2.3.1	Hipótesis ensayo 1	15
2.3.2	Hipótesis ensayo 2	15
3	ESTADO DEL ARTE	17
3.1	NUEVOS CERELARES	17
3.2	MICOTOXINAS	18
3.3	BIENESTAR ANIMAL	25
3.4	INDICADORES FISIOLÓGICOS.....	28
3.4.1	Parámetros hematológicos: hemograma	28
3.4.2	Parámetros relacionados con el estrés	31
3.4.3	Parámetros metabólicos relacionados con el bienestar animal.....	36
3.5	PARÁMETROS PRODUCTIVOS	41
3.5.1	Peso corporal	41
3.5.2	Condición Corporal	41
4	MATERIAL Y MÉTODOS	43
4.1	ENSAYO 1	43
4.1.1	Animales.....	43
4.1.2	Muestras.....	43
4.1.3	Parámetros fisiológicos.....	44
4.2	ENSAYO 2	45
4.2.1	Animales.....	45
4.2.2	Muestras.....	46
4.2.3	Parámetros fisiológicos.....	46
4.2.4	Parámetros zootécnicos:	46
4.2.5	Composición nutricional y de los principales hongos productores de micotoxinas en los forrajes utilizados (maíz y DDRR).....	48
4.2.6	Estudio anatomopatológico e histopatológico.....	49
4.3	Análisis estadístico	50

1	RESULTADOS	51
4.4	RESULTADOS DEL ENSAYO 1	51
4.4.1	Parámetros hematológicos relacionados con el bienestar animal...	51
4.4.2	Leucocitos y parámetros relacionados con el estrés.....	52
4.4.3	Parámetros metabólicos relacionados con el bienestar animal.....	53
4.4.4	Parámetros inmunológicos relacionados con el bienestar animal ..	54
4.5	RESULTADOS DEL ENSAYO 2	55
4.5.1	Parámetros hematológicos relacionados con el bienestar animal...	55
4.5.2	Leucocitos y parámetros relacionados con el estrés.....	56
4.5.3	Parámetros metabólicos relacionados con el bienestar animal.....	57
4.5.4	Parámetros inmunológicos relacionados con el bienestar animal ..	58
4.5.5	Parámetros zootécnicos	59
4.5.6	Estudio anatomopatológico e histopatológico.....	60
5	DISCUSIÓN	63
5.1	ENSAYO 1	63
5.2	ENSAYO 2.....	67
6	CONCLUSIONES	71
6.1	ENSAYO 1	71
6.2	ENSAYO 2.....	71
7	RESUMEN	73
8	ABSTRACT	77
9	BIBIOGRAFÍA	81
10	ANEXO I. INDICIOS DE CALIDAD	91

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1 Tritordeum. Fuente: Agrasys S.L.....	10
Fig. 2 Detalle de los hongos Aspergillus y Fusarium. Fuente: https://www.adisseo.com	20
Fig. 3 AFB ₁ en mazorca de maíz. Fuente: https://www.mipromaalimentacion.es	21
Fig. 4 Metabolismo de Aflatoxina B1. Fuente: Rodríguez, 2023.....	24
Fig. 5 Eje hipotálamo-adenohipófisis glándula adrenal. Fuente: @farmocotips.....	27
Fig. 6 Morfología de los neutrófilos. Fuente: Carmona-Rivera y Kaplan 2016, modificada.	32
Fig. 7 Mecanismos antimicrobianos de los neutrófilos. Fuente. Rosales, 2018.....	33
Fig. 8 Proceso de la digestión de los hidratos de carbono en el sistema digestivo de los ruminantes. Fuente: Russi, 2020.....	35
Fig. 9 Reacción catalizada por la GDH. Fuente: Tejjón, 2016.....	38
Fig. 10 Unidad básica de Igs. Cadenas pesadas (H), cadenas ligeras (L). Fuente: www.inmunosalud.net	40
Fig. 11 Toma de muestra de sangre en la vena yugular externa de oveja. Fuente: propia.	44
Fig. 12 Evaluación de los parâmetros fisiológicos. Fuente: propia.....	45
Fig. 13 Ovejas alimentadas con ensilado de DDRR a la izquierda y con ensilado de maíz a la derecha. Fuente: propia.....	45
Fig. 14 Evaluación de la condición corporal en ovinos. Fuente: Propia y Romero, 2015.	47
Fig. 15 Necropsia de una de las ovejas del ensayo. Fuente: Propia.....	49
Fig. 16 Evolución del peso durante el ensayo 2 para los dos tipos de alimentación en ganado ovino.....	59
Fig. 17. Evolución de la condición corporal durante el ensayo 2 para los dos tipos de alimentación en ganado ovino.	60

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Micotoxinas identificadas en diferentes cereales. Fuente: Salazar, 2008.	21
Tabla 2 Principales clases de inmunoglobulinas existentes en los animales domésticos. Fuente: Tizard, 2019.....	41
Tabla 3 Tabla 3. Clasificación de la condición corporal según los diferentes estados fisiológicos. Fuente: Romero, 2015.....	42
Tabla 4 Categorización de la condición corporal.	47
Tabla 5 Composición química de los forrajes ensilados.	48
Tabla 6 Contenido de micotoxinas (ppb o mg/Kg)	49
Tabla 7 Parámetros hematológicos relacionados con el bienestar animal.....	52
Tabla 8 Leucocitos y parámetros relacionados con el estrés.....	53
Tabla 9 Parámetros metabólicos relacionados con el bienestar animal.....	54
Tabla 10 Parámetros inmunológicos relacionados con el bienestar animal.	55
Tabla 11 Parámetros hematológicos relacionados con el bienestar animal para dos tipos de alimentación en ganado ovino.	56
Tabla 12 Leucocitos y parámetros relacionados con el estrés para dos tipos de alimentación en ganado ovino.	57
Tabla 13 Parámetros metabólicos relacionados con el bienestar animal para dos tipos de alimentación en ganado ovino.	58
Tabla 14 Parámetros inmunológicos relacionados con el bienestar animal para dos tipos de alimentación en ganado ovino	59

1 INTRODUCCIÓN

España, según la Política Agrícola Común 2023-2027 en los sectores cárnicos de ovino y caprino, dispone sobre todo de superficies de pastos. Por un lado, la práctica de pastoreo extensivo tiene por finalidad mejorar la gestión y la sostenibilidad de los pastos, evitando tanto el infra pastoreo como el sobrepastoreo. De esta manera, contribuye a la adaptación al cambio climático y a su mitigación, aumentando la capacidad de sumidero de carbono del suelo y reduciendo la vulnerabilidad de los sistemas ganaderos a los impactos del cambio climático. La práctica de pastoreo extensivo consiste en realizar sobre las superficies elegibles, que serán tanto los pastos permanentes como los pastos temporales, un pastoreo real y efectivo (entendido este como el aprovechamiento a diente), durante un período mínimo de 120 días al año y respetando unas cargas ganaderas mínimas y máximas atendiendo al tipo de superficie, según se trate de pastos húmedos o pastos mediterráneos (MAPA, 2023).

Por otro lado, la siega sostenible, consiste en respetar un período de no aprovechamiento, (en los pastos de siega) de 60 días durante los meses de junio, julio y agosto y cumplir con una frecuencia de siega determinada dependiendo de la altitud en la que se ubiquen los pastos. Además, siempre que sea posible, y las condiciones agroclimáticas lo permitan, y particularmente en pastos ubicados en zonas Red Natura 2000 (miteco.gob.es), se realizará el henificado o cualquier otra práctica alternativa al ensilado con el fin de favorecer el mantenimiento de los hábitats para invertebrados y aves y la heterogeneidad del hábitat en favor de una mayor biodiversidad (MAPA, 2023).

Una prolongada sequía está afectando al sector agrícola y ganadero en España. Desde el inicio del año hidrológico el 1 de octubre de 2022 hasta la fecha, las precipitaciones medias han estado un 27,5% por debajo de la media de este periodo. La falta de precipitaciones y la escasez de agua en los embalses están llevando a agricultores y ganaderos a una situación extremadamente "crítica" que amenaza, de forma inminente, con devastar los cultivos de muchas explotaciones agrícolas de Andalucía, por lo que el

sector exige soluciones y una profunda reflexión sobre el modelo productivo para la obtención de los alimentos que demanda la ganadería.

Esta crisis ha tenido un impacto especialmente severo en los cultivos de cereales, como la avena y el trigo, con consecuencias para el bienestar animal por la falta de forrajes. Ante esta situación, la inclusión del cultivo de tritordeum como alimento alternativo puede ser una opción útil para los ganaderos ante el cambio climático y el aumento de las temperaturas, al tratarse de un cereal con rendimientos similares al trigo, pero con alta resistencia a la sequía y estrés por altas temperaturas (Villegas *et al.*, 2010). En particular, es un cultivo robusto con buena resistencia a enfermedades (*Fusarium culmorum* y *Septoria nodorum*) y bajos requerimientos de agua y fertilizantes (Rubiales *et al.*, 1996). Estas características lo hacen adecuado para su uso en sistemas de producción sostenibles y de bajo impacto ambiental (Requena *et al.*, 2016).

El tritordeum hexaploide es el anfiploide fértil ($2n=6x=42$, AABBH chH ch) entre la cebada silvestre (*Hordeum chilense*) y el trigo duro (*Triticum turgidum*). Esta nueva especie, resultante de la síntesis de cientos de anfiploides diferentes, tiene una amplia variabilidad genética disponible para su reproducción (Martín *et al.*, 1999). Las propiedades de Tritordeum están determinadas en gran medida por el genoma de *H. chilense* (Ávila *et al.*, 2021).



Fig. 1 Tritordeum. Fuente: Agrasys S.L.

El cereal con genotipo DDRR (triticale tetraploide) fue producido mediante la técnica de hibridación inter-específica entre las especies de *Aegilops tauschii* (un ancestro del trigo y donador del genoma DD) y *Secale cereale* (centeno y donador del genoma

RR). Es un cereal de elevada producción de biomasa, convirtiéndola en un forraje potencial y alternativo al *Lolium multiflorum* (raigrás) en las explotaciones de rumiantes (Cabrera *et al.*, 1996).

La nutrición animal abarca el proceso mediante el cual los componentes químicos (nitrógeno, carbono y minerales) presentes en los forrajes y granos se transforman en leche, lana y músculo (carne) por la intervención del aparato digestivo que participa en la digestión, absorción y asimilación. La cantidad y la calidad del alimento disponible y el estado fisiológico del animal colaboran en la eficacia de los procesos digestivos citados (Vera y Vega, 1985).

Un requisito fundamental para el bienestar de los animales radica en la nutrición (FAWC, 1993; Kyriazakis y Savory, 1997; Prache *et al.*, 2021). Es normal que surja la dudas de cuál es una nutrición apropiada que garantice el bienestar. En la ganadería intensiva se usan alimentos formulados considerándose que se alcanza la nutrición adecuada cuando se satisfacen las necesidades nutricionales del promedio de los animales que componen el rebaño (Villalba *et al.*, 2009). No obstante, el ganado ovino de la misma raza, edad y sexo varía en sus preferencias alimentarias, sus necesidades de nutrientes y su tolerancia a los excesos de nutrientes en sus dietas (Provenza *et al.*, 2003). Dado que la nutrición durante la gestación es, de todos los factores ambientales, el más importante cuantitativamente en la relación ambiente-gen (Vaquero, 2008; Castillo, 2015) y debido a que el período fetal se caracteriza por ser un momento en el que el nuevo individuo posee una enorme plasticidad y capacidad para responder al estilo de vida y al entorno materno (Chango y Pogribny, 2015), la nutrición materna juega un papel clave en esta etapa ya que induce metilación permanente del ADN (Zheng, *et al.*, 2014). Los componentes de la dieta pueden afectar la función y expresión de los genes en el útero y durante las primeras etapas de la vida. Esto se consigue gracias a la modulación de mecanismos epigenéticos mediados por el metabolismo del ácido fólico en el metabolismo de los carbohidratos o por procesos de transmetilación que afectan la metilación del ADN; la metilación de histonas o los microARN no codificantes (Chango y Pogribny, 2015). Por todo lo mencionado anteriormente, es natural preguntarse qué constituye una dieta adecuada para garantizar el bienestar del ganado ovino, sobre todo durante el periodo de gestación.

Los ovinos son rumiantes, exclusivamente herbívoros, que se caracterizan por tener un sistema digestivo altamente especializado y desarrollado con la capacidad de

digerir el alimento de forma más exhaustiva que otras especies. Como rumiantes que son su estómago está formado por cuatro compartimentos (rumen, retículo, omaso y abomaso). Presentan peculiaridades anatómicas y fisiológicas en la porción anterior de su tubo digestivo, ya que la degradación de los alimentos desde el abomaso tiene características comunes con las especies monogástricas (Reece, 2015).

La digestión de la fibra (carbohidratos como la celulosa y hemicelulosa) es llevada a cabo por microorganismos (levaduras, arqueas, bacteria, hongos y protozoos) que viven en el rumen y en el retículo. Cuando los rumiantes consumen forrajes, toman bocados bastante grandes y tragan el material con un mínimo de masticación. Los principales factores que afectan la síntesis de proteína microbiana son la disponibilidad de los carbohidratos, la proteína degradable, la grasa, y el pH ruminal (Kheirandish *et al.*, 2022).

El rumen y el retículo que tienen la capacidad de descomponer la celulosa presente en los forrajes en material vegetal que el animal puede digerir, permitiéndole acceder a la energía contenida en los vegetales fibrosos. Consecuentemente, una norma esencial en la alimentación de los rumiantes radica en nutrir a los microorganismos presentes en el rumen para, de esa forma, alimentar al animal en sí (García *et al.*, 2017). Por lo tanto, es esencial ser muy cauteloso al seleccionar el tipo de alimento para los rumiantes de forma que no se altere el ambiente ruminal y las condiciones de la microbiota sean óptimas con el fin de que no se produzcan una disbiosis ruminal (Brown *et al.*, 2012).

Actualmente el bienestar animal es un tema que preocupa a la sociedad. El bienestar de los animales está supeditado al esmero que se ponga para valorar, optimizar y respetar las condiciones en las que viven los animales (Broom, 2011). Los indicadores de bienestar animal pueden clasificarse en tres categorías: (i) indicadores evaluados mediante la observación o el examen de los animales (basados en los animales); (ii) indicadores que evalúan las disposiciones relacionadas con los animales, como el alojamiento y el pastoreo (basados en los recursos); o (iii) indicadores relacionados con las políticas y las prácticas de gestión de los ganaderos (basados en la gestión) (Capdeville y Veissier, 2001).

Los indicadores del bienestar de los ovinos basados en los animales que se seleccionen para una evaluación del bienestar deben ser válidos (pertinentes para el bienestar de los ovinos), fiables (producir resultados coherentes cuando se realicen en diferentes momentos o por diferentes evaluadores) y viables (eficientes en términos de tiempo, personal y materiales); sin embargo, no se deben olvidar indicadores fisiológicos.

Estos son elementos imprescindibles que contribuyen a originar una respuesta, tanto positiva como negativa, a nivel del funcionamiento de órganos y sistemas en un ser vivo, proporcionando mucha información sobre el bienestar de los animales (Damián y Ungerfeld, 2013).

Los indicadores fisiológicos que se utilizan con más frecuencia son aquellos que miden la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-glándula adrenal, porque la respuesta de estrés involucra la activación de este eje que, a su vez, resulta en una secreción incrementada de glucocorticoides (cortisol) (Mormède *et al.*, 2011). La concentración de cortisol, corticosterona o de sus metabolitos se utiliza para medir la respuesta de estrés y, por lo tanto, para evaluar el bienestar animal. Asimismo, se debe evaluar los parámetros hematológicos (recuento de glóbulos rojos (GR), hematocrito (Hto), hemoglobina (Hb), leucocitarios (leucocitos, neutrófilos, linfocitos, relación neutrófilos/linfocitos) metabólicos (glucosa, albúminas, proteínas plasmáticas totales (PPT), lactato deshidrogenasa (LDH), creatin fosfoquinasa (CPK), aspartato amino transferasa (AST), fosfatas alcalina (FAL), glutamato deshidrogenasa (GDH), inmunológicos (IgA e IgG) (Cunningham, 2020).

Por todo lo expuesto, la situación actual ha contribuido a centrar esta investigación en la elección de nuevos cereales (tritordeum y triticale tetraploide [DDRR]), resistentes a la sequía, para nutrir al ganado ovino que son más seguros desde el punto de vista medioambiental y de la salud que otros cereales usados tradicionalmente y evaluar su efecto sobre el bienestar animal. Además, la creciente demanda de alimentos más saludables, incluidos los derivados de cereales integrales, ha promovido la investigación sobre características del tritordeum relacionadas con la salud humana (Álvarez *et al.*, 1992; Martín *et al.*, 1999; Salcedo *et al.*, 2014; Rey *et al.*, 2015; Vaquero *et al.*, 2018; Sánchez-León *et al.*, 2020; Zdaniewicz *et al.*, 2020; Nocente *et al.*, 2021; Shewry *et al.*, 2023). Sin embargo, se ha detectado que existe poca bibliografía dedicada al uso de tritordeum en alimentación animal y el efecto y repercusiones en el bienestar animal (Requena *et al.*, 2016; Requena *et al.*, 2017; Requena *et al.*, 2019; Agüera *et al.*, 2023). Si el tritordeum se incorpora bien a la alimentación humana ¿por qué no incluirlo en la alimentación animal para potenciar sus propiedades y su efecto en el bienestar animal asegurando el éxito productivo del rebaño?.

2 OBJETIVOS E HIPÓTESIS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto de la alimentación a base de nuevos cereales (tritordeum y DDDR) frente a cereales tradicionales en el ganado ovino.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Ensayo 1

Comparar dos dietas diferentes (pradera de tritordeum frente a pradera de avena) para ovejas preñadas en pastoreo con el fin de determinar si hay algún efecto sobre los indicadores fisiológicos objetivos del bienestar animal.

2.2.2 Ensayo 2

Valorar el posible daño orgánico que se produce en ganado ovino al alimentarlo con el nuevo forraje ensilado (DDRR) frente al ensilado a base de maíz.

2.3 HIPÓTESIS

2.3.1 Hipótesis ensayo 1

Si el tritordeum se considera un nuevo cereal con ventajas nutricionales para la especie humana como son su digestibilidad, altos niveles de luteína, gran cantidad de fibra, poder antioxidante, fructanos que ayudan a la microbiota intestinal y riqueza en proteínas, minerales y compuestos fenólicos. Si se introduce en la nutrición del ganado ovino favorecerá el bienestar animal asegurando el éxito productivo de esta especie.

2.3.2 Hipótesis ensayo 2

Si el cereal con genotipo DDDR (triticale tetraploide) se usa para ensilado con alto valor nutritivo en ganado vacuno lechero, además no provoca problemas derivados del contenido en micotoxinas como puede darse con el de maíz. Por tanto, haciendo un estudio controlado en ovino podemos determinar si esta especie sufre alteraciones orgánicas como consecuencia de estos tipos de ensilado (maíz y DDDR) y sus posibles

influencias, tanto negativa como positiva, sobre el bienestar animal y sus parámetros zootécnicos.

3 ESTADO DEL ARTE

3.1 NUEVOS CERELARES

El tritordeum es un nuevo cereal desarrollado por un equipo de investigadores del Instituto de Agricultura Sostenible del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) de Córdoba mediante técnicas tradicionales de mejora sin utilizar tecnología transgénica. Agrasys S.L. es una *spin-off* del CSIC que adquirió los derechos exclusivos de este cereal y es la responsable de la concesión de licencias comerciales a nivel mundial. Se ha obtenido por el cruce natural de diversas variedades de "triticum" (trigo) y "hordeum" (Cebada silvestre recolectada en Chile) sin incluir una modificación genética.

A nivel agronómico, el tritordeum destaca por ser un cereal con rendimientos similares al trigo, con una alta resistencia a la sequía y al estrés por altas temperaturas y bajo impacto medioambiental. Es un cultivo robusto que necesita poca agua y pocos fertilizantes, característica que lo hacen apto para su uso en sistemas de producción sostenible y con bajo impacto medioambiental (Maldonado *et al.*, 1996).

Con respecto al trigo, el tritordeum tiene los siguientes beneficios saludables: menor cantidad de proteínas indigestibles del gluten (gliadinas), diez veces más luteína (antioxidante y protector de luz UV), mayor contenido de ácido oleico ácido graso monoinsaturado típico de la dieta mediterránea que reduce el riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares, y es rico en fibra dietética y fructanos, unos carbohidratos de acción prebiótica que contribuyen a mantener la flora bacteriana intestinal. El tritordeum representa el primer cereal híbrido con sello español que ha llegado a la alimentación humana y el segundo creado por el hombre. El primero fue el triticales (trigo x centeno) que no ha conseguido llegar al mercado porque no tiene la calidad necesaria para elaborar productos alimenticios (Álvarez *et al.*, 1992).

El cereal con genotipo DRRR (triticales tetraploide) fue producido mediante la técnica de hibridación inter-específica entre las especies de *Aegilops tauschii* (un ancestro del trigo y donador del genoma DD) y *Secale cereale* (centeno y donador del genoma RR) (Cabrera *et al.*, 1996). Es un cereal de elevada producción de biomasa,

convirtiéndolo en un forraje potencial y alternativo al *Lolium multiflorum* (raigrás) en las explotaciones de bovino de carne y leche. Salcedo y colaboradores (2014) concluyeron que serían interesantes los estudios *in situ* para determinar su valor nutritivo.

Las características más relevantes del DDRR son las de crecimiento inicial en roseta y elevado ahijado, floración tardía, tallos fuertes y altos, hojas muy largas y estrechas, espigas muy largas (25-30 cm) con una densidad de espiguillas baja, elevada producción de espigas, raquis entero y gluma semitenaz. El grano es alargado de tamaño medio-pequeño con fertilidad y rendimientos de grano bajos, insensibilidad a las enfermedades más comunes de los trigos (royas y oídio) y tasa de senescencia de las hoja muy baja (Ballesteros *et al.*, 2007).

La elección de este tipo de cereales se debe a que presentan una buena producción de biomasa y buena respuesta al corte y rebrote o producción de grano según corresponda, siendo más eficientes para alimentación animal y producción de alimentos más seguros para el ganado (Salcedo *et al.*, 2014).

3.2 MICOTOXINAS

Las micotoxinas son metabolitos secundarios tóxicos de bajo peso molecular, producidas por varias especies de hongos filamentosos en sustratos donde estos se estén desarrollando en condiciones adecuadas de temperatura y humedad (Efsa, 2012). Son consideradas como uno de los contaminantes naturales primordiales en los alimentos por su alta incidencia tanto en productos de origen vegetal (cereales) cómo en producto lácteos y cárnicos (Efsa, 2012; Rasff, 2012). La contaminación por micotoxinas es un problema, por tanto, en alimentos de origen vegetal, principalmente en cereales y frutos secos, pero también en alimentos de origen animal, cuando el animal ha sido alimentado con piensos contaminados (AESAN, 2021).

El cambio climático, problema emergente global, implica el incremento de los niveles de CO₂ y otros gases de efecto invernadero en la atmósfera y, como consecuencia, afecta a las condiciones meteorológicas con cambios en los patrones de precipitación, sequías y tormenta. Camardo Liggeri *et al.* (2019) describieron que la influencia del cambio climático sobre la naturaleza y, por tanto, sobre los sistemas agrícolas afecta a la inocuidad de los alimentos e influye en la seguridad de la cadena alimentaria (Cotty y Jaime, 2007; Camardo Leggieri *et al.*, 2019). Las condiciones meteorológicas extremas,

los aumentos de temperatura, la variación en la distribución e intensidad de las lluvias y la elevación de los niveles de CO₂ afectan a las especies de hongos dominantes de diferentes formas, dependiendo de sus necesidades ecológicas (Camardo Leggieri *et al.*, 2019).

La relación que existe entre el crecimiento de la planta y las enfermedades fúngicas asociadas y poblaciones de plagas se está modificando porque los cambios ambientales provocan el desequilibrio de la relación patógeno/plaga, planta y medio ambiente, influyendo también en otros factores como son la distribución geográfica de los insectos y su ciclo de vida (Grulke, 2011). Todo esto está llevando a que los investigadores estudien en profundidad la genética y la biología de los hongos toxigénicos (Moretti *et al.*, 2019).

La aparición de micotoxinas en cereales y forrajes se debe fundamentalmente a la proliferación de hongos en dichos productos. La aplicación adecuada de técnicas de cultivo, recolección y almacenamiento, aunque no contribuya por completo a eliminar la presencia de micotoxinas en el alimento, si puede reducir su presencia. La mayoría de las micotoxinas son químicamente estables, por lo tanto, tienden a permanecer durante el almacenamiento y el procesado de los producto (Jard *et al.*, 2011). Este hecho hace aún más importante el que haga hincapié en que se eviten las condiciones que favorecen la formación de micotoxinas. Esto es difícil de conseguir cuando se trata de cultivos sometidos a determinadas condiciones meteorológicas. Una vez que los cereales han sido cosechados, se debe prevenir el desarrollo de mohos y la formación de micotoxinas durante el almacenamiento y transporte, aunque a veces esto no sea posible conseguirlo en la práctica (Salvacion *et al.*, 2015).

Existen dos tipos de hongos: género *Fusarium*, aparece durante el cultivo de la planta, y género *Aspergillus*, que aparece durante la conservación de cereales y forrajes. En ambos casos, las condiciones de almacenamiento del cultivo o forraje y el manejo que se realiza puede afectar al desarrollo del hongo, y por tanto, de micotoxinas, en mayor o menor medida (Berthiller *et al.*, 2013).



Fig. 2 Detalle de los hongos *Aspergillus* y *Fusarium*. Fuente: <https://www.adisseo.com>

Como se ha comentado, la contaminación por micotoxinas puede ocurrir no solo en la fase agrícola, sino también durante el almacenamiento o procesamiento de los alimentos. Esto representa un problema en la salud humana y animal debido a la alta toxicidad que poseen. Además, hay que añadirle que son moléculas muy estables a los procesos industriales a los que se someten los alimentos (Kabak, 2009; Efsa, 2012; Rasff, 2012).

La micotoxicosis en los rumiantes puede manifestarse por una variedad de signos y problemas subclínicos difíciles de identificar de forma específica. Estos varían desde alteración de la ingesta de alimento y la función ruminal hasta insuficiencia reproductiva, respuestas inmunológicas deficientes, alteración de la piel, disminución de rendimiento lechero y problemas relacionados con el intestino (por ejemplo, diarrea, daño al epitelio, hemorragia, etc.). Muchas micotoxinas pueden causar daño en el hígado, limitando la capacidad del animal para dividir los nutrientes de manera efectiva para satisfacer las necesidades fisiológicas y reduciendo la conversión de la materia prima en proteína animal. Además, si compromete a la inmunidad puede conducir a más infecciones de la ubre, mayor número de células somáticas/recuento y mastitis, conduciendo a una pérdida de leche vendible del animal (Alonso *et al.*, 2002) y también disminuye la fertilidad (Adeyeye, 2016).

Al ganado ovino les afecta principalmente la aflatoxina B₁ (AFB₁) que impacta a todos los órganos pero especialmente al hígado. Los rumiantes, en general, y los ovinos, en particular, son muy resistentes a las Ocratoxinas (géneros *Aspergillus* y *Penicillium*)

ya que son hidrolizadas por el líquido ruminal y la flora intestinal a ocratoxina A, un metabolito no tóxico (Marquardt y Frohlich, 1992). Sin embargo, si ingieren más de 2mg/kg de pienso con ocratoxina A se puede encontrar restos de ésta en heces, orina o en el suero (Höhler *et al.*, 1999). La zearalenona produce hiperestrogenismo por su alta afinidad a los receptores de los estrógenos, lo que potencialmente interfiere con la función endocrina y conduce a una baja fertilidad y desarrollo mamario, particularmente en animales jóvenes, edematización e hiperemia de los genitales, abortos y prolapsos de vagina y recto (Upadahaya *et al.*, 2010).



Fig. 3 AFB₁ en mazorca de maíz. Fuente: <https://www.mipromaalimentacion.es>

Las micotoxinas detectadas en alimentación se relacionan en la tabla 1.

Tabla 1 Micotoxinas identificadas en diferentes cereales. Fuente: Salazar, 2008.

MICOTOXINA	HONGO	GRANO
Aflatoxina	<i>Aspergillus</i>	Maíz
Ocratoxina	<i>Aspergillus</i> <i>Penicillium</i>	Maíz, trigo y arroz
Deoxinivalenol (DON)	<i>Fusarium</i>	Maíz, trigo y arroz
Zearalenona (F-11)	<i>Fusarium</i>	Maíz y trigo
Fumonisina	<i>Fusarium</i>	Maíz

Los efectos tóxicos de las micotoxinas varían de acuerdo con los siguientes factores: especie y raza de los animales afectados; tipo(s) de micotoxina(s), dosis y tiempo de ingestión; estado nutricional y sanitario de los animales; infecciones concomitantes;

condiciones medioambientales (temperatura, humedad, ventilación, manejo); tratamientos farmacológicos, presencia de otras toxinas y efectos aditivos, sinérgicos o antagónicos entre las toxinas (Giriat *et al.*, 1989).

El consumo de alimentos contaminados por micotoxinas está relacionado con la aparición de enfermedades agudas y crónicas tanto en animales como personas (Soriano del Castillo, 2007). A continuación se relacionan los efectos que pueden ocasionar en los distintos órganos:

Hígado: producen degeneración grasa hemorragia y necrosis del parénquima hepático. En algunos casos se provoca un tamaño anormal del hepatocito y su núcleo (megalocitosis: pérdida de la relación tamaño del citoplasma-tamaño del núcleo). Algunas micotoxinas pueden originar hiperplasia de los conductos biliares e incluso hepatoma. En las toxicosis agudas hay ictericia, anemia hemolítica, elevación de los niveles plasmáticos de las enzimas hepáticas y fotosensibilización secundaria. En las toxicosis crónicas se presenta hipoproteïnemia, hipoprotrombinemia, fibrosis hepática y cirrosis. En raras ocasiones puede haber una fotosensibilización secundaria (Jelinek *et al.*, 1989).

Riñón: el ácido oxálico y otros agentes nefrotóxicos pueden ser producto de *Aspergillus* y *Penicillium*. Producen daños tubulares y ocasionan signos y lesiones características de nefrosis tóxica tubular (Berry, 1988).

La médula ósea, eritrocitos y endotelio vascular también sufren cambios. Entre los signos clínicos descritos se incluyen hemorragias difusas, hematomas, debilitamiento, anemia, leucopenia y aumento de la susceptibilidad a las infecciones (Adeyeye, 2016).

Sistema inmunitario: hay aflatoxinas y rubratoxinas que disminuyen la eficacia del sistema inmunitario, produciendo así gran susceptibilidad a las enfermedades infecciosas (Jelinek *et al.*, 1989).

El curso de la enfermedad y el tipo de lesiones puede estar relacionado con el tipo de micotoxicosis y la predisposición a la misma que presente cada animal. Los efectos tóxicos con bajos niveles de contaminación puede tardar varias semanas en aparecer. Por todo esto, es importante hacer un análisis detallado y meticuloso de los alimentos sospechosos. La muestra que se tome para analizarla debe de ser representativa ya que se puede dar el caso de que solo una parte del alimento esté contaminado (Berry, 1989).

El calor en exceso, cambios químicos (acidez) y la luz solar son los elementos que pueden alterar la estructura y actividad de los hongos mencionados. El diagnóstico de las micotoxicosis es complejo porque los signos y lesiones son inespecíficos, por ello, el laboratorio, al que se envíen las muestras a analizar, necesita información relativa a la calidad de las materias primas y de los alimentos; información de los tratamientos preventivos y de control en los ingredientes, en las materias primas y en los animales afectados, e información sobre la respuesta a las terapias en los animales afectados (Valladares, 2007).

La presencia de hongos en el alimento no necesariamente indica presencia de micotoxinas, ya que la producción de éstas depende de la temperatura, humedad, tipo de sustrato, cantidad de alimento contaminado, etc. Algunos componentes naturales de alimentos y forrajes pueden producir falsos resultados positivos en el análisis químico del laboratorio. Hay que tener en cuenta que las mezclas alimenticias (raciones, pellet) son complejas y dificultan el análisis (Trombete *et al.*, 2013).

Un método químico muy empleado para la detección de micotoxinas es la cromatografía en capa fina. Para llevar a cabo esta prueba primero se debe realizar una extracción química del alimento problema. Para la mayoría de las toxinas se debe observar la cromatografía en capa fina con luz ultravioleta, las cuales reflejan distintas fluorescencia según cual micotoxina se trate. Posteriormente sobre la misma placa se realizan pruebas confirmatorias para asegurar el diagnóstico (Trombete *et al.*, 2013; Chulli, 2023).

La determinación de la actividad enzimática en suero o plasma es de utilidad para el diagnóstico y diferenciación de alteraciones o enfermedades que se presentan en los distintos órganos como hígado corazón, riñón y páncreas. Cada órgano tiene un patrón enzimático típico. La mayoría de las enzimas utilizadas para diagnóstico clínico de trastornos en órganos, como el hígado, son enzimas que se encuentran dentro de la célula, las cuales son liberadas hacia el torrente sanguíneo cuando presenta daño (Trombete *et al.*, 2013).

El suero es la muestra preferencial para el análisis de la actividad enzimática en sangre. Se puede utilizar plasma, preferentemente con heparina que no inactiva las enzimas. Es importante separar el suero del plasma rápidamente y determinar la actividad lo antes posible (antes de 24h) (Winter *et al.*, 2022).

Como se ha reseñado la contaminación de ingredientes utilizados para la formulación de piensos animales, supone un problema a nivel mundial. Además, el consumo de forrajes contaminados puede dar lugar a intoxicaciones subagudas o crónicas en el ganado, y también puede contribuir al paso de micotoxinas a alimentos de origen animal para consumo humano como la leche, la carne o los huevos (Fink-Gremmels 2008a; Pinotti *et al.* 2016).

Uno de los principales riesgos asociados con la presencia de micotoxinas en los forrajes ensilados utilizados en sí mismos o como parte de mezclas en alimentación ganadera, es la posible transmisión a la leche, comprometiendo la seguridad alimentaria. Cuando los rumiantes consumen forrajes con presencia de AFB₁, parte de la misma es degradada en el rumen a aflatoxicol, y otra se metaboliza en el hígado por enzimas hepáticas mediante procesos bioquímicos de hidroxilación, hidratación, demetilación y epoxidación. La hidroxilación de la AFB₁ da lugar a la aflatoxina M₁(AFM₁). Una parte de este compuesto es excretada finalmente a través de la leche (Dhanasekaran *et al.*, 2011) (Figura 4).

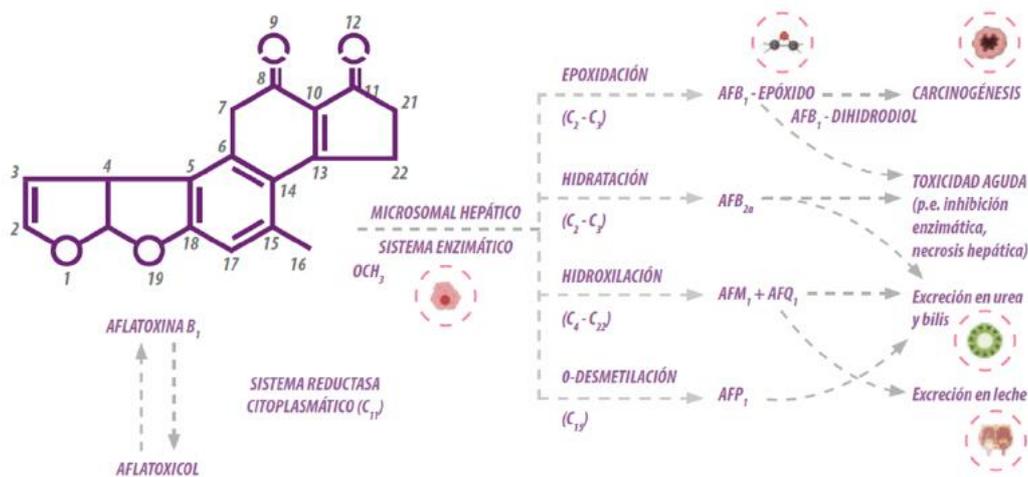


Fig. 4 Metabolismo de Aflatoxina B1. Fuente: Rodríguez, 2023.

En cuanto a los ingredientes utilizados en alimentación animal, sólo se han establecido niveles máximos para la AFB₁. En la Unión Europea estos límites son de 0,02 mg/kg en ingredientes para piensos compuestos y 0,005 mg/kg en forrajes ensilados para

animales lecheros. Respecto a las fumonosinas, deoxinivalenol y zearalenona, solo existen niveles máximos recomendados, que en forrajes para vacas lecheras son 5 mg/kg de deoxinivalenol, 0,5 mg/kg de zearalenona y 50 mg/kg en el caso de la suma de fumonisina B₁ y fumonisina B₂ (EC 2006).

Se han establecido niveles máximos en diferentes países, en concreto, en la UE los niveles máximos son de 50 mg/kg de AFM₁ en leche cruda, leche tratada térmicamente y leche para la fabricación de productos lácteos (EC 2006). En la aplicación práctica, la técnica para reducir la presencia de AFM₁ en leche consistiría en aminorar la exposición de las vacas lecheras a piensos o forrajes contaminados por AFB₁ (Rodríguez, 2023).

Los rumiantes, entre ellos los ovinos, son considerados bastante resistentes al mecanismo de acción de las micotoxinas, ya que la microbiota ruminal es capaz de degradar estos compuestos en otros menos tóxicos o incluso biológicamente inactivos a niveles normales de exposición. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la capacidad de degradación del rumen puede saturarse, y puede verse afectada por cambios en la dieta o como consecuencia de enfermedades metabólicas (Fink-Gremmels, 2008b).

Actualmente, al no existir límites para alimentación en rumiantes productores de carne, ni ovejas ni vacas reproductoras, el ensilado que no es apto para alimentación de ganado productor de leche suele utilizarse para ganado de carne con las consiguientes perjuicios orgánicos, los cuales se tienen actualmente en consideración, repercutiendo en la producción y el bienestar animal de los mismos.

3.3 BIENESTAR ANIMAL

El bienestar animal (BA) es un tema de considerable importancia para los consumidores europeos. Hoy en día la calidad de los alimentos se determina no sólo por la naturaleza global y la seguridad del producto final, sino también por el estado de bienestar recibido por los animales de los cuales se produce el alimento. El hecho de que la mejora del BA puede afectar positivamente a la calidad del producto de origen animal, y corregir la resistencia frente a las enfermedades, también tiene una influencia directa en la calidad de los alimentos y en la seguridad alimentaria (Agüera, 2013).

Hoy por hoy los consumidores y los medios de comunicación muestran una preocupación creciente sobre el BA, la seguridad de los productos de origen animal así

como la trazabilidad de los productos animales (carne, leche). Por ello, las normas para la evaluación del bienestar en las explotaciones ganaderas y los sistemas de información tienen que basarse en las demandas del consumidor, los requisitos de comercialización de los minoristas y la validación científica. Esta vinculación del origen del producto animal hasta su consumo ha llevado al tradicional eslogan de “de la granja a la mesa” (Agüera, 2013).

El buen mantenimiento y un sistema de cría adaptado a las necesidades fisiológicas y de comportamiento de los animales son requerimientos básicos para la salud y bienestar de los mismos. También hay que añadirle factores medioambientales apropiados de manera que las condiciones de cría respondan a las necesidades y métodos de alimentación adecuados, así como también de confort y de protección ante condiciones climáticas adversas (Mota *et al.*, 2016). El suministro de dietas apropiadas y agua suficiente contribuye a mantener la salud y productividad de los animales (Rossner *et al.*, 2010).

Tanto los rumiantes, como otros animales domésticos, manifiestan cambios fisiológicos durante el estrés que se pueden evaluar con indicadores sanguíneos que muestran el grado de su impacto sobre el BA (Romero *et al.*, 2011).

El estrés altera la homeostasis interna produciendo cambios en el eje hipotálamo-hipófisis-glándula adrenal (HHA) y el sistema simpático-adreno-medular. Las hormonas que se liberan son hormona liberadora de corticotropina (CRH), hormona adrenocorticotropa (ACTH), corticosteroides (principalmente cortisol) y catecolaminas (adrenalina y noradrenalina) (Silverthorn, 2019; Cunningham, 2020).

Los animales en situación de estrés pierden el apetito debido a que la CRH actúa directamente sobre las estructuras nerviosas que controlan la ingestión de alimento ejerciendo un efecto inhibitorio que influye en su crecimiento y ganancia de peso (Mota *et al.*, 2016). En el caso de animales jóvenes se retrasa la pubertad, lo que afecta también a la reproducción prorrogando el momento de la primera gestación y aumentando la muerte embrionaria temprana (Senger, 2005).

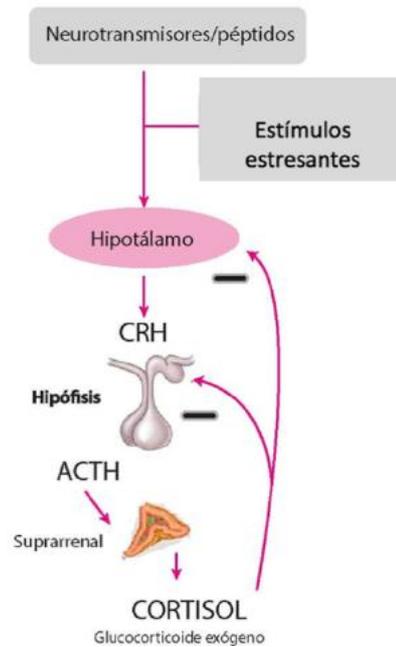


Fig. 5 Eje hipotálamo-adenohipófisis glándula adrenal. Fuente: @farmocotips

El bienestar de los animales de producción se puede predecir cuándo se alteran los indicadores de BA. Entre ellos están: indicadores endocrinos (incremento de la concentración sérica de ACTH, cortisol y catecolaminas); Indicadores bioquímicos (aumento de la glucemia, CPK, proteínas plasmáticas, LDH, FAL, GDH); indicadores fisiológicos (aumento de la frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria y temperatura corporal); indicadores hematológicos (cambios en el hematocrito, concentración de GR, leucocitos, monocitos, linfocitos y neutrófilos); comportamentales (disminución del apetito y tiempo de rumia, vocalizaciones, alteración del comportamiento de la especie); productivos (alteración de la condición corporal, disminución en el peso, calidad de la carne y leche producida); ambientales (instalaciones, falta de sombra, calor extremo, humedad, intensidad lumínica) así como la forma y frecuencia de ingestión del alimento, disponibilidad y calidad del mismo (Mota *et al.*, 2016).

Hoy día, las organizaciones internacionales tienen por objetivo lograr que la implementación de nuevas tecnologías pueda mejorar el bienestar sin producir una disminución en la producción (Edward, 2004; FAO, 2009). Las buenas prácticas de BA deben incluir: prevención y tratamiento de enfermedades y lesiones; prevención y alivio del dolor, estrés y otros estados negativos; suministro de alimentación y condiciones de vida adecuadas a las necesidades y naturaleza de los animales; capacitación y entrenamiento de las personas que intervienen en el manejo de los animales (FAO, 2009).

3.4 INDICADORES FISIOLÓGICOS

3.4.1 Parámetros hematológicos: hemograma .

El hemograma es una evaluación básica que se utiliza para poder valorar el bienestar y el estado de salud y para tener orientación a la hora de diagnosticar una patología (Rahman *et al.*, 2018; Al-Thuwaini, 2021). Este análisis valora tres poblaciones celulares: los GR, los leucocitos, las plaquetas, dando los resultados en porcentajes y valores absolutos (Torrens, 2015).

A pesar de que las células sanguíneas se originan en la médula ósea, el hemograma es un análisis de la sangre periférica donde se encuentran esas células. La mayor parte de las modificaciones que hallamos en el hemograma no están relacionadas con afecciones que tengan origen en la médula ósea, sino que se corresponden con alteraciones fisiopatológicas de origen diferente (Retamales, 2013).

La familiarización con los recuentos de células sanguíneas (aunque se utilice un analizador automático) y la revisión del frotis sanguíneo al microscopio es primordial para poder hacer una valoración correcta de los resultados obtenidos (Vives, 2015). En los últimos años, ha habido una tendencia de cierta intensificación de la gestión relativa al control sanitario de los rebaños ovinos. Se sabe que, debido a su pequeño tamaño, los hematíes ovinos suelen interpretarse erróneamente cuando son analizados en instrumentos hematológicos calibrados para otras especies (Polizopoulou, 2010), además, para que el análisis sea fiable, hay que tener en cuenta factores como manejo, raza, estado nutricional y condiciones ambientales (Ndoutamia y Ganda, 2005).

En el hemograma se analizan los siguientes parámetros fisiológicos (Aceña *et al.*, 2008):

- Recuentos celulares: indican el número de células, ya sean GR, leucocitos o plaquetas por mm³ de sangre. Los GR se miden en millones de células/mm³.
- Valor hematocrito: es el porcentaje de volumen de sangre que ocupan los glóbulos rojos al sedimentar por centrifugación. Se mide en tanto por ciento (%).
- Concentración de hemoglobina: el valor refleja la cantidad de Hb en gramos por decilitro de sangre (gr/dL).

- Recuento de reticulocitos e índice de producción de reticulocitos (IPR): indica el incremento en la producción de hematíes. El reticulocito es el estadio celular anterior al eritrocito maduro.

- Índices eritrocitarios:

- Volumen celular medio (VCM): constituye el tamaño promedio de los GR. Se expresa en fentolitros (fL).
- Hemoglobina celular media (HCM): representa la cantidad media de hemoglobina por hematíe. Se expresa en picogramos (pg).
- Concentración media de hemoglobina celular (CMHC): mide la cantidad o porcentaje de Hb en un volumen determinado de eritrocitos. Se expresa tanto en gramos por decilitro (gr/dL) como en tanto por ciento (%).

- Fórmula leucocitaria o recuento diferencial de leucocitos: es el análisis que cuantifica cada tipo de glóbulo blanco (linfocitos, neutrófilos, monocitos, eosinófilos y basófilos). Los linfocitos y los neutrófilos son las formas más abundantes. En los rumiantes predomina la serie linfocítica en condiciones fisiológicas, en oposición a los humanos, los gatos, los perros y los caballos (García-Sacristán, 2018).

3.4.1.1 *Glóbulos rojos o eritrocitos*

En los mamíferos, los GR (eritrocitos, hematíes o células rojas) tienen forma redonda bicóncava, con zonas pálidas en el centro, carentes de núcleo y de motilidad. El grosor y diámetro de estas células varía según la especie (de 7 a 10 μm de diámetro) y el estado nutricional del animal. Tienen la habilidad de sufrir cambios en su forma al pasar por los capilares sanguíneos en los que llegan a adquirir un diámetro de 3 a 5 μm (García-Sacristán, 2018; Křížková, 2021). Esta peculiaridad se debe a que la membrana celular del GR es flexible, proporcionando a la célula la capacidad de modificar su morfología al pasar por esos capilares pequeños; sin embargo no es muy elástica por lo que su capacidad de estiramiento está limitada (Křížková, 2021). Las funciones de los GR son el transporte de oxígeno (O_2), el transporte de anhídrido carbónico y contribución a la regulación del pH sanguíneo (Cunningham, 2020).

Los GR ovinos, además de ser más pequeños que en otras especies de mamíferos, no suelen deformarse ni agregarse (Weiss y Wardrop, 2010). En los ovinos valores normales de GR en sangre son de 9 a 15 $\times 10^6/\text{mm}^3$ (Winter *et al.*, 2022). La esperanza

de vida de estas células varía según la especie, concretamente en estos rumiantes está entre 125 y 150 días. Cuando los GR se acercan al final de su esperanza de vida se caracterizan por ser menos deformables y terminan lisándose (Reece, 2015).

3.4.1.2 Hemoglobina

La Hb es una proteína que se encuentra dentro del GR en elevadas concentraciones, constituyendo aproximadamente el 35% de su peso. Es una cromoproteína formada un grupo prostético y cuatro grupos pirrol que están conectados a un átomo ferroso (Fe^{2+}) y todo esto está ensamblado a una cadena proteica. Esa cadena es la porción más versátil de la Hb porque cada especie tiene una o varias cadenas propias. En casi la totalidad de los vertebrados se presenta como un tetrámero al que se pueden unir cuatro moléculas O_2 (Hall *et al.*, 2021). La particularidad necesaria para que el O_2 se una con la Hb es que en los GR haya abundancia de esta última, lo cual depende de la cantidad de hierro que se reabsorba desde el alimento y esté disponible en el organismo (Cunningham, 2020).

La Hb se encarga del transporte de O_2 desde aparato respiratorio hacia los tejidos periféricos y del transporte de CO_2 y protones (H^+) desde los tejidos periféricos hasta los pulmones para mantener la homeostasis y, por lo tanto, la salud y para que el rendimiento productivo sea óptimo (Mendoza *et al.*, 2011). Los valores de Hb en sangre de ovino se han fijado entre 9-15 g/dL (Brooks *et al.*, 2022). No obstante, factores como la edad, el sexo, estado reproductivo, el estado nutricional, altitud, temperatura, humedad, estrés, salud o la alimentación pueden afectar a la concentración de Hb en sangre (Winter *et al.*, 2022). Reibeiro *et al.*, (2014) y Al Dawood (2017) describieron que las corderas en situaciones de estrés térmico se presenta un aumento de los niveles de Hb sanguínea derivado de la mayor demanda de O_2 para poner en marcha los mecanismos termorreguladores.

La Hb se satura al 100% a una presión de O_2 determinada en los pulmones (por su elevada presión) y desde ahí se distribuye a los tejidos. El aporte de O_2 a los tejidos se hace de forma autorregulada porque a medida que disminuye la presión de O_2 , mayor es el consumo de O_2 demandado por tejido, provocando que desde la sangre se ceda más O_2 (Hall *et al.*, 2021). La altitud contribuye a que la saturación O_2 sea menor (Acosta, 2018) porque disminuye la cantidad de O_2 en el aire, lo que implica que no llega suficiente O_2

a los tejidos. Como consecuencia se incrementa la producción de GR pero disminuye la cantidad de O₂ que se une a la Hb (Mortola y Wilfong, 2017).

3.4.1.3 Hematocrito

El Hto valora el porcentaje de sangre compuesta por los GR (relación GR/plasma) (Gordeuk *et al.*, 2019). En el análisis para valorar el Hto se procede centrifugando una muestra de sangre de la que se obtienen dos fracciones bien diferenciadas, separadas por un halo de color blanco. Una fracción compacta de color rojo es del volumen de GR en sangre. Sobre ella se aprecia pequeño halo blanquecino que se corresponde con los leucocitos y otra fracción líquida que se corresponde con el de plasma libre de células (García-Sacristán, 2018).

Los valores de Hto en sangre de ovino se han establecido entre 27-45% (Brooks *et al.*, 2022). El Hto puede sufrir cambios fisiológicos relacionados con la edad, así en recién nacidos su valor es más alto que en animales seniles. Por otro lado, las hembras tienen valores levemente inferiores que los machos. Otros factores exógenos que pueden influir en la elevación de los valores del Hto son el estrés, el manejo, la altitud y la deshidratación (Hack y Couto, 2010). Esto se debe a un aumento del número de GR bien por la estimulación de la eritropoyetina o por una esplenotomía que contribuye a la liberación de GR almacenados en el bazo (Jauchem *et al.*, 2019). La disminución del valor Hto refleja pérdidas de sangre (shock hemorrágico), situaciones de ayuno, estados anémicos (Li *et al.*, 2020).

Aunque, como se ha especificado más arriba, la fórmula leucocitaria se incluye en el hemograma, en esta tesis doctoral lo vamos a incluir en el apartado que se presenta a continuación por estar relacionada con el estrés.

3.4.2 Parámetros relacionados con el estrés

El estrés es la respuesta fisiológica que se produce en el organismo cuando se altera la homeostasis. El eje hipotalámico-hipofisario-glándula adrenal y el sistema nervioso simpático desempeñan un papel en la regulación de esta respuesta. Esto se consigue a través de acciones neuroendocrinas que resultan en cambios fisiológicos y de comportamiento (Hall, 2021). Los cambios fisiológicos se pueden comprobar valorando parámetros como leucocitos, neutrófilos, linfocitos, relación neutrófilos/linfocitos, glucosa y cortisol (Butler *et al.*, 2021).

3.4.2.1 Glóbulos Blancos o leucocitos

Los glóbulos blancos (GB) o leucocitos se diferencian de los GR porque tiene núcleo y disfrutan de movimientos independientes. Los leucocitos se clasifican en granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos) y agranulocitos (monocitos y linfocitos) (Frandsen, 2014).

Se han publicado variaciones estacionales en los recuentos de leucocitos en rumiantes, observándose una elevación de los recuentos durante el periodo estival. También se ha estudiado la influencia de la dieta observándose una linfocitosis y monocitosis en vacas alimentadas con ensilado de hierba vs a las alimentadas con forraje (Brooks *et al.*, 2022)

3.4.2.1.1 Neutrófilos

Los neutrófilos son GB más abundantes en los mamíferos (engloban entre el 40 y 70% del total de los leucocitos) y se consideran un componente esencial de las respuestas inmunes innatas y los mecanismos de defensa del huésped (Carmona-Rivera y Kaplan, 2016). Se producen en la médula ósea y se caracterizan por ser capaces de fagocitar macromoléculas y partículas y tener una vida corta (Actor, 2012). Los neutrófilos tienen un núcleo multilobulado distinto con múltiples gránulos que cubren su citoplasma como se aprecian en la Fig.6.

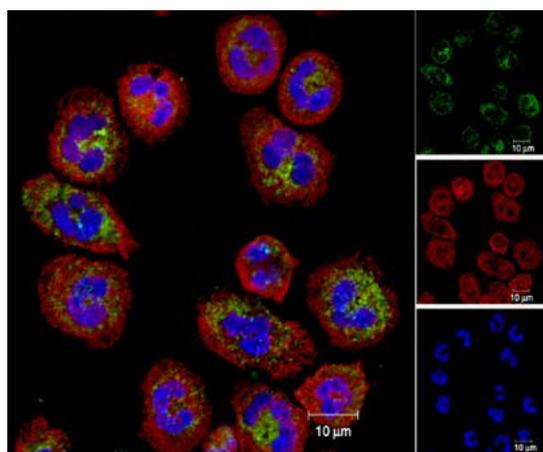


Fig. 6 Morfología de los neutrófilos. Fuente: Carmona-Rivera y Kaplan 2016, modificada.

Los neutrófilos vigilan continuamente el organismo intentando detectar señales de infecciones microbianas. Una vez que las localizan, actúan atrapando y destruyendo a

los patógenos que hayan invadido el organismo. Las tres funciones antimicrobianas que llevan a cabo los neutrófilos son fagocitosis, desgranulación y liberación de material nuclear en forma de trampas extracelulares de neutrófilos (NET) (Figura 7).

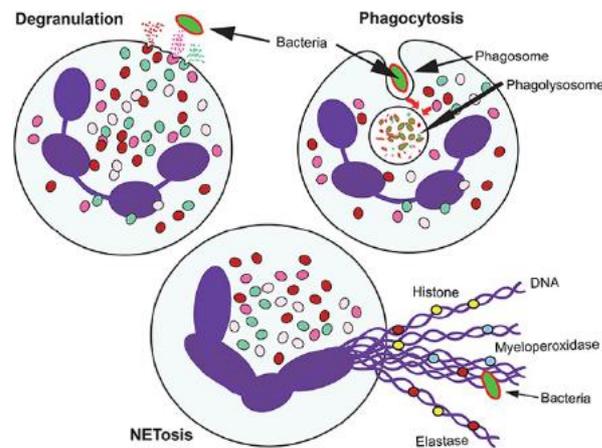


Fig. 7 Mecanismos antimicrobianos de los neutrófilos. Fuente. Rosales, 2018.

En la última década se ha comprobado que las funciones de los neutrófilos no quedan reducidas a las tres citadas anteriormente sino que, además, los neutrófilos responden a múltiples señales produciendo varias citocinas y otros factores inflamatorios que intervienen y regulan tanto la inflamación como el sistema inmunológico (Nauseef y Borregaard, 2014 ; Scapini y Cassatella, 2014). En la literatura científica está descrito que los neutrófilos son células complejas transcripcionalmente activas (Ericson *et al.*, 2014) que producen citocinas (Tecchio y Cassatella, 2016), modifican las actividades de las células adyacentes e intervienen en la resolución de la inflamación (Greenlee-Wacker, 2016), regulan los macrófagos para obtener respuestas inmunes a largo plazo (Chen *et al.*, 2014), contribuyen activamente en varias enfermedades como el cáncer (Uribe-Querol y Rosales, 2015 ; Mishalian *et al.*, 2017), e incluso tienen un papel en la memoria del el sistema inmunológico innato (Netea *et al.*, 2016). El porcentaje de neutrófilos en la especie ovina es de 10-50% (Winter *et al.*, 2022).

3.4.2.1.2 Linfocitos

Los linfocitos (leucocitos agranulares) son células que colaboran en la respuesta inmune adaptativa. Su aspecto y tamaño es variable y tienen núcleo relativamente grande rodeado por una pequeña parte de citoplasma. Los valores de referencia de linfocitos en ovejas son de 40-55% (Winter *et al.*, 2022).

La sangre es el vehículo que favorece el desplazamiento de los linfocitos por el organismo y pueden abandonarla deslizándose hacia el interior de los tejidos. Los linfocitos se dividen en dos tipos: los B (de “bursa de Fabricius”) responsables de la inmunidad humoral y los T (maduran en el timo) que son los encargados de la inmunidad celular. Ambos contienen subtipos. Tanto linfocitos B como T se originan en la médula ósea y se pueden encontrar en la sangre y en el sistema linfático. Los linfocitos se observan fácilmente en frotis sanguíneos (García-Sacristán, 2018).

Una de las principales funciones de los linfocitos es la formación de anticuerpos como respuesta a los antígenos presentes en el organismo o mediante el desarrollo de inmunidad celular (Cunningham, 2020).

3.4.2.2 *Glucosa*

La glucosa es el sustrato energético esencial para el organismo. Después de la ingestión de los alimentos y una vez absorbidos los monosacáridos, la glucosa penetra en la célula por difusión facilitada con ayuda de la proteína transportadora de glucosa (GLU) (Abali *et al.*, 2021). El control endocrino de la regulación de los niveles de glucosa en sangre lo lleva a cabo las hormonas insulina y el glucagón. La insulina con su función anabólica contribuye al transporte y almacenamiento de la glucosa en las células y, además, ayuda a que se pueda utilizar la glucosa como fuente de energía. El glucagón tiene una función catabólica porque al disminuir los niveles de glucosa en sangre movilizando los nutrientes para mantener la homeostasis (Butler *et al.*, 2021). Por lo tanto, estas dos hormonas mantienen la glucemia en niveles constantes, independiente de factores asociados a la dieta. (García-Sacristán, 2018). Los valores de referencia son ovinos son 50-80 mg/dl (Winter *et al.*, 2022).

Los rumiantes, mediante la digestión fermentativa en los preestómagos, digieren los hidratos de carbono, por ello, aunque el intestino delgado está preparado para absorber la glucosa, generalmente este hidrato de carbono no llega al intestino porque fermenta rápidamente en el rumen. Los rumiantes sintetizan la mayor parte de la glucosa, mediante el proceso de fermentación ruminal, convirtiéndola en ácido propiónico (ácido graso volátil de 3 carbonos, subproducto de la fermentación) (Cunningham, 2020). Este ácido se absorbe en la paredes del rumen y se transforma en glucosa en el hígado (Russi, 2020). Como consecuencia de este hecho, los rumiantes viven en un estado constante de escasez de glucosa.

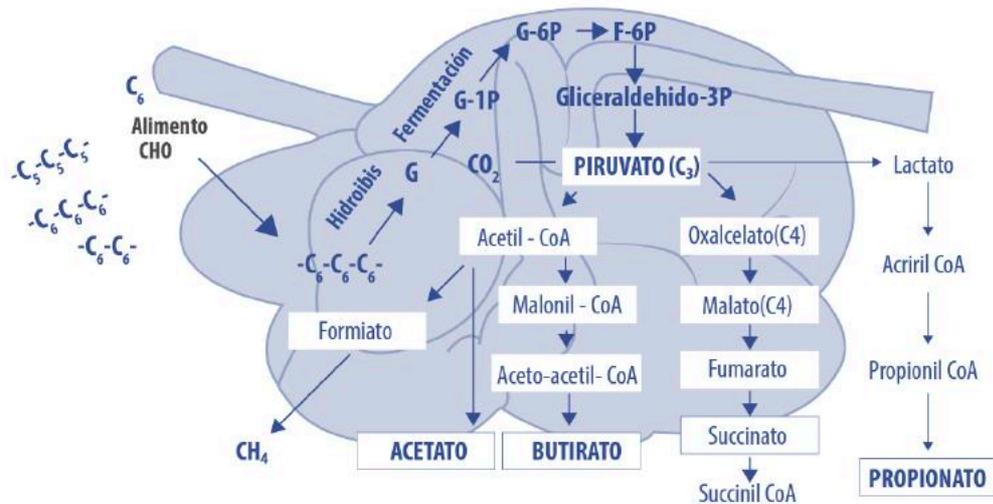


Fig. 8 Proceso de la digestión de los hidratos de carbono en el sistema digestivo de los ruminantes. Fuente: Russi, 2020.

La concentración de glucosa es un buen indicador indirecto de estrés (Tadich *et al.*, 2005). Esto se debe a que durante la respuesta inicial al estrés se produce una estimulación de la glucogénesis hepática como consecuencia de la liberación de catcolaminas y, por lo tanto, en pocos minutos incrementan los niveles de glucosa en sangre. Además, participan el cortisol, la insulina y el glucagón (Bórnex *et al.*, 2009). Asimismo, pasada esa fase inicial, durante el estrés propiamente dicho, los niveles de cortisol activan la glicólisis hepática, la gluconeogénesis e incremento del catabolismo de las proteínas libres (Knowles y Warris, 2006; Tadich *et al.*, 2005). La concentración de glucosa sanguínea en ovinos de 50-80 mg/dL (Winter *et al.*, 2022).

3.4.2.3 Cortisol

El cortisol es un glucocorticoide que, a pesar de que por el incremento su concentración en plasma, su inestabilidad y su vida corta es un indicador neuroendocrino primario, también es un marcador biológico clave en la valoración del estrés (Tadich *et al.*, 2005). Para evaluar los niveles de cortisol es fundamental conocer los valores de referencia y considerar que hay factores que pueden interferir en la interpretación de los resultados: el ritmo circadiano, enfermedades, el estrés calórico, ejercicio, ordeño, lactación, etc. (Sapolsky *et al.*, 2000; Gallo *et al.*, 2003; Trevisi y Bertoni, 2009; Agüera *et al.*, 2023).

La exposición reiterada a factores estresantes conduce a niveles bajos de cortisol en el ganado y su respuesta a estos estresores varía según la experiencia previa, duración, intensidad y tipo de factor estresante. Por lo que ante un mismo estresor obtiene respuestas diferentes en cada animal (Parker *et al.*, 2004; Solano *et al.*, 2004; Winter *et al.*, 2022).

3.4.3 Parámetros metabólicos relacionados con el bienestar animal

3.4.3.1 *Lactato deshidrogenasa*

La LDH es un grupo de isoenzimas oxidorreductasa que catalizan la reacción reversible entre piruvato y lactato. Las cinco isoformas de esta enzima, formadas a partir de dos subunidades, varían en puntos isoeléctricos y estas isoformas tienen diferente afinidad de sustrato, constantes de inhibición y movilidad electroforética. La separación electroforética de las isoenzimas es necesaria para localizar la fuente de mayor actividad (Nelson y Cox, 2018). Estas propiedades bioquímicas desempeñan un papel clave en su especificidad celular, tisular y orgánica. Aunque la LDH está presente preferentemente en el citoplasma, también se puede ubicar en diferentes órganos y tejidos aunque con mayor presencia en el cerebro, los pulmones, el corazón, los músculos, los riñones, el hígado y en los glóbulos rojos (Khan *et al.*, 2020). Los valores de referencia en ovino son 238-440 UI/L (Winter *et al.*, 2022).

La LDH desempeña un papel muy importante en el metabolismo corporal general y algunas señales pueden inducir el cambio de isoenzimas en determinadas circunstancias, asegurando que los tejidos mantengan consistentemente un suministro adecuado de ATP. Esta enzima también experimenta algunas modificaciones postraduccionales, para tener funciones metabólicas diferenciadas. Diversas complicaciones toxicológicas y patológicas dañan distintos órganos, lo que finalmente provoca la fuga de esta enzima en el suero. Por lo tanto, el nivel inusual de isoformas de LDH en suero sirve como un biomarcador importante de diferentes enfermedades. En general, la LDH juega un papel clave en el diagnóstico clínico de diversas enfermedades comunes y raras, ya que esta enzima tiene un papel destacado en la actividad metabólica (Khan *et al.*, 2020).

3.4.3.2 *Creatin fosfoquinasa*

La CPK es una enzima citoplasmática fundamental para el transporte y almacenamiento de energía en las células musculares. Se encuentra en altas concentraciones en el tejido cardíaco y musculo-esquelético y en menores

concentraciones en el cerebro y otros órganos (Venace, 2016). Existen tres isoenzimas: MM, MB y BB. Por un lado, el músculo esquelético contiene principalmente MM (95%), el músculo cardíaco MM (80%) y MB (20%). Por otro lado, el cerebro, el sistema gastrointestinal y el aparato genitourinario contienen mayoritariamente BB (D'Ottavio *et al.*, 2008). La CK-MM es la isoenzima que constituye casi todas las enzimas circulantes en individuos sanos (Chawla, 2011; Venace, 2016).

La medición de CPK sérica es el estudio diagnóstico más utilizado ante la sospecha de una enfermedad neuromuscular. Sin embargo, niveles elevados de esta enzima pueden estar relacionados con factores de género, raza, edad, masa muscular o actividad física (Saad *et al.*, 2022). Los valores de referencia en ovino son entre 8,1 y 12,9 UI/L (Winter *et al.*, 2022).

3.4.3.3 *Aspartato amino transferasa*

La AST tiene la capacidad de transferir reversiblemente el grupo amino del aspártico al cetoglutarico, convirtiéndose en glutámico y oxalacético. Los valores de referencia en ovinos son de 60 a 280UI/L (Winter *et al.*, 2022). La presencia de AST en la fibra muscular asegura el aporte de oxalacético necesario en el ciclo de Krebs ante la intensa llegada de acetil Co-A de la lipólisis. De esta forma, se evitaría la inadecuada utilización de este último compuesto frente a las grandes demandas de energía, su acumulo e incluso la formación de cuerpos cetónicos (Nelson y Cox, 2018).

Un incremento de la actividad de cualquiera de estas enzimas indica un desorden patológico asociado a diversas patologías del hígado y también del músculo (Winter *et al.*, 2022).

3.4.3.4 *Fosfatasa alcalina*

La FAL es una enzima hidrolasa responsable de eliminar grupos de fosfatos de nucleótidos, proteínas y alcaloides. Como sugiere su nombre, las fosfatasas alcalinas son más efectivas en un ambiente alcalino. El proceso de eliminar el grupo fosfático se denomina desfosforilación. Se encuentran presentes en casi todos los tejidos del organismo, siendo particularmente alta en huesos, hígado, placenta, intestinos y riñón (Guyton, 2021).

Esta enzima procede de la ruptura normal de las células sanguíneas y de otros tejidos, muchas de ellas no tienen un papel metabólico en el plasma excepto las enzimas

relacionadas con la coagulación y con el sistema del complemento (Nelson y Cox, 2018). Los valores de referencia en la especie ovina son de 68-387 U/L (Winter *et al.*, 2022).

3.4.3.5 *Glutamato deshidrogenasa*

La enzima GDH está bien caracterizada en organismos vertebrados. Puede ser dependiente de NAD y NADP y se ha purificado en diversas especies a partir de diferentes tejidos como riñón, corazón, cerebro, mucosa intestinal, etc. Es una enzima de la matriz mitocondrial y realiza una doble función, tanto catabólica como anabólica según las necesidades celulares. Aunque la mayor parte del glutamato se sintetiza a través de la vía de las transaminasas, se ha comprobado que en situaciones de exceso de amonio, la GDH puede funcionar como vía de síntesis de dicho aminoácido (Kanamori y Ross, 1995), o como mecanismo de detoxificación celular. En el sentido catabólico la enzima funciona cuando se requiere 2-oxoglutarato, o cuando por exceso de glutamato es necesario el reciclaje de este aminoácido (Plaitakis *et al.*, 2000). Esta enzima es fácil localizarla en el parénquima hepático, y posee un efecto protector del hepatocito (Winter *et al.*, 2022).

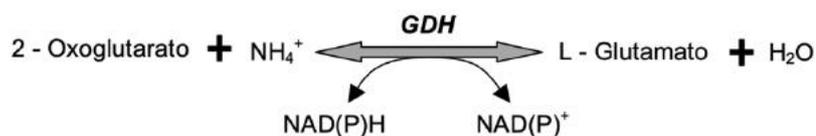


Fig. 9 Reacción catalizada por la GDH. Fuente: Teji3n, 2016.

3.4.3.6 *Prote3nas plasmáticas totales y relación albuminas/globulinas*

El plasma contiene una mezcla de proteínas con diferentes propiedades, funciones y concentraciones, denominadas conjuntamente como proteínas totales. Las proteínas plasmáticas son sintetizadas principalmente en el h3gado (>80 % de las PPT) y por los plasmocitos (~15 %). Las fracciones principales de proteínas plasmáticas est3n formadas por: alb3mina (55 %), globulinas (38 %) y fibrin3geno (7 %). El suero es la parte del plasma que est3 desprovista de fibrin3geno (obtenido por centrifugado de la sangre coagulada). El contenido de proteínas s3ricas individuales puede determinarse mediante electroforesis. La suma de las concentraciones de todas y cada una de las proteínas presentes en el plasma se conoce como PPT (Garc3a Sacrist3n, 2018; Cunningham, 2020; Guyton 2021).

Las proteínas pueden ser clasificadas según su composición, su disposición espacial, su función biológica y su localización. Según su localización las proteínas se clasifican en tisulares y plasmáticas. Los valores de referencia de la PPT en ovejas son entre 6-7,5 g/dL. Los valores de albúmina son entre 2-30 g/L (0,2-3 g/dL), los de las globulinas entre 35-57 g/L (3,5-5,7 g/dL) y los del fibrinógeno entre 100 y 500 mg/L (Winter *et al.*, 2022).

La albúmina tiene como función fisiológica proporcionar presión coloidosmótica al plasma para evitar la salida de este por los capilares. Las globulinas cumplen diferentes funciones enzimáticas en el plasma pero, además, se ocupan de la inmunidad natural y adquirida del organismo frente a los microorganismos invasores. El fibrinógeno se polimeriza en largos filamentos de fibrina durante la coagulación sanguínea, formando coágulos de sangre que ayudan a reparar las pequeñas roturas del aparato circulatorio (Guyton, 2021).

3.4.3.7 *Inmunoglobulinas*

El sistema inmunológico salvaguarda al organismo contra enfermedades infecciosas reconociendo a agentes extraños, atacándolos y destruyéndolos. Mientras más efectivas sean estas acciones inmunes mayor será la resistencia a las infecciones de un animal o persona (Gleenson *et al.*, 2006).

Las Igs son proteínas heterodiméricas compuestas por 2 cadenas pesadas y 2 ligeras iguales entre sí, unidas por puentes disulfuro que confieren estabilidad a la molécula, y siendo la longitud de las primeras aproximadamente el doble de las segundas. Las Igs, en general, tienen dos funciones principales: el de ser moléculas efectoras solubles, que pueden unirse individualmente y neutralizar los antígenos a distancia y el de ser receptores de antígenos en la superficie celular. Existen cinco tipos básicos de Igs: IgG, IgM, IgA, IgD e IgE. Las IgM e IgD son sintetizadas por linfocitos y las IgG, IgA e IgE son sintetizadas por las células plasmáticas (Schroeder y Cavacini, 2010).

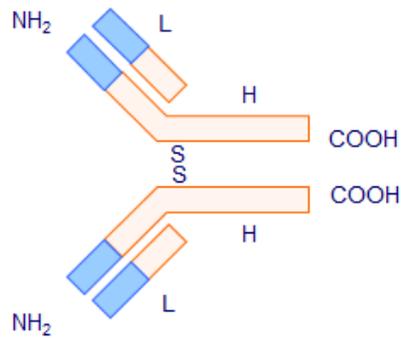


Fig. 10 Unidad básica de Igs. Cadenas pesadas (H), cadenas ligeras (L). Fuente: www.inmunosalud.net

En ganado ovino, la IgG es la Ig predominante, al igual que ocurre en el ganado bovino. Está codificada como IgG1, IgG2 e IgG3. Además, en menor cantidad, tiene IgA (Tizard, 2018).

La IgA aparece principalmente en secreciones (saliva, secreción intestinal, lágrimas etc.). Se caracteriza por ser la proteína antimicrobiana más abundante que protege las superficies mucosas (Brandtzaeg, 2003), lugar en el que comienzan infinidad de infecciones (Mazanec *et al.*, 1993; Lam, 1997; Bosch *et al.*, 2002; Neville *et al.*, 2008). La IgA secretora proporciona una barrera inmunológica al neutralizar y prevenir que los patógenos virales penetren en el cuerpo a través de las superficies mucosas (Mazanec *et al.*, 1993; Lam, 1997; Neville *et al.*, 2008).

La IgG está formada y secretada por las células plasmáticas del bazo, los nódulos linfáticos y la médula ósea. Esta Ig es el anticuerpo más común y que alcanza la mayor concentración en sangre. Se detecta fundamentalmente en el plasma sanguíneo y el líquido intersticial teniendo un rol principal en los mecanismos de defensa mediados por anticuerpos. También es una de las proteínas más abundantes en el suero y representa alrededor del 10 al 20% de todas las proteínas plasmáticas. La IgG aparece durante la primera y segunda respuesta inmune activando el sistema del complemento y los macrófagos (Brandtzaeg, 2003; Vidarsson *et al.*, 2014). La IgG coopera con la IgA para optimizar la inmunidad, la homeostasis y la tolerancia (Chen *et al.*, 2020).

Tabla 2 Principales clases de inmunoglobulinas existentes en los animales domésticos. Fuente: Tizard, 2019.

CLASES DE INMUNOGLOBULINAS					
Propiedad	IgM	IgG	IgA	IgE	IgD
Peso molecular	900.000	180.000	360.000	200.000	180.000
Subunidades	5	1	2	1	1
Cadena pesada	μ	γ	α	ϵ	δ
Lugar de síntesis	Bazo y ganglios linfáticos	Bazo y ganglios linfáticos	Tracto intestinal y respiratorio	Tracto intestinal y respiratorio	Bazo y ganglios linfáticos

3.5 PARÁMETROS PRODUCTIVOS

En condiciones de campo los métodos utilizados para evaluar las reservas corporales del ganado son el peso vivo y la condición corporal (Crempien *et al.*, 1993; Herrera-Corredor *et al.*, 2021).

3.5.1 Peso corporal

El peso corporal (PC) es entendido como el peso animal que se toma en una balanza siendo uno de los métodos más exactos para establecer el crecimiento del ganado (Wishart *et al.*, 2017). No obstante, los ganaderos no suelen tener básculas para pesar el ganado por su alto coste económico (Kunene *et al.*, 2009; Sebolai *et al.*, 2012; Chay-Canul *et al.*, 2019). Además, el ganado ovino puede perder peso de forma significativa en la manipulación antes del pesaje que puede constituir una pérdida de ente el 3,5 y el 5,6% (Whisart *et al.*, 2017; Chay-Canul *et al.*, 2019). Hay explotaciones que utilizan métodos biométricos alternativos como son la altura a la cruz, la longitud del cuerpo y la circunferencia del corazón. Diferentes investigadores (Sowande y Sobola, 2008; Yilmaz *et al.*, 2013; Chay-Canul *et al.*, 2019) han demostrado que la circunferencia del corazón está correlacionada positivamente con el peso corporal en diferentes razas de ovejas y cabras.

3.5.2 Condición Corporal

La condición corporal (CC) es una medición subjetiva del estado físico-nutricional de los animales para evaluar si el nivel de alimentación es correcto. Se trata de una herramienta de bajo costo que permite realizar ajustes de la dieta para mejorar el rendimiento de los animales y los resultados económicos del rebaño (Romero, 2015). Esta técnica se desarrolla en base a una escala de 1 a 5, con divisiones al medio de cada punto cuando es necesaria la toma de decisiones específicas para aumentar la eficiencia productiva y reproductiva (Giraud, 2009; Romero, 2015; Herrera 2021).

Tabla 3 Clasificación de la condición corporal según los diferentes estados fisiológicos. Fuente: Romero, 2015.

CLASIFICACIÓN	
ESTADO FISIOLÓGICO	CONDICIÓN CORPORAL
Cubrición	2,5-3,0
Gestación temprana	3,0-3,5
Gestación avanzada	2,5-3,0
Inicio de lactancia	3,0-3,5
Lactancia avanzada	2,0-2,5

4 MATERIAL Y MÉTODOS

El material y métodos se va a describir para cada uno de los ensayos.

4.1 ENSAYO 1

4.1.1 Animales

La investigación se llevó a cabo en una explotación ovina situada en la localidad de Pedroche, en el Valle de los Pedroches (norte de la provincia de Córdoba, España). Esta explotación contaba con dos praderas adyacentes de 30 hectáreas cada una. Una de ellas sembrada de tritordeum y la otra de avena. Se evaluaron un total de 150 ovejas Merinas preñadas de entre 3 y 5 años de edad. Antes del inicio del estudio, según el protocolo descrito por Martínez-Ros *et al.* (2018), se sincronizó el celo de las ovejas mediante esponjas vaginales. A los 45 días, 150 animales gestantes fueron seleccionados utilizando el ecógrafo MyLabOneVet (ESAOTE, Barcelona, España) equipado con un transductor lineal multifrecuencia de 6-10 MHz para determinar el estado de gestación. A partir del 60º día de gestación se recogieron las primeras muestras para evitar el estrés que podría provocar la ecografía. Ninguna de ellas parió durante el estudio, aunque éste finalizó en el quinto mes de gestación.

Todos los animales gozaban de buena salud y estaban libres de enfermedades infecciosas o contagiosas y de infestaciones parasitarias en el momento de iniciarse el estudio. Estas ovejas se dividieron aleatoriamente en dos grupos: el grupo 1 ($n_1=75$) se alimentó con pradera de tritordeum y el grupo 2 ($n_2=75$) con pradera de avena durante la estación primaveral. Las ovejas fueron alimentadas *ab libitum* en la pradera durante 12 horas. Igualmente, se les suministró agua *ab libitum*.

4.1.2 Muestras

Se tomaron muestras de sangre de cada oveja al principio y al final del estudio. Con ellas se evaluó el efecto de la alimentación en praderas sobre parámetros relacionados con el bienestar animal (parámetros hematológicos, metabólicos e inmunitarios) y el estrés (parámetros leucocitarios, cortisol y glucosa). A la hora de

programar la toma de muestras se tuvo en cuenta el ritmo circadiano del cortisol. Las extracciones se realizaron a las 14.00 horas, después de un periodo de siesta, para no interferir con los picos matinales de cortisol (Squires, 2006). El periodo entre muestreos fue de 3 meses. La frecuencia de muestreo fue baja para evitar que el estrés de la manipulación de los animales influyera en los parámetros estudiados (es decir, el cortisol).

Se punzó la vena yugular externa para obtener muestras de sangre. Se utilizaron tubos Vacutainer® (con y sin anticoagulante). La sangre se separó en tres alícuotas: una en un tubo con anticoagulante EDTA, otra en un tubo con heparina-litio y otra sin anticoagulante. La alícuota con EDTA se mantuvo refrigerada hasta su posterior análisis en el laboratorio en las 24 horas siguientes a la recogida. Las alícuotas con heparina-litio y sin anticoagulante se centrifugaron a 3000 rpm en los 10 minutos siguientes a la recogida. Se obtuvieron plasma y suero, ambos se congelaron a -20°C hasta análisis posteriores.



Fig. 11 Toma de muestra de sangre en la vena yugular externa de oveja. Fuente: propia.

4.1.3 Parámetros fisiológicos

Los parámetros fisiológicos analizado en sangre fueron recuento de GR, Hb, Hto, y recuento de GB. Se midió el porcentaje de neutrófilos y linfocitos y se calculó el cociente neutrófilos/linfocitos. Los parámetros analizados en plasma fueron LDH, CPK, AST, GDH, PPT y la glucosa. En cuanto a los parámetros investigados en suero fueron albúmina, globulinas, FAL, cortisol e IgA, IgG.



Fig. 12 Evaluación de los parámetros fisiológicos. Fuente: propia.

4.2 ENSAYO 2

4.2.1 Animales

El ensayo se llevó a cabo en la Granja Universitaria de Rabanales de la Universidad de Córdoba. Se evaluaron 100 ovejas de raza merina de 3-4 años de edad. Todos los animales gozaban de buena salud y estaban libres de enfermedades infecciosas o contagiosas y de infestaciones parasitarias en el momento de iniciarse el estudio. Las ovejas fueron alimentadas con forrajes ensilados a base de maíz y DRRR procedente de COVAP. Estas ovejas se dividieron aleatoriamente en dos grupos: El grupo 1 ($n_1=50$) fue alimentado con ensilado de maíz con contenidos no superiores a los permitidos en micotoxinas para alimentación animal y el grupo 2 ($n_2=50$) se alimentó con ensilado de DRRR. Los animales disponían de agua *ab libitum*. Ninguna oveja se encontraba gestante.

Este trabajo experimental se llevó a cabo con la autorización de Comité de Bioética de la Universidad de Córdoba.



Fig. 13 Ovejas alimentadas con ensilado de DRRR a la izquierda y con ensilado de maíz a la derecha. Fuente: propia.

4.2.2 Muestras

Se tomaron muestras de sangre de cada oveja al inicio y al final del ensayo, cuya duración fue de tres meses. Las muestras se extrajeron de la vena yugular externa mediante la utilización de tubos Vacutainer® (con y sin anticoagulante). La sangre se separó en tres alícuotas: una en un tubo con anticoagulante EDTA, otra en un tubo con heparina-litio y otra sin anticoagulante. La alícuota con EDTA se mantuvo refrigerada hasta su posterior análisis en el laboratorio en las 24 horas siguientes a la recogida. Las alícuotas con heparina-litio y sin anticoagulante se centrifugaron a 3000 rpm en los 10 minutos siguientes a la recogida. Se obtuvieron plasma y suero, ambos se congelaron a -20°C hasta análisis posteriores.

4.2.3 Parámetros fisiológicos

Los parámetros fisiológicos analizado en sangre fueron recuento de GR, Hb, Hto, y recuento de GB. Se midió el porcentaje de neutrófilos y linfocitos y se calculó el cociente neutrófilos/linfocitos. Los parámetros analizados en plasma fueron LDH, CPK, AST, GDH, PPT y la glucosa. En cuanto a los parámetros investigados en suero fueron albúmina, globulinas, se calculó el cociente albúmina/globulina, FAL, cortisol e IgA, IgG.

4.2.4 Parámetros zootécnicos:

La ganancia de peso se controló pesando a las ovejas con una con báscula electrónica marca Torrey FS-250/50, con capacidad de 250 kg y una aproximación de ± 0.05 kg. El índice de CC en las ovejas se realizó mediante la palpación con los dedos en las apófisis espinosas y transversas de la columna vertebral a nivel lumbar (Fig. 13) (Herrera-Corredor *et al.*, 2021).

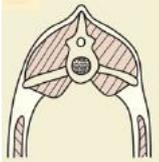
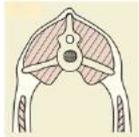
Según la palpación se estableció una escala del 1 al 5, en la que el 1 indica que la oveja está en estado de emaciación y el 5 obesa.

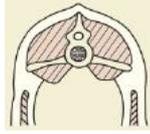
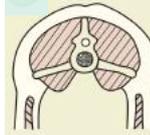
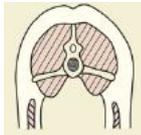


Fig. 14 Evaluación de la condición corporal en ovinos. Fuente: Propia y Romero, 2015.

Siguiendo a Romero (2015) y Herrera-Corredor *et al.*, (2021), la condición corporal se registró de la siguiente forma:

Tabla 4 Categorización de la condición corporal.

CATEGORIZACIÓN	
GRADO	DESCRIPCIÓN
<p>CC 1: Emaciación</p>	<p>Los dedos se introducen fácilmente. La piel está pegada a la base de la pelvis y de la cola. Las vértebras lumbares son perceptibles a la vista y al tacto. Las apófisis transversa y espinosa están muy marcadas, sin cobertura de grasa.</p> 
<p>CC 2: Delgada</p>	<p>Los dedos penetran con cierta facilidad. A la palpación las apófisis están prominentes pero suaves. Se nota una capa de grasa moderada.</p> 

CC 3: Buena	<p>Los dedos se introducen con mayor presión. Base de la cola y pelvis se notan con una cubierta grasa y muscular adecuada Las costillas se palpan redondeadas.</p> 
CC 4: Gorda	<p>Área de la base de la cola y la pelvis están redondeadas.</p> 
CC 5: Obesa	<p>El área de la base de la cola y la pelvis, sin angularidades no se palpan prominencias óseas. Apófisis espinosa de las vértebras lumbares y apófisis transversa no se detectan. Las costillas no se palpan ni la depresión entre ellas.</p> 

4.2.5 Composición nutricional y de los principales hongos productores de micotoxinas en los forrajes utilizados (maíz y DDDR).

A continuación se proporciona información detallada de los nutrientes presentes en los dos tipos de ensilados para ofrecer una visión integral de la calidad nutricional del forraje para poder valorar su impacto en los parámetros zootécnicos de bienestar animal.

Tabla 5 Composición química de los forrajes ensilados.

CALIDA NUTRICIONAL DE LOS ENSILADOS		
COMPOSICIÓN QUÍMICA (%)	ENSILADO DDDR	ENSILADO MAÍZ
Materia Seca	30,1	30,9
Proteína Bruta	7,3	7,13
Fibra Bruta	37,5	24,5
Fibra Ácido Detergente	42,8	26,8
Fibra Neutro Detergente	67,6	46
Grasa Bruta	6,6	4,20
Cenizas	2,11	4,18

En la siguiente tabla se detalla información sobre la presencia y concentración de micotoxinas presente en los forrajes ensilados utilizados en este ensayo, los cuales fueron enviados a un laboratorio de referencia para su análisis.

Tabla 6 Contenido de micotoxinas (ppb o mg/Kg)

MICOTOXINAS: DATOS RECIBIDOS DEL LABORATORIO DE REFERENCIA					
ALIMENTACIÓN	AFB ₁	Deoxinivalenol	Toxina T ₂	Fumonisin	Zearalenona
Ensilado DDRR	1,6	10,5	5,7	13	<LD
Ensilado Maíz	4,8	27,1	15,1	46	<LD

*<LD : inferior a límite detectable.

4.2.6 Estudio anatomopatológico e histopatológico.

Se le practicó una necropsia reglada a los animales que causaron baja en las instalaciones del Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas, de la Universidad de Córdoba con el fin de observar las alteraciones morfológicas, macro y microscópicas producidas por el consumo de la alimentación a base de los forrajes ensilados.

Aparte se enviaron a matadero la totalidad de animales de ambos, ya que productivamente se había determinado así, y se podían utilizar los datos para el presente estudio con el fin de valorar las posibles lesiones macroscópicas en matadero y tomar muestras de biopsia de hígado para su estudio histopatológico.



Fig. 15 Necropsia de una de las ovejas del ensayo. Fuente: Propia.

4.3 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron con SPSS v29 (IBM® Statistical Package for the Social Sciences). En primer lugar, se analizó la normalidad de los datos mediante el test de Kolmo-gorov-Smirnov utilizando el estadístico corregido de Lilliefors (1967) para determinar si se debía aplicar estadística par-amétrica o no-paramétrica. Posteriormente, se calcularon la media y su error estándar para los dos grupos con alimentación diferente, considerando tanto la medición inicial (T0) como la medición final (T1). Por último, se aplicaron técnicas estadísticas paramétricas para concluir el análisis y determinar el efecto de una dieta u otra sobre las medias de los parámetros analizados. La utilización de estas técnicas también se justificó porque la muestra era suficientemente grande. Así, como cada grupo de alimentación constituye en sí mismo una muestra dependiente, ya que cada animal que lo compone tiene dos mediciones de los parámetros en estudio, una inicial (T0) y otra final (T1), se aplicó la prueba t de Student para muestras pareadas (McDonald, 2014). Esta prueba permite determinar si existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias iniciales y finales de cada una de las variables analizadas, estableciendo un nivel de significación del 5% para los contrastes. Los resultados se presentan en tablas agrupadas en cuatro bloques diferentes de tipos de parámetros relacionados con el bienestar animal.

1 RESULTADOS

4.4 RESULTADOS DEL ENSAYO 1

En primer lugar, se calculó la media y el error estándar medio para cada parámetro en los dos grupos de alimentación considerados (avena y tritordeum). Posteriormente, se realizó un contraste de medias para muestras dependientes (pareadas) en cada uno de ellos para estudiar si existían diferencias en las medias entre las dos mediciones de cada uno de los parámetros. Las tablas 1 a 4 muestran la media y el error estándar de la media de los parámetros que componen el grupo para los dos tipos de alimentación, así como la probabilidad límite asociada al estadístico t que nos permite concluir sobre el contraste de hipótesis para ver el efecto que cada dieta tiene sobre la media de los parámetros analizados.

4.4.1 Parámetros hematológicos relacionados con el bienestar animal

La Tabla 7 muestra diferencias estadísticamente significativas entre los valores medios de todos los parámetros hematológicos relacionados con el bienestar animal entre las mediciones iniciales y finales, tanto para las ovejas alimentadas con avena como para las alimentadas con tritordeum ($p < 0,001$). En cuanto a la variación que se produce en cada uno de los parámetros analizados, se puede observar cómo éstos disminuyen en el grupo alimentado con avena, mientras que aumentan en el grupo alimentado con tritordeum.

Tabla 7 Parámetros hematológicos relacionados con el bienestar animal.

Parámetros	Pradera de avena			Pradera de tritordeum		
	Inicio	Final	p-valor	Inicio	Final	p-valor
	Media ± SEM	Media ± SEM		Media ± SEM	Media ± SEM	
Glóbulos Rojos (10 ⁶ /mm ³)	9.80±0.07	9.41±0.06	<0.001 *↓	9.93±0.07	10.68±0.07	<0.001 *↑
Hemoglobina (g/dl)	9.89±0.07	9.62±0.06	<0.001 *↓	10.02±0.07	11.46±0.11	<0.001 *↑
Hematocrito (%)	32.71±0.22	31.71±0.21	<0.001 *↓	32.75±0.23	35.28±0.16	<0.001 *↑

Nota: Cálculo de la media ± SEM y prueba t de comparación de medias para muestras dependientes.

* Diferencias estadísticamente significativas al menos al 5% detectadas en la prueba de comparación de medias entre la medición inicial y la final para cada tipo de alimentación. Aparece ↑ o ↓ indicando si la diferencia significativa detectada es un aumento o disminución de la media en la medición final.

4.4.2 Leucocitos y parámetros relacionados con el estrés

La Tabla 8 muestra los resultados de las pruebas de comparación de medias de los parámetros leucocitarios y de los parámetros relacionados con el estrés. Muestra que no hay diferencias estadísticamente significativas en los valores medios de leucocitos ($p = 0,343$) y neutrófilos ($p = 0,351$) en las ovejas alimentadas con avena entre las dos mediciones. En cambio, en las ovejas alimentadas con pradera de tritordeum, se detectaron diferencias entre las dos mediciones para todos los parámetros considerados en este grupo ($p < 0,001$).

Centrando la atención en los linfocitos, cuya media muestra diferencias estadísticamente significativas entre las dos mediciones para ambas dietas, el incremento sufrido por éstos en los animales alimentados con tritordeum ($p < 0,001$) es notablemente superior al de los alimentados con avena ($0,002^*$). Por otro lado, el ratio neutrófilos/linfocitos, cuya media también muestra diferencias estadísticamente significativas para las dos dietas, muestra una disminución mucho más acentuada en el grupo alimentado con tritordeum ($p < 0,001$) (Tabla 8).

El cortisol, que muestra diferencias estadísticamente significativas entre la media de las dos mediciones para los dos alimentos ($p < 0,001$), presenta la particularidad de aumentar para la dieta de avena mientras que disminuye notablemente para la de tritordeum.

Tabla 8 Leucocitos y parámetros relacionados con el estrés.

Parámetros	Pradera de avena			Pradera de Triticordeum		
	Inicio	Final	p-valor	Inicio	Final	p-valor
	Media ± SEM	Media ± SEM		Media ± SEM	Media ± SEM	
Leucocitos (10 ³ /mm ³)	6.61±0.22	6.67±0.21	0.343	6.49±0.21	7.14±0.18	<0.001 *↑
Neutrófilos (%)	47.53±0.825	47.16±0.562	0.351	48.52±0.784	42.81±0.61	<0.001 *↓
Linfocitos (%)	42.83±0.65	43.96±0.41	0.002 *↑	43.23±0.75	53.95±0.78	<0.001 *↑
N/L	1.14±0.03	1.08±0.01	<0.001 *↓	1.14±0.02	0.81±0.02	<0.001 *↓
Cortisol (µg/dL)	11.81±0.47	12.03±0.42	0.048 *↑	12.01±0.47	7.41±0.31	<0.001 *↓
Glucosa (mg/dL)	64.55±1.55	73.09±1.16	0.001 *↑	63.71±1.34	84.75±1.42	<0.001 *↑

Nota: Cálculo de la media ± SEM y prueba t de comparación de medias para muestras dependientes.

* Diferencias estadísticamente significativas al menos al 5% detectadas en la prueba de comparación de medias entre la medición inicial y la final para cada tipo de alimentación. Aparece ↑ o ↓ indicando si la diferencia significativa detectada es un aumento o disminución de la media en la medición final.

4.4.3 Parámetros metabólicos relacionados con el bienestar animal

En cuanto al análisis de las diferencias observadas en los parámetros metabólicos relacionados con el bienestar animal, resulta de especial interés cómo varían en sentido contrario según se trate de una dieta de avena o de tritordeum (Tabla 9). Este es el caso de la LDH, cuyos valores medios entre mediciones muestran diferencias estadísticamente significativas en las dos dietas, aumentando en el caso de la avena y disminuyendo significativamente en el caso del tritordeum; un comportamiento similar se observa para los parámetros FAL y GDH.

El resto de los parámetros, que no presentan diferencias estadísticamente significativas en el grupo de ovejas alimentadas con avena, sí lo hacen para la dieta con tritordeum. Así, se observa una disminución de CPK y AST, y un aumento de PPT y albúmina.

Tabla 9 Parámetros metabólicos relacionados con el bienestar animal.

Parámetros	Pradera de avena			Pradera de tritordeum		
	Inicio	Final	p-valor	Inicio	Final	p-valor
	Media ± SEM	Media ± SEM		Media ± SEM	Media ± SEM	
LDH (IU/L)	641.15±8.01	664.45±7.11	<0.001 *↑	640.16±8.217	536.21±13.482	<0.001 *↓
CPK (IU/L)	379.41±18.68	369.37±16.85	0.546	387.57±18.80	286.27±17.59	<0.001 *↓
AST (IU/L)	128.60±2.34	125.85±1.71	0.344	130.28±2.087	111.95±3.806	<0.001 *↓
FAL (IU/L)	114.68±5.91	133.28±5.584	<0.001 *↑	115.15±5.91	90.64±2.71	<0.001 *↓
PPT (g/dL)	6.97±0.04	6.95±0.04	0.766	6.96±0.04	7.27±0.03	<0.001 *↑
GHD (IU/L)	9.29±0.36	9.35±0.36	<0.001 *↑	8.69±0.32	7.26±0.27	<0.001 *↓
Albumina (g/dL)	3.16±0.02	3.16±0.02	0.906	3.14±0.03	3.17±0.02	<0.001 *↑

Nota: Cálculo de la media ± SEM y prueba t de comparación de medias para muestras dependientes.

* Diferencias estadísticamente significativas al menos al 5% detectadas en la prueba de comparación de medias entre la medición inicial y la final para cada tipo de alimentación. Aparece ↑ o ↓ indicando si la diferencia significativa detectada es un aumento o disminución de la media en la medición final.

4.4.4 Parámetros inmunológicos relacionados con el bienestar animal

En la Tabla 10, los resultados correspondientes a los parámetros inmunológicos relacionados con el bienestar animal muestran que sólo se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre las medias de las dos mediciones para el parámetro IgA ovina ($p < 0,001$) al centrarse en la dieta de avena. En cambio, se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre las medias de las mediciones iniciales y finales de los cuatro parámetros en los animales alimentados con tritordeum ($p < 0,001$).

En particular, para las dos dietas consideradas, se observó un aumento de la IgA ovina entre las dos mediciones. También se observó un aumento de las globulinas y de la IgG en los animales alimentados con tritordeum. En cambio, la media albúmina/globulina disminuyó entre las dos mediciones para éstos.

Tabla 10 Parámetros inmunológicos relacionados con el bienestar animal.

Parámetros	Pradera de avena			Pradera de tritordeum		
	Inicio	Final	p-valor	Inicio	Final	p-valor
	Media ± SEM	Media ± SEM		Media ± SEM	Media ± SEM	
Globulinas (g/dl)	3.78±0.048	3.67±0.05	0.080	3.66±0.06	4.03±0.04	<0.001 *↑
Albumina/globulinas	0.84±0.01	0.87±0.01	0.101	0.87±0.01	0.79±0.01	<0.001 *↓
IgA (mg/dl)	7.54±0.23	7.76±0.23	<0.001 *↑	7.34±0.24	9.13±0.30	<0.001 *↑
IgG (mg/dl)	633.85±21.65	655.65±21.718	0.118	634.57±20.65	820.58±31.98	<0.001 *↑

Nota: Cálculo de la media ± SEM y prueba t de comparación de medias para muestras dependientes.

* Diferencias estadísticamente significativas al menos al 5% detectadas en la prueba de comparación de medias entre la medición inicial y la final para cada tipo de alimentación. Aparece ↑ o ↓ indicando si la diferencia significativa detectada es un aumento o disminución de la media en la medición final.

4.5 RESULTADOS DEL ENSAYO 2

En primer lugar, se calculó la media y el error estándar medio para cada parámetro en los dos grupos de alimentación considerados (ensilado DDRR y ensilado maíz). Posteriormente, se realizó un contraste de medias para muestras dependientes (pareadas) en cada uno de ellos para estudiar si existían diferencias en las medias entre las dos mediciones de cada uno de los parámetros. Las tablas 1 a 5 muestran, tanto para los parámetros que componen cada uno de los grupos, como para las variables peso y condición corporal, la media y el error estándar de la media para los dos tipos de alimentación, así como la probabilidad límite asociada al estadístico t que nos permite concluir sobre el contraste de hipótesis para ver el efecto que cada dieta tiene sobre la media de los parámetros analizados.

4.5.1 Parámetros hematológicos relacionados con el bienestar animal

En la Tabla 11 se puede observar cómo existen diferencias estadísticamente significativas en los valores medios de todos los parámetros hematológicos relacionados con el bienestar animal entre las mediciones inicial y final, para las ovejas alimentadas con ensilado de DDRR, mientras que, para las alimentadas con ensilado de maíz, las diferencias del parámetro hemoglobina no son estadísticamente significativas, y de bajo nivel de significación para los glóbulos rojos. En cualquiera de los casos, las diferencias detectadas indican un aumento de los parámetros en cuestión, entre las mediciones inicial

y final, mostrando un mayor aumento y significación en el ensilado de DDRR, frente al de maíz.

Tabla 11 Parámetros hematológicos relacionados con el bienestar animal para dos tipos de alimentación en ganado ovino.

Parámetros	Ensilado DDRR			Ensilado Maíz		
	Inicio	Final	p-valor	Inicio	Final	p-valor
	Media ± SEM	Media ± SEM		Media ± SEM	Media ± SEM	
Glóbulos Rojos (10 ⁶ /mm ³)	8.4252±0.11	9.8196±0.14	<0.001 *↑	8.2766±0.09	8.6120±0.15	0.016 *↑
Hemoglobina (g/dl)	8.4576±0.10	9.608±0.12	<0.001 *↑	8.4100±0.099	8.572±0.14	0.334
Hematocrito (%)	27.5404±0.32	31.0640±0.61	<0.001 *↑	28.1692±0.33	29.6100±0.61	0.004*↑

Nota: Cálculo de la media ± SEM y prueba t de comparación de medias para muestras dependientes.

* Diferencias estadísticamente significativas al menos al 5% detectadas en la prueba de comparación de medias entre la medición inicial y la final para cada tipo de alimentación. Aparece ↑ o ↓ indicando si la diferencia significativa detectada es un aumento o disminución de la media en la medición final.

4.5.2 Leucocitos y parámetros relacionados con el estrés

La Tabla 12 muestra los resultados del test de comparación de medias sobre los leucocitos y los parámetros relacionados con el estrés tanto en las ovejas que son alimentadas con ensilado de DDRR, como las que son alimentadas con ensilado de maíz. En el primero de los casos, todos los parámetros muestran diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$) que se materializan en disminuciones producidas entre la medición inicial y final para las variables leucocitos, neutrófilos, N/L y cortisol, y aumentos para las variables linfocitos y glucosa. Por el contrario, las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$) detectadas en las ovejas alimentadas con ensilado de maíz (a excepción de la variable linfocitos), cuya diferencia de medias resulta no relevante ($p=0,182$), muestran un comportamiento totalmente opuesto; es decir, las diferencias estadísticamente significativas detectadas entre las mediciones inicial y final, implican aumento en el caso de las variables leucocitos totales, neutrófilos, N/L y cortisol, y disminución para los linfocitos y la glucosa.

Tabla 12 Leucocitos y parámetros relacionados con el estrés para dos tipos de alimentación en ganado ovino.

Parámetros	Ensilado DDRR			Ensilado Maíz		
	Inicio	Final	p-valor	Inicio	Final	p-valor
	Media ± SEM	Media ± SEM		Media ± SEM	Media ± SEM	
Leucocitos (10 ³ /mm ³)	9.4160±0.29	7.3212±0.23	<0.001 *↓	9.4120±0.24	10.8740±0.32	<0.001 *↑
Neutrófilos (%)	46.84±0.99	37.00±1.24	<0.001 *↓	47.12±0.96	50.40±1.40	0.007*↑
Linfocitos (%)	49.56±1.16	59.14±1.26	<0.001 *↑	49.20±1.35	47.95±1.41	0.182
N/L	0.9942±0.04	0.6606±0.04	<0.001 *↓	1.0180±0.05	1.1196±0.05	0.025*↑
Cortisol (µg/dL)	6.9546±0.37	4.9902±0.33	<0.001 *↓	6,9678±0.31	10.2082±0.50	<0.001 *↑
Glucosa (mg/dL)	68.94±1.79	76.32±0.912	<0.001 *↑	71.66±1.56	86.72±1.68	<0.001 *↑

Nota: Cálculo de la media ± SEM y prueba t de comparación de medias para muestras dependientes.

* Diferencias estadísticamente significativas al menos al 5% detectadas en la prueba de comparación de medias entre la medición inicial y la final para cada tipo de alimentación. Aparece ↑ o ↓ indicando si la diferencia significativa detectada es un aumento o disminución de la media en la medición final.

4.5.3 Parámetros metabólicos relacionados con el bienestar animal

Centrando la atención en el análisis de las diferencias de medias observadas en los parámetros metabólicos relacionados con el bienestar animal, cuyos resultados se muestran en la Tabla 13, cabe destacar como para el caso de la alimentación de ensilado DDRR, todos ellos resultan significativas, mientras que no ocurre lo mismo en el caso de la alimentación de ensilado de maíz, en la que parámetros como LDH, PPT y GDH, no muestran diferencias estadísticamente significativas entre las mediciones inicial y final.

Concretamente, las medias de los parámetros LDH, CPK y albúmina disminuyen, mientras que AST, FAL, PPT y GHD aumentan, en las ovejas alimentadas con ensilado de DDRR. Por su parte, entre los parámetros cuyas medias muestran diferencias estadísticamente significativas para el rebaño alimentado con ensilado de maíz, se encuentran tres que se comportan de forma similar al anterior: AST y FAL, cuyos promedios presentan un aumento significativo entre las mediciones inicial y final, siendo el mismo de bastante mayor cuantía que el que experimentan los animales alimentados con DDRR, y albúmina que presenta una disminución significativa entre las medias inicial y final. De otro lado se tienen las diferencias de medias detectadas en el parámetro CPK, que sufre un aumento muy considerable entre las mediciones inicial y final, al contrario que ocurre en las ovejas alimentadas con DDRR.

Tabla 13 Parámetros metabólicos relacionados con el bienestar animal para dos tipos de alimentación en ganado ovino.

Parámetros	Ensilado DRRR			Ensilado maíz		
	Inicio	Final	p-valor	Inicio	Final	p-valor
	Media ± SEM	Media ± SEM		Media ± SEM	Media ± SEM	
LDH (IU/L)	690,28±14.46	448.52±12.69	<0.001 *↓	676.40±13.410	712.90±29.855	0.284
CPK (IU/L)	278.26±25.37	209.54±10.56	<0.001 *↓	241.10±16.86	668.00±18.983	0.024*↑
AST (IU/L)	93.76±3.88	118.04±4.36	<0.001 *↑	120.10±6.79	426.18±21.56	<0.001 *↑
FAL (IU/L)	178.80±14.42	192.82±17.522	0.013 *↑	182.60±12.56	483.22±25.35	<0.001 *↑
PPT (g/dL)	5.9658±0.09	6.5824±0.10	<0.001 *↑	6.0950±0.07	6.1076±0.11	0.870
GHD (IU/L)	9.1202±0.45	20.5126±0.85	<0.001 *↑	7.7972±0.28	7.4090±0.65	0.578
Albumina (g/dL)	3.1654±0.13	2.8364±0.04	<0.001 *↓	3.05±0.11	2.6834±0.05	<0.001 *↓

Nota: Cálculo de la media ± SEM y prueba t de comparación de medias para muestras dependientes.

* Diferencias estadísticamente significativas al menos al 5% detectadas en la prueba de comparación de medias entre la medición inicial y la final para cada tipo de alimentación. Aparece ↑ o ↓ indicando si la diferencia significativa detectada es un aumento o disminución de la media en la medición final.

4.5.4 Parámetros inmunológicos relacionados con el bienestar animal

En la Tabla 14, los resultados correspondientes a los parámetros inmunológicos relacionados con el bienestar animal muestran que sólo se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre las medias de las dos mediciones para los parámetros IgA e IgG ($p < 0,001$) cuando se trata de ovejas alimentadas con ensilado de maíz, en las que las medias de los citados parámetros disminuyen. Por otra parte, para el caso de las ovejas alimentadas con ensilado de DRRR, se encuentran diferencias estadísticamente significativas en el caso de los cuatro parámetros considerados. Sin embargo, las globulinas, IgA e IgG, presentan un aumento en el grupo de ensilado DRRR, al contrario que ocurre para los dos últimos en el caso de ovejas alimentadas con ensilado de maíz. Además, para el cociente albumina/globulina disminuye significativamente con el ensilado DRRR y no se aprecian diferencias significativas para el caso del grupo alimentado con ensilado de maíz.

Tabla 14 Parámetros inmunológicos relacionados con el bienestar animal para dos tipos de alimentación en ganado ovino

Parámetros	Ensilado DDRR			Ensilado maíz		
	Inicio	Final	p-valor	Inicio	Final	p-valor
	Media ± SEM	Media ± SEM		Media ± SEM	Media ± SEM	
Globulinas (g/dl)	2.8890±0.08	4.2886±0.08	<0.001 *↑	2.9750±0.08	2.8046±0.13	0.186
Albumina/globulinas	1.1282±0.06	0.6798±0.02	<0.001 *↓	1.0568±0.05	1.0306±0.04	0.579
IgA (mg/dl)	4.2966±0.25	7.3474±0.39	<0.001 *↑	4.4562±0.26	3.8924±0.25	0.012*↓
IgG (mg/dl)	1426.4296±53.44	1994.9234±62.14	<0.001 *↑	1332.6118±42.39	999.5752±64.03	<0.001 *↓

Nota: Cálculo de la media ± SEM y prueba t de comparación de medias para muestras dependientes.

* Diferencias estadísticamente significativas al menos al 5% detectadas en la prueba de comparación de medias entre la medición inicial y la final para cada tipo de alimentación. Aparece ↑ o ↓ indicando si la diferencia significativa detectada es un aumento o disminución de la media en la medición final.

4.5.5 Parámetros zootécnicos

En ambos grupos el aumento de peso fue significativo, pero donde apreció presentó mayor grado de significación y de valores medios absolutos fue en el grupo de ovejas alimentadas con DDRR (Gráfica 1). Por otro lado, la condición corporal (Gráfica 2) mejora significativamente en las ovejas alimentadas con DDRR y de forma no significativa en las de ensilado de maíz.

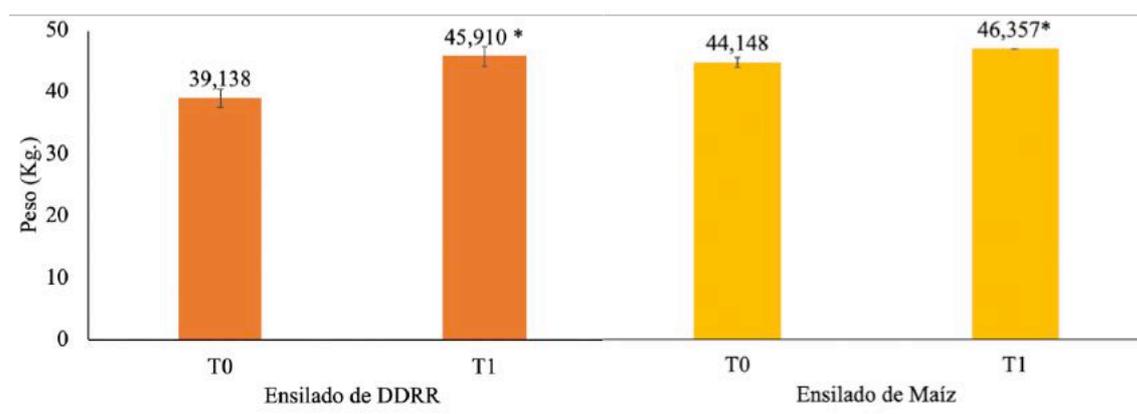


Fig. 16 Evolución del peso durante el ensayo 2 para los dos tipos de alimentación en ganado ovino.

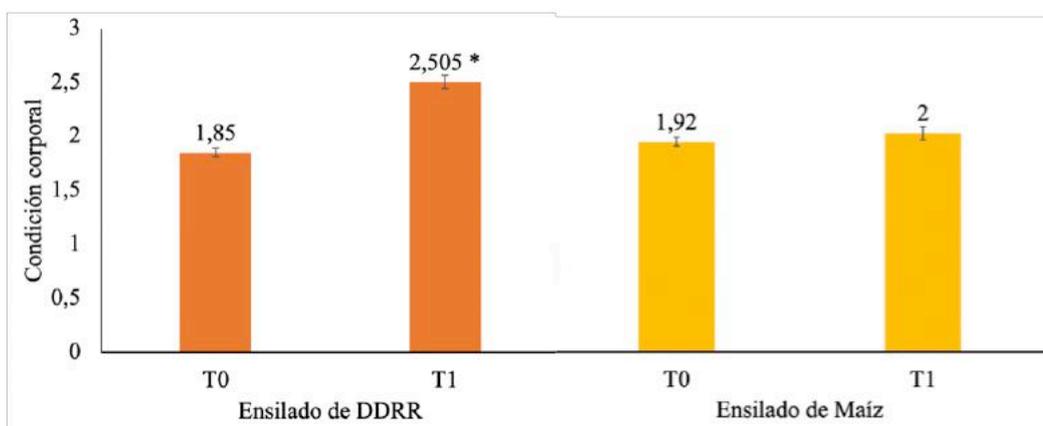


Fig. 17. Evolución de la condición corporal durante el ensayo 2 para los dos tipos de alimentación en ganado ovino.

4.5.6 Estudio anatomopatológico e histopatológico.

4.5.6.1 Ovejas alimentadas con ensilado de maíz

El estudio anatomopatológico demostró que, de las 50 ovejas alimentadas con maíz, 3 causaron baja en torno a la tercera semana del ensayo. Una vez realizada la necropsia, se diagnosticó que la causa de la muerte fue una neumonía, con cambios en el pulmón, no correlacionada con la alimentación que estaban consumiendo.

A las 47 ovejas restantes, se les practicó el examen post-mortem en matadero. De estos 47 animales, un total de 28 (59,58%) presentaron cambios severos en hígado descritos como focos blanquecinos inflamatorios difusos con placas de fibrina y cambios grasos (esteatosis), y, 12 ovejas (25,53%) presentaron cambios leves en este órgano, que fueron pequeños focos inflamatorios con petequias. En ambos grupos fueron decomisadas las vísceras. Un total de 7 ovejas (14,9%) no presentaron lesiones, siendo el diagnóstico aparentemente normal.

En cuanto al estudio histopatológico del hígado, el hallazgo lesional más relevante correspondió a la existencia de focos de necrosis de diferente extensión en el parénquima hepático. Tanto en los espacios periportales como en relación directa con los focos de necrosis se aprecia un intenso infiltrado inflamatorio de carácter predominantemente agudo constituido principalmente por leucocitos polimorfonucleares neutrófilos y piocitos junto a un menor número de macrófagos y escasos linfocitos y células plasmáticas periféricos con fibrosis delimitante. El centro de dichas lesiones muestra calcificación distrófica. Se apreció hiperplasia de las vías biliares.

El daño orgánico asociado, a nivel histopatológico, a este tipo de alimentación a base de ensilado de maíz durante tres meses se diagnosticó como severa hepatitis necrótico-piogranulomatosa multifocal (inespecífica) con calcificación distrófica asociada. Fue diagnosticado en un 59,58 % de los animales de forma severa y en un 25,53% de forma más leve.

4.5.6.2 Ovejas alimentadas con ensilado de DDRR

El grupo de ovejas alimentadas con ensilado a base de DDRR, no causó ninguna baja durante el ensayo. En el examen post-mortem en matadero, se detectó que un 88% de los animales (44 ovejas) presentaban hígado aparentemente normal, y el resto, un 12% (6 ovejas) con las lesiones leves anteriormente descritas. En el estudio histopatológico de las ovejas aparentemente normales, reveló que no había cambios patológicos a nivel microscópico, mientras que, en las ovejas con lesiones leves, se apreció pequeños focos inflamatorios periportales y en los vasos de la vesícula biliar.

5 DISCUSIÓN

5.1 ENSAYO 1

Conocer el perfil metabólico de una oveja, incluidos los parámetros fisiológicos (indicadores sanguíneos, plasmáticos y séricos), es esencial para determinar su estado nutricional y prevenir problemas sanitarios que afecten a la producción y la reproducción (Antunovic *et al.*, 2004). Aunque el objetivo de esta investigación es estudiar la influencia de dos dietas diferentes sobre el bienestar animal y no sobre la gestación, cabe señalar que la gestación conlleva una respuesta fisiológica que influye, por ejemplo, en la concentración de albúmina y proteína total con una disminución de sus niveles debido a una rápida extracción de inmunoglobulinas del plasma en los últimos meses de gestación cuando se forma el calostro (Kaneco, 2008). El aumento de proteínas debido al desarrollo fetal (Castillo *et al.*, 1997) y el aumento de la actividad enzimática AST muestran un aumento del metabolismo hepático derivado de una disminución de la ingesta de materia seca al final de la gestación (Chalmeh *et al.*, 2019). El aumento tanto de la demanda de oxígeno como de la tasa metabólica contribuyen a aumentar los valores de GR, Hb y Hto (Soliman, 2014; Sharma *et al.*, 2015). Sin embargo, los cambios obtenidos en este estudio no significan que estén asociados a la gestación sino a la alimentación; por ello, para este estudio se eligieron ovejas que estuvieran en el mismo estado fisiológico con el fin de que no se dieran interferencias en los resultados.

Los resultados indican que el pastoreo con tritordeum afecta a los parámetros hematológicos y, por tanto, al bienestar animal. El efecto de la dieta fue significativo, por lo que cabe destacar que tritordeum mostró un incremento en todos los valores medios en el muestreo final. Estos resultados no concuerdan con los obtenidos en un estudio preliminar por Requena *et al.* (2019), que compararon ovejas alimentadas con ensilado de maíz vs ovejas alimentadas con ensilado de tritordeum. Estos autores observaron un aumento de los parámetros hematológicos a favor del ensilado de tritordeum; sin embargo, no consideraron que afectara al bienestar de las ovejas porque este aumento no fue estadísticamente significativo. La falta de concordancia con estos autores puede deberse a las diferencias de pH en el ensilado y en el pastoreo. En el caso de las ovejas,

el cuarto y el quinto mes de gestación representan los periodos con mayor impacto en el crecimiento del feto (Kenyon *et al.*, 2019). Los valores de hematíes, hemoglobina y hematocrito obtenidos fueron superiores a los comunicados en ovejas de gestación tardía por Habibu. *et al.* (2014), Cihan *et al.* (2016), Kalif *et al.* (2020), y Yemilmez *et al.* (2021). Estas diferencias pueden deberse a la influencia de la cría y la nutrición (Soliman, 2014; Sharma *et al.*, 2015; Cian *et al.*, 2016). Las concentraciones fisiológicas de los parámetros hematológicos encontrados en estas ovejas Merinas podrían estar asociadas a su adaptación a las condiciones ambientales y agropecuarias del Valle de los Pedroches, Córdoba (Chaves *et al.*, 2009).

Se observaron niveles elevados de cortisol en ovejas alimentadas con avena. Esto puede deberse a la metabolización hepática incompleta del cortisol (Radostists *et al.*, 2002), así como al estrés nutricional y ambiental que desencadena el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (Binsiya *et al.*, 2017). Este eje regula la expresión del cortisol y contribuye a varios cambios durante la gestación (Cunningham, 2020). Estos cambios se producen principalmente porque el aumento de cortisol está condicionado por los estrógenos que regulan los niveles plasmáticos de globulina fijadora de corticosteroides (la globulina fijadora de corticosteroides aumenta con el aumento de estrógenos) y la función placentaria (Almanza-Sepulveda *et al.*, 2020). El aumento crónico de la hormona adrenocorticotropa (ACTH) y del cortisol durante la gestación no revela ni una apertura relativa ni absoluta del bucle de retroalimentación entre el cortisol y el hipotálamo y la adenohipófisis en las ovejas gestantes (Keller-Wood, 1996).

Los autores son conscientes de que la toma de muestras de sangre a las 14 horas no es habitual, pero el propietario del ganado insistió en que las muestras se tomaran a esa hora. En cuanto al cortisol, no se encontraron referencias bibliográficas que apoyaran la hora elegida por los autores, pero se tuvo en cuenta la ritmicidad circadiana para interpretar los resultados del cortisol plasmático (Cunningham, 2020; Larry, 2012). Este parámetro se debe muestrear siempre a la misma hora del día para para minimizar la variación pulsátil de su secreción (Squires, 2006).

Durante el quinto mes de gestación, los resultados mostraron que los niveles de glucosa aumentaron en ambas dietas. Aunque se ha informado de que los niveles de glucosa disminuyen significativamente en las ovejas gestantes tardías (Teleb *et al.*, 2019; Ismael *et al.*, 2019), algunos investigadores han encontrado concentraciones elevadas de glucosa durante este periodo (Husted *et al.*, 2008; Khatun *et al.*, 2011), mientras que otros

no han encontrado diferencias significativas en la glucosa reproductiva (Firat y Ozpinar, 2002). Al final de la gestación, la glucosa es metabolizada principalmente por tejidos que no dependen de la insulina para su absorción, en particular el feto. Experimentos anteriores han demostrado que el feto representa el 70% (Lindsay, 1971) del metabolismo de la glucosa al final de la gestación y del metabolismo en rumiantes al final de la gestación.

La glucemia está regulada por un complejo y eficaz control endocrino en el organismo, lo que le permite permanecer muy constante independientemente de los factores asociados a la dieta (Reece, 2015). Sin embargo, la pradera de tritordeum contribuyó a una disminución de los niveles de cortisol y a un aumento de los de glucosa. La principal fuente de glucosa en los rumiantes es la neoglucogénesis, con una contribución menor de la absorción intestinal (Caldeira, 2005). El hígado desempeña un papel importante en la regulación de la concentración de glucosa en sangre y su distribución a los tejidos, siendo prácticamente el único órgano donde tiene lugar la neoglucogénesis, aunque existe cierta contribución del riñón (Marteniuk *et al.*, 1998). Como la mayor parte de la glucosa procedente de la descomposición de los carbohidratos de la dieta se fermenta en el rumen (Cunningham, 2020), los rumiantes tienen un déficit crónico de glucosa. Con un nivel reducido de cortisol, la función del rumen no se ve afectada por el estrés nutricional y la glucosa se mantiene elevada (Galyean *et al.*, 1981). Alimentar a las ovejas con tanto con heno de avena como con forraje grueso aumenta significativamente la ingesta, la digestibilidad y la digestibilidad aparente de la fibra detergente ácida y la fibra detergente neutra, mejorando la absorción y la utilización del nitrógeno por parte del organismo. Al mismo tiempo, la alimentación con dietas con heno hace que el valor del pH del líquido ruminal de las ovejas se sitúe dentro del rango normal favoreciendo la descomposición en el rumen de los hidratos de carbono y la celulosa de la dieta. Al mejorar el entorno del rumen y aumentar la diversidad de la microbiota, también mejora la digestibilidad aparente (An *et al.*, 2020).

Las ovejas alimentadas con hierba de avena presentaban una relación neutrófilos/linfocitos invertida en comparación con las ovejas alimentadas con pradera de tritordeum. Los investigadores utilizan la relación neutrófilos/linfocitos como medida complementaria de la respuesta al estrés (Davis *et al.*, 2008; Stockman *et al.*, 2011), y está relacionada con la magnitud del proceso de estrés y la concentración de cortisol circulante (Romero *et al.*, 2011). A medida que aumentan los niveles de cortisol durante

el estrés, los linfocitos circulantes se adhieren a las células endoteliales que recubren las paredes de los vasos sanguíneos y migran de la circulación a otros tejidos (bazo, médula ósea, ganglios linfáticos y piel) donde quedan retenidos, lo que provoca una disminución del número de linfocitos circulantes. Del mismo modo, el cortisol estimula el paso de neutrófilos de la médula ósea a la sangre e inhibe su paso a otros compartimentos, lo que conduce a un aumento de neutrófilos maduros e inmaduros en la circulación (Cavalcanti *et al.*, 2007). Estos cambios garantizan que los distintos tipos celulares se dirijan a los tejidos donde son necesarios durante el estrés (Davis *et al.*, 2008). Alimentar a las ovejas con tritordeum contribuyó a que la relación neutrófilos/linfocitos se situara en niveles fisiológicos, lo que aporta pruebas de bienestar animal.

Algunos marcadores bioquímicos séricos pueden indicar cambios en el metabolismo nutricional y la función de los órganos en los animales (Wang *et al.*, 2009). El estrés, además de afectar negativamente al bienestar animal, estimula un factor liberador de corticotropina que aumenta la permeabilidad intestinal, permitiendo el paso de lipopolisacáridos y otros antígenos. Asimismo deja al hígado completamente expuesto y vulnerable a los procesos inflamatorios (Sejrsen *et al.*, 2006). Los resultados de este estudio muestran una disminución significativa de la actividad de las enzimas hepáticas (LDH, AST, CPK y FAL) en ovejas alimentadas con pradera de tritordeum. Esto sugiere que el tritordeum tiene un efecto protector sobre la funcionalidad hepática, lo que contribuye a prevenir enfermedades y contribuye a mejorar el bienestar de los animales (Invierno y Vega, 2022).

La inmunidad humoral incluye los anticuerpos circulantes o Ig. Los niveles circulantes de Ig pueden reducirse por malnutrición, estrés e infecciones bacterianas, víricas o parasitarias (Tizart, 2019). Las células plasmáticas derivadas de los linfocitos B sintetizan las IgA y las IgG. La IgA desempeña un papel clave en la formación de la barrera inmunitaria de la mucosa intestinal expuesta a ataques de patógenos externos (Han *et al.*, 2022), mientras que la IgG se encuentra principalmente en el plasma sanguíneo y en el líquido intersticial (Tizart, 2019). Las respuestas inmunitarias de las ovejas Merino presentaron diferencias entre las dietas de tritordeum y avena. La nutrición es la principal estrategia para desarrollar una inmunidad madura (Beasley *et al.*, 2010), influyendo en la producción de Ig (Alvarado *et al.*, 2017). Las Ig actúan como receptores de membrana en los β -linfocitos y son utilizadas por el sistema inmunitario para la identificación y neutralización de virus y bacterias (Khalili *et al.*, 2019). En el presente ensayo, la mayor

concentración de IgA se encontró en las ovejas que consumieron tritordeum. Esto contribuiría a la prevención de infecciones y mejoraría su rendimiento productivo y su capacidad antioxidante (Khalili *et al.*, 2019).

La albúmina, las globulinas y la relación albúmina/globulina se consideran biomarcadores nutricionales e inflamatorios. El cociente albúmina/globulina es un parámetro bioquímico utilizado para interpretar los cambios en las proteínas séricas asociados a enfermedades. El principal uso clínico del cociente albúmina/globulina es cuando disminuye debido a una disminución de la albúmina sérica y un aumento de las globulinas séricas (Chen *et al.*, 2022). No hubo diferencias significativas al principio y al final del ensayo en las ovejas alimentadas con pradera de avena. Sin embargo, se observó un aumento significativo tanto de la albúmina como de las globulinas, presentando una disminución de la relación albúmina/globulina, en las ovejas alimentadas con pradera de tritordeum. Este hallazgo de una mayor concentración de albúmina en el plasma es un indicio más de que estas ovejas no están expuestas a ningún estrés que pudiera repercutir en su bienestar y en su estado nutricional e inmunológico (Gazzaneo *et al.*, 2005).

La principal limitación de este ensayo fue la baja frecuencia de muestreo para que el manejo del ganado no interfiriera con los resultados obtenidos en los parámetros fisiológicos evaluados.

5.2 ENSAYO 2

El ensilado consiste en la preservación natural de forraje verde mediante fermentación láctica en ausencia de oxígeno (Miller, 2001). El objetivo primordial al producir ensilaje es preservar al máximo los nutrientes originales del forraje, minimizando las pérdidas en su calidad nutricional. Esto facilita su uso como alimento durante épocas de escasez, evitando limitaciones estacionales en la producción y permitiendo una mayor carga animal por hectárea (Alonso *et al.*, 2013). La elección del ensilado DDRR se debe a que presenta buena respuesta al corte y rebrote, o producción de grano, según corresponda, con déficit hídrico (Ballesteros *et al.*, 2007), como ocurre en los periodos de sequía en el Sur de la Península Ibérica. Asimismo, es más eficiente para alimentación animal y producción de alimentos más seguros para el ganado que le ensilado de maíz (Requena *et al.*, 2019).

El forraje de maíz es una materia prima altamente valorada para el ensilado debido a su contenido nutricional excepcionalmente elevado. Este cereal es una de las principales fuentes de alimentación en rumiantes porque es una combinación singular de fibras digeribles y de granos. No obstante, a pesar de sus ventajas nutricionales se enfrenta a diferentes desafíos, uno de ellos los altos requerimientos hídricos, que en zonas con déficit de agua como el sur de España, en ciclos de sequía es un problema. Por otro lado el de la contaminación fúngica y la presencia de micotoxinas bien por proceso de conservación o por prácticas inadecuadas de manejo (Kabak, 2009). Si bien, se realizan controles de la cantidad de micotoxinas de los ensilados dedicados a alimentación de rumiantes de aptitud lechera, no así para los de aptitud cárnica. Pensando que ensilados con altos contenidos en micotoxinas, al no afectar ni a la carne (animales de engorde), ni a madres nodrizas aparentemente, no hay ningún inconveniente en dárselo como alimentación. Pero se ha podido constatar en este ensayo que produce afectación del daño orgánico, principalmente relacionado con el metabolismo, concordando con autores como Fink-Gremmels (2008a y 2008b) y Pinotti, *et al.* (2016).

Al estudiar los resultados obtenidos comparando las dos alimentaciones se han observado diferencias significativas que pueden afectar al bienestar animal de los animales evaluados. Esas diferencias podrían estar fundamentadas en que los forrajes ensilados pueden contener una carga de micotoxinas, que aunque no sea excesiva, puede influir en la fisiología del animal. El hemograma del grupo de animales alimentados con ensilado de DDRR indicó que los parámetros GR, Hb y Hto presentaron un aumento muy significativo. Sin embargo, el incremento de estos parámetros en grupo alimentado con ensilado de maíz fue poco significativo, excepto la Hb. Estos resultados coinciden con el estudio preliminar de Requena, *et al.* (2019) en el que se comparó el ensilado de maíz con alta carga de micotoxinas frente al ensilado de tritordeum, aumentando significativamente el grupo del tritordeum. Estos mejores datos del DDRR se pueden explicar por su alta digestibilidad reflejada debido a un mayor porcentaje de fibra ácido detergente, siendo en DDRR de 42,8% frente al 26,8% que tenía en ensilado de maíz, concordando con lo descrito para el rendimiento forrajero del DDRR por Salcedo *et al.* (2014).

Partiendo de que la fórmula leucocitaria del ovino es de tipo linfocitario (García-Sacristán, 2018; Cunningham, 2020), se observó que en la toma de muestras inicial en los dos grupos el porcentaje de linfocitos y neutrófilos era prácticamente igual, lo que podría deberse a que los animales partían de un cierto nivel de estrés, como revelan las

concentraciones similares en ambos grupos de cortisol. La inversión de la fórmula leucocitaria se puede explicar por el efecto del cortisol sobre el endotelio vascular, provocando una menor adherencia de neutrófilos al mismo, inhibiendo su marginación y apareciendo en un mayor porcentaje en la sangre circulante; mientras que los linfocitos se redistribuyen y retienen en el tejido linfoide (Reece, 2015; Winter, *et. al.*, 2022). A partir de esta premisa, se explica que con la alimentación a base de ensilado DRRR, con la que se apreció un descenso del cortisol, debido a un menor estrés metabólico, la fórmula leucocitaria volvió a su condición fisiológica para el ovino, de tipo linfocitaria, de forma altamente significativa. Estos datos concuerdan con los referidos en ovino alimentado con tritordeum en pastoreo por Agüera *et. al.* (2023).

Es probable que, al haberse realizado el ensilado de maíz durante el verano, las temperaturas altas favorecieron el crecimiento de micotoxinas como se refleja en el análisis recibido del laboratorio de referencia (véase material y métodos). Está descrito que temperaturas constantes diurnas entre 25 y 35°C y nocturnas similares $\geq 21^{\circ}\text{C}$ contribuyen a que se produzcan micotoxinas con facilidad (Blandón y Denli, 2001; Gimeno 2002; Winter *et al.*, 2022), estas temperaturas se dan en Andalucía sobradamente desde mayo a septiembre, unido a la humedad relativa producida por el agua de riego utilizada necesariamente en el cultivo de maíz forrajero. Sin embargo, el ensilado de DRRR al ser un cereal de invierno, su periodo de crecimiento es otoño-invierno, donde hay temperaturas frías y la humedad de las precipitaciones estacionales que normalmente corresponden al otoño-invierno, y refleja menores cantidades de micotoxinas en su análisis.

Con respecto a las enzimas de importancia diagnóstica en el daño hepático hay que puntualizar que, por un lado, el grupo de ovejas alimentadas con ensilado de maíz mostraron un incremento muy significativa de sus valores en AST y FAL, escasas diferencias para la elevación de CK y ninguna para la LDH. Estos resultados confirmaron analíticamente el diagnóstico de daño hepático observado en el estudio anatomopatológico que se expone más adelante. Estos hallazgos se atribuyeron probablemente al mayor contenido en micotoxinas del ensilado de maíz, concordando con Winter *et al.* (2022) y a los mayores niveles de cortisol detectados.

Por otro lado, los resultados que se obtuvieron en el grupo de ovejas alimentadas con ensilado de DRRR mostraron que los animales revelaron un descenso muy significativo de los valores de LDH y CPK, así como una discreta elevación de los niveles

de AST y FAL. Estas observaciones coinciden con los que obtuvieron Requena *et al.*, en 2018 cuando estudiaron las lesiones orgánicas que se producían en ovejas alimentadas con alta cantidad de ensilado de maíz con micotoxinas vs a ensilado de tritordeum. El aumento muy significativo de la enzima GHD presenta un efecto protector sobre el hígado al estar implicada en los mecanismos de detoxificación celular como indica Plaitakis *et al.*, (2000) y Winter *et al.*, (2022).

En cuanto a las necropsias realizadas a las ovejas alimentadas con ensilado de maíz presentaron daño hepático (necrosis del parénquima hepático, hiperplasia de vías biliares) compatible con Jelinek *et al.* (1989) y Kumar *et al.*, (2021) lo que pudo alterar el metabolismo de las grasas, proteínas e hidratos de carbono influyendo de forma negativa en a la hora de satisfacer sus necesidades fisiológicas para mantener el peso y la condición corporal (Fraile s.f.; Rodríguez- Magadan *et al.*, 2021). Esto quedó reflejado en que su ganancia y de peso y su condición corporal fue inferior en comparación con lo obtenido en las ovejas alimentadas con DDRR. En las muestras de hígado de las alimentadas con DDRR no se apreciaron cambio alguno, con lo cual, podemos atribuir que estos daños anteriormente descritos fueron causados por la contaminación del ensilado de maíz.

La inmunidad se vio comprometida en los animales que se alimentaron con ensilado de maíz lo que pudo influir en que presentaran algunas infecciones concomitantes detectadas (aunque este dato no se tuvo en cuenta a la hora de hacer el estudio estadístico) produciendo así gran susceptibilidad a las enfermedades infecciosas (Jelinek *et al.*, 1989; Tizard, 2018; García-Bocanegra y Zafra, 2019). Es posible que el ensilado de maíz pudiera sufrir una contaminación post-cosecha con hongos toxigénicos que son comunes en ensilajes que afectan a la salud del animal por la alta toxicidad que poseen (Soriano del Castillo, 2007), revelada por el análisis recibido del laboratorio de referencia y porque son moléculas altamente estables a las fermentaciones láctica a las que se someten los forrajes ensilados (Efsa, 2012; Rasff, 2012; Kabak, 2009).

6 CONCLUSIONES

6.1 ENSAYO 1

PRIMERA: la alimentación con pradera de tritordeum influye positivamente en los parámetros fisiológicos de bienestar animal estudiados en ovejas Merino preñadas.

SEGUNDA la pradera de tritordeum (i) tuvo un efecto protector sobre la función hepática (disminución de la actividad enzimática), lo que contribuye a la prevención de enfermedades; (ii) el aumento de la concentración plasmática de albumina indica que estas ovejas no estuvieron expuestas a ningún estrés que pudiera afectar a su bienestar; (iii) los estados nutricional e inmunitario y el aumento de la concentración de IgA contribuyeron a la prevención de infecciones y mejoraron su rendimiento productivo y su capacidad antioxidante. Por lo tanto, la pradera de tritordeum puede considerarse un pienso funcional, ya que tiene un efecto beneficioso sobre el bienestar de las ovejas gestantes más allá de su valor nutricional básico.

TERCERA La resistencia del tritordeum a las enfermedades fúngicas de los cereales, como *Fusarium culmorum* y *Septoria nodorum*, lo hace adecuado para su uso en sistemas de producción sostenibles con una huella medioambiental reducida. También es adecuado para forraje, ya que sus condiciones de cultivo son menos exigentes que las del maíz y el triticale.

CUARTA: Se recomienda a los ganaderos alimentar a sus ovejas con un cereal como el tritordeum, ya que no sólo garantiza que los animales aprovechen todos los nutrientes, sino que también previene enfermedades y mejora su calidad de vida.

6.2 ENSAYO 2

PRIMERA Las ovejas alimentadas con ensilado cereal maíz sufrieron daño orgánico mientras que las alimentadas con ensilado de DDR se beneficiaron del efecto protector que sobre el hígado ejerce la GHD, la cual está implicada en los mecanismos de detoxificación celular.

SEGUNDA. Los resultados obtenidos que comparan las dos alimentaciones demuestran diferencias significativas que pueden afectar al bienestar animal de los animales evaluados. Esas diferencia podrían estar fundamentadas en que los forrajes ensilados pueden contener una carga de micotoxinas, que aunque no sea excesiva, puede influir en la fisiología del animal.

TERCERA. El ensilado a base del nuevo cereal DDDR, tiene mejor rendimiento nutricional en ovejas en comparación con el de maíz, probablemente debido a sus mayores porcentajes de fibra ácido detergente y menor carga de micotoxinas, lo que redundaría en un mejor estado sanitario de hígado potenciando el metabolismo digestivo, y mejorando sus rendimientos zootécnicos (peso y condición corporal).

7 RESUMEN

La situación actual de cambio climático y subida de las temperaturas ha contribuido a centrar esta investigación en la elección de nuevos cereales (tritordeum y triticales tetraploide [DDRR]), resistentes a la sequía, para nutrir al ganado ovino que son más seguros desde el punto de vista medioambiental y de la salud que otros cereales usados tradicionalmente y evaluar su efecto sobre el bienestar animal. Además, la creciente demanda de alimentos más saludables, incluidos los derivados de cereales integrales, ha promovido la investigación sobre características del tritordeum relacionadas con la salud humana. Sin embargo, se ha detectado que existe poca bibliografía dedicada al uso de tritordeum en alimentación animal y el efecto y repercusiones en el bienestar animal. Para estudiar el efecto de la alimentación a base de nuevos cereales (tritordeum y DDRR) frente a cereales tradicionales en el ganado ovino se han hecho dos ensayos:

En el **primer ensayo** se compararon dos dietas diferentes (pradera de tritordeum frente a pradera de avena) para ovejas preñadas en pastoreo con el fin de determinar si hay algún efecto sobre los indicadores fisiológicos objetivos del bienestar animal. La investigación se llevó a cabo en una explotación ovina situada en la localidad de Pedroche (norte de la provincia de Córdoba, España). Esta explotación contaba con dos praderas adyacentes de 30 hectáreas cada una. Una de ellas sembrada de tritordeum y la otra de avena. Se evaluaron un total de 150 ovejas Merinas preñadas de entre 3 y 5 años de edad. Antes del inicio del estudio, se sincronizó el celo de las ovejas mediante esponjas vaginales. A los 45 días, 150 animales gestantes fueron seleccionados utilizando el ecógrafo equipado con un transductor lineal multifrecuencia de 6-10 MHz para determinar el estado de gestación. A partir del 60º día de gestación se recogieron las primeras muestras para evitar el estrés que podría provocar la ecografía. Ninguna de ellas parió durante el estudio, aunque éste finalizó en el quinto mes de gestación. Estas ovejas se dividieron aleatoriamente en dos grupos: el grupo 1 (n1=75) se alimentó con pradera de tritordeum y el grupo 2 (n2=75) con pradera de avena durante la estación primaveral. Las ovejas fueron alimentadas *ab libitum* en la pradera durante 12 horas. Igualmente, se les suministró agua *ab libitum*. Se tomaron muestras de sangre de cada oveja al principio y al final del estudio. Con ellas se evaluó el efecto de la alimentación en praderas sobre parámetros relacionados con el bienestar animal (parámetros hematológicos, metabólicos

e inmunitarios) y el estrés (parámetros leucocitarios, cortisol y glucosa). A la hora de programar la toma de muestras se tuvo en cuenta el ritmo circadiano del cortisol. Las extracciones se realizaron a las 14.00 horas, después de un periodo de siesta, para no interferir con los picos matinales de cortisol. El periodo entre muestreos fue de 3 meses. Los resultados indican que el pastoreo con tritordeum afecta a los parámetros hematológicos y, por tanto, al bienestar animal ($p < 0,001$). El efecto de la dieta fue significativo ($p < 0,001$), por lo que cabe destacar que tritordeum mostró un incremento en todos los valores medios en el muestreo final. La alimentación con pradera de tritordeum influye positivamente en los parámetros fisiológicos de bienestar animal estudiados en ovejas Merino preñadas. Se recomienda a los ganaderos alimentar a sus ovejas con un cereal como el tritordeum, ya que no sólo garantiza que los animales aprovechen todos los nutrientes, sino que también previene enfermedades y mejora su calidad de vida.

El **segundo ensayo** se valoró el posible daño orgánico que se produce en ganado ovino al alimentarlo con el nuevo forraje ensilado (DDRR) frente al ensilado a base de maíz. Se llevó a cabo en la Granja Universitaria de Rabanales de la Universidad de Córdoba. Se evaluaron 100 ovejas de raza merina de 3-4 años de edad. Las ovejas fueron alimentadas con forraje de ensilado procedente de COVAP. Estas ovejas se dividieron aleatoriamente en dos grupos: El grupo 1 ($n_1=50$) fue alimentado con ensilado de maíz con contenidos normales en micotoxinas que se producen y el grupo 2 ($n_2=50$) se alimentó con ensilado de DDRR con baja cantidad de micotoxinas. Los animales disponían de agua *ab libitum*. Ninguna oveja se encontraba gestante. Este trabajo experimental se llevó a cabo con la autorización de Comité de Bioética de la Universidad de Córdoba. El ensayo tuvo una duración de tres meses, realizando la toma de muestras al inicio y al final. Los parámetros fisiológicos analizados en sangre fueron recuento de GR, Hb, Hto, y recuento de GB. Se midió el porcentaje de neutrófilos y linfocitos y se calculó el cociente neutrófilos/linfocitos. Los parámetros analizados en plasma fueron LDH, CPK, AST, GDH, PPT y la glucosa. En cuanto a los parámetros investigados en suero fueron albúmina, globulinas, FAL, cortisol e IgA, IgG. Los parámetros zootécnicos evaluados fueron la ganancia de peso, el índice de condición corporal. se registraron a primera hora de la mañana cuando se les suministró el alimento. Asimismo en las instalaciones del Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas, Campus de Rabanales, Universidad de Córdoba se realizaron necropsias. Se le practicó una necropsia reglada a los animales que causaron baja en las instalaciones del

Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas, de la Universidad de Córdoba con el fin de observar las alteraciones morfológicas, macro y microscópicas producidas por el consumo de la alimentación a base de los forrajes ensilados. Aparte se enviaron a matadero la totalidad de animales de ambos, ya que productivamente se había determinado así, y se podían utilizar los datos para el presente estudio con el fin de valorar las posibles lesiones macroscópicas en matadero y tomar muestras de biopsia de hígado para su estudio histopatológico. Muestras de ambos ensilados se enviaron a un laboratorio de referencia para comprobar carga de micotoxinas.

Tanto los parámetros metabólicos como los inmunológicos relacionados con el bienestar animal presentaron valores favorables estadísticamente significativos ($p < 0,001$) en las ovejas alimentadas con DDRR y con el daño orgánico las alimentadas con ensilado de maíz ($p < 0,001$). En cuanto a parámetros zootécnicos se demostró mayor ganancia de peso y de condición corporal en ovejas alimentadas con DDRR. Se diagnosticó hepatitis necrótico-piogranulomatosa multifocal (inespecífica) con calcificación distrófica asociada (lesión severa) en las ovejas alimentadas a base de ensilado de maíz. Fue diagnosticado en un 59,58 % de los animales de forma severa y en un 25,53% de forma más leve. No obstante, el estudio en el grupo de ovejas alimentadas con ensilado a base de DDRR, reveló que no había cambios patológicos a nivel microscópico, mientras que, en las ovejas con lesiones leves, se apreció pequeños focos inflamatorios periportales y en los vasos de la vesícula biliar. Las ovejas alimentadas con ensilado cereal maíz sufrieron daño orgánico mientras que las alimentadas con ensilado de DDR se beneficiaron del efecto protector sobre el hígado ejerce la GHD que está implicada en los mecanismos de detoxificación celular. Los resultados obtenidos que comparan las dos alimentaciones demuestran diferencias significativas que pueden afectar al bienestar animal de los animales evaluados. Esas diferencia podrían estar fundamentadas en que los forrajes ensilados pueden contener una carga de micotoxinas, que aunque no sea excesiva, puede influir en la fisiología del animal.

8 ABSTRACT

The current situation of climate change and rising temperatures has contributed to focus this research on the choice of new drought-resistant cereals (tritordeum and tetraploid triticale [DDRR]) to feed sheep that are safer from an environmental and health point of view than other traditionally used cereals and to assess their effect on animal welfare. In addition, the growing demand for healthier foods, including those derived from whole grains, has promoted research on tritordeum traits related to human health. However, it has been found that there is little literature dedicated to the use of tritordeum in animal feed and the effect and impact on animal welfare. To study the effect of feeding new cereals (tritordeum and DDRR) versus traditional cereals in sheep, two trials have been carried out:

In the **first trial**, two different diets (tritordeum grassland versus oat grassland) for grazing pregnant ewes were compared in order to determine if there is any effect on objective physiological indicators of animal welfare. The research was carried out on a sheep farm located in the town of Pedroche (north of the province of Cordoba, Spain). This farm had two adjacent pastures of 30 hectares each. One of them was sown with tritordeum and the other with oats. A total of 150 pregnant Merino ewes between 3 and 5 years of age were evaluated. Before the start of the study, the ewes were synchronised for oestrus using vaginal sponges. At 45 days, 150 pregnant animals were selected using the ultrasound scanner equipped with a 6-10 MHz multi-frequency linear transducer to determine pregnancy status. From the 60th day of gestation onwards, the first samples were collected to avoid stress that could be caused by ultrasonography. None of the ewes lambed during the study, although the study ended in the fifth month of gestation. These ewes were randomly divided into two groups: group 1 (n1=75) was fed on tritordeum grassland and group 2 (n2=75) on oat grassland during the spring season. Ewes were fed *ab libitum* on grassland for 12 hours. Water was also provided *ab libitum*. Blood samples were taken from each ewe at the beginning and at the end of the study. These samples were used to assess the effect of grassland feeding on parameters related to animal welfare (haematological, metabolic, and immune parameters) and stress (leucocyte, cortisol and glucose parameters). The circadian rhythm of cortisol was considered in the sampling schedule. Samples were taken at 14.00 hours, after a siesta period, so as not to interfere with morning cortisol peaks. The period between samples was 3 months. The results indicate that grazing with tritordeum affects haematological parameters and thus animal

welfare ($p < 0.001$). The effect of diet was significant ($p < 0.001$), so it should be noted that tritordeum showed an increase in all mean values in the final sampling. Feeding tritordeum grassland positively influences the physiological animal welfare parameters studied in pregnant Merino ewes. It is recommended that farmers feed a cereal such as tritordeum to their ewes, as it not only ensures that the animals take up all the nutrients, but also prevents diseases and improves their quality of life.

The **second trial** assessed the possible organic damage caused to sheep by feeding the new forage silage (DDRR) versus maize-based silage. It was carried out at the Granja Universitaria de Rabanales of the University of Cordoba. A total of 100 Merino ewes of 3-4 years of age were evaluated. The ewes were fed with silage forage from COVAP. These ewes were randomly divided into two groups: Group 1 ($n_1 = 50$) was fed maize silage with normal contents of mycotoxins occurring and group 2 ($n_2 = 50$) was fed DDRR silage with low amount of mycotoxins. The animals were provided with water *ab libitum*. No ewes were pregnant. This experimental work was carried out with the authorisation of the Bioethics Committee of the University of Cordoba. The trial lasted three months and samples were taken at the beginning and at the end of the trial. The physiological parameters analysed in blood were RBC count, Hb, Hto, and WBC count. The percentage of neutrophils and lymphocytes was measured, and the neutrophil/lymphocyte ratio was calculated. The parameters analysed in plasma were LDH, CPK, AST, GDH, PPT and glucose. Serum parameters investigated were albumin, globulins, FAL, cortisol and IgA, IgG. The zootechnical parameters evaluated were weight gain, body condition index. were recorded early in the morning when the animals were fed. Necropsies were also carried out at the facilities of the Department of Comparative Anatomy and Pathology, Rabanales Campus, University of Cordoba Necropsies were carried out on the animals that left the facilities of the Department of Comparative Anatomy and Pathology, University of Cordoba, in order to observe the morphological, macro, and microscopic alterations produced by the consumption of the feed based on silage fodder. In addition, all the animals from both silages were sent to the slaughterhouse, as this had been determined for production purposes, and the data could be used for the present study in order to evaluate the possible macroscopic lesions in the slaughterhouse and to take liver biopsy samples for histopathological study. Samples of both silages were sent to a reference laboratory to check for mycotoxin load.

Both metabolic and immunological parameters related to animal welfare showed statistically significant favourable values ($p < 0.001$) in ewes fed DDRR and with organic damage in ewes fed maize silage ($p < 0.001$). In terms of zootechnical parameters, higher weight gain and body condition were demonstrated in ewes fed DDRR. Multifocal necrotic-pyogranulomatous hepatitis (non-specific) with associated dystrophic calcification (severe lesion) was diagnosed in ewes fed maize silage. It was diagnosed in 59.58% of the animals as severe and in 25.53% as milder. However, the study in the group of ewes fed with DDRR-based silage revealed no pathological changes at the microscopic level, whereas, in the ewes with mild lesions, small inflammatory foci were seen periportal and in the vessels of the gall bladder. Ewes fed corn silage suffered organic damage while those fed RDA silage benefited from the protective effect on the liver exerted by GHD which is involved in cellular detoxification mechanisms. The results obtained by comparing the two feeds show significant differences that may affect the animal welfare of the animals evaluated. These differences could be due to the fact that silage feeds may contain a mycotoxin load, which, although not excessive, may influence the animal's physiology.

9 BIBLIOGRAFÍA

- Abali, E.E.; Cline, S.D.; Franklin, D.S.; Viselli, S.M.. Bioquímica (Lippincott Illustrates Reviews) Ed. 8ª . Wolters Kluwer. **2021**.
- Aceña, C.; Fernández, A.; Ferrer, L.M.; Gascón, M.; Gómez, P.; Loste, A.; Marca, M.C.; Navarro, L.; Ortín, A.; Ramos, J.J.; Verde, M. Manual de prácticas de fisiología animal. Prensas Universitarias de Zaragoza. Zaragoza, España. **2008**.
- Acosta, B.I. Determinar la relación de la Hemoglobina y el hematocrito con la altura en la Parroquia Lita Imbabura. Universidad técnica del Norte. **2018**.
- Actor, J. Cells and organs of the immune system. In: Immunology and Microbiology 2nd ed. Elsevier. **2012**.
- Adeyeye S. Fungal mycotoxin in foods: a review. *Cogent Food Agric* **2016** 2 (1): 1-11
- Agüera, E.I.; Requena, L.; García-Moreno, M.B.; Pérez-Priego, M.A.; Requena, F. Promotion of Pregnant Merino ewes' welfare with the introduction of a drought- and high-temperature-resistant cereal into their diet: analysis of tritordeum meadow. *Animals* **2023**, 13, 3155. <https://doi.org/10.3390/ani13193155>
- AESAN (Grupo de Trabajo); Marín, S.; Daschner, A.; Morales, F.J.; Rubio, C.; Ruiz, M.J.; Burdaspal, P. Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación a los efectos del cambio climático sobre la presencia de micotoxinas en los alimentos. *Rev Com Cient AESAN* **2021**, 33, 11-51.
- Al-Dawood, A. (2017) Towards heat stress management in small ruminants - a review. *Ann Anim Sci* **2017**, 17, 59-88.
- Al-Thuwaini, T.M. The relationship of hematological parameters with adaptation and reproduction in sheep ; A review study. *Iraqi J Vet Sci* **2021**, 35(3). <https://doi.org/10.33899/ijvs.2020.127253.1490>
- Almanza-Sepulveda, M.L.; Fleming, A.S.; Jonas, W. Mothering revisited: A role for cortisol? *Horm. Behav.* **2020**, 121, 104679. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2020.104679>.
- Alonso, V.A.; Pereyra, C.M.; Keller, L.M.A.; Dalcero, A.M.; Rosa, C.A.R.; Chiacchiera, S.M.; Cavaglieri, L.R. Fungi and mycotoxin in silage: an overview. *J Appl Microbiol*, **2013**, 637-643.
- Alvarado, A.; González, R.; Zaragoza, M.; Zaragoza-Vera, C.; Arjona, G.; López, M.E.; Navarro, F. Parámetros inmunológicos en ovinos de pelo para abasto contra nematodos gastrointestinales en tabasco, México. *Agroproductividad* **2017**, 10, 47–52.
- Álvarez, J.B.; Ballesteros, J.; Sillero, J.A.; Martín, L.M. Tritordeum: Un nuevo cultivo de importancia potencial en la industria alimentaria. *Hereditas* **1992**, 116, 193–197.
- An, X.; Zhang, L.; Luo, J.; Zhao, S.; Jiao, T. Effects of oat hay content in diets on nutrient metabolism and the rumen microflora in sheep. *Animals* **2020**, 10, 2341. <https://doi.org/10.3390/ani10122341>.
- Antunovic, Z.; Speranda, M.; Steiner, Z. The influence of age and the reproductive status to the blood indicators of ewes. *Arch. Tierz Dummerstrof* **2004**, 3, 265–237.
- Ávila, M.C.; Rodríguez, C.; Atienza, S.G. Tritordeum: Creación de una nueva especie de cultivo: el uso exitoso de los recursos fitogenéticos. *Plants* **2021**, 10 (5) 1029. doi.org/10.3390/plants10051029
- Ballesteros, J., Cabrera, A., Aardese, A., Ramírez, M.C., A Tienza, S.G., Martín A. Registration of TS1, TS10 and TS41, Three High Biomass Production Tetraploid Triticale Germplasm Lines. *J Plant Regist*, **2007**, 1, 71-72.

- Beasley, A.M.; Kahn, L.P.; Windon, R.G. The periparturient relaxation of immunity in Merino ewes infected with *Trichostrongylus colubriformis*: Parasitological and immunological responses. *Vet. Parasitol.* **2010**, *168*, 60–70.
- Binsiya, T.K.; Sejian, V.; Bagath, M.; Krishnan, G.; Hyder, I.; Manimaran, A.; Lees, A.M.; Gaughan, J.B.; Bhatta, R. Significance of Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis to adapt to Climate Change in Livestock. *Int Res J Agric Food Sci* **2017**, *2*, 1–20.
- Bladon, J.C.; Denli, M. La presencia de micotoxinas en el pienso y su impacto en la producción avícola. UAB Barcelona, Unidad de producción Animal, Facultad de Veterinaria. **2001**
- Bórnez, R.; Linares, M.B.; Vergara, H. Haematological, hormonal and biochemical blood parameters in lamb: effect of age and blood sampling time. *Lives Sci* **2009**, *121*, 200-206.
- Bosch JA, Ring C, de Geus EJ, Veerman EC, Amerongen AV. Stress and secretory immunity. *Int Rev Neurobiol.* **2002**, *52*:213–253. doi: 10.1016/s0074-7742(02)52011-0.
- Brandtzaeg, P. Role of secretory antibodies in the defence against infections. *Intl J Med Microbiol* **2003**, *293*:3–15. doi: 10.1078/1438-4221-00241.
- Brooks, M.B.; Harr, K.L.; Seelig, D.M.; Wardrop, K.J.; Weiss, D.J. Schalm's Veterinary Hematology, 7th edition. Wiley Blackwell. **2022**.
- Broom, D.M. A History of Animal Welfare Science. *Acta Biotheor* **2011**, *59*,121–137. doi: 10.1007/s10441-011-9123-3.
- Brown, K.; De Coffe, D.; Molcan, E.; Gibson, D.L. Disbiosis de la microbiota intestinal inducida por la dieta y los efectos sobre la inmunidad y la enfermedad . *Nutrientes* **2012**, *4* , 1095–1119. Disponible en: 10.3390/nu4081095
- Buffa, M.; Pereira J.P Mediciones del músculo *Longissimus dorsi* y de cobertura de grasa en corderos pesados y su relación con el grado de terminación y rendimiento de cortes valiosos en frigorífico. Tesis presentada para obtener el título de Ingeniero Agrónomo. Universidad de la República. Facultad de Agronomía. Montevideo, Uruguay. **2004**
- Butler, P.; Brown, A.; Stephenson G.; Speakman, J.; Animal Physiology: an environmental perspective. 1st ed. OUP Oxford. **2021**.
- Cabrera, A.; Domínguez, I.; Rubiales, D.; Ballesteros, J.; Martín, A. DDRR-Tetraploid triticale from *Aegilops squarrosa* L. × *Secale* L. spp. p. 179–182. In H. Güedes-Pinto, N. Darvey, and V. P. Carnide (ed.).Triticale: Today and tomorrow. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands. **1996**
- Caldeira, R. Monitorização da adequação do plano alimentar e do estado nutricional em ovelhas. *RPCV* **2005**, *555–556*, 125–139.
- Camardo Leggieri, M.; Giorni, P.; Pietri, A.; Battilani, P. *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides* Interaction: Modeling the Impact on Mycotoxin Production. *Front Microbiol* **2019**, *10*, 2653.
- Capdeville, J.; Veissier I. A method of assessing welfare in loose housed dairy cows at farm level, Focusing on animal observations. *Acta Agric. Scand. A Anim. Sci.* **2001**, *51*, 62–68. doi: 10.1080/090647001316923081.
- Carmona-Rivera, C.; Kaplan, M.J. Neutrophil Biology. In *Encyclopedia of Cell Biology*; Bradshaw, R.A., Stahl, P.D., Eds.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, **2016** .
- Castillo, C.; Hernández, J.R.; López, M.; Miranda, M.; García-Partida, P.; Benedicto, J.L. Relationship between venous pH, serum calcium and proteins in the course of anoestrus, pregnancy and lactation in the ewe. *Arch. Tierz. Dummerstorf* **1997**, *40*, 257–263.
- Castillo, S. Consideraciones sobre epigenética perinatal. *Bol Hosp Viña Mar* **2015**, *71*(1), 19-22.
- Cavalcanti, D.M.H.; Lotufo, C.M.C.; Borelli, P.; Ferreira, Z.S.; Markus, R.P.; Farsky, S.H.P. Endogenous glucocorticoids control neutrophil mobilization from bone marrow to blood and tissues in non-inflammatory conditions. *Br. J. Pharmacol.* **2007**, *152*, 1291–1300. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp>
- Chalmeh, A.; Pourjafar, M.; Badieli, K.; Esmacili, A.; Sebdani, M.M. Comparison of circulating metabolic and hepatic indices between fat-tailed and semifat-tailed ewes in different pre and post-partum periods. *Vet. Arh.* **2019**, *89*, 43–53.

- Chango, A.; Pogribny I.P. Considering maternal dietary modulators for epigenetic regulation and programming of the fetal epigenome. *Nutrients* **2015**, 7(4), 2748-70.
- Chaves, D.; Morais, D.; Vale, A.; Moraris, J.; Facó, O.; Guilhermino, M. Parâmetros hematológicos e escore corporal de ovelhas da raça Morada Nova em ambiente quente. In Proceedings of the XLVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, Maringá, Brazil, 14-17 July **2009**
- Chawla J. Stepwise approach to myopathy in systemic disease. *Front Neurol* **2011** 5, 2:49 doi: 10.3389/fneur.2011.00049.
- Chay-Canul, A.J.; García-Herrera, R.A.; Salazar-Cuytún, R.; Ojeda-Robertos, N.F.; Cruz-Hernández, A.; Fonseca, M.A.; Canul-Solís, J.R. 2019. Desarrollo y evaluación de ecuaciones para predecir el peso corporal de ovejas Pelibuey utilizando el corazón circunferencia. *Rev Mex Cienc Pecu* **2019**, 10 (3):767-777
- Chen, F.; Wu, W.; Millman, A.; Craft, J. F.; Chen, E.; Patel, N.; Boucher, J.; Urban Jr., J.; Kim, C., Gause, W. Neutrophils prime a long-lived effector macrophage phenotype that mediates accelerated helminth expulsion. *Nat Immunol* **2014**, 15, 938-946. doi: 10.1038/ni.2984
- Chen, K.; Magri, G.; Grasset, E.K.; Cerutti, A. Rethinking mucosal antibody responses: IgM, IgG and IgD join IgA. *Nat Rev Immunol.* **2020**, 20(7):427-441. doi: 10.1038/s41577-019-0261-1. Epub 2020 Feb 3. PMID: 32015473; PMCID: PMC10262260
- Chen, Z.; Song, C.; Yao, Z.; Sun, J.; Liu, W. Associations between albumin, globulin, albumin to globulin ratio and muscle mass in adults: Results from the national health and nutrition examination survey. 2011-2014. *BMC Geriatr.* **2022**, 22, 383. <https://doi.org/10.1186/s12877-022-03094-4>.
- Chulli, E.S. Contaminación de micotoxinas en alimentos balanceados. Titulación certificada. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Ciencias Pecuarias. Chimborazo, Ecuador. **2023**.
- Cihan, H.; Temizel, E.M.; Yilmaz, Z.; Ozarda, Y. Serum iron status and its relation with haematological indexes before and after parturition in sheep. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg* **2016**, 22, 679-683.
- Cotty, P.; Jaime-García, R. Influences of climate on aflatoxin producing fungi and aflatoxin contamination. *Int J Food Microbiol* **2007**, 119, 1 (2), 109-115.
- Crempien, C.; López, J.; Rodríguez, D. Efecto de la condición corporal al parto sobre el peso al nacimiento, mortalidad neonatal, peso al destete en los corderos y peso de vellón en ovejas Merino Precoz. *Agricultura Técnica.* **1993**.
- Cunningham, J.K. Fisiología Veterinaria. 6th ed.; Elsevier: Barcelona, Spain, **2020**.
- Dhanasekaran, D.; Shanmugapriya, S.; Thajuddin, N.; Annamalai, P. Aflatoxins and aflatoxicosis in human and animals In : Dr. Ramon G. Guevara-Gonzalez (Ed.), *Aflatoxins-Biochemistry and Molecular Biology*. Intech, Rijeka, Croatia, pp 221-254. **2011**
- D'Ottavio, G.E.; Parodi, R.; Montero, J.E.; Egri, N.; Carlson, D., Greca, A. Creatinfosfoquinasa y su aplicación clínica. *Anuario Fundación Dr. JR Villavicencio*, **2008**, 16:156-159.
- Damián, J.P.; Ungerfeld, R. Indicadores de bienestar animal en especies productivas: una revisión crítica. *Rev Lat Prod Anim*, **2013**, 21, 103-113
- Davis, A.K.; Maney, D.L.; Maerz, J.C. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: A review for ecologists. *Funct. Ecol.* **2008**, 22, 760-772.
- Ericson, J.A.; Duffau, P.; Yasuda, K.; Ortiz-López, A.; Rothamel, K.; Rifkin, I.R.; Monach, P.A.; Consorcio ImmGen . Gene expression during the generation and activation of mouse neutrophils: implication of novel functional and regulatory pathways. *PLoS ONE*, **2014**, 9:e108553. doi: 10.1371/journal.pone.0108553
- EFSA - European Food Safety Authority. Mycotoxins. Disponible en: <http://www.efsa.europa.eu/en/aboutefsa.htm>. Consultado el 13 noviembre 2023.
- European Commission (EC) Commission Recommendation (EC) No 576/2006 of 17 August 2006 on the presence of deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin A, T-2 and HT-2 and fumonisins in products intended for animal feeding. *Off J Eur Union* L229:7-9. **2006**

- FAWC. Second report on priorities for research and development in farm animal welfare. Farm animal welfare council. MAFF Tolworth, UK. **1993**
- Firat, A.; Ozpinar, A. Metabolic profile of pre-pregnancy, pregnancy, , and early lactation in multiple lambing Sakiz ewes. Changes in plasma glucose, B-hydroxybutyrate and cortisol levels. *Ann Nutr Metab* **2002**, *46*, 57–61.
- Fraile, E. Principales micotoxicosis en ganado ovino. Disponible en https://www.mapa.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/revistas/pdf_MG/MG_2011_236_86_90.pdf Consultado el 16 noviembre 2023
- Fransson R.D. Anatomía y Fisiología Veterinaria. 12ª ed. México: McGraw Hill Interamericana. **2014**.
- Fink-Gremmels J. Mycotoxins in cattle feeds and carry-over to dairy milk: a review. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* **2008a** *25* (2),172-80. doi: 10.1080/02652030701823142.
- Fink-Gremmels, J. The role of mycotoxins in the health and performance of dairy cows. *Vet J.* **2008b**, *176* (1), 84-92. doi: 10.1016/j.tvjl.2007.12.034.
- Gallo, C.; Lizondo, G.; Knowles, G. Effects of journey and lairage time on steers transported to slaughter in Chile. *Vet Rec* **2003**, *152*, 361-364.
- Galyean, M.L.; Lee, R.W.; Hubbert, M.E. Influence of fasting and transit on rumen blood metabolites in beef steers. *J. Anim. Sci.* **1981**, *53*, 7.
- García, M.; Bradford, B.J.; Nagaraja, T.G. Revisión invitada: microbios ruminales, productos microbianos e inflamación sistémica . *Los científicos profesionales de animales* **2017**, *33* , 635–650. Disponible en: 10.15232/pas.2017-01663
- García-Bocanegra, I.; Zafra Leva, R.. Enfermedades infectocontagiosas en rumiantes: Manuales clínicos de Veterinaria. Elsevier **2019**
- García-Sacristán A. Fisiología Veterinaria (2ª ed.). Editorial Tébar Flores. **2018**
- Garibotto, G.; Bianhi, G. El ultrasonido como herramienta en la industria animal. Nota técnica. *Cangüe* **2001**, *23*, 12-16.
- Gazzaneo, M.; Tineo, E.; Chapín, Y.; Vizcaíno, R.; Gerardino, O.; Rodríguez, Y. Albúmina sérica como indicador negativo de estrés metabólico en pacientes pediátricos con sepsis. *Estado Anzoátegui AVPP* **2005**, *68*, 7–14
- Gimeno, A.. 2002. Revisión general del problema de los hongos y micotoxinas en alimentación animal. Disponible en: www.engormix.com. Consultado el 16 noviembre 2023
- Gleeson, M.; Bishop, N.C.; Stensel, D.J.; Lindley, M.R.; Mastana, S.S.; Nimmo, M.A. The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. *Nat Rev Immunol* **2011**, *11*:607–615. doi: 10.1038/nri3041.
- Greenlee-Wacker, M.C. Clearance of apoptotic neutrophils and resolution of inflammation. *Immunol Rev* **2016** *273*, 357–370. doi: 10.1111/imr.12453
- Gulke, N.E. The nexus of host and pathogen phenology: understanding the disease triangle with climate change. *New Phytol* **2011**, *189*, 8-11.
- Habibu, B.; Kawu, M.U.; Makun, H.J.; Aluwong, T.; Yaqub, L.S.; Ahmad, M.S.; Tauheed, M.; Buhari, H.U. Influence of sex, reproductive status and foetal number on erythrocyte osmotic fragility, haematological and physiologic parameters in goats during the hot-dry season. *Vet. Med. Czech* **2014**, *59*, 479–490.
- Hack, A.; Couto, K. Caracterización genética y perfil hematológico y bioquímico en ovinos de raza "Criolla Lanada Serrana " del Planalto Serrano Catarinense - Santa Catarina, Brasil. 2010. Disponible en: <http://buleria.unileon.es/bitstream/handle/10612/827/2009COUTO%20HACK%2c%20KARINA.pdf?sequence=1> Consultado el 16 noviembre 2023
- Hall J.E. El Sistema nervioso: Principios generales y fisiología de la sensibilidad. En Guyton y Hall: Tratado de Fisiología. Hall JE (eds). 14ª Edición. Elsevier Saunders, España. **2021**. pp 541-582.
- Hall, J.E.; Guyton, A.C.; Hall, M.E. Tratado de fisiología médica (14ª). Elsevier. **2021**.

- Han, L.X.; Yao, W.L.; Pan, J.; Wang, B.S.; He, W.H.; Fan, X.P.; Wang, W.H.; Zhang, W.D. Moniezia benedeni Infection restrain IgA+, IgG+, and IgM+ cells residence in sheep (Ovis aries) small intestine. *Front. Vet. Sci.* **2022**, *28*, 878467. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022>.
- Herrera-Corredor, A.; Salazar-Murillo E.A.; Sánchez Hernández, M.A.; Rosales-Nieto, C.A.; Zaragoza-Bastida, A.; Rivas-Jacobo, M.A. Productividad de ovejas en pastoreo suplementadas *Ecosist Recur Agropec* **2021**. II: e2972 <https://doi.org/10.19136/era.a8nII.2972>
- Husted, S.M.; Nielsen, M.O.; Blache, D.; Ingvarsten, K.L. Glucose homeostasis and metabolic adaptation in the pregnant and lactating sheep are affected by the level of nutrition previously provided during her late fetal life. *Domest Anim Endocrinol* **2008**, *34*, 419–431.
- Ismaeel, M.A.; Awad, A.H.; Dhahir, N.N. Assessment of alterations in some blood biochemical and mineral contents concentration before and during pregnancy period in Iraqi ewes of Salah-edin province. *Iraq J. Vet. Sci.* **2019**, *32*, 161–165.
- Jard, G.; Liboz, T.; Mathieu, F.; Guyonvarch, A.; Lebrihi, A. (2011). Review of mycotoxin reduction in food and feed: From prevention in the field to detoxification by adsorption or transformation. *Food Addit and Contam: Part A* **2011** *28*, 1590-1609.
- Jauchem, J.R.; Burns, J.M.; Voorhees, W.B.; Jirjis, MB. Increased hematocrit due to electrical-waveform exposures in splenectomized *Sus scrofa*. *J Forensic Sci* **2019**, *64*(4), 1196–1202. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.13969>
- Jelinek, C.F.; Pohland, A.E.; Wood, G.E. Worldwide occurrence of mycotoxins in foods and feeds (an update). *J AOAC International*, **1989**, *72*, 223–230.
- Kabak B. The fate of mycotoxins during thermal food processing. *J Sci Food Agr*, **2009**, *89*: 549-54.
- Kanamori, K.; Ross. B.D. 1995. Steady-State in-Vivo Glutamate-Dehydrogenase Activity in Rat-Brain Measured by N-15 Nmr. *J Biol Chem*, **1995**, *270*, 24805-24809.
- Kaneko, J.J.; Harvey, J.W.; Bruss, M.L. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, 6th ed.; Academic Press: San Diego USA, **2008**.
- Keller-Wood, M. Inhibition of stimulated and basal ACTH by cortisol during ovine pregnancy. *Am. J. Physiol.* **1996**, *271*, R130–R136. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1996.271.1>.
- Kenyon, P.R.; Roca Fraga, F.J.; Blumer, S.; Thompson, A.N. Triplet lambs and their dams—a review of current knowledge and management systems. *N Z J Agric Res* **2019**, *62*, 399–437.
- Khalif, A.T.; Al-Thuwaini, T.M.; Al-Shuhaib, M.B.S. Association of litter sizewith hematology parameters of Awassi Iraqi ewes. *J. Kerbala Agric Sci* **2020**, *7*, 20–26.
- Khalili, M.; Chamani, M.; Amanlou, H.; Nikkhah, A.; Sadeghi, A.A. Effects of different sources of selenium supplementation on antioxidant indices, biochemical parameters, thyroid hormones, and Se status in transition cows. *Acta Sci. Anim. Sci.* **2019**, *4*, 44392.
- Khan, A.A.; Allemailem, K.S.; Alhumaydhi, F.A.; Gowder, S.J.T.; Rahmani, A.H. The biochemical and clinical perspectives of lactate dehydrogenase: An enzyme of active metabolism. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, **2020** *20*(6):855-868. doi: 10.2174/1871530320666191230141110. PMID: 31886754.
- Khatun, A.; Wani, G.M.; Bhat, J.I.A.; Choudhury, A.R.; Khan, M.Z. Biochemical indices in sheep during different stages of pregnancy. *Asia J Anim Vet Adv* **2011**, *6*, 175–181.
- Kheirandish, P.; Petri, R.M.; Sener-Aydemir, A.; Schwartz-Zimmermann, H.E.; Berthiller, F.; Zebeli, Q.; Pacifico, C. Characterization of microbial intolerances and ruminal dysbiosis towards different dietary carbohydrate sources using an in vitro model. *J Appl Microbiol* **2022**, *133*(2):458-476. doi: 10.1111/jam.15573.
- Knowles, T.; Warriss, P. Stress physiology of animals during transport. In: *Livestock handling and transport*, eds. Temple Grandin. 3 ed. Biddles, King's Lynn., UK **2006**.
- Křížková, V. Blood and Blood Components, Hematopoiesis, Selected Methods Used in Cytology, Histology and Hematology. Charles University in Prague, Karolinum Press. **2021**.
- Kumar, V.; Abbas, A.K.; Aster, J.C. Robbins y Cotran. Patología estructural y funcional. 10ª edición. Saunder, Elsevier. **2021**.

- Kunene, N.W.; Nesamvuni, A.E.; Nsahlai IV. Determinación de ecuaciones de predicción para estimar el peso corporal de ovejas Zulu (Nguni). *Small Ruminant Res* **2009**, 84:41-46.
- Kurtz, D.M.; Travlos, G.S. *The Clinical Chemistry of Laboratory Animals*. CRC Press, Inc. **2018**.
- Kyriazakis, I., Savory, J. Hunger and thirst. In *Animal welfare* (ed. MC Appleby and BO Hughes). CAB International, Wallingford, UK. **1997**.
- Lamm, M.E. Interaction of antigens and antibodies at mucosal surfaces. *Annu Rev Microbiol* **1997**, 51:311–340. doi: 10.1146/annurev.micro.51.1.311.
- Larry, E. *Metabolic and Endocrine Physiology*; Teton NewMedia: New York, NY, USA, **2012**.
- Li, M.; Wang, Y.S.; Elwell-Cuddy, T.; Baynes R.E.; Tell, L.A.; Davis, J.L.; Lin, Z. Physiological parameter values for physiologically based pharmacokinetic models in food-producing animals. Part III: Sheep and goat. *J Vet Pharmacol Ther* **2020**, 1–22. <https://doi.org/10.1111/jvp.12938>
- Lilliefors, H.W. On the Kolmogorov-Smirnov Test for Normality with Mean and Variance Unknown. *J Am Stat Assoc* **1967**, 62(318), 399–402. <https://doi.org/10.2307/2283970>
- Lindsay, D.B. Changes in the pattern of glucose metabolism in growth, pregnancy and lactation in ruminants. *Proc Nutr Soc* **1971**, 30, 272–277.
- Marteniuk, J.V.; Herdt, T.H. Pregnancy toxemia and ketosis of ewes and does. *Vet. Clin. N. Am. Food A* **1998**, 4, 307–315. [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)31050-1](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)31050-1).
- Martín, J.B.; Álvarez, L.M.; Martín, F.; Barro, J.; Ballesteros. El desarrollo del tritordeum, un nuevo cereal para el procesamiento de alimentos. *J. Cereal Sci* **1999**, 30, 85-95. doi: ,10.1006/jcrs.1998.0235
- Martínez-Ros, P.; Astiz, S.; García-Rosello, E.; Rios-Abellan, A.; González-Bulnes, A. Effects of short-term intravaginal progestagens on the onset and features of estrus, preovulatory LH surge and ovulation in sheep. *Anim Reprod Sci* **2018**, 197, 317-323.
- Mazanec, M.B.; Nedrud, J.G.; Kaetzel, C.S.; Lamm, M.E. A three-tiered view of the role of IgA in mucosal defense. *Immunol Today* **1993**, 14, 430–435. doi: 10.1016/0167-5699(93)90245-G
- McDonald, J.H. *Handbook of biological statistics*. New York. **2014**.
- Mendoza, A.; González, A.; Berumen, et al; Diagnóstico Clínico del Ovino. Tesis de Grado. Tabasco: Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. **2011**.
- Miller, J.D. Mycological investigations of indoor environments. In: *Microorganisms in Home and Indoor Work Environments: Diversity, Health Impacts, Investigation and Control* eds. Flannigan, B., Samson, R.A. and Miller, J.D., pp. 231–246. New York: Taylor and Francis. **2001**.
- Mishalian, I.; Granot, Z.; Fridlender, Z.G. The diversity of circulating neutrophils in cancer. *Immunobiol* **2017**, 222, 82–88. doi: 10.1016/j.imbio.2016.02.001
- Moretti, A.; Pascale, M.; Logrieco A.F. Mycotoxin risks under a climate change scenario in Europe. *Trends Food Sci Technol* **2019**, 84, 38-40.
- Mormède, P.; Andanson, S.; Aupérin, B.; Beerda, B.; Guémené, D.; Malmkvist, J.; Manteca, X.; Manteuffel, G.; Prunet, P.; van Reenen, C.G.; Ricardo, S.; Veissier, I. Exploration of the hypothalamic-pituitary-adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. *Physiol Behav* **2007**, 92, 317-339.
- Mortola, J.P.; Wilfong, D.A. Hematocrit of mammals (Artiodactyla, Carnivora, Primates) at 1500 m and 2100 m altitudes. *Zoology*, **2017** 125, 10–23. <https://doi.org/10.1016/j.zool.2017.07.001>
- Ndoutamia, G.; GandaA, K. Détermination des paramètres hématologiques et biochimiques des petits ruminants du Tchad. *Rev Med Vet* **2005**, 156(4), 202–206.
- Nelson, D.L.; Cox, M.M; Cuchillo M. Lehninger. Principios de bioquímica. 7ªed. Editorial Omega. **2018**.
- Netea, M.G.; Joosten, L.A.; Latz, E.; Mills, K.H.; Natoli, G.; Stunnenberg, H.G., O'Neill L.A.J.; Xavier, R.J. Trained immunity: a program of innate immune memory in health and disease. *Science* **2016**, 352:aaf1098. doi: 10.1126/science.aaf1098
- Neville V, Gleeson M, Folland JP. Salivary IgA as a risk factor for upper respiratory infections in elite professional athletes. *Med Sci Sports Exerc* **2008**, 40,1228–1236.

- Nocente, F.; Natale, C.; Galassi, E.; Taddei, F.; Gazza, L. Using de Einkorn and Triticum Brewers' Spent Grain to increase the nutritional potential of Durum Wheat. *Foods* **2021**, *10*, 502.
- Parker, A.J.; Hamlin, G.P.; Coleman, C.J.; Fitzpatrick, L.A. Excess cortisol interferes with a principal mechanism of resistance to dehydration in Bos indicus steers. *J Anim Sci* **2004**, *82*, 1037-1045.
- Pinotti, L.; Ottoboni, M.; Giromini, C.; Dell'Orto, V.; Cheli, F. (2016) Mycotoxin contamination in the EU feed supply chain: a focus on cereal byproducts. *Toxins (Basel)*, **2016** *8*,45. doi: 10.3390/toxins8020045
- Plaitakis, A.; Metaxari M.; Shashidharan P. Nerve tissue specific (GLUD2) and housekeeping (GLUD1) human glutamate dehydrogenases are regulated by distinct allosteric mechanisms: Implications for biologic function. *J Neurochem* **2000**, *7*, 1862-1869.
- Polizopoulou, Z.S. Haematological tests in sheep health management. *Small Rumin Res* **2010**, *92*, 88–91, doi:10.1016/j.smallrumres.2010.04.015.
- Prache, S.; Schreurs, N.; Guillier, L. Review: Factors affecting sheep carcass and meat quality attributes. *Animal* **2021** *16* (1):100330. doi: 10.1016/j.animal.2021.100330. Epub 2021 Aug 13. PMID: 34400114.
- Provenza, F.D.; Scott, C.B; Phy, T.S.; Lynch J.J. Preferences of sheep for foods varying in flavors and nutrients. *J Anim Sci* **1996** *74*, 2355–2361. doi: 10.2527/1996.74102355x. PMID: 8904703
- Radostits, O.M.; Gay, C.C.; Blood, D.C.; Hinchcliff, W.W. Medicina Veterinaria, 9th ed.; McGrHill-Interamericana: London, UK, Volume II. **2002**.
- Rahman, M.K.; Islam, S.; Ferdous, J.; Uddin, M.H.; Hossain, M.B.; Hassan, M.M.; Islam, A. Determination of hematological and serum biochemical reference values for indigenous sheep (*Ovis aries*) in Dhaka and Chittagong Districts of Bangladesh. *Vet World*, **2018** *11*(8), 1089-1093. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.1089-1093>
- Rasff (2012). The Rapid Alert System for Food and Feed. Annual Report. EU, Luxembourg, Disponible en: <http://ec.europa.eu/RASFF>. Consultado el 13 de noviembre de 2023
- Reece W.O. Duke's physiology of domestic animals. 13th ed. .Wiley Blackwell, Iowa U.S.A. **2015**.
- Requena F.; Escribano, B.M.; Requena, F.D.; Montes, F.; Hernández M.; Serrano, A.; Cardoso, F., Requena, L.; Agüera, E.I. Mejora de bienestar animal asociada a una alimentación basada en nuevos piensos y forrajes más seguros y digestibles dentro del “Proyecto Ánfora”: presentación de los primeros resultados. *Anales de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental* **2016**, *28* (1), 269-299.
- Requena, F.; Requena, L.; Escribano, B.M.; Martínez-Marín, A.L.; Agüera, E.I. Influencia de la alimentación con forrajes con alta carga de micotoxinas en parámetros fisiológicos de bienestar animal y lesiones orgánicas en ovinos. *An. Real Acad. Cienc. Vet. Andal. Orient.* **2017**, *30*, 115–122.
- Requena, L.; Agüera, E.I.; Requena, F. Cambios fisiopatológicos en ovejas por consumo de ensilados con micotoxinas frente a nuevos forrajes ensilados. *Creando Redes* **2019**, 207.
- Requena, F.; Escribano, B.M.; Martínez-Marín, A.L.; Alcalde, M.J.; Requena, L.; Agüera, E.I. Alteración de índices fisiológicos de bienestar animal y lesiones orgánicas en ovejas alimentadas con alta cantidad de ensilado de maíz con micotoxinas frente a ensilado de tritordeum. XLIII Congreso Nacional y XIX Congreso Internacional de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotécnica SEOC, Zaragoza, 19 al 21 septiembre **2018**.
- Retamales E., Recomendaciones para la interpretación del Hemograma. Instituto de Salud Pública, Ministerio de Salud, Gobierno de Chile. Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia, **2013**.
- Rey, M.D.; Calderón, M.C.; Rodrigo, M.J.; Zacarías, L.; Alós, E.; Prieto, P. Novel bread wheat lines enriched in carotenoids carrying Hordeum chilense chromosome arms in the ph1b background. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0134598.
- Ribeiro, L.N.; Ribeiro, N.M.; Bozzi, R.; Givisiez, E.N.; Costa, G.R. Physiological and biochemical blood parameters of goats subjected to heat stress. *J of Biomed and Environm Sci* **2014**, *09*, 29-35.
- Rodríguez, M. Micotoxinas en granjas de ganado vacuno lechero. Contaminación de raciones y transferencia de aflatoxinas a la leche. Estudio procedente de España. *Nutrinews Latina* **2023**, *2*, 82-89.

- Rodríguez-Magadan, H.M.; Hernández-Bautista, J.; Cadena-Villegas, S.; Salinas-Rios, T.; Silva-Rodríguez, E.; Torres-Aguilar, H.; Sosa-Montes, E. Respuesta reproductiva, metabólica y cambios corporales en ovejas alimentadas con dos niveles de energía. *Revista MVZ Córdoba*, **2021**, 1-6 doi.org/10.21897/rmvz.2129
- Romero O. Herramientas de manejo animal. Evaluación de la condición corporal y edad de los ovinos. Informativo 79. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Ministerio de Agricultura, Temuco, Chile, **2015** 1-4.
- Romero, M.H.; Uribe-Velázquez, L.F.; Sánchez, J.A. Biomarcadores de estrés como indicadores de bienestar animal en ganado de carne. *Biosalud* **2011**, *10*, 71–87.
- Rosales, C. Neutrophil: a cell with many roles in inflammation or several cell types? *Front Physiol*, **2018** *9*. doi:10.3389/fphys.2018.00113
- Rubiales, D.; Snijders, C.H.A., Nicholson, P.; Martín, A. Reacción del tritordeum a *Fusarium culmorum* y *Septoria nodorum*. *Eutífica* **1996**, *88*, 165-174.
- Russi J.P. Utilización de la glucosa en rumiantes. Diferencias entre la absorción y el metabolismo del almidón y la glucosa en los rumiantes. *Nutrinews A. Latina* **2020**, 64-73.
- Saad, E.J.; Rodríguez Ruiz A.; Douthat Y Barrionuevo, A.; Milanesio, M.; Flores Balverdi, J.; Riscanevo, N.C.; Peñaranda, G.E.; Novatti, E.B.; Saurit, V.; Alvarez, A.C.; Baenas, D.F. Estudio de los pacientes con elevación de enzima Creatinfosfokinasa en dos hospitales de tercer nivel de la ciudad de Córdoba. *Rev Fac Cien Med Univ Nac Cordoba*. **2022**, *21*;79(4):327-333. doi: 10.31053/1853.0605.v79.n4.36031. PMID: 36542584; PMCID: PMC9987303.
- Salazar Juárez, LF.. Determinación de la presencia de aflatoxinas en granos de maíz (*Zea mays*) producidos en Petén y distribuidos en la central de mayoreo de la ciudad capital, y elaboración de un análisis de peligros y puntos de control críticos (APPCC). Tesis Licenciatura. Guatemala, USAC. **2008**.
- Salcedo, G.; Martínez, C.; Barceló, P.; Lazzeri, P.; Martín, A. Potencial productivo y nutritivo de los triticales de nueva generación. Pastos y PAC 2014–2020. En: Proceedings de la 53ª Reunión Científica de la SEEP, Paris, Francia, 9–12 June; pp. 263–270. **2014**.
- Salvacion, A.R.; Pangga, I.B.; Cumagun, C.J. Assessment of mycotoxin risk on corn in the Philippines under current and future climate change conditions. *Rev Environ Health* **2015**, *30*, 135-142.
- Sánchez-León, S.; Haro, C.; Villatoro, M.; Vaquero, L.; Comino, I.; González-Amigo, A.B.; Vivas, S.; Pastor, J.; Sousa, C.; Landa, B.B.; et al. Los panes de Tritordeum son bien tolerados con preferencia sobre los panes sin gluten en pacientes sensibles al trigo no celíacos y su consumo induce cambios en las bacterias intestinales. *J. Cienc. Aliment. Agrícola* **2021**, 1-9.
- Sapolsky, R.M.; Romero, M.L.; Munck, A.U. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocrinol Rev* **2000**, *21*(1), 55-89.
- Schroeder, H.W.; Cavacini, L. Structure and function of immunoglobulins. *J Allergy a Clin Immunol* **2010**, *125* (2), S41-S52.
- Sebolai, B.; Nsoso, S.J.; Podisi, B.; Mokhutshwane, B.S. La estimación del peso vivo basada en rasgos lineales en cabras indígenas Tswana de distintas edades en Botswana. *Trop Anim Health Prod* **2012**, *44*, 899-904.
- Sejrsen, K.; Hvelplund, T.; Nielsen, M.O. Physiology of Ruminants; Wageningen Academic: Wageningen, The Netherlands, **2006**. <https://doi.org/10.3920/978-90-8686-566-6>.
- Sharma, A.; Kumar, P.; Singh, M.; Vasishta, N.K. Haemato-biochemical and endocrine profiling of northwestern Himalayan Gaddi sheep during various physiological/reproductive phases. *Open Vet. J.* **2015**, *5*, 103–107.
- Shewry, PR, Brouns, F., Dunn, J., Hood, J., Burridge, AJ, America, AHP, Gilissen, L., Proos-Huijsmans, ZAM, Van Straaten, JP, Jonkers, D., Lazzeri, PA, Ward, JL y Lovegrove, A. Comparative compositions of grain of tritordeum, durum wheat and bread wheat grown in multi-environment trials. *Food Chemistry* **2023** 423, 136312. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.136312>
- Solano, J.; Galindo, F.; Orihuela, A.; Galina, C.S. The effect of social Rank on the physiological response during repeated stressful handling in Zebu cattle (*Bos indicus*). *Physiol Behav* **2004**, *82*, 679-683.

- Soliman, E.B. Effect of physiological status on some hematological and biochemical parameters of Ossimi sheep. *Egypt J. Sheep Goats Sci.* **2014**, *9*, 1–10.
- Soriano del Castillo JM. Micotoxinas en alimentos. Ediciones Díaz Santos. **2007**.
- Sowande, O.S., Sobola, O.S. Body measurements of west African dwarf sheep as parameters for estimation of live weight. *Trop Anim Health Prod* **2008**, *40*, 433–439.
- Squires, E.J. Efectos sobre el comportamiento, salud y bienestar animal. Endocrinología animal aplicada. En Endocrinología aplicada. Editorial Acribia, S.A., pp211-251. **2006**.
- Standford K.; Clark I.; Jones S.D.M. Use of ultrasound in prediction of carcass characteristics in lamb. *J Anim Sci* **1995** *75*, 1985-189.
- Stockman, C.A.; Collins, T.; Barnes, A.L.; Miller, D.; Wickham, S.L.; Beatty, D.T.; Blache, D.; Wemelsfelder, F.; Fleming, P.A. Qualitative behavioural assessment, and quantitative physiological measurement of cattle naïve and habituated to road transport. *J. Anim. Prod. Sci.* **2011**, *51*, 240–24.
- Tadich, N.; Gallo, C.; Bustamante, H.; Schwerter, M.; van Schaik G. Effects of transport and lairage time on some blood constituents of Friesian-cross steers in Chile. *Livest Prod Sci* **2005**, *93*, 223-233.
- Tecchio, C.; Cassatella, M.A. Neutrophil-derived chemokines on the road to immunity. *Semin Immunol* **2016**, *28*, 119–128. doi: 10.1016/j.smim.2016.04.003
- Teijón, J.M. Fundamentos de bioquímica estructural. 3ª ed. Editorial Tebar, Madrid. **2016**.
- Teleb, D.; Ahmed, N.; El-Din, T.; Hanan, A.; Abou El Soud, S.; Hassan, O.M. Study of levels of some blood hormonal and biochemical constituents during different reproductive status in Saidi ewes. *Egypt J. Sheep Goats Sci.* **2019**, *9*, 1–10.
- Tizard I.R. Introducción a la inmunología veterinaria. 10ª ed. Elsevier, Brcelona, España. **2018**.
- Torrens, M. Interpretación clínica del hemograma. *Rev Med Clin Las Condes* **2015**, *26*(6), 713-725.
- Torrent, M.; Badell, I. Intrepretación del hemograma y de las pruebas de coagulación. Madrid: Exlibris Ediciones; **2012**.
- Trevisi, E.; Bertoni, G. Some physiological and biochemical methods for acute and chronic stress evaluation in dairy cows. *Ital J Anim Sci* **2009**, *8*(Suppl.1), 265-286.
- Uribe-Querol, E.; Rosales, C. Neutrophils in cancer: two sides of the same coin. *J. Immunol. Res.* **2015**, 983698. doi: 10.1155/2015/983698.
- Vaquero, L.; Comino, I.; Vivas, S.; Rodríguez-Martín, L.; Giménez, M.J.; Pastor, J.; Sousa, C.; Barro, F. Tritordeum: Un nuevo cereal para procesamiento de alimentos con buena aceptabilidad y reducción significativa de péptidos inmunogénicos de gluten en comparación con el trigo. *J. Cienc. Aliment. Agrícola*, **2018**, *98*, 2201–2209.
- Vaquero, P. Genética, nutrición y enfermedad. Editorial CSIC - CSIC Press; **2008**.
- Venance, SL. Approach to the Patient with HyperCKemia.. *Muscl eneuromuscul Junct disord Continuum (Minneap Minn)* **2016** *22*(6):1803–1814. doi: 10.1212/01.CON.0000511069.68640.39.
- Vera y Vega, A. Alimentación y pastoreo del ganado ovino. Ed.UCO. **1985**
- Vidarsson G.; Dekkers, G.; Rispens T. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Front Immunol* **2014**, *5*:520. doi: 10.3389/fimmu.2014.00520.
- Villalba, J.J.; Manteca, X.; Provenza, F.D. Relationship between reluctance to eat novel foods and open-field behavior in sheep. *Physiol Behav* **2009**, *96*, 276–281.
- Villegas, D.; Casadesús, J.; Atienza, SG; Martos, V.; Maalouf, F.; Karam, F.; Aranjuelo, I.; Nogués, S. Tritordeum, componentes del rendimiento del trigo y el triticale en condiciones de sequía mediterránea multilocal. *Cultivo de campo Res* **2010**, *116*, 68–74.
- Vives Corrons J., Aguilar J., Manual de Técnicas de laboratorio en Hematología, 4ª edición, Barcelona, Editorial Masson, **2015**.
- Voigt, G.L. Conceptos y técnicas hematológicas para técnicos veterinarios. Zaragoza, Acribia. **2003**.

- Wang, J.P.; Yoo, J.S.; Kim, H.J.; Lee, H.I.; Kim, I.H. Nutrient digestibility, blood profiles and fecal microbiota are influenced by chitooligosaccharide supplementation of growing pigs. *Livest. Sci.* **2009**, *125*, 298–303.
- Winter, A.L.; Moses, M.A.; Vega, S. El manual Merck de Veterinaria, 11th ed.; Grupo Asis Biomédica: S.L. Zaragoza, Spain, **2022**.
- Wishart, H., Morgan-Davies, C., Stott, A., Wilson, R., Waterhouse, T. Liveweight loss associated with handling and weighing of grazing sheep. *Small Rumin Res* **2017**, *153*, 163-170. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2017.06.013>
- Yenilmez, K.; Arslan, S.; Kiliç, S.; Atalay, H. The effect of twinship on selected hematological and biochemical parameters in late pregnant ewes. *Med. Weter.* **2021**, *77*, 6578–2021.
- Yilmaz, O., Cemal, I., Karaca, O. 2013. Estimation of mature live weight using some body measurements in Karyia sheep. *Trop Anim Health Prod* **2013**, *45*, 397-403.
- Zdaniewicz, M.; Pater, A.; Hrabia, O.; Dulinski, R.; Cioch-Skoneczny, M. Tritordeum malt: An innovative raw material for beer production. *J. Cereal Sci.* **2020**, *96*, 103095
- Zheng, J.; Xiao, X.; Zhang, Q.; Yu, M. DNA methylation: the pivotal interaction between early-life nutrition and glucose metabolism in later life. *Br J Nutr* **2014**, *112*(11), 1850-7.

Páginas Web:

- Agrasys S.L. <https://www.dicyt.com/viewItem.php?itemId=35870>
- <https://inmunosalud.net/index.php/defensas/70-03-inmunoglobulinas>
- https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/notapac2023-web-ovinocaprinodef_tcm30-58890.pdf
- <https://twitter.com/farmacotips/status/1393974282045304832chromeextension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://repositorio.unillanos.edu.co/bitstream/handle/001/2813/TESES%20FINAL%20%20DETERMINACION%20DE%20PAR%20METROS%20HEMATOL%20GICOS%20Y%20QU%20DMICA%20SANGU%20DNEA%20EN%20VINOS.%20%281%29.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- <https://www.miteco.gob.es/es/biodiversidad/temas/espacios-protegidos/red-natura-2000.html>
- <https://www.adisseo.com>
- <https://www.mipromaalimentacion.es/aflatoxina-b1>

10 ANEXO I. INDICIOS DE CALIDAD

