



Universitat Autònoma de Barcelona
Departament de Ciència Animal i dels Aliments

**Evaluación de diferentes estrategias de ordeño en ovejas lecheras de raza
Manchega y Lacaune: efectos de la disminución de la frecuencia de ordeño
sobre la secreción y el almacenamiento de la leche en la ubre**

*Evaluation of different milking strategies in Manchega and Lacaune dairy
ewes: effects of decreasing milking frequency on milk secretion and milk storage
in the udder*

TESIS DOCTORAL

VANESA CASTILLO LÓPEZ

Barcelona (2008)



Universitat Autònoma de Barcelona
Departament de Ciència Animal i dels Aliments

La tesis doctoral **“Evaluación de diferentes estrategias de ordeño en ovejas lecheras de raza Manchega y Lacaune: efectos de la disminución de la frecuencia de ordeño sobre la secreción y el almacenamiento de la leche en la ubre”**¹ realizada por Vanesa Castillo López y dirigida por los doctores Francesc Xavier Such y Gerardo Caja del Departament de Ciència Animal i dels Aliments de la Universitat Autònoma de Barcelona se presenta para optar al grado de Doctor.

Bellaterra, 11 de Febrero de 2008

Dr. Xavier Such i Martí

Dr. Gerardo Caja López

¹ Todos los trabajos presentados en esta tesis forman parte del proyecto CICYT (AGL2002-03472), financiado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología de España.

A mi abuelo, el principio de todo

A mi familia, lo más importante

A tu Tomàs, per aparéixer

*Senyor, el meu cor no és ambició ni són altius els meus ulls;
visc sense pretensions de grandeses o de coses massa altes per a mi.
Jo em mantinc en pau, tinc l'ànima serena.
Com un nen a la falda de la mare, així se sent la meva ànima.*

Salm 130

AGRADECIMIENTOS

Sens dubte, aquest és un dels grans i millors moments de la tesi! Qui deixaria passar l'oportunitat de dir **gràcies** a totes les persones que al llarg d'aquests anys de bogeria m'han acompanyat i m'han estimat? Jo, no penso fer-ho:

En primer lloc, voldria donar les gràcies al meu director de tesi, Dr. Xavier Such. Mil gràcies per aquests 5 anys de respostes, consells, correccions, discussions científiques, riures, d'acompanyament..., però sobretot per haver confiat en mi i en el meu treball, per ser rigurós i per transmetre'm la il·lusió pel treball de granja. Moltes gràcies per haver-me animat en els moments durs de la tesi i, per fer-te proper.

A mi codirector de tesis, Dr. Gerardo Caja. Por transmitirme las ganas de ciencia y el interés por publicar. Gracias por las recomendaciones y apreciaciones hechas, y por acabar de dar forma a los "papers.

A tots els professors que m'heu acompanyat al llarg d'aquests anys. Gràcies a tots i a cadascú de vosaltres per l'escolta, l'ajuda i pels bons moments compartits. En especial a Elena, por las risas, los pequeños detalles, y por tener siempre la puerta abierta para escuchar y ayudar. Gracias por el buen humor y el cariño. I al Ramon, per la teva generositat i disponibilitat.

Als companys de despatx: Cristobal, ha sido un placer tenerte tan cerquita. En estos momentos "yo también siento que la Virgen me habla". Gracias por tu amistad. Ahmed, muchas gracias por tu ayuda, por tus críticas y por estar siempre dispuesto a echar una mano. A Marta, Moez, Jean, Juan, Bertha i Ali, ja no sou per aquí però, gràcies per tants moments. I als que encara ressiu: Alejandra, Adel, Sergi, Antonio, Vanessa, i Lucia, gràcies per aquests mesos tan agradables. Por las entretenidas discusiones en el bar, por crear un buen ambiente de trabajo y por el gran intercambio cultural. Visca la multiculturalitat!

Sense dubtes, no m'oblidaré dels grans moments compartits amb el Luciano, l'Aina, l'Ernesto, la Coni, l'Elier, la Irene, i l'Amine. Ens ho vam passar verdaderament bé! Gràcies per les escapadetes a la Costa Brava, a Cotlliure, pels grans sopars internacionals, pels amics invisibles i per les mil i una xerradeta entre granja i SAS. Amb vosaltres, combinar feina i diversió ha estat possible. Aquests darrers mesos us he trobat molt a faltar!

A tots els becaris i becàries de Producció Animal. Als que ja heu marxat: Lorena, Marta Busquet, Paul, Martha Li, Sílvia, Montse, Ana, Begoña, Aida, Glauber, Vincent, Toni,

Gerardo Zenón, José, Adriana, als qui m'hagi pogut descuidar... I als que encara hi sou: Marta Blanch, M. Carmen, María, Roser, Diego, Feliu, Cristina, molts ànims a tots!

A les "secres", pel bon ambient, per atendre'ns sempre amb un somriure a la cara, i per fer la feina que no es veu però que és tan i tan important. Mil gràcies també a la Rosa i al Blas, per les hores al laboratori i les posades a punt de noves tècniques. I a la Carmen, per la seva alegria i per les seves ganes.

A la GRANJA. Gràcies a l'Alfredo, a l'Adela i al Josep, per les classes magistrals de munyida mecànica i de maneig de Manxeguetes i Lacaunecitas, però sobretot perquè m'heu fet sentir com a casa, perquè m'heu cuidat i heu fet que anar a la granja fos tot un privilegi. Gràcies Ramon, pels teus consells i per la teva confiança. Gràcies per deixar-me convertir el teu despatx en el meu dormitori durant aquelles setmanes boges. Gràcies al Ricard, per les cançons de bon matí i per fer-me riure tantes vegades; al Ramon Sáez, pel teu bon humor, pels ànims, i per carregar-me les piles cada matí; al Manel, pel teu somriure, la teva calma i pels "piques" Barça-Penya; al Vale, per les estones que hem "filosofat" sobre el món ramader i tantes coses, i al Manolo, pels teus acudits, que en més d'una ocasió m'han fet treure els colors i per tants "¡Hola, prenda!" Gràcies de debò, m'he sentit una més!

A les meves nenes: Rosa, Montse, Ester, Irene, Sònia, Marina, Cèlia, Laia, Núria, i Lourdes i al meu nen, Xavi. Gràcies per la vostra ajuda amb el treball de granja i de laboratori, per les vostres ganes i entusiasme. Amb vosaltres, tot va ser més fàcil!

Je tiens à remercier particulièrement Mr. Marnet, pour m'avoir donné l'opportunité et de m'accueillir au sein de l'UMR Production du lait INRA-Agrocampus Rennes. Je remercie aussi à tous les membres de l'équipe de l'unité, qui m'ont fait sentir mon stage de 6 mois tant agréable et reste toujours dans ma mémoire. Merci pour les cafés, les gateaux, les recettes que vous m'avez offerts et pour me découvrir les secrets Rennaises. Merci, spécialement à Jacques, pour ta gentillesse, et aux stagiaires : Aurélie, Moussa et Erwan, bon courage pour la continuation ! Sans votre aide et patience mon Français n'aurait pas pu s'améliorer. Je veux aussi remercier tous les animaliers, les jours à la ferme ont été très amusants ! Finalement aux copains de l'Agrocampus avec lesquelles j'ai partagé beaucoup de repas, soirées et weekends. Merci beaucoup pour les barbecues ! C'était magnifique d'apprendre quelques mots en Arabe, en Swédois, en Allemand, en Slovénien, en Mexicano, en Chileno, ...

Muchas gracias a las niñas: Vero y María. Con vosotras, descubrir la Bretagne fue muy especial. Gracias por hacerme sentir como en casa aún estando a miles de kilómetros y

gracias por todos los momentos, por las risas, los abrazos y por el cariño. Os guardo en un rinconcito muy especial. Y a Miguel y Alvarito, qué bien lo pasamos.

Mil gràcies als grans amics de la carrera i de la vida. A la Núria Andrés, per la teva força, les teves ganys i per les teves abraçades fortes i sinceres. M'ha encantat compartir amb tu mil moments a la granja, converses telefòniques i palmeres de xocolata. A en Carles i en Pep, pel recolzament, per la visiteta a París (des d'aleshores em vau acabar de robar el cor!!!) i, per tants i tants moments. Pep, ara et toca a tu! A tu Clara, perquè sempre i malgrat la distància t'he trobat aprop. Per tots els moments viscuts, per tot el que ens ha passat i ens passarà, visca els Reis Mags i visca la xocolata! Gràcies a tots per ser-hi sempre!

A mis queridísimas “Chiquis: Olguita, Núria, Judith y Maitechu, vosotras sois de las que se pueden contar con los dedos de la mano. Gracias por nuestros grandes momentos, por la amistad de tantos años y porque sé con certeza que siempre estaréis ahí! Y no me olvido, gracias a los mariditos, porque en más de una ocasión han aguantado lo que otros no hubieran hecho, jejejeje!

A Carlos, por nuestros piques, nuestras risas y porqué sé el cariño que me tienes. Y a Nuria, por tantos años.

A Pep, Sonia, Siria, y Montse, a mis niños y a todos los de los Sales, imprescindibles! A Pili y a “les noiètes” del Cottolengo, por enseñarme a ver la vida con otros ojos. Sou àngels...

Un petonàs enorme pel grupet de les doctorials, perquè el món post-tesi ens espera! I pels llicenciats i batxillers de Vallespir 172, graciíiiiiis!!!!

Gracis, Suau! Perquè aquests darrers mesos infernals els has convertit en un conte molt agradable. Per fer que tot resulti tan fàcil, pel teu somriure i per tants i tants projectes en comú. Ja s'acaba!

A la bella Roma, grazie mille!

A mi familia, por tener siempre una sonrisa que mostrarme y un abrazo que regalarme. Sin vosotros, esto no hubiera sido posible. Gracias por quererme y por hacerme sentir tan feliz siempre.

MOLTES GRÀCIES A TOTS!

LISTA DE ABREVIATURAS

1X, 2X,7X	1, 2, ...7 ordeños al día
12X, 14X	12 o 14 ordeños semanales
AG	Aparato de Golgi
bST	Somatotropina bovina
CN	Caseína
CP	Proteína bruta
DIM	Días en lactación
FIL	Factor inhibitorio de lactación
GH	Hormona de crecimiento
i.v.	Intravenoso
LPL	Lipoproteína lipasa
MBF	Flujo sanguíneo mamario
OT	Oxitocina
PIM	Presión intramamaria
PTHrP	Péptido relacionado con la hormona paratiroide
PRL	Prolactina
RCS	Recuento de células somáticas
REr	Retículo endoplásmico rugoso
REs	Retículo endoplásmico liso
SCC	Recuento de células somáticas
tARN	ARN de transferencia
TJ	Uniones estancas
UI	Unidades internacionales
VLDL	Lipoproteína de baja densidad

RESUMEN

Se utilizaron 79 ovejas Manchega y 56 ovejas Lacaune en 4 experimentos para estudiar los efectos del intervalo entre ordeños y de la supresión de ordeños sobre la producción, la composición de la leche, los compartimentos de la ubre y la permeabilidad de las uniones estancas. En el Exp. 1 y 2, 12 Manchegas y 12 Lacaunes fueron ordeñadas a diferentes intervalos entre ordeños (4, 8, 12, 16, 20 y 24 h), a mitad de lactación. La leche total y cisternal aumentaron linealmente hasta las 24 h, mientras que la alveolar lo hizo hasta las 16 h en Manchega y 20 h en Lacaune, mostrándose el papel relevante de la cisterna mamaria para acumular leche y favorecer el aumento de la producción. Las Lacaune siempre presentaron mayores volúmenes y porcentajes cisternales que las Manchega. El área cisternal aumentó hasta las 20 h en Manchega y 16 h en Lacaune, debido a la limitada profundidad de la sonda. A las 8 h, se obtuvieron las mejores correlaciones entre el área y la leche cisternal (Manchega: $r = 0.70$; Lacaune, $r = 0.56$). La grasa disminuyó en la leche total y cisternal al incrementarse el intervalo entre ordeños, y aumentó en la alveolar hasta las 12 h en Manchega y las 20 h en Lacaune. La proteína láctea sólo aumentó en la leche alveolar al hacerlo el intervalo. El contenido en lactosa no varió en las Lacaune pero disminuyó en las Manchega a las 24 h. La lactosa plasmática aumentó marcadamente tras 20 h de acumulación de leche en la ubre, por tanto, las uniones estancas se abrieron en ambas razas, aunque en mayor medida en Manchega. En el Exp. 3, 27 Manchegas y 26 Lacaune se ordeñaron 1 (1X) o 2 veces al día (2X) al inicio (sem. 6-14) o mitad (sem. 14-22) de lactación. 1X al inicio de lactación, redujo un 37% la producción en Manchega pero menos de un 11% en Lacaune. Las ovejas con cisternas pequeñas mostraron pérdidas superiores. A mitad de lactación, 1X no produjo pérdidas productivas. La composición y el RCS no se afectaron negativamente por 1X, pero la permeabilidad de las uniones estancas aumentó al pasar de 2X a 1X, especialmente al inicio de la lactación y en las Manchega. En el Exp. 4, se utilizaron 40 Manchegas y 18 Lacaune para estudiar la respuesta productiva a la supresión de 2 ordeños semanales (12X) con respecto a la no supresión de ordeños (14X), al inicio (sem. 7-15) y a mitad de lactación (sem. 15-22). Al inicio de la lactación, 12X tendió a reducir un 16% la producción de leche en Manchega, pero no la afectó a partir de mitad de lactación. En las Lacaune, 12X no afectó a la producción de leche. La supresión de ordeños no afectó negativamente la composición ni los RCS de la leche. El día de la supresión, la producción, el contenido en grasa y en lactosa de la leche disminuyeron en ambas razas, siendo más marcada la pérdida productiva al inicio que a mitad de lactación. Al recuperar la rutina normal de ordeño, la producción de leche aumentó marcadamente, tanto más cuanto mayor fue el tamaño cisternal. El porcentaje graso mejoró

desde el segundo día de supresión, recuperando los valores de referencia 48 horas después de la última supresión. La proteína no varió a lo largo de la semana y los RCS de la leche no se vieron afectados negativamente por las supresiones. Las uniones estancas se debilitaron en ambas razas, pero el epitelio mamario pareció adaptarse a las supresiones al aplicarse de forma sucesiva.

RESUM

Es van utilitzar un total de 79 ovelles de raça Manchega i 56 de raça Lacaune a 4 experiments destinats a estudiar els efectes de l'interval entre munyides i de la supressió de munyides sobre la producció i la composició de la llet, sobre els compartiments del braguer i sobre la permeabilitat de les TJ. A l'Exp.1 i 2, 12 Manchegas i 12 Lacaune van ser munyides, a meitat de la lactació, a diferents intervals entre munyides (4, 8, 12, 16, 20 i 24 h). La llet total i cisternal van augmentar linealment fins a l'interval de 24 h, mentre que la llet alveolar va augmentar fins assolir la saturació a les 16 h a les Manchega i a les 20 h a les Lacaune, tot evidenciant-se la capacitat de la cisterna per dilatar-se com a resultat de la transferència de llet del compartiment alveolar al cisternal. Les ovelles Lacaune acumularen, per a tots els intervals entre munyides, volums i percentatges cisternals més grans als de les ovelles Manchega. L'àrea cisternal, mesurada mitjançant l'ecografia, va augmentar fins les 20 h d'ompliment del braguer a les Manchega i fins les 16 h a les ovelles Lacaune, condicionat per la profunditat de la sonda. Les correlacions més bones entre l'àrea i la llet cisternals foren obtingudes a les 8 h d'interval entre munyides (Manchega: $r = 0.70$; Lacaune, $r = 0.56$). El greix va ser el component de la llet més afectat per l'interval entre munyides, tot disminuint a la llet total i cisternal a mesura que s'allargà l'interval entre munyides, i tot augmentant a la llet alveolar fins les 12 h a les Manchega i fins les 20 h a les Lacaune. No es van observar diferències a la proteïna de la llet total i cisternal, però a la llet alveolar, la proteïna augmentà amb l'interval. El contingut de lactosa restà estable a les Lacaune mentre que a les Manchega va disminuir quan es realitzà un interval entre munyides de 24 h. La lactosa plasmàtica va augmentar marcadament a partir de les 20 h d'acumulació de la llet al braguer, mostrant un increment en la permeabilitat de les TJ a ambdues races, sent més pronunciada a les ovelles de raça Manchega. A l'Exp. 3, es van munyir 27 ovelles Manchega i 26 Lacaune 1X o 2X, bé a l'inici (setm. 6-14) o bé a la meitat (setm. 14-22) de la lactació. Quan es va realitzar 1X a l'inici de la lactació, la producció es reduí un 37% a les Manchega però menys d'un 11% a les Lacaune, afectant-se més els animals amb cisternes més petites. La producció de llet no va ser afectada per 1X a partir de la meitat de la lactació a cap de les races. No es van detectar efectes negatius sobre la composició i el RCS a la llet. Ara bé, la permeabilitat de les TJ es va veure incrementada al produir-se el canvi de 2X a 1X, especialment a l'inici de la lactació i a les ovelles Manchega. A l'Exp. 4, van ser utilitzades 40 ovelles de raça Manchega i 18 de raça Lacaune per estudiar la resposta productiva a la supressió de 2 munyides setmanals (12X) a l'inici (setm. 7-15) i a la meitat de la lactació (setm. 15-22), al llarg de la lactació i diàriament, respecte a les ovelles munyides sempre 2 cops al dia

(14X). La supressió de 2 munyides setmanals tendí a reduir un 16% la producció de llet a les Manchega quan va ser realitzada a l'inici de la lactació, però a partir de la meitat de la lactació, 12X no va produir efectes sobre la producció. A les ovelles de raça Lacaune, la producció de llet no es va veure afectada per la supressió de munyides ni a l'inici ni a la meitat de la lactació. A més a més, al llarg de la lactació, la composició i el RCS de la llet no es van veure afectats negativament per la supressió de munyides. En quant a la variació diària, el primer dels dies de la setmana en què s'aplicà la supressió de la munyida, tant la producció com el contingut en greix i en lactosa de la llet es van reduir a ambdues races, sent més marcada la reducció de la producció a l'inici que no pas a la meitat de la lactació. En recuperar-se la rutina de 2 munyides diàries, es va produir un augment compensatori a la producció de llet que va ser més gran contra més important fou la cisterna. El contingut en greix també va incrementar-se des del segon dia de supressió de munyides, restablint-se els valors de referència 48 hores després de la segona supressió de munyides, fet que cal considera si es realitzen controls lleters. La proteïna no va variar al llarg de la setmana i els RCS de la llet no es van veure afectats negativament per les supressions. Malgrat tot, es va produir el debilitament de les TJ mamàries a ambdues races, però l'epiteli mamari semblà adaptar-se als intervals entre munyides llargs quan aquests van ser realitzats de forma successiva.

SUMMARY

Seventy-nine Manchega and 56 Lacaune dairy ewes were used in 4 experiments to study the effects of milking intervals and milking omissions on lactational performance, udder compartments and TJ leakiness. In Exp. 1 and 2, 12 Manchega and 12 Lacaune were milked at different milking intervals (4-, 8-, 12-, 16-, 20-, and 24-h) in a 2-wk experiment performed in mid-lactation. Total and cisternal milk increased linearly for up to 24-h, whereas alveolar milk increased until reaching a plateau at 16-h in Manchega and 20-h in Lacaune ewes, demonstrating the ability of the cistern to dilate as a result of milk transfer from the alveolar to the cisternal compartment. Lacaune ewes accumulated greater cisternal volumes and showed greater cisternal percentages than Manchega ewes for all the milking intervals. Cisternal area measured by ultrasonography increased with milking interval until 20 h in Manchega and 16 h in Lacaune ewes, being conditioned by probe depth capability. The greatest correlation between cisternal area and cisternal milk was observed at 8-h milking interval (Manchega, $r = 0.70$; Lacaune, $r = 0.56$). Milking interval affected markedly milk fat content, which decreased in total and cisternal milk from 4- to 24-h in both breeds, but increased in alveolar milk (until 12 h in Manchega; and 20 h in Lacaune). Total and cisternal milk protein content did not vary, but protein content increased in alveolar milk with milking interval. Lactose milk content was stable in Lacaune and decreased at 24 h in Manchega ewes. Plasma lactose increased dramatically after 20 h of milk accumulation, indicating an enhanced permeability of mammary TJ in both breeds, despite being more pronounced in Manchega than in Lacaune ewes. In Exp. 3, 27 Manchega and 26 Lacaune were milked 1X or 2X in early- and mid-lactation. Once-daily milking, when performed in early-lactation, reduced milk yield by 37% in Manchega and by less than 11% in Lacaune, those with small mammary cisterns being more affected. Milk yield was not affected by 1X when started in mid-lactation in either breeds. No negative effects on milk composition and SCC were observed. TJ permeability increased after switching from 2X to 1X, especially in early lactation and in Manchega ewes. In Exp. 4, 40 Manchega and 18 Lacaune were used to study the response to omitting 2 milkings weekly (12X) in early- (wk 7 to 15) and mid-lactation (wk 15 to 22) comparing to milking twice-daily every day (14X). Omitting 2 milkings weekly tended to reduce milk yield by 16% in Manchega ewes when applied in early-lactation, but no effects were observed in mid-lactation. Milk yield did not decrease as a result of 12X in Lacaune ewes, either in early- or in mid-lactation. Milk composition and SCC were not negatively affected by milking omissions throughout lactation. Milking omission decreased milk yield, milk fat and lactose content on the 1st omission day of the

week in both breed, losses being more noticeable in early- than in mid-lactation. A compensatory increase was noticed in milk yield after recovering the twice-daily milking routine, being greater in large- than in small-cisterned ewes. Milk fat content increased after the 1st milking omission, reestablishing reference values 48 h after the 2nd milking omission, and this should be taken into account for milk recording. Milk protein did not vary and SCC was not negatively affected by milking omissions. Milking omissions caused TJ leakiness in both breeds, but mammary epithelium adapted to extended milking intervals when applied successively.

RESUME

Un total de 79 brebis de race Manchega et 56 brebis de race Lacaune ont été utilisé dans 4 essais afin d'étudier les effets de l'intervalle entre traites et de la suppression de traites sur la production et la composition du lait, sur les compartiments de la mamelle et sur la perméabilité des TJ. Dans l'essai 1 et 2, 12 Manchega et 12 Lacaune ont été traités à différents intervalles entre traites (4, 8, 12, 16, 20 et 24 h) au milieu de la lactation. Le lait total et cisternal ont linéairement augmenté jusqu'à l'intervalle de 24 h, alors que le lait alvéolaire a atteint la saturation à 16 et 20 h d'intervalle chez les brebis Manchega et Lacaune, respectivement, démontrant ainsi la capacité de dilatation de la citerne de la mamelle pour stocker le lait transféré du compartiment alvéolaire au cisternal. Pour tous les intervalles de traite considérés, les brebis Lacaune ont montré des volumes et pourcentages du lait cisternal plus importants que ceux des brebis Manchega. La surface cisternal, mesurée par échographie, a augmenté jusqu'aux 20 h de remplissage de la mamelle chez les Manchega et 16 h chez les brebis Lacaune, mais été conditionnée par la profondeur de la sonde. Les meilleures corrélations obtenues entre la surface et le lait cisternal ont été à 8 h d'intervalle entre traites (Manchega : $r = 0,70$; Lacaune, $r = 0,56$). La matière grasse a été le composant du lait le plus affecté par l'intervalle entre traites, diminuant du lait total et cisternal quand l'intervalle entre traites a augmenté. Par contre, le taux butyreux du lait alvéolaire a augmenté jusqu'à l'intervalle de 12 h chez les Manchega et de 20 h chez les Lacaune. La teneur en protéines du lait total et cisternal n'ont pas varié, mais celle du lait alvéolaire a augmenté avec l'intervalle. La teneur en lactose s'est maintenue stable chez les Lacaune alors que chez les Manchega a diminué quand l'intervalle entre traites était de 24 h. Le lactose plasmatique a nettement augmenté à partir de 20 h de stockage du lait dans la mamelle, en indiquant une augmentation de la perméabilité des TJ dans les deux races, mais étant plus prononcé chez les brebis Manchega. Dans le 3^{ème} essai, 27 Manchega et 26 Lacaune ont été traités pour les fréquences 1X ou 2X au début (sem. 6-14) et au milieu (sem. 14-22) de la lactation. Après avoir réalisé 1X au début de la lactation, la production a chuté de 37 % chez les Manchega mais moins de 11 % chez les Lacaune, signalant que sont les brebis avec les plus petites citernes qui ont été les plus affectés. La production de lait n'a pas varié après avoir appliqué 1X à partir du milieu de la lactation. On n'a pas observé des effets négatifs sur la composition et le comptage des cellules somatiques du lait. Cependant, la perméabilité des TJ a augmenté en réponse au changement de fréquence de 2X à 1X, spécialement au début de la lactation et chez les brebis Manchega. Dans l'essai 4, on a utilisé 40 Manchega et 18 Lacaune pour étudier la réponse productive à la suppression de 2

traites hebdomadaires (12X) appliquée au début (sem. 7-15) et au milieu de la lactation (sem. 15-22), pendant la lactation et quotidiennement. La suppression de 2 traites hebdomadaires pendant le début de la lactation a tendance à réduire de 16 % la production de lait chez la Manchega. Par contre, 12X n'a pas causé d'effets sur la production laitière à partir du milieu de la lactation. Chez les brebis Lacaune, la production de lait n'a pas été altérée par la suppression de traites au début et au milieu de la lactation. En plus, la composition et le comptage des cellules somatiques du lait n'ont pas été affecté négativement par la suppression de traites. En ce qui concerne la variation quotidienne, le premier des jours de la semaine dans lesquels la suppression de la traite s'est appliqué, tant la production comme la teneur en graisse et lactose du lait ont diminué, et été plus remarquable la chute de la production au début qu'au milieu de la lactation. Après la reprise de routine de 2 traites/jour, un accroissement compensatoire de la production de lait s'est produit, qui a été plus important avec le volume de la citerne. Le taux butyreux a aussi augmenté depuis le 2^{ème} jour de suppression de traite, rétablissant ainsi les valeurs de référence 48 h après la 2^{ème} suppression, ceci devrait être pris en considération lors du contrôle laitier. Le taux protéique n'a pas varié pendant la semaine et les comptages cellulaires du lait ne se sont pas affectés négativement par les suppressions faites. Cependant, la suppression de traites a produit l'affaiblissement des TJ dans les deux races. Il semble aussi que l'épithélium mammaire s'est adapté aux grands intervalles entre traites quand ceux-ci se sont appliqués d'une forme successive.

ÍNDICE

Capítulo 1. Introducción	1
Capítulo 2. Revisión bibliográfica	3
1. Anatomía y morfología de la ubre de oveja	3
1.1. Anatomía externa	3
1.2. Anatomía interna	4
1.2.1. Aparato suspensor mamario	4
1.2.2. Parénquima glandular	5
1.3. Vascularización de la ubre	7
1.4. Inervación de la ubre	9
1.5. Relación de los parámetros anatómicos y morfológicos con la aptitud al ordeño	9
2. Secreción de los componentes de la leche	10
2.1. La célula epitelial alveolar	10
2.1.1. Las uniones estancas	11
2.1.2. Vías de transporte de los precursores y de los componentes de la leche	12
2.2. Secreción de la grasa de la leche	14
2.3. Secreción de las proteínas de la leche	15
2.4. Secreción de la lactosa de la leche	17
2.5. Secreción de los iones en la leche	17
2.6. Control de la secreción láctea	18
2.6.1. Control hormonal sistémico	18
2.6.2. Control local autocrino	21
3. Eyección de leche	24
3.1. Estímulos desencadenantes de la eyección de leche	24
3.2. La liberación de oxitocina y los efectos del reflejo de eyección	26
3.3. Transferencia de la leche intramamaria entre ordeños	28
3.4. Cinética de emisión: evaluación del reflejo de eyección y su relación con la aptitud al ordeño	29
3.5. Inhibición del reflejo de eyección	31
4. Fraccionamiento de la leche en la ubre	34
4.1. Distribución de la leche entre el compartimento cisternal y alveolar	34
4.2. Composición y recuento de células somáticas de las fracciones de leche	38
4.3. Compartimento cisternal y su valoración mediante ecografía	41
4.4. Compartimento alveolar: consecuencias de la acumulación de leche	45
4.4.1. Presión intramamaria	46
4.4.2. Flujo sanguíneo mamario	46
4.4.3. Acumulación del factor inhibitorio de lactación	47
4.4.4. Apertura de las uniones estancas	48
5. Efecto de la frecuencia y del intervalo entre ordeños sobre la producción y la calidad de la leche	52
5.1. El aumento de la frecuencia de ordeño	52
5.1.1. Efecto sobre la producción de leche	52
5.1.2. Efecto sobre la composición de la leche	55

5.1.3. Efecto sobre el recuento de células somáticas de la leche	57
5.2. Disminución de la frecuencia y supresión de ordeños	58
5.2.1. Supresión de un ordeño diario	59
5.2.1.1. Efecto sobre la producción de leche	59
5.2.1.2. Efecto sobre la composición química de la leche	63
5.2.1.3. Efecto sobre el recuento de células somáticas	67
5.2.2. Realización de tres ordeños cada dos días	68
5.2.3. Supresión de 1 o 2 ordeños durante el fin de semana	69
5.2.3.1. Efecto sobre la producción de leche	69
5.2.3.2. Efecto sobre la composición de la leche	72
5.2.3.3. Efecto sobre el recuento de células somáticas y la sanidad de la ubre	74
Capítulo 3. Objetivos	77
Capítulo 4. Effect of Milking Interval on Milk Secretion and Mammary Tight Junction Permeability in Dairy Ewes	79
Abstract	79
Introduction	80
Materials and Methods	81
Animals and Management Conditions	81
Experimental Procedures	82
Sampling and Analyses	83
Statistical Analyses	84
Results and Discussion	84
Milk Yield and Milk Secretion Rate	84
Milk Composition	87
Plasmin Activity	90
Tight Junction Permeability	91
Conclusions	94
Capítulo 5. Changes in Alveolar and Cisternal Compartments Induced by Milking Interval in the Udder of Dairy Ewes	95
Abstract	95
Introduction	96
Materials and Methods	97
Animals and Management Conditions	97
Experimental Procedure	98
Scanning Methodology	98
Sampling and Analyses	99
Statistical Analysis	99
Results and Discussion	99

Milk Volumes and Milk Partitioning in the Udder	99
Cisternal Scans	104
Relationship between Cisternal Area and Milk Fractions	106
Composition of Milk Fractions	108
Conclusions	111
Capítulo 6. Long-Term Effects of Milking Once-Daily on Milk Yield, Milk Composition and Mammary Tight Junction Permeability in Dairy Ewes	113
Abstract	113
Introduction	114
Materials and Methods	115
Animals, Treatments, and Management Conditions.....	115
Experimental Procedures	116
Sampling and Analyses	116
Milk Partitioning and Cisternal Scanning	117
Milking Kinetic Measurement	118
Statistical Analyses	119
Results and Discussion	119
Milk Yield	119
Milk Composition	123
Major milk constituents	123
Somatic cell count	125
Mineral concentrations	125
Plasma Lactose Concentration	127
Milk Fractioning and Cisternal Area	129
Milk Emission Kinetics	131
Conclusions	134
Capítulo 7. Long Term and Daily Effects of Omitting Two Weekend Milkings on Lactational Performances and Mammary Tight Junction Permeability in Dairy Ewes	135
Abstract	135
Introduction	136
Materials and Methods	137
Animals and Management Conditions	137
Routine Milking	139
Procedures, Sample Collection, and Analysis.....	139
Statistical Analyses	140

Results and Discussion	141
Lactational Performance over the 15 Experimental Weeks.....	141
Daily Modifications of Milk Yield, Milk Composition, and Udder Health.....	145
Tight Junction Permeability.....	150
Conclusions	152
Capítulo 8. Conclusiones	155
Capítulo 9. Implicaciones y aplicaciones en la práctica	159
Capítulo 10. Referencias Bibliográficas.....	161

ÍNDICE DE FIGURAS

Capítulo 2. Revisión bibliográfica

Figura 1. Morfología externa de la ubre de oveja de raza Manchega	4
Figura 2. Molde anatómico de la ubre de oveja lechera obtenido a partir de la inyección de epoxi y del método de corrosión plástica y detalle del sistema ductal, con sus conductos y alvéolos	5
Figura 3. Estructura del alvéolo mamario	6
Figura 4. Estructura interna de la ubre ovina.....	6
Figura 5. Vista lateral del sistema arteriovenoso de la ubre de oveja.....	8
Figura 6. Visión de un corte transversal de una TJ en un cultivo de células epiteliales mamarias	11
Figura 7. Modelo para el complejo TJ y sus interacciones con proteínas asociadas y con los componentes del citoesqueleto	12
Figura 8. Célula epitelial alveolar mostrando sus diferentes vías de secreción	13
Figura 9. Precursores y componentes de la leche	16
Figura 10. Llenado de la cisterna mamaria tras la administración i.v. de 5 UI de oxitocina en vacuno	24
Figura 11. Microscopia electrónica del alvéolo mamario.....	26
Figura 12. Descarga de oxitocina antes, durante y después del ordeño a máquina de ovejas Lacaune durante la primavera y el otoño	27
Figura 13. Cinética de emisión de ovejas de raza Manchega y Lacaune de curvas de “1 pico”, “2 picos” y “en meseta”	30
Figura 14. Evolución de la leche total, cisternal y alveolar, a lo largo de diferentes intervalos entre ordeños en ovino, caprino y vacuno lechero	36
Figura 15. Efecto del intervalo entre ordeños sobre el contenido en grasa y proteína de la fracción de leche cisternal y alveolar en ovejas East Friesian cruzadas	40
Figura 16. Ecografía mamaria en ovejas lecheras de raza Lacaune y Manchega	41
Figura 17. Área cisternal a diferentes intervalos de ordeño en vacuno lechero y en cabras Murciano-Granadina.....	45
Figura 18. Proposición de un modelo para explicar el rol de las uniones estancas como mediadoras de los efectos de 1X o de una mayor frecuencia de ordeño sobre la producción de leche durante las primeras 24 horas (respuesta aguda)	49
Figura 19. Contenido en grasa y proteína de la leche al incrementarse el número diario de ordeños en ovino lechero de raza Lacaune	56
Figura 20. Efecto de diferentes intervalos entre ordeños sobre el contenido y el porcentaje de grasa y de proteína bruta en leche de ovino	63
Figura 21. Concentración de lactosa en la leche de ovejas de raza Sarda, Awassi y Merino ordeñadas una o dos veces al día	64
Figura 22. Efecto de diferentes intervalos entre ordeños sobre la concentración de grasa y proteína en caprino y vacuno, respectivamente	65
Figura 23. Efecto de diferentes intervalos entre ordeños sobre el RCS en ovino.....	67
Figura 24. Variación diaria (mañana y tarde) del contenido en grasa y proteína de la leche al omitir el ordeño del domingo tarde en ovejas de raza Préalpes du Sud	74

Capítulo 4. Effect of Milking Interval on Milk Secretion and Mammary Tight Junction Permeability in Dairy Ewes

Figure 1. Effect of different milking intervals (4, 8, 12, 16, 20, and 24 h) on milk yield at wk 11 and 16 of lactation in Manchega and Lacaune dairy ewes	85
---	----

Figure 2. Milk secretion rates per milking interval in Manchega and Lacaune dairy ewes	86
Figure 3. Plasmin activity at 4-, 8-, 12-, 16-, 20-, and 24-h milking interval in Manchega and Lacaune dairy ewes	90
Figure 4. Plasma lactose concentrations obtained 4, 8, 12, 16, 20, and 24 h after the last milking	92
 Capítulo 5. Changes in Alveolar and Cisternal Compartments Induced by Milking Interval in the Udder of Dairy Ewes	
Figure 1. Changes in volumes of cisternal milk, and alveolar milk in Manchega and Lacaune ewes at different milking intervals.....	101
Figure 2. Cisternal scans of the left half cistern of a Manchega and a Lacaune ewe at 4, 8, 12, 16, 20, and 24-h milking interval, after i.v. administration of atosiban (oxytocin receptor blocking agent)	105
Figure 3. Changes in cisternal area of mammary udder measured by ultrasonography in Manchega and Lacaune breed at different milking intervals	106
Figure 4. Changes in fat, protein, and lactose contents for cisternal and alveolar milk fractions for different milking intervals in Manchega and Lacaune dairy ewes	109
Figure 5. Evolution of somatic cell counts within cisternal and alveolar milk at different milking intervals	111
 Capítulo 6. Long-Term Effects of Milking Once-Daily on Milk Yield, Milk Composition and Mammary Tight Junction Permeability in Dairy Ewes	
Figure 1. Effect of milking once daily during early- or mid-lactation vs. twice daily on milk yield in Manchega and Lacaune dairy ewes throughout the experimental weeks.....	120
Figure 2. Effect of milking once daily during early- or mid-lactation on plasma lactose concentration in Manchega and Lacaune dairy ewes	128
 Capítulo 7. Long Term and Daily Effects of Omitting Two Weekend Milkings on Lactational Performance and Mammary Tight Junction Permeability in Dairy Ewes	
Figure 1. Effect of omitting 2 milkings weekly during early- or mid-lactation vs. no milking omission on milk yield in Manchega and Lacaune ewes throughout the experimental weeks	141
Figure 2. Effect of milking omissions on daily milk yield during the wk 12 and 20 of lactation in Manchega and Lacaune dairy ewes	145
Figure 3. Effect of milking omissions (Saturday and Sunday) on daily milk yield during wk 12 and 20 of lactation in large or small-cisterned Manchega and Lacaune dairy ewes	146
Figure 4. Effect of milking omissions (Saturday and Sunday) on daily fat, protein, and lactose content, and on the daily SCC concentration in milk during wk 12 and 20 of lactation in Manchega and Lacaune	148
Figure 5. Effect of milking omissions (Saturday and Sunday) on daily concentration of plasma lactose during wk 12 and 20 of lactation in Manchega and Lacaune	150
Figure 6. Effect of milking omissions (Saturday and Sunday) on daily concentration of Na and K, and on the Na:K ratio in milk during wk 12 and 20 of lactation in Manchega and Lacaune ewes.....	152

ÍNDICE DE TABLAS

Capítulo 2. Revisión bibliográfica

Tabla 1. Principales hormonas que afectan el desarrollo y funcionamiento de la glándula mamaria	20
Tabla 2. Variación del porcentaje de leche cisternal al aplicarse diferentes intervalos entre ordeños en ovejas, cabras y vacas.....	39
Tabla 3. Área cisternal, producción cisternal y correlación de ambas en los rumiantes lecheros	43
Tabla 4. Efecto del aumento de la frecuencia de ordeño (3X, 4X, 5X, y 7X) sobre la producción de leche en ovino y caprino	53
Tabla 5. Efecto del aumento de la frecuencia de ordeño (3X, 4X, 5X y 6X) sobre la producción de leche en vacuno	55
Tabla 6. Pérdida de producción de leche al ordeñar 1X en vez de 2X en ovino y caprino	60
Tabla 7. Efecto de 1X sobre la producción de leche en bovino.....	62
Tabla 8. Pérdida de producción asociada a la supresión de 1 o 2 ordeños semanales en ovino, caprino y vacuno.....	70

Capítulo 4. Effect of Milking Interval on Milk Secretion and Mammary Tight Junction Permeability in Dairy Ewes

Table 1. Experimental schedule for each studied group applied at wk 11 and 16 of lactation in Manchega and Lacaune dairy ewes	82
Table 2. Short-term effects of milking interval on milk yield and milk composition in Manchega and Lacaune dairy breed ewes	88
Table 3. Effect of different milking intervals (4, 8, 12, 16, 20, and 24 h) on the concentration of Na, K and the Na to K ratio in the milk of Manchega and Lacaune breed	93

Capítulo 5. Changes in Alveolar and Cisternal Compartments Induced by Milking Interval in the Udder of Dairy Ewes

Table 1. Correlations between cisternal area and different milk fractions in Manchega and Lacaune dairy ewes milked at 4, 8, 12, 16, 20, and 24 h of milking interval.....	107
---	-----

Capítulo 6. Long-Term Effects of Milking Once-Daily on Milk Yield, Milk Composition and Mammary Tight Junction Permeability in Dairy Ewes

Table 1. Productive and cisternal characteristics of the experimental ewes according to cisternal size (small or large) at wk 5 of lactation.....	117
Table 2. Effects of once- (1X) vs. twice-daily milkings (2X) during early- and mid-lactation on daily milk yield (mL/d) in Manchega and Lacaune dairy ewes with small or large cisternal milk volumes.....	122
Table 3. Milk yield, milk composition (fat, protein, lactose, total solids) and somatic cell counts (SCC) in Manchega and Lacaune dairy ewes milked once (1X) or twice daily (2X) in early- and mid-lactation.....	124
Table 4. Effect of milking once- (1X) or twice-daily (2X), during early- and mid-lactation, on the Na and K concentration in milk and the Na to K ratio in milk, and plasma lactose concentration in Manchega and Lacaune ewes.....	126

Table 5. Influence of cistern capacity during early- and mid-lactation, on the Na and K concentration and the Na to K ratio in milk, and the plasma lactose concentration in Manchega and Lacaune ewes.....	127
Table 6. Cisternal size, milk fractioning and milk accumulation rates in Manchega and Lacaune dairy ewes milked once (1X) or twice (2X) daily during early- and mid-lactation.....	130
Table 7. Milking characteristics according to milking frequency performed in Manchega and Lacaune dairy ewes.....	132

Capítulo 7. Long Term and Daily Effects of Omitting Two Weekend Milkings on Lactational Performance and Mammary Tight Junction Permeability in Dairy Ewes

Table 1. Productive and cisternal characteristics of the experimental Manchega and Lacaune dairy ewes according to cisternal size (small or large) at 8-h milking interval at wk 6 of lactation.....	138
Table 2. Milk yield, daily milk yield, lactation persistency, milk composition (fat, protein, lactose, total solids) and somatic cell counts (SCC) in Manchega (MN) and Lacaune (LC) dairy ewes milked twelve (12X) or fourteen times (14X) weekly in early- and mid-lactation.....	143

CAPÍTULO 1: Introducción

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

En el conjunto de la producción mundial de leche (622 millones Tm, aproximadamente), el sector ovino representa el 1,4% del total, y se localiza fundamentalmente en el continente asiático (45%), con China a la cabeza, y en Europa (35%), con los países mediterráneos (Italia, Grecia, España, Francia) como principales productores y transformadores (FAO, 2004).

En Europa, el sector ovino lechero es importante desde el punto de vista económico, social, y ambiental (de Rancourt et al., 2006), y se ha caracterizado a lo largo de los años por ser una producción de tipo tradicional y familiar, orientada casi exclusivamente a la producción de queso en queserías artesanales. Sin embargo, el desarrollo de la industrialización y de la automatización del proceso de fabricación del queso, ha propiciado que la capacidad productiva de la industria láctea especializada mejore en los últimos años (Pirisi et al., 2007). Asimismo, la liberalización del mercado internacional, junto con la creciente demanda de queso y de productos lácteos por parte del consumidor, están contribuyendo a que la producción de ovino lechero sea contemplada como una alternativa interesante para los ganaderos.

Las explotaciones de ovino lechero se caracterizan por tener censos elevados de animales (entre 200 y 500 ovejas por explotación) y ordeñar dos veces al día a lo largo de toda la lactación. De aquí que el tiempo destinado al ordeño represente más del 50% de la jornada laboral del ganadero (Marnet y McKusick, 2001). Así pues, todos aquellos procesos orientados a disminuir el tiempo de ordeño favorecerán una producción de leche más eficiente y, sin duda, una mejora de la calidad de vida del ganadero.

La reducción del tiempo de ordeño puede conseguirse mediante la selección de animales con buena aptitud al ordeño mecánico y/o con la disminución de la frecuencia de ordeños.

Trabajos como el de Rovai (2001) ponen de manifiesto que en las ovejas lecheras, la morfología mamaria, la cinética de emisión de leche, y las características de almacenamiento de la leche dentro de la ubre son factores determinantes de la aptitud al ordeño, y por tanto de la facilidad de ordeño de los animales.

La disminución de la frecuencia de ordeño ha sido propuesta por distintos autores como estrategia para la reducción del tiempo dedicado al ordeño y, por tanto, de la jornada laboral

en las explotaciones dedicadas a la producción de leche (Davis et al., 1999; Capote et al., 1999; McKusick et al., 2002a; Salama et al., 2003; Rémond et al., 2004). Sin embargo, en los rumiantes, la supresión de 1 o 2 ordeños semanales puede producir pérdidas productivas que varían entre el 1 y el 26% según la especie, la raza, y el estado de la lactación (Labussière y Coindet, 1968; Casu y Labussière, 1972; Labussière et al., 1974a, Le Mens, 1978; Mocquot, 1978; Huidobro, 1988; Ayadi et al., 2003a; Hervás et al., 2006). Igualmente, suprimir 1 ordeño diario produce pérdidas de producción aún más elevadas, que se sitúan entre el 7 y el 50% en vacuno (Claesson et al., 1959; Stelwagen et al., 1994a), entre el 6 y el 35% en caprino lechero (Mocquot, 1978; Capote et al., 1999), y entre el 13 y el 48% en ovino lechero (Papachristoforou et al., 1982; Knight et al., 1993).

Ahora bien, cabe señalar que la magnitud de dichas pérdidas está muy relacionada con la estructura interna de la ubre, y en concreto, con el patrón de distribución y el almacenamiento de la leche en los distintos compartimentos de la misma. En vacuno y caprino, los animales que son capaces de almacenar grandes volúmenes de leche en la cisterna mamaria, toleran mejor la disminución de la frecuencia de ordeño (Knight and Dewhurst, 1994; Stelwagen et al., 1996; Ayadi et al., 2003a; Salama et al., 2003). En ovino lechero, Labussière (1988) afirmó que las razas que se adaptan bien a las bajas frecuencias de ordeño son aquellas que tienen grandes cisternas. Posteriormente, Negro et al. (2001) concluyeron que al aplicar distintas frecuencias de ordeño, el factor limitante para la producción de leche es la cisterna mamaria. Así pues, una buena evaluación y selección de los animales en base a la capacidad de su compartimento cisternal puede permitir la adopción, por parte del ganadero, de menores frecuencias de ordeño sin que se observen grandes pérdidas productivas.

Esta tesis, por tanto, pretende analizar los efectos del intervalo entre ordeños y de la supresión de ordeños sobre la producción, la composición y la sanidad de la ubre en dos razas de ovino lechero. Además, intenta clarificar el papel de la cisterna mamaria en la adaptación del ovino lechero a los largos intervalos entre ordeños, así como aportar información sobre algunos de los mecanismos fisiológicos que regulan la secreción láctea. Todo ello con el fin último de incorporar nuevas estrategias de ordeño para el ovino lechero que permitan una buena rentabilidad de las explotaciones y una mejor calidad de vida del ganadero.

CAPÍTULO 2: Revisión bibliográfica

CAPÍTULO 2

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. Anatomía y morfología de la ubre de oveja

La glándula mamaria es una glándula epitelial exocrina, presente en todos los mamíferos (*Mammalia*). Su desarrollo embrionario se caracteriza por la formación de un doble engrosamiento lineal del ectodermo, las crestas mamarias o líneas de la leche, que recorren el embrión desde el tórax a la región inguinal. Estas crestas presentan porciones de ectodermo, con un gran poder de proliferación celular, y un mesodermo subyacente densificado de forma característica; son los esbozos mamarios. Cada uno de ellos es susceptible de formar una glándula mamaria. En el caso de la oveja, solo se presentan en la región inguinal (Ruberte et al., 1994b).

La anatomía y morfología de la ubre es uno de los criterios propuestos por Labussière (1983), junto con otros autores, para definir y valorar la aptitud al ordeño mecánico de las ovejas, además del fraccionamiento de la leche y su cinética de emisión. La adaptación o aptitud al ordeño mecánico se define como la capacidad de un animal en lactación para liberar la mayor parte de la leche contenida en la ubre ante el estímulo de un equipo de ordeño mecánico, en el menor tiempo posible y con el mínimo de intervenciones manuales por parte del ordeñador (Fernández, 1985; Such, 1990). Por tanto, la mejora de las explotaciones de ovino lechero pasa por la selección de ovejas lecheras con buena conformación y morfología de ubre.

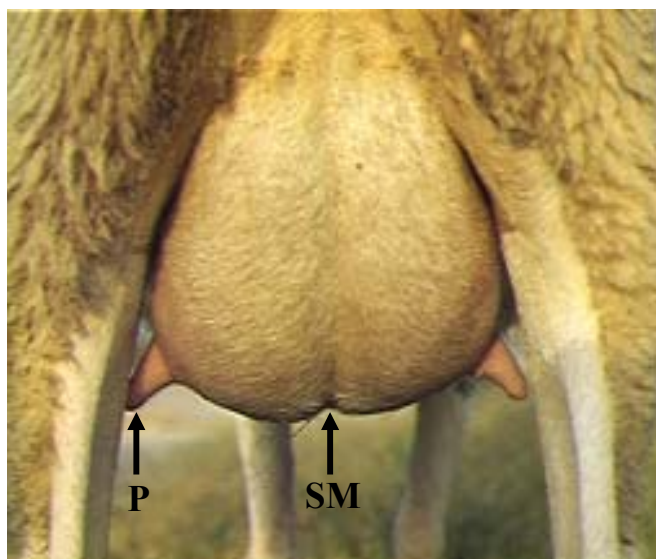
1.1. Anatomía externa

La ubre (*Ubre*) ovina se sitúa en la región inguinal, presenta generalmente forma globular, y está constituida por un par de glándulas mamarias independientes y separadas por un surco intermamario (*Sulcus intermamarius*), medial y superficial. Cada una de las glándulas está situada medial y caudalmente al seno inguinal (*Sinus inguinalis*) del mismo lado, y está provista de un pezón (Figura 1). Los pezones (*Papilla mammae*) miden de 4 a 5 cm y se sitúan, de forma general, lateralmente y sus extremos se dirigen craneal o ventrolateralmente y están cubiertos de forma escasa por un pelo muy fino. En ocasiones es posible encontrar ovejas con pezones supernumerarios (*Mamma accesoria*), los cuales son denominados pezones politelia (Ruberte et al., 1994b).

La parte superior de la ubre de la oveja puede estar cubierta por lana, pero cuando no la poseen, presenta una pigmentación clara y normalmente manchada por la secreción,

amarillenta y grasienta, de las glándulas del interior de las bolsas cutáneas inguinales. Estas invaginaciones cutáneas, denominadas senos inguinales (*Sinus inguinalis*), y su secreción sebácea, tienen dos propiedades fundamentales: una es la presencia de feromonas que posibilitan el reconocimiento materno-filial, y la otra es la disminución del roce propio del movimiento de la ubre en lactación (Ruberte et al., 1994b).

Figura 1. Morfología externa de la ubre de oveja de raza Manchega. Visión caudal. SM: surco intermamario; P: Pezón. (Fuente G. Caja)



1.2. Anatomía interna

La estructura interna de la ubre de la oveja es comparable a la de otras especies domésticas. Cada una de las mamas presenta: una envoltura fibroelástica que constituye el aparato suspensor mamario (*Apparatus suspensorius mammarum*), y el parénquima glandular, encargado de sintetizar la leche. El parénquima glandular y el tejido conjuntivo se distribuyen en función de la actividad secretora de la glándula, y por tanto, de la fase evolutiva de la ubre. Se sabe que el tejido intersticial aumenta con la edad, originando la llamada “mama carnosa” en vacuno lechero, que contiene más o menos tejido adiposo (Schwarze y Schröder, 1984).

1.2.1. Aparato suspensor mamario

El aparato suspensor está constituido por tejido conjuntivo elástico que envuelve el parénquima mamario y sostiene la ubre. Se divide en las láminas laterales (*L. Laminae laterales*) de tejido conjuntivo, responsables de la fijación de la mama al tronco y al perineo, y en las láminas mediales (*L. Laminae mediales*) de tejido elástico, que separan por medio

de un septo los dos complejos mamarios, dando lugar externamente al surco intermamario o ligamento suspensor de la ubre ((L. *Sulcus intermammarius* o *Ligamentum suspensorium uberis*)).

1.2.2. *Parénquima glandular*

El parénquima es la parte secretora de la glándula, y está constituido por una red de conductos (Figura 2), que van desde las estructuras más internas que son los alvéolos mamarios o unidades secretoras de la glándula, hasta las más externas, responsables de la recogida y transporte de la leche, como son las porciones glandular (cisterna) y papilar (pezón) del seno lactífero.

Figura 2. Molde anatómico de la ubre de oveja lechera obtenido a partir de la inyección de epoxi y del método de corrosión plástica (izquierda) y detalle del sistema ductal, con sus conductos y alvéolos (derecha) (Caja et al., 2000).

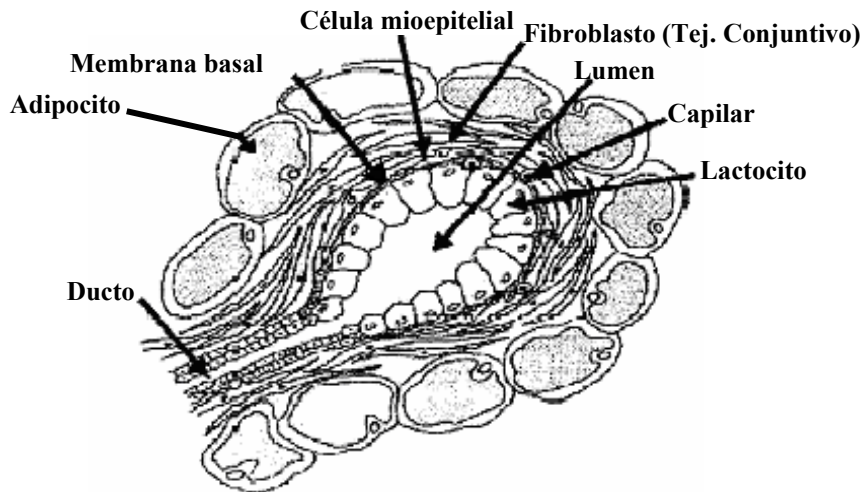


Los alvéolos (Figura 3), de epitelio cúbico simple secretor, juntamente con sus respectivos conductos alveolares, se presentan en grupos encapsulados por tejido conjuntivo, formando los lobulillos mamarios (*Lobuli glandulae mammae*). La agrupación de lobulillos, separados entre sí por tejido conjuntivo, forma los lóbulos mamarios (*Lobi glandular mammae*). Cada glándula mamaria contiene numerosos lóbulos. Los alvéolos que forman el lobulillo se vacían y drenan la leche hacia los conductos intralobulillares, que desembocan en un espacio colector central, desde el que emergen los conductos interlobulillares (lobulares) o galactóforos, de epitelio plano poliestratificado no queratinizado, que vierten finalmente la leche en los conductos lactíferos (Gallego, 1983; Paniagua y Nistal, 1983; Ruberte et al., 1994b).

Los conductos lactíferos (*Ductos lactiferi*) son tubos de diverso diámetro y longitud, compuestos de un epitelio de una o dos capas de células, rodeados por otras capas de naturaleza conjuntivo-elásticas y por fibras musculares. Estos tubos, dispuestos de forma

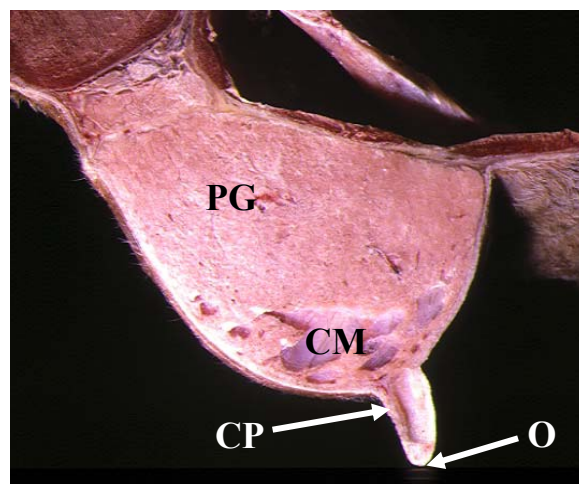
paralela, atraviesan regularmente el parénquima, y son los responsables de conducir la leche proveniente de los alvéolos hacia el seno lactífero (Schwarze y Schröder, 1984).

Figura 3. Estructura del alvéolo mamario (Delouis y Richard, 1991)



El seno lactífero (*Sinus lactiferi*, *Receptaculum lactis*) se divide en una porción glandular o cisterna mamaria (*Pars glandularis*), situada en el interior del parénquima glandular, y en una porción papilar o cisterna del pezón (*Pars Papillaris*), localizada en el interior del pezón y que comunica con el exterior a través de un único orificio papilar (Figura 4). Estas dos cisternas están separadas, en vacuno y en ovino, por una constricción circular (esfínter o anillo) bien definida que recibe el nombre de cricoideas.

Figura 4. Estructura interna de la ubre ovina: Parénquima glandular (PG), cisterna mamaria (CM), cisterna del pezón (CP), orificio del pezón (O) y esfínter cricoideo (E). (Fuente: Ruberte et al., 1994b y Caja et al., 2000).



Cabe señalar que los alvéolos mamarios están rodeados por un sistema capilar

arteriovenoso y por células mioepiteliales, que bajo el efecto vasoconstrictor de la hormona oxitocina (OT) expulsan la leche acumulada en los alvéolos hacia la cisterna mamaria (eyección de leche). La elasticidad de las paredes de la cisterna mamaria permite que en ella se pueda almacenar la leche que se ha ido secretando entre ordeños.

Así pues, la glándula mamaria almacena la leche sintetizada entre dos ordeños consecutivos en dos compartimentos:

- Compartimento alveolar: formado por el tejido glandular. Contiene la leche alveolar.
- Compartimento cisternal: formado por conductos y cisternas de la glándula y del pezón. Almacena la leche cisternal.

En ovino, el porcentaje de leche que puede ser almacenado en el compartimento cisternal oscila entre el 20% y el 75% según la raza (Caja et al., 2000; Rovai et al., 2000; Marnet y McKusick, 2001, McKusick et al., 2002a). Las razas que muestran mejor aptitud al ordeño mecánico son aquellas que presentan un mayor porcentaje de leche cisternal, o lo que es lo mismo, mayor porcentaje de leche recuperable sin necesidad de que se produzca el reflejo de eyección.

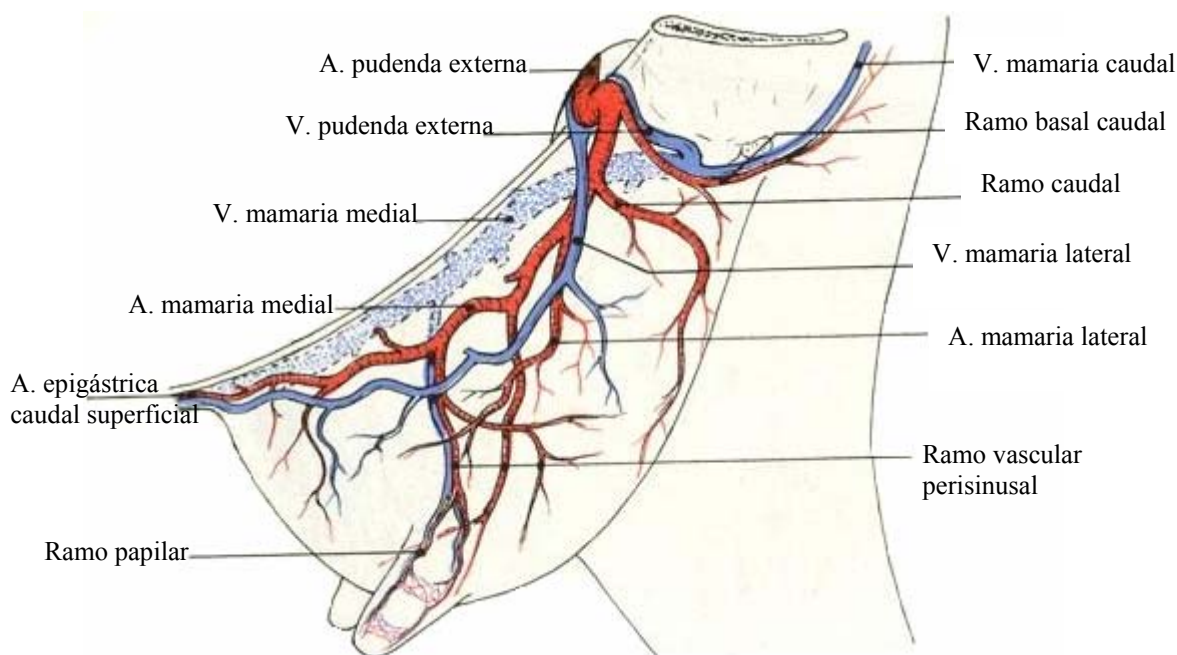
1.3. Vascularización de la ubre

La vascularización de la ubre de la oveja (Figura 5) llega a través de las arterias pudendas externas (*A. Pudenda externa*) (Stojanovic, 1975), que atraviesan el canal inguinal y llegan a la base de cada mama. Al introducirse en el parénquima mamario emite el ramo labial ventral que vasculariza a los ganglios linfáticos inguinales superficiales y la parte dorso-caudal de la glándula mamaria. En el interior del parénquima mamario, la arteria pudenda externa desprende un ramo caudal (*ramus caudalis*), para la porción caudal de la mama. Por último, se divide en las arterias mamarias medial (*A. mammaria medialis*) que dará lugar a las arterias papilares del pezón, y en las arterias mamarias craneal (*A. mammaria cranialis*), que se continúan superficialmente en el abdomen como a. epigástrica superficial caudal.

El sistema venoso mamario de la oveja (Figura 5) es parcialmente satélite del arterial, aunque las venas son más numerosas que las arterias. El drenaje venoso de la ubre se realiza a través de la vena pudenda externa (*V. pudenda externa*) (Ghosal et al., 1981), que avanza paralela a la a. pudenda externa. El pezón está drenado por las venas papilares que a nivel de la base del pezón forman el círculo venoso del pezón, a partir del cual y por medio de las venas medial y lateral del seno, la sangre puede ser vehiculada hacia la vena mamaria media

o la vena mamaria craneal. Estas desembocan en la v. pudenda externa, aunque también lo pueden hacer en la v. epigástrica superficial caudal (*V. epigástrica superficiales caudalis*).

Figura 5. Vista lateral del sistema arteriovenoso de la ubre de oveja (Barone, 1978).



La producción de leche demanda gran cantidad de nutrientes, que llegan a la ubre gracias a la sangre. Así, tanto el flujo sanguíneo como su distribución en la ubre varían según si la oveja se encuentra o no en lactación. Según Thompson (1980), el flujo sanguíneo por media ubre de una oveja no lactante es de 12 ml/min y el 43% de este flujo se destina a irrigar el tejido lóbulo-alveolar, el 25% el tejido linfático, el 20% el tejido adiposo, el 10% la piel que recubre la ubre, y el 2% se destina al pezón. En cambio, la ubre de una oveja lactante requiere una mayor vascularización, llegando a presentar flujos sanguíneos por medias ubres de 357 ml/min, destinándose el 98% de este flujo a la vascularización del tejido lóbulo-alveolar. El incremento del flujo de sangre que atraviesa la ubre en animales lactantes se debe al mayor peso del tejido secretor y al gran incremento de flujo sanguíneo por unidad de peso del tejido secretor observado en dichos animales. El mismo autor determinó que el flujo de sangre que vasculariza la glándula mamaria varía de 0,58 a 7,57 ml/10 g de tejido secretor y minuto en ovejas no-lactantes y lactantes, respectivamente.

Los vasos linfáticos mamaros forman un plexo alrededor del pezón, el cual a través de los vasos linfáticos colectores comunica con los ganglios linfáticos inguinales superficiales (*Lymphonodi inguinalis superficiales*), también llamados ganglios linfáticos mamaros. Estos ganglios son dobles y se sitúan superficial y caudodorsalmente a las mamas, por lo que pueden ser palpados exteriormente.

1.4. Inervación de la ubre

La inervación sensitiva de la ubre depende de los ramos ventrales (*Ramus cutaneus ventralis*) del 2º, 3º y 4º par lumbar, que pertenecen a los nervios iliohipogástrico caudal (L₂) (N. *iliohypogastricus caudalis*), ilioinguinal (L₃) (N. *ilioinguinalis*) y genitofemoral (L₄) (N. *genitofemoralis*). La inervación autónoma proviene de los plexos mesentérico caudal, hipogástrico y pélvico (Flieger, 1976).

El reflejo de eyección de leche que se produce durante el ordeño y el amamantamiento, es un reflejo neuroendocrino. Este reflejo consta de una vía aferente o sensitiva (conduce los estímulos sensoriales originados en el pezón al sistema nervioso central a través de las neuronas) y una vía eferente (conduce la hormona OT, liberada por la neurohipófisis, hasta la glándula mamaria por vía sanguínea).

1.5. Relación de los parámetros anatómicos y morfológicos con la aptitud al ordeño

Numerosos autores han puesto de manifiesto que los caracteres morfológicos de la ubre en las ovejas lecheras condicionan en gran medida su adaptación al ordeño mecánico (Fernández et al., 1983; Gallego et al., 1983; Labussière, 1988; Fernández et al., 1995; Peris et al., 1996; Marie et al., 1999; y Rovai, 2001, entre otros). Según Mikus (1968, 1969, 1978), la ubre ideal (“*udder machine*”), denominada así por este autor, debe poseer pezones verticales y de tamaño medio, no demasiada altura de las cisternas mamarias, y gran uniformidad.

En las razas más productoras o seleccionadas, como la Lacaune o la Assaf, se observa con relativa frecuencia la no adaptación del individuo a la máquina de ordeño por problemas de morfología de la ubre (Fernández, 1985). Esto se debe a que la selección genética aplicada en estas razas se ha dirigido hacia el aumento de producción sin tener en cuenta los caracteres mamarios de los animales. Algunos autores señalan que, al incrementar la producción lechera, se puede notar un empeoramiento progresivo de la morfología mamaria, disminuyendo, por tanto, la ordeñabilidad de los animales (Gonzalo, 1992; Vijil, 1993). Por esta razón, Fernández et al. (1995) recomendaron introducir caracteres morfológicos relacionados con la buena aptitud al ordeño (medidas de la cisterna, posición, ángulo de inserción, longitud, y anchura de los pezones) en los programas de selección genética para la mejora de razas de ovino lechero.

2. Secreción de los componentes de la leche

Los procesos de síntesis y excreción láctea requieren la participación coordinada de todos los sistemas fisiológicos involucrados. Debe producirse el desarrollo de los alvéolos mamarios, la diferenciación bioquímica y estructural de las células secretoras alveolares, los ajustes metabólicos necesarios para suministrar sustratos a la glándula mamaria, y la retirada de la leche de forma regular (por parte de la cría o mediante el ordeño) (Akers, 2002).

La glándula mamaria es un órgano exocrino, en el que se producen dos tipos de excreción: 1) excreción merocrina, vía de secreción de las proteínas y los carbohidratos, y 2) excreción apocrina, vía de secreción de los lípidos (Banks, 1986). Su secreción, la leche, es una mezcla muy compleja de componentes provenientes de vías de secreción muy distintas.

2.1. La célula epitelial alveolar

Las células epiteliales alveolares son las responsables de la síntesis de la mayoría de los componentes lácteos y de su secreción al lumen alveolar. Por tanto, la evolución de una lactación va a depender, en última instancia, del número de células epiteliales funcionales y de su actividad de síntesis y secreción (Wilde y Knight, 1989). Trabajos realizados en pequeños rumiantes han demostrado que la caída de producción tras el pico de lactación se debe principalmente a una disminución en el número de células epiteliales, puesto que su capacidad metabólica potencial para la síntesis láctea apenas varía (Wilde y Knight, 1989). Así pues, el incremento del número de células epiteliales alveolares puede ser útil para mejorar la eficiencia de la producción de leche (Tucker, 1987).

Las células alveolares epiteliales secretoras tienen forma cuboidal, con unos 10 μm de lado. Como cabe esperar de células secretoras altamente activas, el citoplasma de las células alveolares durante la lactación contiene un gran número de mitocondrias y un extenso retículo endoplásmico rugoso (**REr**). También tiene un aparato de Golgi (**AG**) muy desarrollado y vesículas secretoras, con micelas de caseína en su interior, en la región apical (Hollman, 1974; citado en McManaman y Neville, 2003).

Las células epiteliales están unidas entre sí por un complejo de unión situado a nivel apical, compuesto por uniones adherentes, desmosomas y uniones estancas (tight junction, **TJ**) (Nguyen y Neville, 1998). Este complejo forma una barrera hermética que impide el paso directo de sustancias entre el compartimento vascular y el lumen alveolar a lo largo de toda la lactación.

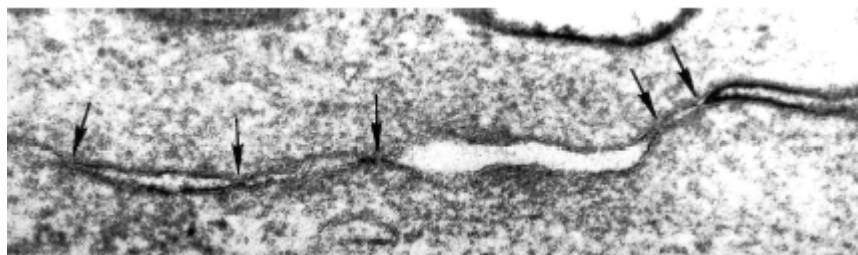
2.1.1. Las uniones estancas

Las TJ son el componente más apical de dicho complejo de unión. Forman como una especie de junta alrededor de cada célula epitelial, que se une a una estructura similar de la célula adyacente (Stelwagen et al., 1995).

Durante la lactación, cuando los ductos y los alvéolos mamarios están llenos de leche, el epitelio mamario se localiza entre dos medios bien diferentes: la leche, que contiene lactosa, proteínas lácteas y una baja concentración de sodio y cloro, y el fluido intersticial, que contiene proteínas plasmáticas y una gran concentración de sodio y cloro. Las TJ son las encargadas de prevenir la interdifusión de los constituyentes de estos dos fluidos sellando fuertemente las células epiteliales mamarias entre sí (Nguyen y Neville, 1998). Además, se encargan de mantener una pequeña diferencia de potencial transepitelial entre la sangre y la leche (Stelwagen et al., 1994b).

Al examinar en el microscopio electrónico secciones perpendiculares del epitelio mamario, las TJ aparecen como una serie de puntos en los que las membranas se fusionan (Figura 6).

Figura 6. Visión de un corte transversal de una TJ en un cultivo de células epiteliales mamarias. Los puntos de fusión de las capas exteriores de las membranas plasmáticas están señalados por las flechas (Nguyen y Nevile, 1998).

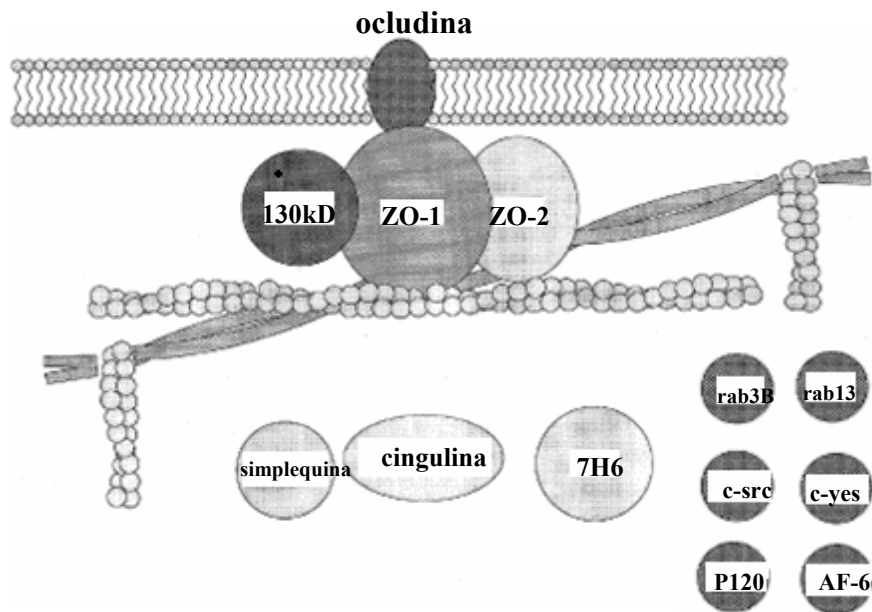


Se sabe que las TJ se asocian a proteínas plasmáticas (Figura 7). La ZO-1, de unos 210-220 kD, fue la primera TJ asociada a proteínas que se descubrió, y es la más utilizada como marcador morfológico para las TJ. Hay dos TJ más asociadas a proteínas: la ZO-2 (160 kD) con ciertas homologías a la ZO-1, y una proteína no caracterizada de 130kD (Anderson y Van, 1995). La ocludina (65 kD), es la única proteína transmembranal asociada a las TJ. Además, muchas otras proteínas se localizan en zonas citoplasmáticas cercanas a las TJ (simplequina, cingulina, etc.).

Las TJ también aparecen asociadas a elementos del citoesqueleto, en concreto, parecen estar asociadas con los filamentos de actina. Por tanto, parece ser que existe una relación

funcional entre las TJ y el citoesqueleto (Stevenson et al., 1988).

Figura 7. Modelo para el complejo TJ y sus interacciones con proteínas asociadas y con los componentes del citoesqueleto (Nguyen y Neville, 1998).



2.1.2. Vías de transporte de los precursores y de los componentes de la leche

El polo basal de las células epiteliales alveolares contacta con las células mioepiteliales. La membrana basal es la encargada de separar el compartimento epitelial del estroma y del sistema vascular.

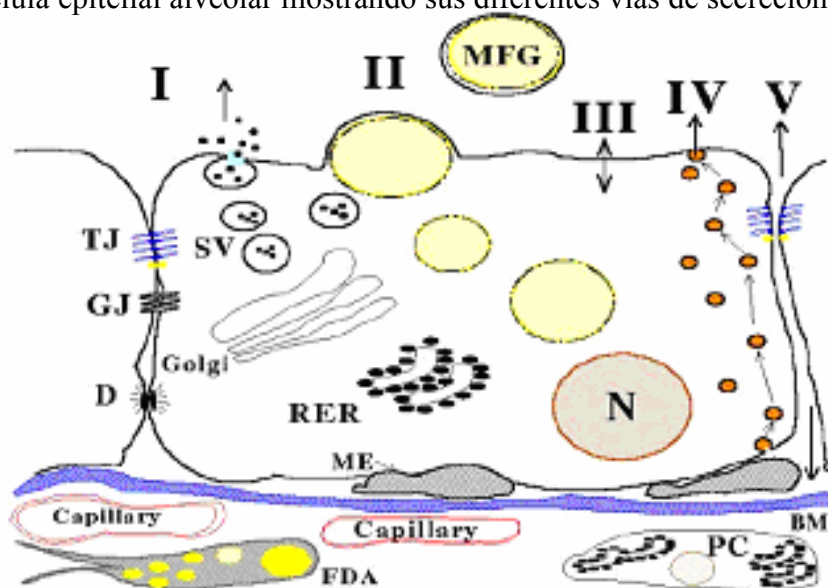
McManaman y Neville (2003), en su revisión sobre fisiología mamaria y secreción de leche, afirman que hay gran número de barreras potenciales para la transferencia de sustancias exógenas, provenientes de la sangre o de células del estroma, a la leche: membrana vascular y estromal, membrana basal epitelial, uniones estancas a nivel paracelular, membranas de Golgi y membrana apical epitelial.

Según los mismos autores, existen diferentes vías de secreción (Figura 8) a través del epitelio secretor mamario (4 transcelulares y 1 paracelular), las cuales permiten el acceso de los diferentes solutos al lumen alveolar:

I. Vía exocitótica o ruta de Golgi: mecanismo primario para la secreción de proteínas (caseína, α -lactoalbúmina), y también de agua, lactosa, oligosacáridos, fosfato, calcio y citrato. Estas sustancias son empaquetadas en vesículas secretoras dentro de Golgi y son transportadas hacia la membrana plasmática apical, con la que se fusionan descargando así su contenido en el espacio extracelular.

II. Vía de lípidos o ruta de los lípidos de la leche: a través de esta vía se secretan, por ejemplo: lípidos, hormonas (leptina), etc. Es un transporte exclusivo de las células del epitelio mamario. Las moléculas lipídicas recién formadas se van agrupando formando gotas lipídicas, las cuales van hacia la membrana plasmática apical donde al ser secretadas quedan rodeadas por parte de la membrana plasmática de la célula epitelial (secreción apocrina), dando lugar a la estructura que recibe el nombre de glóbulo graso de la leche. Este proceso produce, ocasionalmente, la inclusión de parte del citoplasma dentro del glóbulo graso (Huston y Patton, 1990), permitiendo así que sustancias típicamente citoplasmáticas lleguen a estar presentes en leche.

Figura 8. Célula epitelial alveolar mostrando sus diferentes vías de secreción (Neville et al., 1983).



SV: vesículas secretoras, RER: retículo endoplásmico rugoso, BM: membrana basal, N: núcleo, PC: plasma celular, FDA: adipocito graso, TJ: uniones estancas, D: uniones adherentes, GJ: uniones tipo gap, ME: célula mioepitelial, MFG: glóbulo graso de la leche.

III. Vía de transporte a través de membrana: compuesta por diferentes mecanismos soluto-específicos de transporte de iones monovalentes y polivalentes y de moléculas pequeñas como la glucosa y los aminoácidos. Esta vía requiere la presencia de transportadores específicos en las membranas basal y apical, o en la membrana plasmática basal y en Golgi o en las membranas secretoras.

IV. Vía transcitócica: vía de secreción de ciertas proteínas y de otras macromoléculas (Ej. Inmunoglobulinas, prolactina, transferrina). En esta vía se produce endocitosis de sustancias a nivel de la membrana basal y formación de vesículas que atraviesan la célula y se fusionan con la membrana plasmática apical liberando de esta forma su

contenido al medio extracelular (exocitosis).

V. Vía paracelular: un transporte directo, bidireccional, que permite el movimiento extracelular tanto de sustancias de bajo peso molecular (Na^+ , K^+ , Cl^- , lactosa,...) como de solutos macromoleculares (Ej. linfocitos) entre el lumen alveolar y el espacio intersticial durante la gestación, en episodios de mamitis o tras la involución mamaria. Normalmente, esta vía se encuentra cerrada durante la lactación por la presencia de TJ entre las células epiteliales. Sin embargo, tanto en el vacuno (Stelwagen et al., 1994a, 1997) como en el caprino (Stelwagen et al., 1994b) se ha observado que la acumulación de leche en la ubre al aplicarse intervalos entre ordeños extensos (≥ 18 h en vacuno, ≥ 21 horas en caprino), puede producir el debilitamiento y apertura de las TJ, permitiéndose el paso de solutos a través de la vía paracelular.

La glándula mamaria, y en concreto, las células epiteliales mamarias, utilizan los nutrientes extraídos del torrente sanguíneo para la síntesis de los componentes lácteos. La utilización de los nutrientes y por tanto, la secreción de los componentes lácteos, puede estar regulada por:

- La cantidad de nutrientes que llegan a la glándula mamaria a través del aporte arterial, que a su vez depende de la concentración arterial de nutrientes y del flujo sanguíneo.
- La eficacia de la glándula mamaria para extraer los nutrientes de la sangre.
- La eficacia de las células epiteliales mamarias (actividad metabólica y secretoria) para sintetizar y excretar los componentes lácteos a partir de los nutrientes extraídos del torrente sanguíneo.

2.2. Secreción de la grasa de la leche

En los rumiantes, los lípidos de la leche (Figura 9) constan principalmente (97-98%) de triglicéridos. El 2-3 % restante son fosfolípidos (componentes de la membrana de los glóbulos grasos) y lípidos menores (esteroles, tocoferoles, esfingolípidos, mono- y diacilglicéridos, etc.). Según varios autores (Collier, 1985; Larson, 1985; Nickerson, 1992), la síntesis de triglicéridos así como la de fosfolípidos tiene lugar a nivel del RE. Las fuentes o precursores de los ácidos grasos presentes en los triglicéridos de la leche son dos:

- **Lípidos sanguíneos:** a partir de ácidos grasos, provenientes de los lípidos de la dieta y/o de la movilización de grasas del tejido adiposo, y transportados hasta la glándula

mamaria por lipoproteínas de baja densidad (VLDL y quilomicrones). Los triglicéridos son hidrolizados a nivel de la pared capilar o de la superficie celular mamaria por la enzima lipoproteína lipasa (LPL), penetrando los ácidos grasos libres, el glicerol y algunos mono- y diacilgliceroles en la célula mamaria donde son reutilizados para sintetizar triglicéridos. Estos ácidos grasos son de cadena larga (16 carbonos o más), principalmente C₁₆ (palmítico) y C₁₈ (esteárico, oleico y linoléico).

- Ácidos grasos sintetizados "de novo": son ácidos grasos de cadena corta (menos de 8 carbonos) y media (de 8 a 16 carbonos), sintetizados por las células epiteliales mamarias, a través de la ruta bioquímica del malonil CoA. Para su síntesis son necesarios el acetato y el β-hidroxibutirato (ácidos grasos volátiles procedentes de las fermentaciones ruminales), que llegan a la glándula mamaria por vía sanguínea.

Los triglicéridos son sintetizados "de novo" o a partir de ácidos grasos de origen sanguíneo en el polo citoplasmático del retículo endoplásmico liso (REs). Se agrupan en gotitas lipídicas que aumentan de tamaño a medida que se alejan del REs, y llegan a la membrana apical de la célula, donde la presionan hasta formar vesículas rodeadas por la propia membrana, que caen, finalmente, a la luz alveolar.

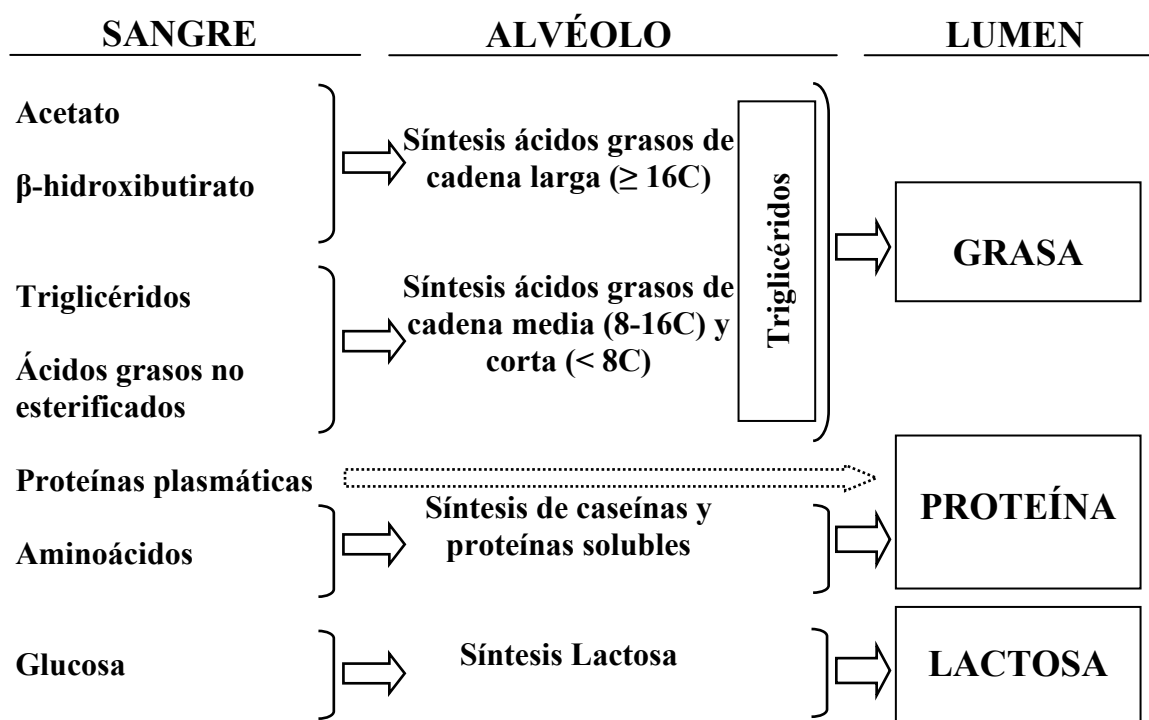
2.3. Secreción de las proteínas de la leche

La función biológica de las proteínas lácteas es variable. El 80-95% de ellas (según la especie) son proteínas específicas de la lactación, sintetizadas en la célula epitelial alveolar, a partir de los aminoácidos libres aportados por la sangre.

Las proteínas lácteas se encuentran en dos fases diferentes:

- Fase micelar: fase inestable, donde se encuentran las caseínas (α_{s1} -, α_{s2} -, β -, κ - y γ -caseínas). Se agregan dando lugar a la estructura de micela y aportan a la leche su aspecto blanco opaco. Representan el 80-90% de las proteínas lácteas.
- Fase soluble: fase estable constituida por polímeros proteicos hidrófilos, denominados proteínas solubles. Las proteínas mayoritarias de esta fase son: la β -lactoglobulina (~ 50% de las proteínas solubles) y α -lactoalbúmina (~ 25% de las proteínas solubles). En menor cantidad se encuentran: la albúmina sérica, inmunoglobulinas, lactoferrinas, transferrinas, lactoperoxidasas, lisozima, proteínas procedentes de restos celulares degenerados, etc., muchas de las cuales desempeñan diferentes funciones biológicas: enzimáticas, estructurales, antibacterianas, inmunológicas.

Figura 9. Precursores y componentes de la leche. Adaptado de Delouis et al. (2001).



El 90% de las proteínas lácteas (Figura 9) son sintetizadas a partir de los aminoácidos libres presentes en la sangre. Una vez dentro de la célula epitelial mamaria, los aminoácidos pueden: 1) participar en la producción de proteínas lácteas, 2) ser retenidos por la propia célula bajo la forma de proteínas estructurales o enzimas, 3) participar en reacciones metabólicas de la célula, o 4) pasar directamente a la leche, la sangre o la linfa como aminoácidos libres (Mephram, 1982).

El mecanismo de síntesis de las proteínas lácteas ha sido descrito por Ribadeau-Dumas (1981) y Larson (1979, 1985). Las proteínas lácteas son sintetizadas por los ribosomas del RER, siguiendo los mecanismos predeterminados y codificados en los genes y comúnmente aceptados para la síntesis proteica. Las cadenas peptídicas producidas se liberan a la luz del RER y pasan a continuación al AG, donde se reúnen con el resto de constituyentes no grasos de la leche (lactosa, iones y agua) dentro de las vesículas de Golgi. En estas vesículas y gracias a la presencia de enzimas específicos, de calcio y fosfato inorgánico, las moléculas de caseína sufren modificaciones (glicosilación, fosforilación y agregación en micelas), adquiriendo así su conformación tridimensional definitiva. Las vesículas secretoras abandonan el AG y se desplazan hacia la membrana plasmática apical y un proceso de exocitosis permite la descarga del contenido vesicular al lumen alveolar.

2.4. Secreción de la lactosa de la leche

La lactosa es el principal carbohidrato y el constituyente más constante de la leche de los rumiantes (Figura 9). Es un disacárido formado por una molécula de D-glucosa y una de D-galactosa, que juega un papel muy importante en el mantenimiento de la osmolaridad de la leche. Su secreción determina la cantidad de agua y de iones presentes en la leche y, por tanto, el volumen de leche producido.

La síntesis de una molécula de lactosa requiere 2 moléculas de glucosa. La glucosa no puede ser sintetizada por las células epiteliales mamarias ya que éstas carecen de glucosa-6-fosfatasa, enzima de la neoglucogénesis (Scott et al., 1976). Así pues, las 2 moléculas de glucosa requeridas para la síntesis de lactosa, deben ser sintetizadas en el hígado a partir de ácido propiónico proveniente de la fermentación ruminal o de la gluconeogénesis.

Una vez en el interior de la célula epitelial mamaria, una de las glucosas consigue pasar a través de las membranas del AG y llegar hasta el lumen de Golgi gracias a un transportador de glucosa denominado GLUT1. Es un transportador pasivo, por tanto, aparentemente no limita la síntesis de lactosa. La otra molécula de glucosa es convertida, en el citosol de la célula, en UDP-galactosa (uridina difosfato-galactosa) gracias a una serie de reacciones bioquímicas y a la acción de una enzima epimerasa (Kuhn, 1983). Posteriormente, la UDP-galactosa es transportada activamente hasta el lumen del AG. Así, el transporte de galactosa en el AG puede ser un limitante de la síntesis láctea (Kuhn, 1983).

La síntesis de lactosa tiene lugar en el lumen de las vesículas del AG, donde el enzima lactosa sintetasa cataliza la reacción que posibilita la unión de la glucosa y la galactosa para la formación de lactosa. Este enzima consta de dos partes proteicas: la galactosil transferasa y la α -lactoalbúmina, la cual está libre en el lumen de AG y forma parte, junto con la lactosa, de los componentes de la leche (Collier, 1985; Larson, 1985).

La síntesis de lactosa en el lumen del AG tiene importantes consecuencias osmóticas. La membrana del AG no es permeable a la lactosa pero sí lo es al agua, de forma que a medida que se sintetiza la lactosa, el agua penetra en el lumen para mantener su contenido isotónico con el citoplasma de la célula.

2.5. Secreción de los iones en la leche

Las membranas son permeables a los iones, especialmente al Na^+ , K^+ , Mg^{2+} y Cl^- . A medida que los líquidos se acumulan en el AG, la concentración de estos iones disminuye, la presión osmótica aumenta y se favorece un mayor movimiento de agua. Sin embargo, los

altos contenidos en K^+ y los bajos contenidos de Na^+ y Cl^- de la leche, comparados con los de sangre, sugieren la presencia de una bomba iónica selectiva (Na^+-K^+) en las membranas de las vesículas de Golgi, similar a la existente en la membrana basal de la célula epitelial.

En la leche también encontramos Ca^{2+} , fosfato y citrato. Estos iones no difunden con facilidad hacia el lumen puesto que la membrana apical es impermeable a ellos. Así pues, no pueden retornar a la célula una vez se encuentran en leche. Ca^{2+} y fosfato son fundamentales en la formación de la estructura micelar de las caseínas lácteas. El Mg^{2+} y el citrato también forman parte de ellas (Hurley, 2001).

2.6. Control de la secreción láctea

Se considera que son dos las vías de control sobre las células epiteliales alveolares: un control sistémico, que actúa sobre la totalidad de la glándula mamaria, y un control local o autocrino, que interviene sobre la unidad glandular.

2.6.1. Control hormonal sistémico

El sistema endocrino juega un papel fundamental en el desarrollo mamario (mamogénesis), en el comienzo de la lactación (lactogénesis), y favoreciendo la secreción láctea (galactopoyesis) (Akers, 2006). La lactogénesis, acostumbra a ser descrita como un proceso que ocurre en dos estadios (Akers, 2002; Neville et al., 2002; McManaman et al., 2003, entre otros):

- Lactogénesis 1 (o fase de iniciación): Tiene lugar durante el último tercio de la gestación. Se caracteriza por producirse la diferenciación estructural y funcional del epitelio secretor (de forma limitada), y la expresión de algunos de los genes involucrados en la síntesis de los componentes lácteos.
- Lactogénesis 2 (o fase de activación secretora): Fase del desarrollo mamario dirigida a la secreción del calostro y, posteriormente, de la leche. Se produce durante el parto y coincide con el comienzo de la síntesis y secreción láctea. Molecularmente se caracteriza por el incremento en la expresión de genes proteicos, el cierre de las uniones estancas entre células epiteliales alveolares, el movimiento de gotas lipídicas y micelas de caseína hacia el lumen alveolar (Neville et al., 2002).

Estas fases de desarrollo son esenciales para que se den los requisitos fisiológicos que permiten, en última instancia, que ocurra la lactación. Por tanto, es lógico pensar que las alteraciones en la actividad hormonal o en los factores de crecimiento que modifican la

glándula mamaria durante estas fases, podría tener un impacto importante sobre la producción de leche.

En el control endocrino de la glándula mamaria se encuentran involucradas tres grandes categorías de hormonas (Tabla 1):

- Hormonas reproductivas: estrógenos, progesterona, lactógeno placentario, prolactina (**PRL**) y oxitocina (OT). Todas ellas tienen efecto directo sobre la glándula mamaria.
- Hormonas metabólicas: hormona del crecimiento (**GH**), glucocorticoides, hormona tiroidea e insulina. Su principal función es coordinar la respuesta corporal frente a cambios metabólicos o frente al estrés. Ahora bien, indirectamente pueden regular la síntesis y la secreción láctea a través de la alteración del flujo de nutrientes que llega a la glándula mamaria y también pueden alterar la sensibilidad de ésta a las hormonas reproductivas.

Hormonas mamarias: Son hormonas sintetizadas y secretadas por la propia glándula mamaria. Estas hormonas son: GH, péptido relacionado con la hormona paratiroide (**PTHrP**), leptina y PRL. Aunque todas ellas tienen acciones locales paracrinas o autocrinas sobre la glándula mamaria, hay evidencias de que muchas de ellas (GH, PTHrP y posiblemente la leptina) pueden tener funciones sistémicas.

De las hormonas anteriormente citadas, la GH y la PRL son fundamentales para la producción de leche. La PRL es bien conocida por su acción lactogénica en los rumiantes y por su participación crítica durante el parto para que se produzca el comienzo de la lactación (Tucker, 2000). Sin embargo, hay una interesante contradicción en el posible papel de la PRL a lo largo de la lactación. Estudios realizados por Plaut et al. (1987), donde no se observó ningún efecto de la infusión de PRL sobre la producción de leche, o por Koprowski y Tucker (1973), donde se obtuvo una correlación mínima entre la concentración de PRL en sangre y la producción de leche en vacuno, han contribuido a considerar que la PRL carece de importancia en la galactopoyesis en los rumiantes. Ahora bien, esta consideración es cuestionable ya que una mínima secreción de PRL parece ser suficiente para mantener la producción de leche en ovino (Buys et al., 1995). Además, el tejido mamario de los rumiantes es capaz de secuestrar cantidades significativas de PRL incluso cuando ésta se presenta en bajas concentraciones en la circulación, y también hay evidencias de producción local de PRL por parte de la propia glándula mamaria (Knight, 2001). Cabe añadir que la administración de bromocriptina (reduce la producción de PRL) disminuye la producción de leche de un 15 a un 20% en cabras (Knight, 2001) y un 50% en ovejas (Buys et al.,

Tabla 1. Principales hormonas que afectan el desarrollo y funcionamiento de la glándula mamaria (Adaptado Neville et al., 2002).

Hormonas	Efectos principales en glándula mamaria
H. reproductivas	
Estrógenos	Desarrollo de los conductos mamarios
Progesterona	Desarrollo de los lóbulos alveolares
Lactógeno placentario	Inhibe la secreción activa de leche (lactogénesis 1)
Prolactina	Desarrollo mamario (lactogénesis 1)
Oxitocina	Lactogénesis, desarrollo y diferenciación alveolar, expresión de genes de proteína en leche
H. metabólicas	Mantenimiento lactación (promueve la supervivencia alveolar, el mantenimiento de las uniones estancas y la síntesis de proteína y lactosa)
Hormona del crecimiento	Reflejo de eyección de leche
Glucocorticoides (cortisol, corticoesterona)	Mantenimiento de la lactación
Hormonas tiroideas	Desarrollo de los conductos mamarios, diferenciación mamaria (¿?)
Insulina	Estimula la producción de leche
Hormona del crecimiento	Lactogénesis, diferenciación celular, disminuye la permeabilidad de las uniones estancas
Leptina	Lactación (necesarios para la activación secretora)
Prolactina	Estimulan el consumo de oxígeno y la síntesis de proteína
H. mamarias	Regula el flujo de nutrientes que llega a glándula mamaria
	Ídem
	Desarrollo y proliferación de células epiteliales
	Ídem

1995). De forma similar, la administración de PRL exógena aumenta un 10% la producción de leche en caprino lechero (Knight, 2001). Por tanto, parece ser que hay claras evidencias de que la PRL juega también un papel destacado en la galactopoyesis y probablemente un papel menor pero significativo, en la persistencia de la lactación en los rumiantes lecheros.

Estudios realizados sobre la inhibición de la PRL y la GH en ratas, han ayudado a clarificar que el efecto individual de la PRL o de la GH sólo puede ser observado cuando se produce la ausencia de una de las dos hormonas. Por tanto, es posible que los efectos de la PRL sobre la lactación sólo puedan ser observados cuando la GH no está presente (Tucker, 2000), lo que explicaría el escaso o nulo efecto producido por la PRL o la bromocriptina sobre la producción de leche en rumiantes, respectivamente (Tucker, 2000).

La GH es la principal hormona galactopoyética en los rumiantes. Su aporte exógeno en forma de somatotropina bovina (**bST**) incrementa la producción de leche y favorece la persistencia de la lactación en vacas (Bauman et al., 1999), ovejas (Fernández et al., 2001) y en cabras (Baldi et al., 2002). La GH regula el flujo de nutrientes que llega a la glándula mamaria (Neville et al., 2002), favoreciendo su afluencia a ésta y facilitando la secreción de componentes lácteos por parte de las células epiteliales mamarias. Además, sus acciones antiapoptótica (Baldi et al., 2002) y estimuladora de la renovación celular en las ubres en lactación (Capuco et al., 2001), ayudan a mantener la población celular mamaria a lo largo de la lactación, contribuyendo de esta manera a mejorar su persistencia en los rumiantes. En caprino ha sido descrito un incremento de la hipertrofia celular (Boutinaud, 2003) y del DNA total mamario (Baldi et al., 2002; Boutinaud, 2003).

2.6.2. Control local autocrino

La segunda vía de control de la producción de leche y del desarrollo de la glándula mamaria es el control local autocrino. Este control es ejercido por la propia glándula mamaria sobre sí misma, y es independiente tanto a estímulos externos como al resto de glándulas mamarias del animal.

El control local autocrino fue demostrado por primera vez en estudios realizados en vacas y cabras. Maule Walker y Peaker (1980) realizaron estudios en cabras gestantes cercanas al parto, a las que se ordeñó una de las glándulas, durante varios días, para retirar los fluidos existentes en la misma durante el pre-parto. Se observó que la glándula ordeñada, y únicamente ésta, empezó a secretar copiosas cantidades de leche antes del parto. Igualmente, al aplicar ordeños más frecuentes sobre una de las glándulas en cabras

(Blatchford y Peaker, 1982; Henderson et al., 1983) o sobre dos cuarterones en vacas (Hillerton et al., 1990), la producción de leche de las glándulas tratadas, y únicamente la de éstas, se vio incrementada significativamente. Contrariamente, si la frecuencia de ordeño era reducida en una de las glándulas, la producción de leche decrecía unilateralmente.

Recientemente, Nudda et al. (2002) han observado, en ovejas lecheras de razas Sarda, Awassi y Merino sometidas unilateralmente a uno y dos ordeños al día, una reducción de un 18-24% en la producción de leche de la media ubre ordeñada una vez al día respecto a la ordeñada dos veces al día. El hecho de que el efecto fuera unilateral, confirma que la secreción de leche está controlada, también en ovejas lecheras, por un mecanismo local.

Fleet y Peaker (1978) observaron que al aplicar largos intervalos entre ordeños y aumentar la presión intramamaria (**PIM**), se producía la disminución de la secreción láctea en el caprino. Los mismos autores afirmaron que tanto la disminución del flujo sanguíneo mamario como el deterioro del epitelio mamario se daban al incrementarse el PIM. Además, Nickerson et al. (1980) observaron que el aumento de la PIM comprimía las células epiteliales mamarias provocando una alteración del citoesqueleto y, por tanto, una perturbación del transporte de los constituyentes de la leche a nivel intracelular. Así pues, parece ser que la PIM también desempeña un papel importante en la regulación de la secreción de leche a nivel de la propia glándula.

Ahora bien, algunos autores consideran que la reducción de la actividad mamaria, como consecuencia de largos intervalos entre ordeños, no se debe tanto a una elevación progresiva de la PIM, sino más bien a la acumulación de los productos de secreción en la luz de los alvéolos (Linzell y Peaker, 1971; Peaker, 1980; Davis y Huhson, 1989).

Existen estudios que se decantan hacia el mecanismo inhibitor químico, propuesto ya por Linzell y Peaker (1971), como responsable de la limitación del grado de secreción de leche por parte de la glándula mamaria:

- Henderson y Peaker (1984) observaron que en cabras ordeñadas tres veces al día, si se reemplazaba el volumen recuperado en el ordeño extra por un volumen equivalente de sacarosa isosmótica, se mantenía la presión intramamaria anterior al ordeño y se conseguía mantener el efecto estimulador del ordeño extra.
- Henderson y Peaker (1987) vieron que no hacía falta retirar la leche de la ubre para incrementar el nivel de secreción. Bastaba con diluir la leche almacenada, infundiendo sacarosa en la glándula no ordeñada.

- Wilde et al. (1988), observaron que la infusión de extractos de suero lácteo parcialmente purificados en glándula mamaria de cabras, inhibía la secreción láctea.

Así pues, tras muchos estudios, se logró determinar que la principal responsable del control local de la secreción láctea era una glucoproteína presente en la propia leche y sintetizada por las células epiteliales de la glándula mamaria. Esta proteína fue denominada factor inhibitorio de lactación, **FIL**, y fue aislada de la fracción sérica de leche de cabra por Wilde et al (1987a), con un peso molecular de 10 a 30 kDa.

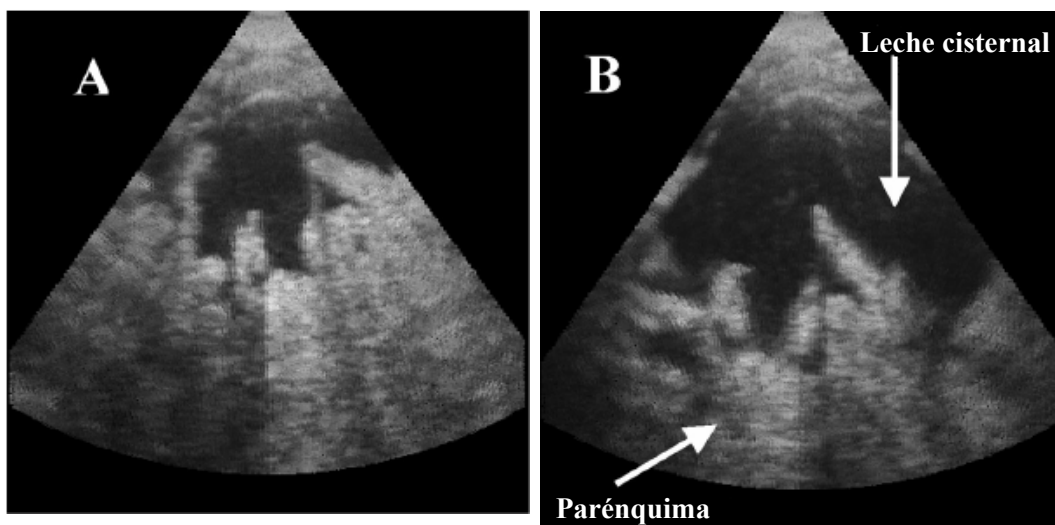
Henderson y Peaker (1987) observaron que al drenar frecuentemente la leche cisternal de la ubre, sin producir reflejo de eyección, la producción de leche no incrementaba, a diferencia de lo que pasaba al realizar frecuentemente ordeños completos. Este hecho confirmó que el lugar de acción del FIL era el tejido alveolar.

La acción del FIL ocurre en las primeras etapas de la vía de secreción de proteínas (Renninson et al., 1993). El FIL bloquea el transporte de vesículas secretorias (específicamente, el transporte entre el RE y el AG, así como el transporte intra-Golgi) en las células epiteliales mamarias, dando lugar a la inhibición de la síntesis de caseína y lactosa, y por tanto, afectando la secreción láctea. El FIL también estimula la degradación intracelular de caseína de nueva síntesis (Wilde et al., 1989).

3. Eyección de leche

En la ubre de los rumiantes, la leche se almacena dividida en dos fracciones: la fracción cisternal y la fracción alveolar. La leche de la fracción cisternal se encuentra en el pezón, en la cisterna glandular y en los grandes conductos galactóforos. Esta leche es fácilmente recuperable ya que la única barrera que impide su extracción es el esfínter del pezón. Por el contrario, la fracción de leche alveolar se localiza en los finos conductos alveolares y en los alvéolos mamarios, y es leche de difícil extracción, ya que está fijada por fuerzas capilares (Peaker y Blatchford, 1988; Bruckmaier et al., 1993). Por tanto, la leche alveolar sólo puede ser recuperada si se produce la expulsión activa de ésta hacia las cavidades cisternales (eyección de leche), todo ello gracias a la descarga de OT endógena que es la que se encarga de producir la contracción de las células mioepiteliales que rodean los alvéolos mamarios (Figura 10).

Figura 10. Llenado de la cisterna mamaria tras la administración i.v. de 5 UI de oxitocina en vacuno. Ecografía del cuarterón delantero izquierdo (A: min. 0; B: 3 min. después de la administración de oxitocina). Caja et al., 2004.



3.1. Estímulos desencadenantes de la eyección de leche

La eyección de leche es un reflejo innato, que no se produce bajo control consciente del animal, y ocurre en respuesta a estímulos táctiles producidos sobre la glándula mamaria a través de un arco reflejo neuroendocrino.

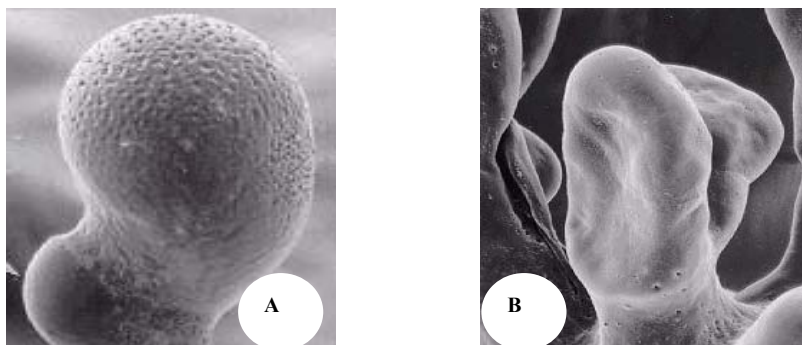
El reflejo de eyección puede ser desencadenado por diferentes estímulos, los cuales, a su vez, generan diferentes tipos de respuestas:

- Amamantamiento: produce un estímulo mucho más potente que el ordeño (Akers y Lefcourt, 1982; Bar-Peled et al. 1995).
- Ordeño a mano: induce una liberación de OT superior al ordeño a máquina (Gorewit et al. 1992), mejora el vaciado de la ubre y reduce la leche residual.
- Ordeño a máquina: la estimulación que producen las pezoneras sobre el pezón suele ser adecuada, pero siempre es menor que la del ordeño a mano. La liberación de OT que se induce con el ordeño a máquina suele ser suficiente para conseguir una eyección de leche efectiva (Labussière et al., 1993; Bruckmaier y Blum, 1996).
- Estimulación del tracto genital: causa una gran liberación de OT, que estimula la glándula mamaria de los rumiantes (Bruckmaier et al., 1992). La estimulación de los genitales ha sido habitualmente utilizada para conseguir una eyección completa de leche en vacas que liberan insuficiente OT.
- Estímulos ópticos y acústicos: en algunas razas de ovino lechero (Lacaune) parece que se produce liberación espontánea de OT endógena debido al comportamiento condicionado al ordeño (Caja et al., 2000). Contrariamente, Fuchs et al. (1987) y Marnet et al. (1998) no observaron, en ovino lechero, descargas de OT previas al ordeño inducidas por el pastor, el ruido de la bomba de la máquina de ordeño o por la distribución de concentrado. En vacas, Svennersten y Samuelsson (1992) también describieron esta descarga de OT condicionada.

Los receptores sensoriales son abundantes en la piel de la glándula mamaria, especialmente en el pezón (Findlay, 1966; citado en Bruckmaier y Blum, 1998). Estos receptores captan los diferentes estímulos sensoriales y los transmiten hasta el encéfalo para que se produzca la liberación de OT en la neurohipófisis (o glándula pituitaria posterior).

La OT, a través del torrente sanguíneo, llega a la glándula mamaria y produce la contracción de las células mioepiteliales que rodean los alvéolos mamarios y que recubren longitudinalmente los conductos interlobulares. Cuando los alvéolos se contraen (Figura 11), los conductos se acortan, el lumen del conducto aumenta su tamaño, y la leche alveolar es drenada activamente a los conductos galactóforos y a la cavidad cisternal (Bruckmaier et al., 1994b).

Figura 11. Microscopia electrónica del alvéolo mamario (A: antes de la eyección de leche; B: después de la eyección de leche) (Caja et al., 2000).



3.2. La liberación de oxitocina y los efectos del reflejo de eyección

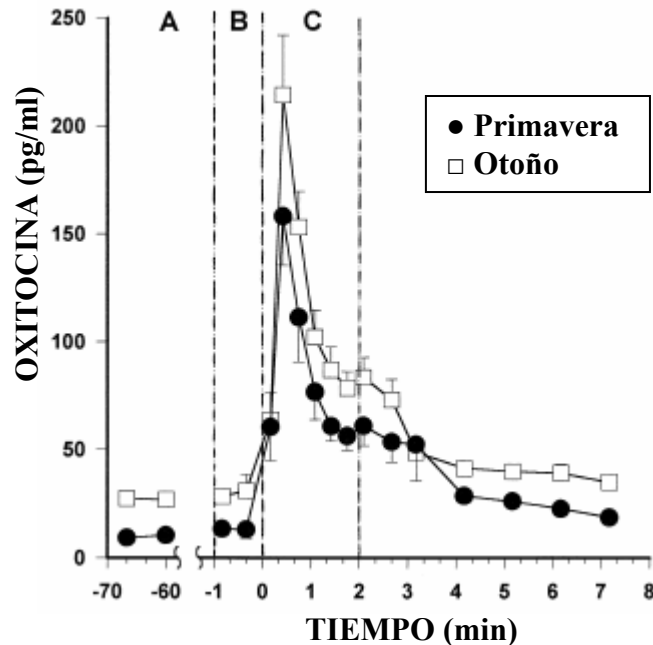
La liberación de la OT durante el amamantamiento o el ordeño a máquina fue descrita inicialmente por Ely y Patersen (1941), verificada posteriormente mediante bioensayo (Fitzpatrick, 1961; Folley y Knagg, 1966), radioinmunoensayo (Schams, 1983), y recientemente mediante ELISA (Marnet et al., 1994). Las nuevas técnicas para medir la concentración de OT en sangre, y su aplicación en la investigación con animales lecheros, han sido muy importante para comprender la relación existente entre la fisiología de la glándula mamaria, el sistema nervioso y el sistema endocrino.

En ovejas lecheras de raza Lacaune, Marnet et al. (1998) observaron que a los 20-30 segundos de la colocación de las pezoneras, la concentración de OT endógena incrementó drásticamente. Esta concentración decreció rápidamente y permaneció estable durante 60 segundos. Volvió a aumentar ligeramente mientras se realizó el apurado a máquina (120s) y posteriormente disminuyó hasta llegar a su concentración basal a los 10 minutos del inicio del ordeño (Figura 12). En este estudio se produjeron descargas de OT endógena en el 92,5% de las ovejas presentes.

En vacuno lechero es sumamente importante alcanzar una concentración de OT elevada y continua durante el ordeño, para conseguir una mejor eyección de leche y un drenaje de los alvéolos a las cisternas lo más completo posible, manteniendo un flujo elevado de leche durante el ordeño. En los pequeños rumiantes, la eyección de leche en respuesta a elevadas concentraciones de OT se produce de forma similar al vacuno. Sin embargo, en estas especies el tiempo de descarga de OT y su circulación periférica, importantes para el drenaje de la leche, es de menor relevancia debido a su mayor fracción cisternal (Bruckmaier et al., 1994b). La leche cisternal de ovejas y cabras se halla disponible durante más tiempo y, por tanto, no se suele interrumpir el flujo de leche aunque se produzcan retrasos en la aparición

del reflejo de eyección.

Figura 12. Descarga de oxitocina antes, durante y después del ordeño a máquina de ovejas Lacaune durante la primavera y el otoño. (A) En el corral y antes del ordeño, (B) en la sala de ordeño mientras comen el concentrado, (C) durante el ordeño a máquina (C). (Marnet et al., 1998).



Aún produciéndose el reflejo de eyección durante el ordeño a máquina, la eyección de leche no es del todo completa. La leche residual permanece en la ubre y únicamente puede ser recuperada si se administran cantidades suprafisiológicas de OT. En el ovino, estudios pertenecientes al proyecto FAO-M4 y realizados sobre distintas razas, determinaron que la leche residual representa de un 11 a un 20% del total de leche producida (Labussière, 1983). En el vacuno, la leche residual representa el 10-30% del total (Bruckmaier y Blum (1998).

En el bovino lechero, frecuentemente, se recurre a la administración de OT exógena antes del ordeño para evitar ausencias o interrupciones de la eyección de leche, o para la terapia de mastitis. Ahora bien, se ha visto que administraciones crónicas de OT, en vacuno, reducen la eyección de leche espontánea una vez se retira la OT exógena (Donker et al., 1954; Bruckmaier, 2003), debido a que la glándula mamaria se hace menos sensible a la OT (Mačuhová et al., 2004). Afortunadamente, este efecto revierte rápidamente, y sólo son necesarios dos días para que la cantidad de leche residual sea igual a la que había antes de iniciar la administración de OT exógena (Bruckmaier, 2003; Mačuhová et al., 2004).

Como hemos mencionado anteriormente, la eyección de leche es importante porque permite el vaciado de la ubre y el mantenimiento de la lactación en los pequeños rumiantes.

Ahora bien, este reflejo también tiene efectos sobre la calidad de la leche obtenida por ordeño, puesto que permite recuperar la leche de la fracción alveolar, que es más rica en grasa que la leche de la fracción cisternal (Labussière, 1969; Rovai, 2001). Según McKusick et al. (2002b), en ovejas cruzadas de raza East Friesian, se observó que más del 70% del total de grasa estaba contenida en la fracción alveolar. Sin embargo, la eyección de leche no afecta apreciablemente al contenido en proteína, ya que las diferencias entre las fracciones cisternal y alveolar son mínimas, tanto en ovejas (McKusick et al., 2002a) como en vacas (Davis et al., 1998; Ayadi et al., 2004).

La no eyección de leche también puede acompañarse de modificaciones en la composición de leche, pero según propone Marnet (1998) éstas no han sido estudiadas profundamente. El efecto más marcado de esta ausencia de eyección sería la distensión de los alvéolos y la posible obertura de las uniones estancas que los mantiene unidos entre sí. Produciéndose, por tanto, el aumento del contenido en proteínas séricas de la leche (albúmina, inmunoglobulinas), variaciones en el contenido en Na y K de la leche, y una disminución del contenido de lactosa, seguida por una bajada en la secreción láctea (Stelwagen et al., 1995).

3.3. Transferencia de la leche intramamaria entre ordeños

En el periodo entre ordeños se produce la transferencia de leche desde los alvéolos mamarios hacia la cisterna. No se sabe con claridad cuáles son los mecanismos que producen la transferencia de leche entre ordeños. Sin embargo existen algunas teorías altamente creíbles:

- Contracción muscular espontánea de las células mioepiteliales, como ocurre en otros sistemas con fibras musculares lisas (Ej. Sistema vascular, digestivo o genital), ya sea como respuesta a la distensión de los alvéolos o a un reflejo neuroendocrino (Marnet y McKusick; 2001).
- Otras fuentes de OT: Ej. Los cuerpos lúteos liberan OT durante la fase luteínica. Esta OT puede influir sobre la transferencia de leche durante el periodo entre ordeños debido, muy probablemente, a la contracción alveolar que se produce (Marnet et al., 1998). En ovejas superovuladas observaron que al aumentar el número de cuerpos lúteos incrementaba la producción de leche significativamente, sobretodo la producción de leche cisternal (Labussière et al., 1993).
- Variaciones en la microanatomía de la glándula mamaria podrían afectar la

transferencia de leche, pero son necesarias evidencias experimentales (Marnet y McKusick; 2001).

Así pues, los animales en los que se produce transferencia de leche entre ordeños son más fáciles de ordeñar y pueden soportar mejor ordeños incompletos. La eyección de leche en presencia casi constante de OT impide que la leche vuelva a subir a los alvéolos, optimizándose, por tanto, la secreción de leche (Marnet, 1998).

Ahora bien, en ratones, Linzell (1955) observó que una vez producida la eyección de leche, el retraso en su recuperación provocaba la descontracción de las células mioepiteliales y el retorno de la leche de los conductos mamarios a los alvéolos. Este efecto ha sido confirmado recientemente en vacuno lechero, y se le ha denominado reflujó cisternal o “cisternal recoil” (Caja et al., 2004). En caprino, Peaker y Blatchford (1988) afirmaron que al inyectar OT repetidamente sin ordeñar, la distribución de la leche en la ubre no se veía afectada como consecuencia del retorno de la leche a los alvéolos. Sin embargo, Salama et al. (2004), mediante ecografía mamaria, no observaron que se produjera dicho reflujó una vez producida la eyección de leche, pese a no realizarse el ordeño. Según los mismos autores, el gran tamaño cisternal fue el responsable de evitar el retorno de la leche cisternal al alvéolo. El ovino debería comportarse de forma similar al caprino, sobretodo en las razas lecheras que presentan grandes cisternas. Sin embargo, no existen estudios realizados al respecto.

3.4. Cinética de emisión: evaluación del reflejo de eyección y su relación con la aptitud al ordeño

La evaluación de la cinética de emisión de leche es una de las metodologías principales para la valoración de la aptitud al ordeño de las ovejas lecheras. El estudio de la evolución de las curvas de emisión de leche durante el ordeño a máquina y su cuantificación (Labussière, 1982) permite evaluar la intensidad del reflejo neuroendocrino de eyección de leche, y relacionarlo con la aptitud al ordeño mecánico de las ovejas (Labussière, 1976).

Según la clasificación de Labussière y Martinet (1964), la eficacia del reflejo de eyección y la cinética de emisión (Figura 13) permiten clasificar a las ovejas en:

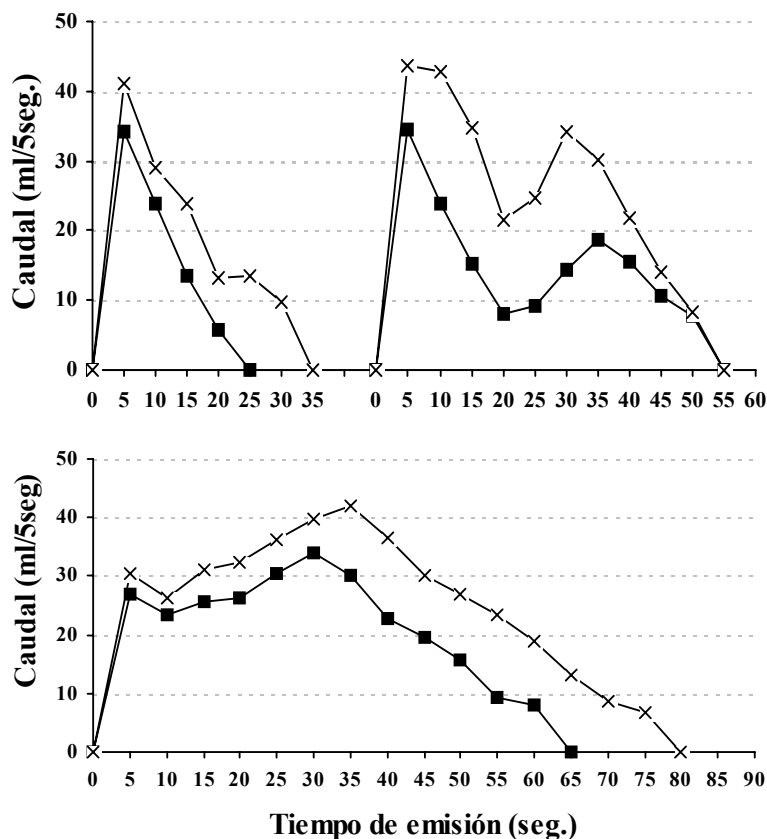
- Ovejas de un pico: presentan un solo máximo, correspondiente a la leche cisternal, y por tanto, con un tiempo de emisión cercano a los 30 segundos.
- Ovejas de dos picos: presentan dos máximos de emisión, que corresponden a las fracciones de leche cisternal y alveolar, respectivamente.

Las ovejas de dos picos son consideradas animales de fácil ordeño, mientras que las de un pico son consideradas de ordeño automático difícil ya que no presentan el reflejo de eyección neuroendocrino y, por tanto, el porcentaje de leche retenida en la ubre es mucho mayor.

Ahora bien, existen ovejas que no pueden ser clasificadas en ninguno de los grupos anteriores por no presentar siempre el reflejo de eyección. Estas ovejas son definidas como de “difícil clasificación” (Labussière y Ricordeau, 1970; Fernández, 1985; Such, 1990).

Rovai (2001) definió un tercer tipo de curva de emisión, llamada “en meseta” y correspondiente a aquellas cinéticas en las que no se diferencian claramente el primer y el segundo pico ya que cuando aparece la segundo pico, la primera emisión aún no ha finalizado (Figura 13). Las cinéticas en meseta se suelen presentar en aquellas ovejas que presentan tiempos de emisión de leche prolongados y elevados caudales.

Figura 13. Cinética de emisión de ovejas de raza Manchega (■) y Lacaune (×) de curvas de “1 pico”, “2 picos” y “en meseta” (Rovai, 2001).



Mayer et al. (1989) mostraron la presencia de curvas de emisión que denominaron de “tipo 3” y “tipo 4”:

- Curvas de “tipo 3”: se caracterizaron por mostrar un gran caudal de emisión inicial,

seguido de una meseta. No se definió la presencia de un segundo pico, debido probablemente a una superposición de los dos picos de emisión.

- Curvas de “tipo 4”: se asociaron a ovejas de mayor tiempo de ordeño, presentaron una primera meseta muy marcada, seguida de otra más pequeña. Posiblemente fue debido a la elevada horizontalidad de los pezones o a la existencia de un estrecho conducto de los pezones.

En las cinéticas de emisión de ovino, se ha observado que la leche cisternal es extraída en unos 30-35 segundos tras la colocación de las pezoneras, debido al pequeño volumen de leche que contienen las cisternas mamarias (Labussière, 1988).

Asimismo, diversos autores describen curvas de cinética con prolongados tiempos de emisión, en las que no se diferencia con claridad la existencia de dos picos diferenciados. Este hecho se explica por tratarse de animales de alta producción (Casu, 1967; Labussière y Ricordeau, 1970; Fernández et al., 1989), los cuales tendrían el reflejo de eyección de la leche alveolar solapado con el final de la recuperación de la leche cisternal (Purroy, 1997)

Marnet et al. (1998) encontraron que además de las ovejas de 1 pico y de 2 picos, existen ovejas con curvas de una sola emisión, pero con un tiempo superior a los 40 segundos, y con múltiples emisiones. En esta categoría se incluyeron las ovejas más productoras y/o con grandes ángulos de inserción de los pezones.

Mayer et al. (1989) estudiaron la relación existente entre la descarga de OT y la cinética de emisión de leche en ovino lechero. Los resultados indicaron una mayor liberación de OT en las ovejas con curva de emisión de “2 picos”, demostrando así la relación existente entre la OT y la eyección de leche. También comprobaron que la descarga de OT se producía antes de la aparición del segundo pico de emisión, correspondiente a la fracción de leche alveolar. Por otra parte, en aquellos animales en los que no se produjo segunda emisión de leche, no se observó descarga de OT.

La OT tiene importancia tanto en la eyección de leche como en el mantenimiento de la secreción durante la lactación, aunque no se ha encontrado una relación directa entre las concentraciones de OT y la cantidad de leche obtenida en el ordeño (Marnet et al., 1998).

3.5. Inhibición del reflejo de eyección

El control de la inhibición total o parcial del reflejo de eyección de leche se realiza mediante la activación del sistema simpático-adrenal. Según Wellnitz y Bruckmaier (2001), la eyección de leche puede ser interrumpida a dos niveles:

- Inhibición a nivel central: cuando no se produce la descarga de OT por parte de la hipófisis posterior. Ej. Ordeño de hembras primíparas inmediatamente después del parto (Bruckmaier et al., 1992) o tras el destete (Akers y Lefcourt, 1982; Tancin et al., 1995; Marnet y Negrão, 2000), animales en estro (Bruckmaier y Blum, 1994), amamantamiento de crías ajenas (Silveira et al., 1993; Hernández et al., 1999; Marnet y Negrão, 2000), u ordeño en ambientes no familiares para los animales (Bruckmaier et al., 1993, 1996; Marnet y Negrão, 2000). En todos estos casos la OT no se libera en respuesta a la preestimulación o al ordeño, pero con la administración de dosis muy bajas de OT (0,2 UI, vía i.v.) es posible inducir el reflejo de eyección (Bruckmaier et al., 1993; Bruckmaier y Blum, 1998).
- Inhibición periférica: se produce liberación de OT endógena en respuesta a la estimulación del pezón y al ordeño, pero ésta no presenta efecto a nivel de glándula mamaria. Este tipo de inhibición puede ocurrir en respuesta a la estimulación de los receptores α -adrenérgicos debido a la administración de catecolaminas (Lefcourt y Akers, 1984; Blum et al., 1989; Bruckmaier et al., 1991; Bruckmaier et al., 1997b) o como resultado del bloqueo de los receptores de la OT (Bruckmaier et al., 1997b).

El sistema adrenérgico es un moderador importante de la eyección de leche. Peeters et al. (1973) demostraron la presencia de receptores α - y β -adrenérgicos en la musculatura lisa del pezón. Posteriormente, diversos autores detectaron 3 subtipos de receptores: α_1 (Roets y Peeters, 1985), α_2 (Roets y Peeters, 1986), y β_2 (Roets et al., 1989), en la musculatura lisa del pezón y, además, en los tejidos que rodean las cisternas glandulares, donde hay gran número de conductos galactóforos (Hammon et al., 1994). Por el contrario, no se encontraron receptores adrenérgicos en el tejido glandular.

La inhibición del reflejo de eyección se ha utilizado experimentalmente para perfeccionar la medida del fraccionamiento de la leche en la ubre (alveolar y cisternal), realizada anteriormente mediante la canulación del pezón (Mielke, 1969; Vehowsky et al., 1986; Dewhurst y Knight, 1993; Knight y Dewhurst, 1994; Knight, 1994; Rovai, 2001), permitiendo recuperar la leche cisternal sin producir estímulos desencadenantes del reflejo de eyección. Existen distintos métodos para conseguir de forma precisa esta inhibición:

- Ordeño de los animales en un medio no familiar (Bruckmaier et al., 1997b).
- Inyección de catecolaminas o estimuladores de los receptores α -adrenérgicos: adrenalina, fenilefrina (Bruckmaier et al., 1997b; Davis et al., 1998; Nudda et al., 2000; Inderwies et al., 2003).

- Utilización de Atosiban® (bloqueador de los receptores de la OT). Permite una inhibición momentánea de la eyección de leche (Melin, 1994) y se caracteriza por su baja afinidad hacia los receptores de la OT. Por tanto puede ser desplazado de los mismos con mucha facilidad. La vida media del Atosiban es de 18 minutos y permite obtener, con gran fiabilidad, las fracciones de leche cisternal y alveolar, por lo que se considera un método muy eficaz para aquellos animales que se estimulan con facilidad. Estos resultados han sido confirmados en vacas (Wellnitz et al., 1999; Ayadi et al., 2003b; Lollivier y Marnet, 2005), en ovejas lecheras (Rovai et al., 2002; McKusick et al., 2002a), y en cabras (Salama et al., 2004).

4. Fraccionamiento de la leche en la ubre

Como hemos mencionado anteriormente, la leche en la glándula mamaria se distribuye entre el compartimento alveolar y el cisternal. La leche cisternal se obtiene de forma pasiva al superar la barrera del esfínter del pezón, mientras que la leche alveolar sólo podrá recuperarse si se induce el reflejo de eyección y, por tanto, se requiere la participación activa del animal.

La eyección láctea durante el amamantamiento o el ordeño ocurre al producirse la unión de la OT a los receptores localizados en las células mioepiteliales mamarias (Linzell, 1955). Diferentes estudios realizados en ovino (Rovai, 2001; McKusick et al., 2002a, b; Castillo et al., 2004), caprino (Salama et al., 2004), vacuno (Welnitz et al., 1999; Ayadi et al., 2003a, b, 2004; Caja et al., 2004; Lollivier y Marnet, 2005), y en búfalos (Thomas et al., 2004) ponen de manifiesto que la separación de las fracciones de la leche puede realizarse de forma correcta y fiable, si se evita la unión de la OT endógena a sus receptores mediante la administración de antagonistas de los receptores de la OT.

La separación de las fracciones también puede realizarse mediante la cateterización del pezón (Peaker y Blatchford, 1988; Knight et al., 1994a, b; Knight y Dewhurst, 1994; Stelwagen et al., 1996; Davis et al., 1998; Rovai 2002) o la inyección de adrenalina (Davis et al., 1998; Nudda et al., 2000). Ambas técnicas permiten estimar las fracciones de leche de forma similar (Davis et al., 1998), pero estos dos métodos pueden hacer que se sobreestime el volumen de leche cisternal si, antes o durante la recuperación de la leche cisternal, se produce la eyección de leche. De hecho, Caja et al. (2000), en ovejas lecheras, obtuvieron valores inferiores de leche cisternal al bloquear los receptores de la OT que al drenar la leche a través de un catéter.

4.1. Distribución de la leche entre el compartimento cisternal y alveolar

La distribución de la leche entre el compartimento cisternal y alveolar (Figura 14) de la ubre varía en función de la especie, la raza, el estado de lactación, el número de parto y el intervalo entre ordeños aplicado.

Cuando se establece un intervalo entre ordeños de 12-14 horas, habitual en muchas explotaciones, los porcentajes de leche almacenados en la cisterna mamaria son inferiores al 35% en vacas lecheras (Pfeilsticker et al., 1996; Ayadi et al., 2003b; Caja et al., 2004). En cambio, en los ovinos y caprinos, el porcentaje de leche cisternal es mayor al presentado por el vacuno y varía de un 40 a un 80% (Marnet y McKusick, 2001; Rovai, 2001; Salama et al.,

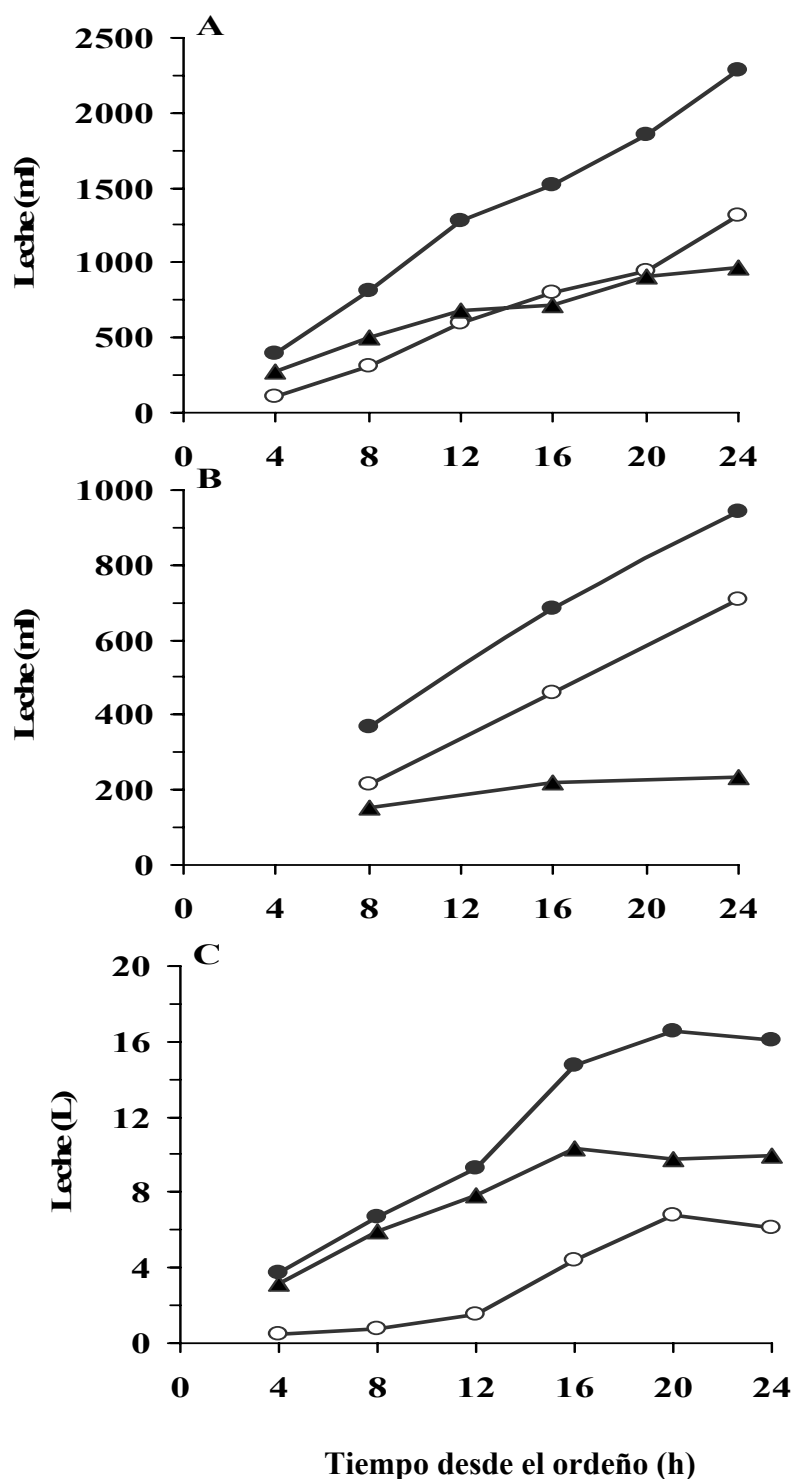
2004). En búfalos, el porcentaje de leche cisternal representa tan sólo el 5% de la leche total (Thomas et al., 2004). En los búfalos, por tanto, resulta sumamente importante que se produzca un reflejo de eyección completo para poder recuperar el 95% de la producción de leche y evitar las pérdidas de producción asociadas a la acumulación de leche en la ubre. Los mismos autores observaron que, como consecuencia del pequeño volumen de leche almacenado en cisterna, el reflejo de eyección debía desencadenarse antes del ordeño a fin de evitar que la cisterna quedara vacía de leche antes de que la OT tuviera efecto. Así pues, en búfalos parece igualmente fundamental la técnica de ordeño.

El volumen y el porcentaje de la leche cisternal disminuyen a medida que avanza la lactación en el ovino (Rovai, 2001) y en el caprino lechero (Salama et al., 2005). Igualmente, en el vacuno, el volumen de leche cisternal disminuye al avanzar la lactación. Sin embargo, el porcentaje cisternal aumenta (Dewhurst y Knight, 1993; Pfeilsticker, 1996; Caja et al., 2004). Stelwagen y Knight (1997) no observaron efecto del estado de lactación ni en el volumen ni en el porcentaje de leche cisternal en vacuno.

Al evaluar el efecto del número de lactación sobre el fraccionamiento de la leche en la ubre de ovino, Rovai (2001) observó que la raza de oveja afectó al resultado. Mientras en las ovejas de raza Lacaune el volumen de leche cisternal aumentó conforme lo hizo el número de lactación (185, 298 y 343 ml para 1, 2 o más de 3 lactaciones, respectivamente), en la raza Manchega no se observaron cambios significativos. En caprino (Salama et al., 2004) y en vacuno (Pfeilsticker, 1996) el volumen cisternal de las múltiparas fue superior al de las primíparas.

La distribución y acumulación de la leche cisternal y alveolar en diferentes intervalos entre ordeños ha sido muy poco estudiada en los pequeños rumiantes. En ovejas lecheras de raza East Friesian cruzada, McKusick et al. (2002a) observaron transferencia de leche desde el compartimento alveolar hacia el cisternal desde las primeras 4 horas tras el ordeño. Durante las primeras 12 horas tras el ordeño, el compartimento alveolar es el encargado de almacenar una mayor proporción de leche en su interior. Ahora bien, a partir de las 12h es el compartimento cisternal el que toma protagonismo, siendo superior su proporción de las 16 a las 24 horas de intervalo entre ordeños (Figura 14a). Los mismos autores observaron que tanto la fracción cisternal como la alveolar aumentaron su volumen de forma lineal desde las 4 hasta las 20 horas del último ordeño. A partir de las 20h, la producción de leche alveolar se saturó, en cambio, la leche cisternal continuó aumentando hasta las 24 horas entre ordeños (McKusick et al., 2002a).

Figura 14. Evolución de la leche total (●), cisternal (○) y alveolar (▲), a lo largo de diferentes intervalos entre ordeños en ovino (A), caprino (B) y vacuno (C) lechero. Adaptado de McKusick et al. (2002a), Ayadi et al. (2003b), y Salama et al. (2004).



En los caprinos lecheros, el modelo de acumulación de leche en los compartimentos de la glándula mamaria fue similar al de los ovinos. La cisterna mamaria empieza a llenarse de leche inmediatamente después del ordeño y lo hace de forma lineal hasta las 24 horas tras el

ordeño. La leche alveolar también aumentó su volumen de forma lineal, pero mostró saturación entre las 16 y las 24 horas de intervalo entre ordeños (Salama et al., 2004) (Figura 14b).

En vacuno lechero, muchos más autores han estudiado la distribución de la leche en los diferentes compartimentos de almacenamiento de la ubre, cuantificando los cambios que ocurren en función del tiempo transcurrido tras el último ordeño (Zaks, 1962; Knight et al., 1994a; Bruckmaier et al., 1994b; Stelwagen et al., 1996; Davis et al., 1998; Ayadi et al., 2003).

Knight et al. (1994a) describieron, en vacas lecheras, modelos matemáticos para explicar la transferencia de leche de los alvéolos a la cisterna en periodos entre ordeños hasta de 20 horas, y encontraron, a diferencia de los pequeños rumiantes, que el inicio del descenso de la leche a la fracción cisternal no se producía hasta las 4-6 horas del vaciado de la ubre. Estos resultados coinciden con los estudios realizados por Zaks (1962) en vacuno lechero, en los que no se presentó una afluencia de leche a las cisternas hasta transcurridas más de 4 horas desde el último ordeño.

En el mismo contexto, Knight y Dewhurst (1994) señalaron que la fracción de leche alveolar se producía progresivamente y de forma lineal en un intervalo entre ordeños de 12h. Sin embargo, su descenso a la cisterna se realizaba en dos etapas: 1) descenso de una pequeña fracción de leche (500 ml aproximadamente) tras el ordeño, 2) descenso de leche mucho más rápido 6 horas más tarde.

Estudios realizados por Ayadi et al. (2003b) también confirman las afirmaciones de Knight et al. (1994a) y Knight y Dewhurst (1994), ya que encontraron que la leche de la fracción alveolar aumentó progresivamente hasta las 16 horas después del ordeño, momento en el que se saturó el compartimento. Mientras que la leche de la fracción cisternal aumentó poco entre las 4 y las 12 horas posteriores al ordeño, y lo hizo de forma más rápida entre las 12 y las 16 h de acumulación de leche en la ubre, alcanzando la saturación a las 20 horas (Figura 14c).

Contrariamente, Stelwagen et al. (1996) señalaron que el llenado del compartimento cisternal se iniciaba inmediatamente después del ordeño, sin necesidad de que el compartimento alveolar estuviera lleno.

En conclusión, podemos decir que la oveja, la cabra y la vaca presentan un mecanismo de drenaje de la leche alveolar hacia la cisterna muy similar, pero con diferencias en cuanto

a los tiempos de llenado y a la saturación de los distintos compartimentos.

En el ovino lechero, el volumen de leche cisternal y alveolar varían en diferente grado a medida que lo hace el intervalo entre ordeños. Por tanto, el porcentaje que representan ambas fracciones respecto al total de leche producida también varía según el intervalo entre ordeños aplicado. En ovino lechero de raza East Friesian cruzada, la fracción de leche cisternal representa entre el 32 y el 57% de la producción total de leche para los intervalos entre ordeños de 4 y 24 horas, respectivamente (McKusick et al., 2002a). Así pues, el porcentaje de leche cisternal incrementa a medida que lo hace el intervalo entre ordeños, poniendo de manifiesto el papel fundamental de la cisterna mamaria de las ovejas en el almacenamiento y acumulación de la leche en la ubre.

El papel relevante de la cisterna mamaria no se limita exclusivamente al ovino. En el caprino (Peaker y Blatchford, 1988; Salama et al., 2004) y en el vacuno (Davis et al., 1998; Ayadi et al., 2003b; Ayadi et al., 2004) se produce la misma situación. Sin embargo, la importancia de la cisterna mamaria sobre el total de la ubre en los pequeños rumiantes, es superior al mostrado por el vacuno lechero (Tabla 2).

Por tanto, podemos concluir que el conocimiento del patrón de llenado de la ubre y de la distribución de la leche en su interior puede ser muy útil para determinar los intervalos de ordeño más apropiados para estas tres especies ganaderas.

4.2. Composición y recuento de células somáticas de las fracciones de leche

En la bibliografía existen pocos trabajos que hablen sobre la composición de las fracciones de leche en los rumiantes lecheros. Ahora bien, se sabe que existen claras diferencias en cuanto a la composición química entre la fracción alveolar y cisternal. En el ovino, la leche cisternal se caracteriza por tener un contenido pobre en grasa, mientras que en la leche alveolar el componente graso es sumamente importante (Labussière, 1969; Rovai, 2001; McKusick et al., 2002a, McKusick et al., 2002b). Igual pasa en el caprino (Salama et al., 2005) y en el vacuno (Davis et al., 1998; Ayadi et al., 2004).

Se sabe que el compartimento alveolar de las ovejas lecheras puede llegar a almacenar más del 70% del total de grasa producida (McKusick et al., 2002a), en bovino lechero puede ser de más del 89% (Ayadi et al., 2004). Estas diferencias son debidas a la dificultad que tienen los glóbulos grasos para drenar del compartimento alveolar al cisternal, ya que requieren una expulsión activa por parte del alvéolo, mediante contracción de las células mioepiteliales.

Tabla 2. Variación del porcentaje de leche cisternal al aplicarse diferentes intervalos entre ordeños en ovejas, cabras y vacas.

Raza	Intervalo entre ordeños (h)									Ref. ¹	
	1	4	5	8	12	16	20	24	40		
Oveja	Ripollesa	24									1
	Sarda								82	2	
	East Friesian cruzada	32		38	47	52	51	57	3		
	Manchega				42					4	
	Lacaune				59					4	
Promedio	28		46	47	52	51	70				
Cabra	Saanen	55					85			5	
	Saanen			58					6		
	Murciano-Granadina			51	68	75			7		
Promedio	55	58	51	77	75						
Vaca	Friesian-Holstein				29					8	
	Friesian-Holstein				31					9	
	Frisona	4			34	38				10	
	Frisona	30				34	35		10		
	Frisona						46	54		11	
	Holstein	15		17	20	32	42	40		12	
Promedio	17	15	29	31	32	42	43	54			

¹Referencias: (1) Caja et al. (1999), (2) Nudda et al. (2000), (3) McKusick et al. (2002a), (4) Rovai et al. (2002), (5) Peaker y Blatchford (1988), (6) Knight et al. (1994b), (7) Salama et al. (2004), (8) Dewhurst y Knight (1993), (9) Knight y Dewhurst (1994), (10) Knight et al. (1994a), (11) Davis et al. (1998), (12) Ayadi et al. (2003b)

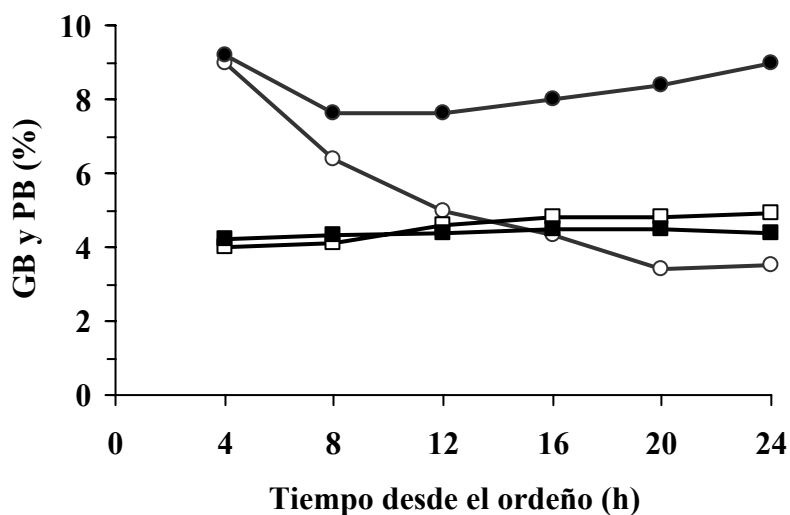
En los rumiantes, la proteína y la lactosa son componentes mucho más estables que la grasa y, generalmente, no suelen haber diferencias de contenido de estos componentes entre la fracción cisternal y la alveolar (Davis et al., 1998; Rovai, 2001; McKusick et al., 2002a; Ayadi et al., 2004; Salama et al., 2005). La proteína de la leche se encuentra en forma de pequeñas micelas de caseína (Cowie y Tindal, 1971), las cuales drenan libremente hacia el compartimento cisternal. Por tanto, su obtención en el ordeño es más independiente del reflejo de eyección que la grasa.

El intervalo entre ordeños puede también puede afectar a la composición de las fracciones (Figura 15). Según McKusick et al. (2002a), a las 4 horas tras el ordeño, la

fracción cisternal es muy rica en grasa (9%) debido a que inmediatamente después del ordeño se produce el drenaje de la leche retenida en los alvéolos mamarios durante el ordeño (leche residual), la cual es especialmente rica en grasa. El porcentaje de grasa en la leche cisternal disminuye a medida que aumenta el intervalo entre ordeños, mientras que en la leche alveolar este porcentaje tiende a incrementarse desde las 8 hasta las 24 horas de intervalo entre ordeños.

En vacas, Davis et al. (1998) compararon la composición de ambas fracciones de leche, para intervalos entre ordeños de 24 y 40 horas. Observaron que el porcentaje de grasa de la fracción alveolar aumentó de 24 a 40 horas de acumulación de leche en la ubre. Sin embargo, la grasa de la fracción cisternal no varió. Ayadi et al. (2004) observaron, igualmente, que el porcentaje de grasa en la leche alveolar se incrementaba al aplicar intervalos entre ordeños más amplios, pero encontraron que el porcentaje de grasa disminuyó en la leche cisternal al incrementarse el intervalo entre ordeños y acumular más leche a nivel cisternal.

Figura 15. Efecto del intervalo entre ordeños sobre el contenido en grasa (●, ○) y proteína (□, ■) de la fracción de leche cisternal (en blanco) y alveolar (en negro) en ovejas East Friesian cruzadas (adaptado de McKusick et al., 2002a).



Según McKusick et al. (2002a), en ovino lechero no hay diferencia entre el porcentaje de proteína en la fracción cisternal y la alveolar durante las primeras 20 horas post-ordeño, y sólo a partir de las 24 horas la leche cisternal se observa un porcentaje superior de proteína total. En vacas lecheras, el contenido en proteína aumenta en la fracción de leche cisternal y tiende a hacerlo en la leche alveolar a medida que aumenta el intervalo entre ordeños (Ayadi

et al., 2004).

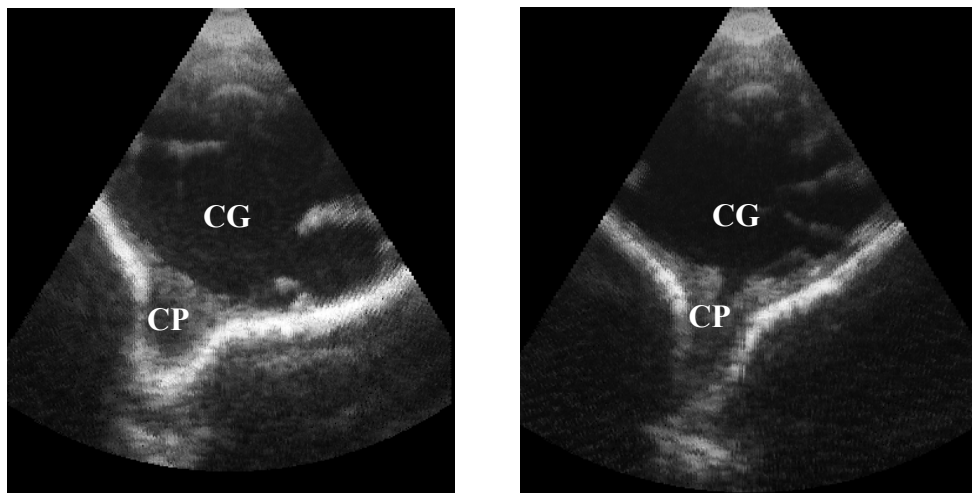
En cuanto al recuento de células somáticas (RCS) de la leche, no se observaron diferencias entre la fracción de leche cisternal y la alveolar durante las primeras 12 horas post-ordeño. Sin embargo, de las 16 a las 24 horas, el RCS fue significativamente superior a nivel alveolar (McKusick et al., 2002a).

4.3. Compartimento cisternal y su valoración mediante ecografía

La técnica ecográfica permite obtener, de forma no invasiva y fácil, imágenes “in vivo” de las estructuras que forman parte de la glándula mamaria. La ecografía posibilita distinguir claramente las estructuras que contienen líquido de aquellas que contienen sólidos. Esta característica hace que sea un método interesante para estudiar el compartimento cisternal de los animales que se encuentran en lactación.

En las ecografías mamarias (Figura 16), tanto la cisterna glandular como la del pezón, se muestran anecogénicas (áreas en negro) cuando están repletas de leche. Por el contrario, el parénquima glandular es ecogénico o hipoecogénico (áreas en blanco o gris) cuando los ductos mamarios están llenos de leche (Ruberte et al., 1994a). Conviene señalar que la leche no se presenta del todo anecoica, ya que los glóbulos grasos y las micelas de caseína que contiene, le confieren cierta ecogenicidad (Ruberte et al., 1994a; Caja et al., 1999).

Figura 16. Ecografía mamaria en ovejas lecheras de raza Lacaune (izquierda) y Manchega (derecha), CG: Cisterna glandular, CP: Cisterna del pezón.



La ecografía ha sido utilizada en ovejas (Bruckmaier y Blum, 1992; Bruckmaier et al., 1997a; Caja et al., 1999; Nudda et al., 2000; Rovai 2001), cabras (Bruckmaier y Blum, 1992; Salama et al., 2004; Wójtowski et al., 2006), vacas (Bruckmaier y Blum, 1992; Ayadi

et al., 2003a, b; Caja et al., 2004) y búfalos (Thomas et al., 2004) para observar la estructura interna de la cisterna glandular mamaria y medir su tamaño (perímetro y superficie) eficientemente (Tabla 3).

El tamaño cisternal determina tanto la aptitud al ordeño de los animales en lactación (Labussière, 1988) como el intervalo entre ordeños (Knight y Dewhurst, 1994; Ayadi et al., 2003b; Salama et al., 2003) al que pueden adaptarse los animales. Los animales que presentan grandes cisternas son ordeñados de forma más rápida, con rutinas de ordeño simples y además, toleran mejor los largos intervalos entre ordeños.

Según Knight y Dewhurst (1994) y Stelwagen et al. (1996) la capacidad que tiene la cisterna mamaria para acumular y almacenar leche durante 24 horas determina la capacidad de los animales para tolerar menores frecuencias de ordeño con menos pérdidas productivas. Por tanto, la anatomía mamaria, en relación con las características de almacenamiento de la leche, puede ser un factor muy importante para determinar la reducción de producción asociada a la aplicación de un ordeño al día. Según Labussière (1988), las razas de ovejas particularmente tolerantes a un ordeño (Ej. Lacaune y Sarda) se caracterizan por tener grandes cisternas. Negro et al. (2001) concluyeron que el factor limitante para la producción de leche cuando se aplican diferentes intervalos entre ordeños, es la capacidad de la cisterna mamaria. En vacuno, Knight y Dewhurst (1994) y Ayadi et al. (2003a), también demostraron que las vacas que podían almacenar mayores proporciones de leche en la cisterna mamaria toleraban mejor un ordeño diario que aquellas que almacenaban grandes proporciones de leche a nivel del compartimento alveolar. En caprino, Salama et al. (2003) afirmaron que la capacidad de la cisterna mamaria es crítica, especialmente al inicio de la lactación, cuando los niveles de producción son más elevados.

También cabe pensar en el papel que juega el tamaño de la cisterna mamaria en el control de la secreción láctea, ya que cuando la cisterna llega a su capacidad de almacenamiento máxima, la presión y la concentración del FIL en el compartimento alveolar aumentan.

El área cisternal, estimada mediante ecografía, proporciona una medida válida del tamaño real de la cisterna mamaria en los pequeños rumiantes. Prueba de ello son los diversos estudios, realizados en ovino, caprino y vacuno, en los que se han encontrado correlaciones altas y positivas entre el área de la cisterna mamaria y el volumen de leche almacenado en la misma (Caja et al., 1999; Nudda et al., 2000; Rovai, 2001, Ayadi et al., 2003, Caja et al., 2004; Salama et al., 2004) (Tabla 3).

Tabla 3. Área cisternal, producción cisternal y correlación de ambas en los rumiantes lecheros.

Especie/Raza	Estado Lact.	Interv. ordeño (h)	Frec. sonda (MHz)	Área Cistern. (cm ²)	Prod. Cistern. (ml)	R	Ref. ¹
OVEJA							
East Friesian	Mitad	7-8	5	18,8			1
East Friesian	Mitad	10-14		40			2
Lacaune	Mitad	10-14		33			2
Ripollesa	Inicio	4	5	5,6	33	0,90	3
Sarda	Final	24	3,5	19	124	0,82	4
Manchega	Toda	8	5	14	149	0,76	5
Lacaune	Toda	8	5	24	275	0,76	5
CABRA							
Saanen	Mitad	7-8	5	16,5			1
Murciano- Granadina	Inicio	8	5	11	215	0,72	6
	Inicio	16	5	22	461	0,57	6
	Inicio	24	5	27	707	NS	6
VACA							
SMxHR, SBxBS, y SMxSB	Mitad	10	5	21	260		7
SMxHR	Mitad	7-8	5	25,6			1
Holstein	Final	4	5	3,1	50	0,44	8
	Final	8	5			0,88	8
	Final	12	5			0,84	8
	Final	16	5			0,63	8
	Final	20	5			0,51	8
	Final	24	5	54	4170	0,46	8
Holstein	Inicio	8	5	12,1	1220	0,82	9
	Mitad	8	5	8,0	620	0,74	9
	Final	8	5	4,2	490	0,80	9
BÚFALA							
Murrah	Inicio	12-14	6	18,3	320		10
	Mitad	12-14	6	14,1	180		10
	Final	12-14	6	7,2	50		10

NS: no significativa.

SM: Simmental, HR: Holstein Roja, SB: Swiss Braunvieh, BS: Brown Swiss

¹ Referencias: (1) Bruckmaier y Blum (1992), (2) Bruckmaier et al., 1997a, (3) Caja et al., 1999, (4) Nudda et al. (2000), (5) Rovai (2001), (6) Salama et al. (2004), (7) Bruckmaier et al. (1994a), (8) Ayadi et al. (2003), (9) Caja et al. (2004), (10) Thomas et al. (2004)

En ovino lechero, Rovai (2001) observó que las diferencias productivas entre las razas Manchega y Lacaune también se manifestaban al analizar el tamaño cisternal (Manchega: 13,96 cm²; y Lacaune: 23,59 cm²). Por el contrario, Bruckmaier et al. (1997a), no observó efecto de la raza al comparar el área cisternal de las razas Lacaune con la de las East Friesian, ya que los animales de ambas razas presentaron producciones de leche similares. Sin embargo, en este mismo estudio, se apreciaron diferencias interraciales en la disposición anatómica de la cisterna mamaria en relación al pezón. En los animales de raza East Friesian, el pezón se localizó por encima de la cisterna mamaria dificultándose, por tanto, la salida de la leche. Este hecho justificó la mejor aptitud al ordeño mecánico de la raza Lacaune.

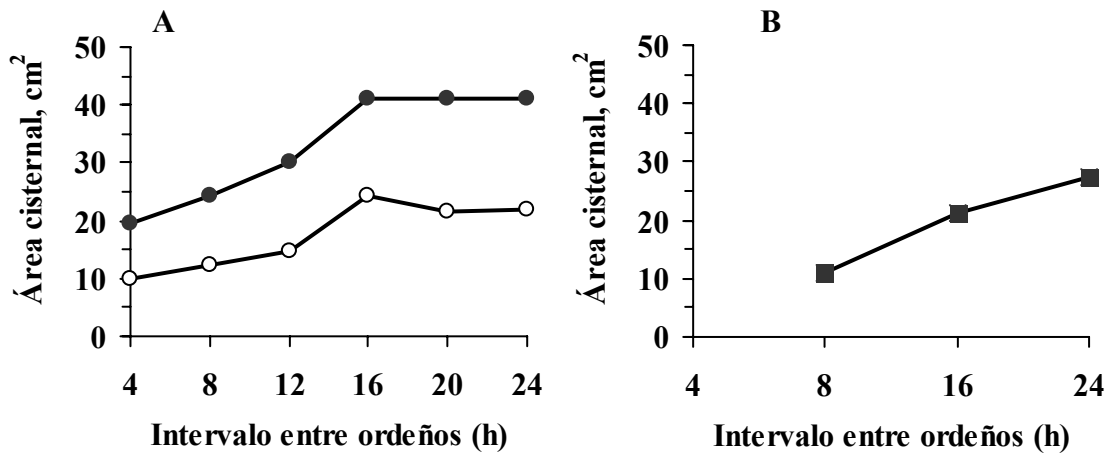
En caprino lechero, Salama et al. (2004) apreciaron que la producción de leche total y alveolar también se correlacionan positiva y significativamente ($r = 0,77$ y $0,69$, respectivamente) con el área cisternal a las 8h post-ordeño. El estudio del volumen cisternal puede considerarse como un objetivo de selección para la mejora de la producción de leche y de la aptitud al ordeño mecánico (Ruberte et al., 1994a; Nudda et al., 2000).

El área cisternal se ha estudiado poco en los rumiantes lecheros pese a la gran importancia y a la posible utilidad práctica para la selección de animales con buena capacidad productiva y buena aptitud al ordeño mecánico.

Como citábamos anteriormente, el tamaño de la cisterna mamaria debe ser considerado a la hora de elegir la frecuencia de ordeño o el intervalo entre ordeños a aplicar. En ovino lechero aún no se ha estudiado cuál es el efecto del intervalo entre ordeños sobre el área cisternal. En vacuno lechero, Ayadi et al. (2003b) observaron que al aplicar diferentes intervalos entre ordeños (4, 8, 12, 16, 20 y 24h), el área cisternal de los cuarterones delanteros y traseros incrementó su tamaño de forma curvilínea, llegando a su máximo a las 16h (23,0 y 40,5 cm² para los cuarterones delanteros y traseros, respectivamente). En caprino lechero, según Salama et al. (2004), el área cisternal aumentó linealmente al incrementarse el intervalo entre ordeños (Figura 17).

Parece ser que el tamaño de la cisterna mamaria va incrementándose a medida que aumenta el intervalo entre ordeños, para poder almacenar en su interior la leche sintetizada de forma más eficiente. Ahora bien, mientras en cabras dicho crecimiento se presenta de forma lineal, en vacuno lechero es curvilíneo, indicando una posible saturación de la cisterna mamaria a partir de las 16 horas en dicha especie. Este hecho destaca la gran importancia de la cisterna mamaria en caprino lechero en relación al vacuno lechero.

Figura 17. Área cisternal a diferentes intervalos de ordeño en vacuno lechero (A; cuartos delanteros: ●, cuartos traseros: ○) y en cabras Murciano-Granadinas (B; ■). Adaptado de Ayadi et al. (2003b) y Salama et al. (2004), respectivamente.



4.4. Compartimento alveolar: consecuencias de la acumulación de leche

En el ovino y el caprino lechero, la cantidad de leche acumulada en el compartimento alveolar aumenta de forma lineal a medida que pasan las horas tras el ordeño, hasta producirse la saturación del compartimento a partir de las 20 horas en ovino (McKusick et al., 2002a) y de las 16 horas en caprino (Salama et al., 2004) y vacuno (Ayadi et al., 2003b).

Diversos autores afirman que la acumulación de leche en la ubre juega un papel determinante en la regulación local de la producción de leche (Davis et al., 1999; Stelwagen, 2001). La regulación de la secreción láctea al aplicar intervalos entre ordeños extensos es realizada por múltiples factores que pueden operar de forma simultánea a diferentes niveles de la glándula mamaria:

- Elevación de la presión intramamaria (Fleet y Peaker, 1978; Peaker, 1980)
- Disminución del flujo sanguíneo mamario (Stelwagen et al., 1994b; Delamaire et al., 2006; Farr et al., 2000)
- Acumulación del FIL a nivel alveolar (Wilde et al., 1995; Wilde y Knight, 1990)
- Pérdida de integridad de las TJ (Stelwagen et al., 1994a)

Por tanto, la acumulación de leche en la ubre puede afectar al funcionamiento de las células epiteliales mamarias vía el control físico ejercido por la presión intramamaria y/o vía el control químico, ejercido por el FIL. En cuanto al control ejercido por las TJ, una de las hipótesis que aparece en la literatura es que el aumento de la presión intramamaria y/o de la

concentración de FIL en los alvéolos mamarios, puede afectar la organización estructural de las TJ e inducir un retrocontrol negativo sobre el funcionamiento de las células epiteliales mamarias (Fleet y Peaker, 1978; Wilde et al., 1995)

4.4.1. Presión intramamaria

Estudios realizados en caprino lechero ponen de manifiesto que la distensión de la glándula mamaria como consecuencia de la acumulación de leche en ésta, produce el incremento marcado de la PIM (Fleet y Peaker, 1978).

Los mismos autores observaron que el incremento de la PIM causaba la caída significativa de la secreción de leche, debido a su efecto sobre la reducción del flujo sanguíneo, sobre el deterioro del epitelio mamario y/o a la alteración del citoesqueleto de la célula epitelial mamaria como consecuencia de la fuerte presión ejercida sobre ella. Sin embargo, estudios realizados posteriormente (Peaker, 1980; Henderson y Peaker, 1984, 1987; Davis y Huhson, 1989) concluyeron que el efecto negativo de la acumulación de leche sobre la secreción láctea no se debía tanto a una elevación progresiva de la PIM, como al aumento de la concentración del FIL a nivel alveolar (explicado previamente en el apartado 2.7.2).

La distensión alveolar también puede favorecer la apoptosis celular al acumularse grandes volúmenes de leche en la ubre (Wilde et al., 1997). Sin embargo, la pérdida de células mamarias como consecuencia de la aplicación de intervalos entre ordeños extensos se da a largo plazo. Prueba de ello son los trabajos en los que al retomar la frecuencia de 2 ordeños diarios (**2X**), tras haber aplicado frecuencias de 1 sólo ordeño al día (**1X**) durante poco tiempo, se observó la recuperación de la producción láctea (Davis et al., 1999; Ayadi et al., 2003a). De igual modo, Stelwagen y Knight (1997) observaron en vacuno que al aplicar 1X durante tres semanas, el volumen de leche obtenido no disminuyó. Sugiriendo el mantenimiento de las células epiteliales mamarias. Ahora bien, cuando 1X fue realizado durante largos períodos de tiempo, la recuperación total del volumen de leche al retomar la frecuencia de ordeño de 2X no fue posible, lo cual hizo pensar en la disminución del número de células mamarias vía apoptosis celular (Davis et al., 1999).

4.4.2. Flujo sanguíneo mamario

La glándula mamaria requiere un aporte de nutrientes y una estimulación hormonal para el mantenimiento de la síntesis láctea. Este aporte de nutrientes y hormonas llega a través de la sangre, y por tanto, el flujo sanguíneo mamario (Mammary Blood Flow, **MBF**) está

claramente relacionado con el flujo de sustratos que llegan a la ubre, y con la producción de leche.

En caprino, el ordeño frecuente (5 ordeños durante 12 horas) produce el incremento del MBF (+44%) y, paralelamente, de la producción de leche (+24%) (Prosser y Davis, 1992). Por el contrario, la producción de leche y el MBF decrecen cuando se acumula la leche en la ubre durante más de 20 horas en cabras (Stelwagen et al., 1994b; Farr et al., 2000), y de 16 horas en vacas (Delamaire y Guinard-Flament, 2006).

Además, Delamaire y Guinard-Flament (2006) han observado recientemente en vacuno lechero que al aplicar intervalos entre ordeños de 8 a 24 horas, tanto la producción de leche (de 18,4 a 14,7 Kg/d, respectivamente) como el MBF (de 1,23 a 0,89 L/min) decrecieron linealmente, y que la ratio MBF:producción de leche permaneció invariable al intervalo entre ordeños aplicado (la cantidad de sangre requerida para la síntesis de 1 kg de leche fue de $543 \pm 54,8$ L).

Lacasse y Prosser (2003) observaron que el incremento del MBF no tuvo ninguna repercusión sobre la producción de leche en cabras. Así pues, parece ser más probable que sea el metabolismo mamario el que controla el MBF que viceversa. En otras palabras, una óptima producción de leche necesita un mínimo aporte sanguíneo pero, el aumento de este aporte sanguíneo por encima del mínimo no tiene porqué repercutir sobre la producción láctea. En cambio, la disminución de la frecuencia de ordeño sí que es probable que haga disminuir el MBF.

4.4.3. Acumulación del factor inhibitorio de lactación

La acumulación de leche en la ubre produce el aumento de la concentración de FIL a nivel alveolar, donde actúa sobre las células secretoras alveolares disminuyendo la síntesis de caseína y lactosa, y por tanto, afectando a la secreción láctea

En la rutina de ordeño habitual no se consigue extraer la totalidad de la leche que hay en la ubre. En las especies lecheras, alrededor de un 10% adicional (leche residual) puede ser recuperado tras la inyección de OT exógena. Por tanto, tras el ordeño, el FIL se encuentra aún en glándula mamaria. Sin embargo, cabe recordar que después de ordeñar se producen movimientos de leche del tejido alveolar a la cisterna en intervalos cortos de tiempo, en ovejas (McKusick et al., 2002a), en cabras (Peaker y Blatchford, 1988) y en vacas (Stelwagen et al., 1996; Knight y Dewhurst, 1994). Este hecho favorece que el FIL drene junto con la leche y, por tanto, no actúe sobre las células alveolares.

El hecho de que el FIL sólo esté activo cuando se encuentra en contacto con las células secretoras significa que será tanto más efectivo cuanto más pequeña sea la ratio entre cisterna y tejido secretor. Esta ratio es muy variable entre individuos, y por tanto, cabe esperar que aquellas ovejas, cabras o vacas que tengan grandes cisternas produzcan más leche por gramos de tejido secretor que las que tengan cisternas pequeñas, además de tolerar mejor largos intervalos entre ordeños. Todas estas predicciones han sido comprobadas posteriormente en vacas y cabras (Peaker y Blatchford, 1988; Dewhurst y Knight, 1994; Knight y Dewhurst, 1994; Ayadi et al., 2003; Salama et al., 2004).

También se ha comprobado que el aumento de la frecuencia de ordeños ejerce, a largo plazo, un efecto positivo sobre la producción de leche, como consecuencia del incremento en el número de células epiteliales alveolares (Henderson et al., 1985; Knight y Wilde, 1993). En este sentido, es importante señalar que el FIL también puede limitar el desarrollo, y por tanto, el tamaño de la población de células secretoras, disminuyendo la sensibilidad de las células epiteliales a las hormonas galactopoyéticas, como la PRL, por una reducción del número de receptores de la misma (Bennet et al., 1990). Así pues, el control autocrino y el endocrino pueden interactuar en la regulación de la producción de leche.

Los efectos de la inmunización frente al FIL a lo largo de la fase descendente de la lactación fueron estudiados en caprino por Wilde et al. (1996). Dichos autores observaron que los animales inmunizados frente a FIL disminuyeron la secreción láctea en menor medida que los no inmunizados. En el mismo trabajo se observó que al disminuir en media ubre la frecuencia de ordeño (de 2 a 1 ordeño diario), el ritmo de secreción láctea disminuyó menos en los animales inmunizados que en los no inmunizados o control. Por tanto, parece ser que el efecto negativo de los largos intervalos entre ordeños sobre la secreción láctea podría evitarse inmunizando a los animales frente al FIL.

4.4.4. Apertura de las uniones estancas

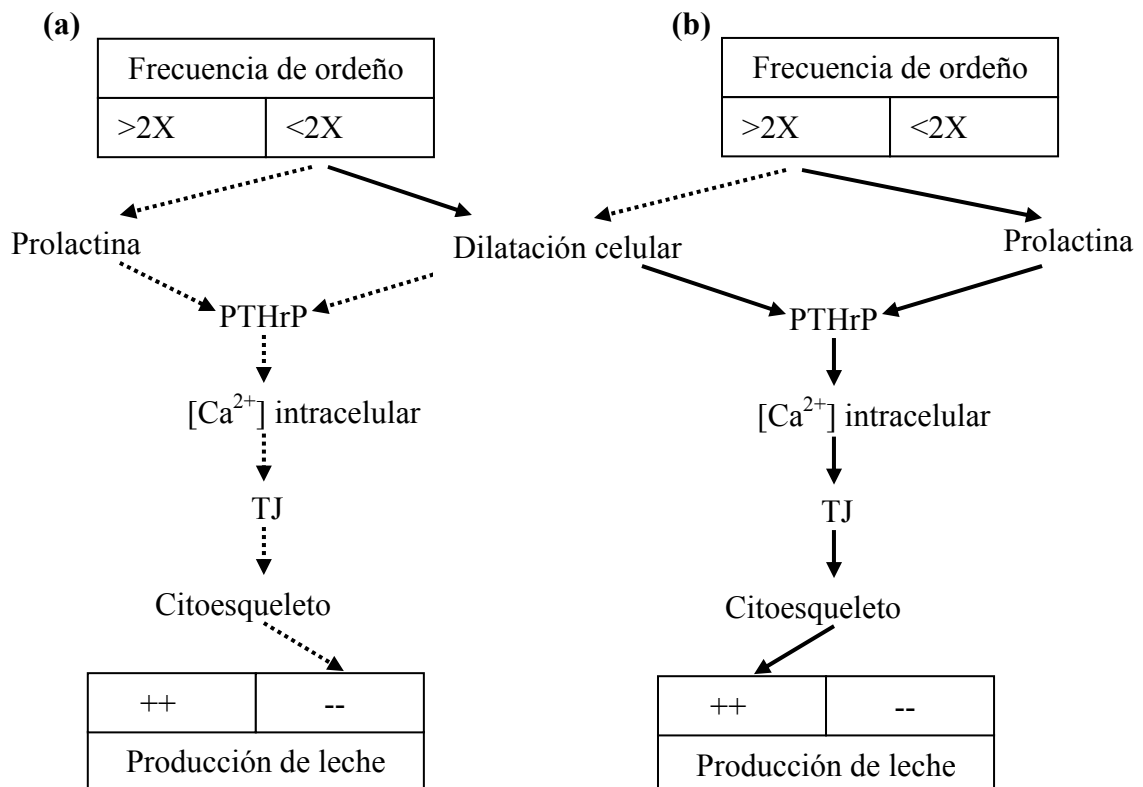
El aumento de la permeabilidad de las TJ es una de las respuestas agudas de la glándula mamaria a la estasis láctea. Estudios realizados en rumiantes lecheros (Stelwagen et al., 1994b) ponen de manifiesto que la integridad de las TJ empieza a deteriorarse a partir de 18 horas de acumulación de leche en vacuno (Stelwagen et al., 1997) y a partir de 21 h de acumulación de leche en la ubre de cabras, momento que coincide con el inicio de la saturación del compartimento alveolar tanto en el vacuno como en el caprino (Ayadi et al., 2003b; Salama et al., 2004), y con la disminución de la secreción de leche en el caprino (Stelwagen et al., 1994b). Por tanto, las pérdidas de producción de leche observadas en

ovino (Morag, 1968), caprino (Wilde y Knight, 1990) y vacuno (Holmes et al., 1992; Davis et al., 1999; Rémond y Pomiès, 2005) cuando se aplican intervalos entre ordeños extensos o 1X, podrían deberse a la desestabilización de las TJ. En ovino lechero no se disponen de estudios que determinen la apertura de las TJ al aplicar intervalos entre ordeños extensos.

El debilitamiento de las TJ y la pérdida de lactosa de la leche a través de ellas, no parece explicar todas las pérdidas productivas que se dan al aplicar 1X. Al abrirse las TJ, el paso de lactosa a través de la vía paracelular, se estimó (a partir del aclaramiento, “clearance”) en un 3%, mientras que la pérdida de producción para las mismas vacas fue del 15% (Stelwagen et al., 1997). Estos resultados sugieren que la mayor parte de la pérdida de leche observada se produjo como consecuencia de la disminución de la secreción láctea debida a los otros mecanismos de regulación de la producción de leche.

Stelwagen (2001) propuso un modelo de regulación de la producción de leche como consecuencia de la obertura de las TJ (Figura 18).

Figura 18. Proposición de un modelo para explicar el rol de las uniones estancas (TJ) como mediadoras de los efectos de 1X (a) o de una mayor frecuencia de ordeño (b) sobre la producción de leche durante las primeras 24 horas (respuesta aguda). Las flechas discontinuas indican una disminución y las flechas continuas indican un aumento (Stelwagen, 2001).



Al pasar de 2X a 1X se produce la disminución de la secreción de PRL y la deformación de las células epiteliales. En los rumiantes, la PRL afecta a la expresión de la ocludina, proteína importante en las TJ (Stelwagen et al., 1999b). Según Stelwagen et al. (1997), los cambios en la forma de las células epiteliales mamarias (dilatación celular) podrían inducirse por mecanotransducción, que es el mecanismo a través del cual un estímulo físico, como la presión, induce señales intracelulares que pueden producir la regulación de ciertos genes. Tanto la PRL como la dilatación de la célula o la mecanotransducción regulan la secreción del PTHrP. Por tanto, una disminución de la PRL o la dilatación de las células alveolares hacen disminuir el PTHrP, encargado de bloquear los canales del calcio, y así impedir que los stocks intracelulares de calcio se vuelvan a llenar. Estos dos mecanismos del metabolismo cálcico son importantes para el mantenimiento de las TJ, por tanto, su bloqueo perturbaría el complejo proteico que compone las TJ y produciría su apertura.

Finalmente, como las TJ están íntimamente relacionadas con el citoesqueleto de la célula, cualquier alteración que las afecte inducirá cambios en el citoesqueleto, que a su vez interferirán sobre la secreción láctea.

Según Stelwagen et al. (1994a, b), la impermeabilidad entre los compartimentos extracelular (leche) e intracelular (sangre) parece restaurarse a los pocos días de 1X, por tanto, la glándula mamaria es capaz de adaptarse a nuevas frecuencias de ordeño. En vacuno lechero, Stelwagen et al. (1994a) observaron que al pasar de 2X a 1X, el fuerte aumento experimentado por la lactosa plasmática durante el primer día de 1X, fue disminuyendo después del primer ordeño, hasta llegar a los niveles basales durante el segundo día de aplicación de 1X. Estos resultados fueron confirmados posteriormente (Stelwagen et al., 1997).

Las TJ también pueden abrirse mediante la utilización de queladores del calcio como el EGTA (Stelwagen et al., 1995) y el citrato (Neville y Peaker, 1981). En cabras lechera al inducir la obertura de las TJ mediante EGTA, se observó una disminución del grado de secreción láctea.

El aumento de la permeabilidad de las TJ produce la modificación tanto de la composición de la leche, como del plasma sanguíneo.

En el plasma sanguíneo se observa un incremento rápido del contenido en lactosa (Stelwagen et al., 1994a, b, 1997), y un aumento de la concentración de α -lactoalbúmina (Stelwagen y Lacy-Hulbert, 1996).

En la leche se produce un aumento de la concentración de Na y Cl y una disminución de la concentración de K (Stelwagen et al, 1994b; Lacy-Hulbert et al., 1999). Cabe destacar que se sabe que el aumento de la ratio Na:K produce la reducción de la secreción láctea (Stelwagen et al., 1999a), y un aumento de la concentración de proteínas derivadas del suero sanguíneo (Ej. Albúmina sérica; Stelwagen et al, 1994a, b; Stelwagen y Lacy-Hulbert, 1996) y del RCS (Stelwagen y Lacy-Hulbert, 1996).

Entre las proteínas sanguíneas que llegan a leche, Stelwagen et al. (1994c) encontraron que el plasminógeno (precursor de la plasmina) y la plasmina se incrementaban al aplicar 1X en vacas. Puesto que el plasminógeno y la plasmina no son sintetizadas por la glándula mamaria, su origen es sanguíneo. Y su presencia en leche sólo puede ser explicada por la apertura de las TJ y su paso a través de la vía paracelular, o a través de células alveolares dañadas durante un proceso de mamitis (Saeman et al., 1988)

Como consecuencia de lo anterior, hay que considerar que la aplicación de intervalos entre ordeños amplios produce cambios en la permeabilidad del epitelio alveolar, y por tanto, cambios en la composición láctea (aumento de las proteínas séricas y de los iones), e incremento en el flujo de lactosa y de K^+ hacia el torrente sanguíneo.

Los cambios en la permeabilidad de las TJ no sólo se producen por acumulación de la leche en la ubre durante extensos intervalos entre ordeños. Las mamitis, la involución de la ubre antes del parto, la acción de ciertas hormonas (OT, PRL, progesterona), o el uso de glucocorticoides también pueden alterar la permeabilidad de las TJ (Nguyen y Neville, 1998).

5. Efecto de la frecuencia y del intervalo entre ordeños sobre la producción y la calidad de la leche

La determinación de una adecuada frecuencia de ordeño, y del consecuente intervalo entre ordeños, tiene especial importancia en la optimización de la producción de leche en los rumiantes lecheros. Ahora bien, hay que tener en cuenta que la variación de la frecuencia de ordeño puede modificar tanto la producción como la composición de la leche.

5.1. El aumento de la frecuencia de ordeño

5.1.1. Efecto sobre la producción de leche

El incremento de la frecuencia de vaciado de la ubre aumenta la producción de leche en el ovino, el caprino y el vacuno (Stelwagen, 2001). La frecuencia de vaciado de la ubre y la producción de leche están correlacionadas positivamente entre sí. Por tanto, frecuencias de 3 o más ordeños diarios estimulan más la producción de leche que las frecuencias de 2 ordeños al día (Erdman y Varner, 1995), aplicadas tradicionalmente.

Estudios realizados en vacuno, ponen de manifiesto que incrementar la frecuencia de ordeño o de amamantamiento al inicio de la lactación tiene un efecto positivo sobre la producción, el cual puede prolongarse durante toda la lactación (Bar-Peled et al., 1995; Hale et al., 2003, Dahl et al., 2004). Sin embargo, tanto el estado de la lactación en el que se aplica un ritmo más acelerado de ordeños, como el intervalo de tiempo durante el que se realiza, pueden determinar distintos efectos del incremento de la frecuencia de ordeños o la ausencia de éstos sobre la producción de leche (Van Baale et al., 2005).

El aumento de la frecuencia de ordeños también afecta al número de células mamarias secretoras de leche. Al incrementarse la frecuencia de ordeños en caprino (Wilde et al., 1987b; Boutinaud et al., 2003) y en vacuno (Hillerton et al., 1990), se obtuvieron incrementos en la síntesis de DNA en la glándula mamaria. Los mismos autores, en caprino, observaron igualmente incrementos en la síntesis de RNA en dicha glándula. Por tanto, se puede afirmar que el incremento de la frecuencia de ordeño previene la pérdida celular y ayuda a mantener la actividad celular en la glándula mamaria.

El incremento productivo observado al aumentar la frecuencia de ordeños puede ser explicado por el impacto que tiene dicho aumento sobre la PRL, hormona que promueve la diferenciación de las células epiteliales mamarias, y el consiguiente incremento del número de células mamarias secretoras (Capuco et al., 2001; Dahl et al., 2004). Se ha observado que

el aumento de la frecuencia de ordeños produce un incremento de la PRL circulante (Bar-Peled et al., 1995; Dahl et al., 2004) y de la expresión de sus receptores (Dahl et al., 2002), por tanto, los animales ordeñados más frecuentemente son más sensibles a la PRL, lo cual es fundamental para la diferenciación de las células epiteliales mamarias.

Muy pocos estudios centran su interés en los efectos del aumento de la frecuencia de ordeño sobre la producción de leche en ovinos y caprinos. Los resultados que aparecen en la bibliografía, referentes al nivel de ganancia productiva al incrementarse la frecuencia de ordeño de 2X a 3X, 4X, 5X y 7X, han sido resumidos en la Tabla 4.

Tabla 4. Efecto del aumento de la frecuencia de ordeño (3X, 4X, 5X, y 7X) sobre la producción de leche en ovino y caprino. La ganancia de producción aparece expresada como porcentaje respecto a 2 ordeños diarios (2X).

	Raza	Frec. Ordeño	Ganancia (%)	Estado Lactación	Duración	Referencia
Ovino	Razas de carne	3X	-2 (NS)	Inicio	32 d	Morag, 1968
	Manchega	3X	13	Inicio	35 d	Gargouri et al., 1993
	Lacaune	3X	35 (NS)	Inicio	6 d	Negrao et al., 2001
	Prealpes du Sud	3X	15	Inicio/Mitad	130 d	Labussière et al., 1974b
	Lacaune	4X	37	Inicio	6 d	Negrao et al., 2001
	Lacaune	5X	26 (NS)	Inicio	6 d	“ “
	Lacaune	7X	38	Inicio	6 d	“ “
Caprino	Saanen	3X	47	Toda	37 sem	Wilde et al., 1987b
	Saanen	3X	20	Inicio	13 wk	“ “
	Saanen	3X	10	Inicio	6 sem	Knight, 1992
	Saanen	3X	14	Mitad/Final	22 sem	Knight et al., 1990
	Saanen	3X	8	Final	23 d	Boutinaud et al., 2003

NS: Las diferencias no fueron significativas

En ovino, Morag (1968) no observó aumentos significativos en la producción de leche al realizar tres ordeños al día en lugar de dos. Sin embargo, Labussière et al. (1974b), Gargouri et al. (1993) y Negrao et al. (2001) demostraron que 3 ordeños diarios, al inicio y a la mitad de la lactación, podían incrementar en un 12-35% la producción de leche. Negrao et

al. (2001) estudiaron también el efecto de ordeñar 4X, 5X y 7X, pero los incrementos de producción observados (37, 26 y 38%, respectivamente) no fueron diferentes a los obtenidos al incrementar la frecuencia de ordeño a 3X.

En caprino, también se produce un aumento de la producción de leche al pasar de dos a tres ordeños al día. Dicho aumento puede oscilar entre el 8 y el 47% (Stelwagen, 2001; Boutinaud et al., 2003).

En vacuno lechero, explotado bajo sistemas de producción intensivos, el aumento de la frecuencia de ordeños ha sido propuesto como una estrategia interesante para maximizar la producción de leche y compensar los elevados costes de producción característicos de estos sistemas (Hillerton y Winter, 1992; Erdman y Varner, 1995). Así, a diferencia de lo que pasa en el ovino y en el caprino, en dicha especie el número de estudios dedicados a comprobar el efecto del aumento de la frecuencia de ordeños sobre la producción de leche es mucho más extenso (Tabla 5).

En experiencias en las que la frecuencia de ordeño aumentaba de 2X a 3X, la producción de leche se incrementó un 1%, al aplicarse a final de lactación (Klei et al., 1997), y hasta un 16% al aplicarse al inicio (Dewhurst y Knight, 1994) o a lo largo de toda la lactación (Smith et al., 2002). Ordeñar 4 veces al día aumentó la producción un 8-9%, a la mitad y al final de la lactación (Ayadi et al., 2004; Lollivier y Marnet, 2005; Wiking et al., 2006), y un 26% al aplicarse a lo largo de toda la lactación (Hale et al., 2003). Pasar de una frecuencia de ordeño de 3X a 6X durante las primeras 6 semanas postparto, incrementó la producción de leche un 21% (7,3 Kg/d) (Bar-Peled et al., 1995). Sin embargo, Van Baale et al. (2005), en la misma raza, no observaron diferencias productivas con respecto a 3X, al aumentar hasta 6X durante 3 semanas al inicio de la lactación. Dahl et al. (2004) obtuvieron incrementos del 18%, con respecto a 2X, al ordeñar 6X durante 3 semanas.

A la vista de los datos presentados en la tabla 5 podemos concluir que el momento de la lactación en el que se aplica el incremento de la frecuencia de ordeño determina considerablemente la respuesta productiva de los animales. Igualmente, cabe destacar que desde el punto de vista productivo parece poco interesante incrementar la frecuencia de ordeños por encima de 3X o 4X, si además se tiene en cuenta que el ordeño puede representar, desde el punto de vista biológico, un riesgo para la vaca, ya que puede aumentar el riesgo de padecer mastitis y de que se produzcan desórdenes metabólicos (Stelwagen et al., 2001).

Tabla 5. Efecto del aumento de la frecuencia de ordeño (3X, 4X, 5X y 6X) sobre la producción de leche en vacuno. La ganancia de producción aparece expresada como porcentaje respecto a 2 ordeños diarios (2X).

Raza	Frec. Ordeño	Ganancia (%)	Estado Lactación	Duración	Referencia
Holstein	3X	15-16	Toda	3 años	Smith et al., 2002
Holstein-Friesian	3X	16	Inicio	7 d	Dewhurst y Knight, 1994
Holstein	3X	10	Inicio	100 d	Klei et al., 1997
“ ”		8	Mitad	100 d	“ ”
“ ”		1	Final	100 d	“ ”
Holstein	4X	26	Toda	21 d	Hale et al, 2003
Holstein	4X	17 **	Preparto	28 d	Rastani et al., 2007
Frisona	4X	10	Inicio	28 d	Hillerton et al., 1990
Holstein	4X	14	Inicio	17 d	Hale et al, 2003
Holstein	4X	13	Inicio	21 d	Wall et al, 2006
Holstein	4X	17	Inicio	21 d	Wall y McFadden, 2007
Holstein	4X	8	Mitad	3 d	Lollivier y Marnet, 2005
Swedish Red & White	4X	9	Mitad-Final	14 d	Wiking et al., 2006
Frisona	4X	8	Final	1 d	Ayadi et al., 2004
Holstein	6X	21*	Inicio	42 d	Bar-Peled et al., 1995
Frisona	6X	18*	Inicio	21 d	Dahl et al., 2004
Holstein	6X	-4*(NS)	Inicio	7 d	VanBaale et al., 2005
“ ”	6X	0,4* (NS)	Inicio	14 d	“ ”
“ ”	6X	-5* (NS)	Inicio	21 d	“ ”
Frisona	6X	30	Final	1 d	Ayadi et al., 2004

NS: Las diferencias no fueron significativas

* Ganancia o pérdida expresada como porcentaje respecto a 3 ordeños/d (3X)

** Ganancia expresada como porcentaje respecto a 1 ordeño/d (1X)

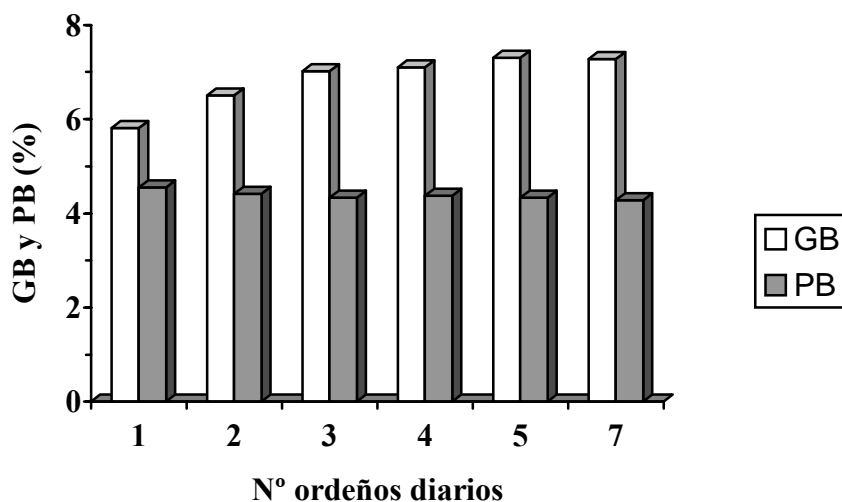
5.1.2. Efecto sobre la composición de la leche

La frecuencia de ordeño también influye en la composición química de la leche ordeñada. Ahora bien, en los pequeños rumiantes hay muy pocos estudios relacionados con el efecto de la frecuencia o intervalos entre ordeños sobre los componentes de la leche.

En ovino, Morag (1968) no observó variaciones en la composición de la leche al pasar a ordeñar 3X en relación a 2X. Sin embargo, Negrao et al. (2001) encontraron que al incrementar la frecuencia de ordeños de 2X a 7X, el contenido en grasa de la leche aumentó de 6,5% a 7,3%, respectivamente (Figura 19). Probablemente, este resultado se debió a que

la presencia del reflejo de eyección de leche fue más frecuente en los regímenes de elevado número de ordeños diarios y, por tanto, la proporción de leche alveolar (mucho más rica en grasa) aumentó, incrementándose así el contenido en grasa de la leche total (Labussière, 1988; Knight y Dewhurst, 1994).

Figura 19. Contenido en grasa (GB) y proteína (PB) de la leche al incrementarse el número diario de ordeños en ovino lechero de raza Lacaune (Adaptado de Negrao et al., 2001)



McKusick et al. (2002a), al estudiar el efecto a corto plazo de distintos intervalos entre ordeños en ovejas East Friesian cruzadas, determinaron que el intervalo entre ordeños de 8 h presentaba un mayor contenido en grasa (7,07 vs. 6,26%) y un menor contenido en proteína (4,31 vs. 4,51%) que el intervalo de 12 h, respectivamente. Por tanto, en función de los resultados obtenidos a corto plazo, sería de esperar que al ordeñar 3 veces al día se produjera una leche de mayor contenido en grasa y menor contenido en proteína que al hacerlo sólo 2 veces.

En caprino, un estudio de Boutinaud et al. (2003) determinó que el incremento de la frecuencia de ordeño aumenta el contenido en proteína de la leche, sin modificar su contenido en grasa. Sin embargo, según los resultados obtenidos por Salama et al., (2003) en una experiencia a corto plazo, sería esperable una disminución en el contenido en proteína bruta y un aumento en grasa bruta al incrementar la frecuencia de ordeños, al considerar los datos obtenidos en cabras de raza Murciano-Granadina a las que se aplicó intervalos de ordeño de 8, 16 y 24 horas.

En vacuno, el contenido en grasa y proteína de la leche suele reducirse a medida que se incrementa la frecuencia de ordeños, como Erdman y Varner (1995) y Smith et al. (2002)

observaron al comparar 2X vs. 3X. Hale et al. (2003) también obtuvieron una disminución en el porcentaje de grasa al aplicar un aumento de la frecuencia de ordeños al inicio de la lactación, que persistió a lo largo del resto de la lactación. Por el contrario, Hillerton et al. (1990) observaron incrementos en el porcentaje de proteína de la leche al aplicar 4X durante toda la lactación. Los mismos autores no observaron variaciones en el contenido en grasa de la leche. Bar-Peled et al. (1995) y VanBaale et al. (2005), al comparar 6X frente a 3X, y Lollivier y Marnet (2005), al comparar 4X vs. 2X, no observaron variaciones en el contenido en grasa y proteína de la leche. Tampoco Wiking et al. (2006) detectaron variaciones en el porcentaje de grasa al ordeñar 4X vs. 2X, aunque se modificó el perfil de ácidos grasos, incrementándose el porcentaje de ácidos grasos libres. Dicho aumento del porcentaje en ácidos grasos libres con el número de ordeños ya había sido previamente descrito en vacuno por Klei et al. (1997)

Las grandes diferencias en la variación de la composición descritas por los distintos autores pueden ser debidas, por una parte, a los distintos efectos que tiene el incremento de la frecuencia de ordeño sobre la producción lechera, que vienen condicionados por la raza, el nivel de producción de los animales, el estado de lactación y las características individuales, y por otro lado a diferencias existentes en el momento y en la duración de la aplicación de las distintas frecuencias de ordeño, y/o a la utilización de diferentes estrategias para la obtención de las muestras de leche.

5.1.3. Efecto sobre el recuento de células somáticas de la leche

El RCS es una herramienta muy útil para el diagnóstico indirecto de las infecciones intramamarias, y es un buen indicador de la calidad de la leche, siendo utilizado por la industria como criterio de pago a los ganaderos de vacuno.

El aumento de las células somáticas en la leche puede deberse, además de a infecciones mamarias, a factores fisiológicos (estado de lactación, parto, celo, número de crías, etc.) y no fisiológicos (laboratorio, método de recuento, almacenaje y transporte de muestras). La frecuencia de ordeño aplicada a los animales también puede influir sobre el RCS en las distintas especies de rumiantes lecheros.

En ovino lechero, McKusick et al. (2002a) estudiaron los efectos a corto plazo de intervalos entre ordeños comprendidos entre 4 y 24 h, y observaron que el RCS fue el mismo al aplicar el intervalo entre ordeños de 8 y de 12 h (125×10^3 células/ml), que son los intervalos más probables de realizar al ordeñar 3X y 2X a los animales, respectivamente.

Igualmente en cabras de raza Saanen, el incremento de la frecuencia de ordeño de 2X a 3X tampoco pareció afectar al RCS (Boutinaud et al., 2003). Por el contrario, Salama et al. (2003) determinaron, en cabras Murciano-Granadina, que el intervalo entre ordeños de 8 h presentó mayores RCS que el de 16 h (1.150 vs. 490×10^3 células/ml). Así pues, en este caso parecería lógico pensar que el incremento de la frecuencia de ordeño puede aumentar el RCS de la leche.

Por último, en vacuno lechero, el RCS disminuyó significativamente al comparar 6X vs. 3X al inicio de la lactación (204 vs. 1318 células/ml, respectivamente). Por tanto, el incremento de la frecuencia de ordeños al inicio de la lactación podría influir sobre la capacidad de la glándula mamaria para resistir infecciones, ya que los niveles de células somáticas se mantuvieron siempre inferiores en el grupo que había sido sometido a la frecuencia de ordeño de 6X. Por tanto, parece existir una relación inversa entre la frecuencia de ordeño y el RCS, además de un efecto persistente de la frecuencia de ordeño sobre el RCS a lo largo de toda la lactación (Dahl et al., 2004).

5.2. Disminución de la frecuencia y supresión de ordeños

Producir leche de forma eficiente también puede conseguirse mediante la disminución de la frecuencia de ordeño. En Nueva Zelanda, explotaciones de vacuno lechero en extensivo empezaron a aplicar frecuencias de ordeño de 1X hacia los años 80, con el objetivo de reducir costes de producción para poder contrarrestar los bajos precios pagados por la leche (Pomiès et al., 2007). Ahora bien, la aplicación de bajas frecuencias de ordeño también puede ser una estrategia para reducir el estrés metabólico de los animales al inicio de la lactación y para mejorar la calidad de vida del ganadero al final de lactación, reduciendo su calendario laboral (Davis et al., 1999).

En el caprino lechero, se da una situación similar a la del vacuno. Prácticamente en la totalidad de las explotaciones caprinas de raza Canaria, la frecuencia de 1X se realiza de forma habitual. En este caso, el objetivo principal de la reducción de la frecuencia de ordeño es tener más tiempo para la fabricación artesanal de quesos (Capote et al., 1999).

Sin embargo, la reducción de la frecuencia de ordeño produce la disminución de la producción de leche (Tablas 6 y 7). Como hemos explicado anteriormente, la acumulación de leche a nivel alveolar al aplicarse largos intervalos entre ordeños desencadena distintos tipos de respuestas por parte de las células epiteliales mamarias. De acuerdo con Stelwagen (2001), la adaptación de la glándula mamaria al cambio de la frecuencia de ordeños pasa por

3 fases:

- Respuesta aguda (durante las primeras 24 h y algunos días): activación de mecanismos de regulación agudos como el FIL, el debilitamiento de las TJ, y el inicio de la apoptosis celular.
- Respuesta a corto-medio plazo (de días a semanas): adaptación de la glándula mamaria a una disminución de la actividad celular (Ej. actividad enzimática).
- Respuesta a largo plazo (de semanas a meses): cambios en el parénquima mamario o en el número de células epiteliales mamarias.

5.2.1. Supresión de un ordeño diario

5.2.1.1. Efecto sobre la producción de leche

Los efectos producidos por la aplicación de 1X sobre la producción de leche en los pequeños rumiantes lecheros se muestran en la Tabla 6.

Reducir la frecuencia de ordeños a 1X produce pérdidas de producción que oscilan entre el 15 y 48% en ovino (Morag, 1968; Labussière et al., 1974b; Papachristoforou et al., 1982; Knight et al., 1993; Knight y Gosling, 1995; Negrao et al., 2001; Nudda et al., 2002), y entre el 6 y el 35% en caprino (Mocquot, 1978; Papachristoforou et al., 1982; Wilde y Knight, 1990; Capote et al., 1999; Boutinaud et al., 2003; Salama et al., 2003).

La reducción en la producción de leche observada al aplicar 1X parece ser más importante al inicio que a mitad o final de lactación. En el ovino, la reducción media de la producción al inicio de la lactación es del 22% (Morag, 1968; Labussière et al., 1974b; Papachristoforou et al., 1982; Negrao et al., 2001) mientras que a mitad-final de la lactación es del 17% (Papachristoforou et al., 1982; Knight y Gosling, 1995). En el ovino, al comparar ovejas de la misma raza (Chios) y bajo las mismas condiciones de trabajo, se observó dicha reducción. Así, mientras que las pérdidas productivas de la aplicación de 1X al inicio de la lactación fueron del 22%, la aplicación a partir de la mitad y hasta el final de la lactación produjo pérdidas de tan sólo el 13% de la producción (Papachristoforou et al., 1982). En caprino, los resultados son similares. Wilde y Knight (1990) y Salama et al. (2003) observaron pérdidas del 26 y 21% al inicio de lactación, respectivamente. En cambio, a mitad-final de la lactación, las pérdidas fueron sólo del 7 y 17% (Papachristoforou et al., 1982; Salama et al., 2003; respectivamente).

Tabla 6. Pérdida de producción de leche al ordeñar 1X en vez de 2X en ovino y caprino. Pérdida de producción expresada como porcentaje respecto a 2 ordeños (2X).

Raza	% Pérdida	Estado lactación	Duración 1X	Referencia
OVINO				
Prealpes du Sud	35	Toda	Toda	Labussière et al., 1974b
Chios	28	Toda	Toda	Papachristoforou et al., 1982
Dorset	48	Toda	Toda	Knight et al., 1993
Razas de carne	19	Inicio	8 d	Morag, 1968
Prealpes du Sud	30	Inicio	130d	Labussière et al., 1974b
Chios	22	Inicio	90 d	Papachristoforou et al., 1982
Lacaune	15 (NS)	Inicio	6 d	Negrao et al., 2001
Sarda	24	Mitad	4 d	Nudda et al., 2002
Merino	23 (NS)	Mitad	4 d	“ “
Awasi	18	Mitad	4 d	“ “
Chios	13	Mitad-Final	89 d	Papachristoforou et al., 1982
Poll Dorset	20	Mitad-Final	12 sem	Knight y Gosling, 1995
CAPRINO				
Alpina	35	Toda	Toda	Mocquot, 1978
Canaria	6	Toda	Toda	Capote et al., 1999
MG	19	Toda	Toda	Salama et al., 2003
Saanen	26	Inicio	4,5 sem	Wilde y Knight, 1990
MG	21	Inicio	10 sem	Salama et al., 2003
MG	17	Mitad	15 sem	Salama et al., 2003
Damascos	7	Mitad/Final	6 sem	Papachristoforou et al., 1982
Saanen	26	Final	23 d	Boutinaud et al., 2003

NS: Pérdida de producción no significativa ($P > 0,05$)

MG: Murciano-Granadina.

Además, Papachristoforou et al. (1982) comprobaron que la disminución de la producción de leche era superior en las ovejas de bajo nivel productivo. Por tanto, es de esperar que las razas de alto nivel productivo presenten una mejor respuesta a la reducción de la frecuencia de ordeño que las de bajo nivel.

En el proyecto FAO-M4 se estudiaron, durante 4 semanas, los efectos de la supresión de un ordeño diario al final de la lactación en distintas razas de ovino (Tsigay, Karagouniko,

Lacaune, Sarda, Manchega, Churra), y se observó una caída de la producción que osciló del 26 al 69% según la raza. Así, las razas Karagouniko o Tsigay, mostraron porcentajes de caída de producción del 57 y 69%, respectivamente, mientras que en las razas Sarda y la Lacaune, caracterizadas por su alta producción y por su gran capacidad cisternal, los mismos porcentajes fueron del 26 y el 41%, respectivamente (Labussière, 1983).

La capacidad de los pequeños rumiantes lecheros para almacenar leche en las cisternas mamarias también puede determinar la respuesta de éstos a la frecuencia de ordeño. Así, en caprino lechero se ha observado que aquellas razas caracterizadas por tener grandes cisternas mamarias, como son las razas Canaria y Murciano-Granadina, presentan pérdidas menores frente a 1X a lo largo de la lactación (6% y 19%, respectivamente; Capote et al., 1999; Salama et al., 2003) que aquellas razas caracterizadas por tener menores cisternas, como la Alpina (35%; Mocquot, 1978).

El número de parto también afecta a la respuesta a la frecuencia de ordeño. Salama et al. (2003) observaron en caprino lechero, que al realizar 1X las pérdidas productivas fueron mayores en las cabras primíparas que en las multíparas, lo que podría relacionarse con el menor desarrollo cisternal observado en los animales de primer parto.

En vacuno se han realizado un gran número de estudios sobre el efecto de disminuir la frecuencia de ordeños de 2X a 1X en la producción de leche (Tabla 7). Al comparar 1X frente a 2X se produce una pérdida de producción de leche que oscila entre un 7 y un 50% (Claesson et al., 1959; Stelwagen et al., 1994a). Al igual que en los pequeños rumiantes, la reducción de la producción de leche al realizar 1X en vacuno es más importante al inicio de lactación (15-38%; Stelwagen et al., 1997; Stelwagen y Knight, 1997) que a la mitad (18-23%; Carruthers et al., 1993; Knight y Dewhurst, 1994) o al final de la lactación (7-36%; Stelwagen et al., 1994a; Kelly et al., 1998).

En el vacuno, volver a aplicar 2X tras un periodo más o menos largo de 1X, hace que la producción de leche remonte al aumentar la frecuencia de ordeño, pero generalmente la recuperación observada no es total (Rémond y Pomiès, 2005). La duración y el momento de la lactación en el que se aplica 1X pueden provocar que la recuperación productiva no sea tan positiva como cabría esperar. Un ejemplo de ello son los resultados obtenidos por Knight y Dewhurst (1994), en los que tras una semana de 1X a mitad de lactación la recuperación del nivel productivo fue total, mientras que Pomiès et al. (2007) al realizar 1X durante 7 semanas a mitad-final de lactación, y Claesson et al., (1959) durante toda la lactación, no consiguieron recuperar totalmente el nivel de producción de leche esperado.

Tabla 7. Efecto de 1X sobre la producción de leche en bovino. Pérdida de producción expresada como porcentaje respecto a 2 ordeños (2X).

Raza	% Pérdida	Estado lactación	Duración 1X	Referencia
Sueca	50	Toda	Toda	Claesson et al., 1959
Jersey, Frisona	35	Toda	Toda	Holmes et al., 1992
Holstein	30	Toda	Toda	Rémond et al., 2004
Holstein-Friesian	31	Toda	Toda	Clark et al., 2006
Jersey	22	Toda	Toda	Clark et al., 2006
Holstein-Friesian	26	Toda	Toda	Gleeson et al., 2007
Frisona	23	Inicio	1 d	Stelwagen et al., 1996
Frisona	38	Inicio	3 sem	Stelwagen y Knight, 1997
Jersey	15	Inicio	1 d	Stelwagen et al., 1997
Jersey	12	Inicio		Stelwagen et al., 1998b
Holstein	23	Inicio	3 sem	Rémond et al., 2002
Holstein-Friesian	20*	Inicio	28 d	Patton et al., 2006
Jersey, Frisona	18	Mitad	2 sem	Carruthers et al., 1993
Friesian-Holstein	23	Mitad	2 sem	Knight y Dewhurst, 1994
Jersey	15	Mitad/Final	5 d	Stelwagen y Lacy-Hulbert, 1996
Frisona	29	Mitad/Final	10 sem	O'Brien et al., 2002
Holstein	25	Mitad/Final	7 sem	Pomiès et al., 2007
Montbéliarde	19	“ “	“ “	“ “
Jersey, Frisona	13	Final	2 sem	Carruthers et al., 1993
Frisona	27	Final	7 d	Knutson et al., 1993
Frisona	28	Final	3 sem	Stelwagen y Knight, 1997
Jersey, Frisona, F × J	11	Final	2 sem	Davis et al., 1998
Holstein Friesian	36	Final	7 d	Kelly et al., 1998
Frisona, F × J	13	Final	26 d	Lacy-Hulbert et al., 1999
Frisona	7	Final	2 sem	Stelwagen et al., 1994a
Frisona	10	Final	1 d	Ayadi et al., 2004

F × J: Frisona × Holstein

* Pérdida expresada respecto a 3 ordeños/d (3X)

El efecto de la raza sobre la pérdida de producción de leche cuando los animales son sometidos a una disminución de la frecuencia de ordeños es controvertido. Carruthers et al.

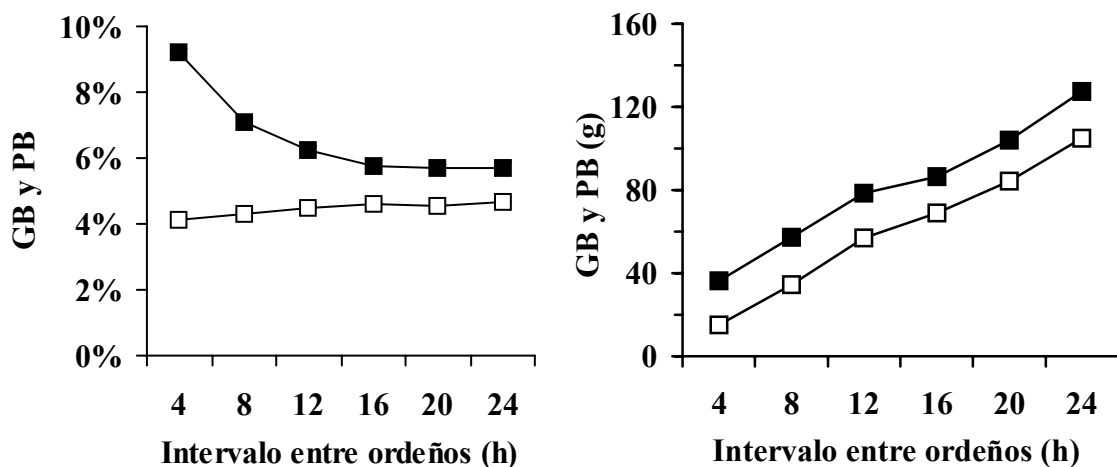
(1993), al comparar vacas de raza Jersey con vacas de raza Holstein, observaron que las diferencias entre ambas razas eran pequeñas y no significativas. Sin embargo, más recientemente, Pomiès et al. (2007) han observado que la raza Montbéliarde resulta menos afectada por 1X que la raza Holstein (-19 y -26%, respectivamente).

Ahora bien, lo que sí parece explicar la respuesta de los animales a la reducción del número diario de ordeños es su capacidad cisternal. Las vacas con mayor tamaño de cisterna, es decir, aquellas que almacenan mayores proporciones de leche total en el compartimento cisternal, toleran mejor la práctica de 1X y sufren menores pérdidas productivas (Knight y Dewhurst, 1994; Ayadi et al., 2003a).

5.2.1.2. Efecto sobre la composición química de la leche

McKusick et al (2002a), en un estudio a corto plazo, valoraron los efectos de diferentes intervalos de ordeño (4, 8, 12, 16, 20 y 24 h) sobre la composición de la leche de ovinos de raza East Friesian cruzada. Observaron que a medida que aumentó el intervalo entre ordeños, la producción total de grasa y de proteína se incrementó de forma significativa. En cambio, el porcentaje de grasa de la leche disminuyó y el porcentaje de proteína se mantuvo estable de 12 a 20h, aumentando significativamente de 20 a 24h, debido al posible paso de proteínas séricas desde el torrente sanguíneo a la ubre por la desestabilización de las TJ (Figura 20).

Figura 20. Efecto de diferentes intervalos entre ordeños sobre el contenido (g) y el porcentaje de grasa (■) y de proteína bruta (□) en leche de ovino. Adaptado de McKusick et al. (2002a).

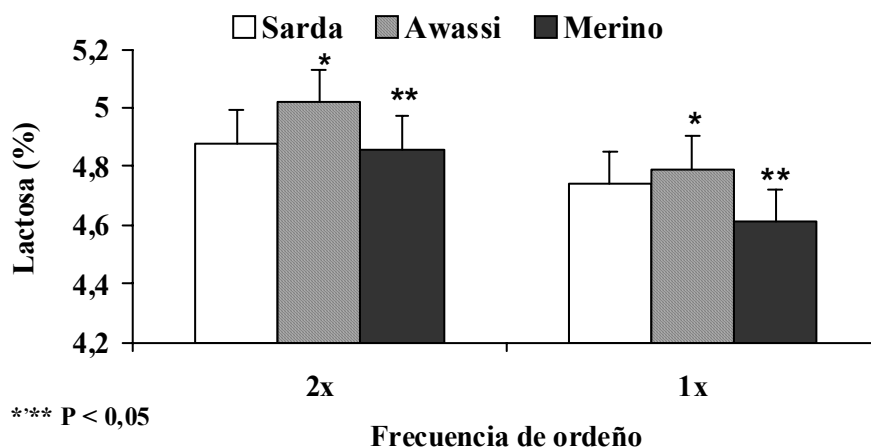


Sin embargo, al aplicar 1X a más largo plazo, el porcentaje de materia grasa en la leche se incrementó (del 5,69 al 6,01%), mientras que la cantidad de grasa obtenida fue superior en los 2X (56 vs. 44 g/d, respectivamente; Morag, 1968). Knight y Gosling (1995) observaron también incrementos en la concentración de proteína de la leche de ovejas de raza Poll Dorset, pero sin modificaciones en la grasa bruta. Igualmente se observó un aumento en la concentración de grasa y proteína de la leche, al aplicar 1X durante 4 semanas, en la mayoría de razas estudiadas en el proyecto internacional FAO-M4 sobre el ordeño mecánico de los pequeños rumiantes (Labussière, 1983).

En el mismo contexto, Nudda et al. (2002) observaron que al disminuir la frecuencia de ordeños de 2X a 1X en ovejas de raza Sarda, Awassi y Merino, la concentración en materia grasa aumentó (de 6,86 a 7,48% y de 7,67 a 8,31%) en la leche de las ovejas de raza Awassi y Merino, respectivamente. El contenido en materia grasa en las ovejas de raza Sarda no presentó diferencias significativas (de 6,44 a 6,69 %). Los mismos autores observaron que en 1X se incrementó el porcentaje de proteína en las tres razas experimentales (Sarda, Awassi y Merino). Por tanto, parece ser que la disminución de la frecuencia de ordeño produce un aumento de la concentración de los componentes mayoritarios de la leche.

En cuanto a la lactosa, la disminución de la frecuencia de ordeño produjo el descenso del porcentaje de lactosa en ovejas de raza Awassi y Merino, mientras que en la raza Sarda se mantuvo estable (Nudda et al., 2002) (Figura 21). Knight y Gosling (1995) también observaron disminución del porcentaje de lactosa al aplicar 1X. Según Stelwagen et al. (1994a, b), los largos intervalos entre ordeños causan una disrupción transitoria de la integridad de las TJ de las células epiteliales mamarias, lo cual produce un flujo de lactosa de la leche hacia la sangre.

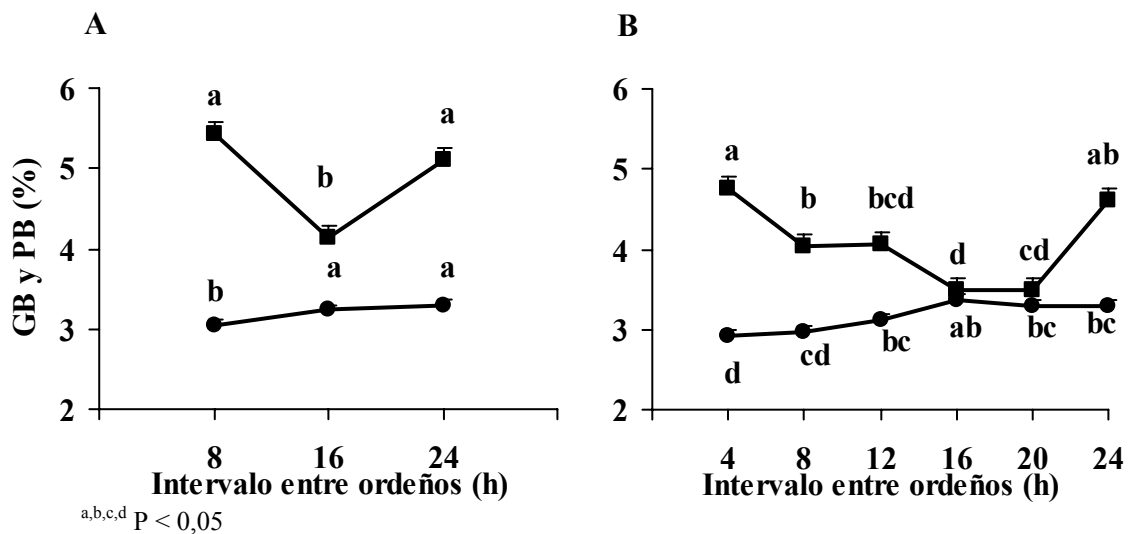
Figura 21. Concentración de lactosa en la leche de ovejas de raza Sarda, Awassi y Merino ordeñadas una (1X) o dos (2X) veces al día. Adaptado de Nudda et al. (2002).



Para muchos autores (Claesson et al., 1959; Stelwagen et al., 1994a; Klei et al., 1997; Kelly et al., 1998; Lacy-Hulbert et al., 1999; O'Brien et al., 2002; Rémond et al., 2004; Pomiès et al., 2007) la práctica de 1X comparada con 2X, y de 1X comparada con 3X (Patton et al., 2006) produce un aumento en la concentración de grasa y proteína en la leche de vaca. Ahora bien, estos resultados no fueron confirmados por Holmes et al. (1992) ni por Rémond et al. (2002), para los que el porcentaje de grasa y proteína de la leche no varió al ordeñar 1X. Stelwagen et al. (1997) tampoco detectaron aumento del contenido graso en vacas ordeñadas 1X.

Ayadi et al. (2004), al aplicar a corto plazo diferentes intervalos entre ordeños, observaron que el porcentaje de grasa bruta de la leche varió cuadráticamente a medida que aumentó el intervalo aplicado. La proteína también varió aunque de forma menos marcada que la grasa (Figura 22).

Figura 22. Efecto de diferentes intervalos entre ordeños sobre la concentración de grasa (■) y proteína (●) en caprino (Gráfico A) y vacuno (Gráfico B), respectivamente. Adaptado de Salama et al. (2003) y Ayadi et al. (2004).



La concentración de lactosa de la leche en general disminuye o tiende a hacerlo al realizar 1X (Claesson et al., 1959; Holmes et al., 1992; Stelwagen et al., 1994a; Kelly et al., 1998; Stelwagen et al., 1998b; Lacy-Hulbert et al., 1999). Esta disminución se explica por el paso de la lactosa a través de las uniones intercelulares mamarias. Ahora bien, 1X no afectó al porcentaje de lactosa en otros estudios realizados en vacuno (Rémond et al., 2002; 2004).

La concentración del Na, K, Cl también varía al disminuir la frecuencia de ordeño, y está relacionada con el aumento de la permeabilidad de las uniones TJ. Concretamente, en vacuno, al reducir la frecuencia de ordeño se produce un aumento de la concentración de Na

y una disminución de la concentración de K en la leche y, por tanto, un aumento de la ratio Na:K (Lacy-Hulbert et al., 1999).

En general, podemos afirmar que la composición química de la leche se comporta de forma similar al disminuir la frecuencia de ordeño en el ganado vacuno y en el caprino. En ambas especies, la leche de 1X suele ser más concentrada que la de 2X. Probablemente, el volumen de leche disminuye más que la producción de materia grasa, aumentando por tanto el porcentaje de la misma por efecto de concentración. En el caso de las proteínas, la concentración de caseína (proteína mayoritaria de la leche; CN) aumenta tanto en la leche de vaca (Lacy-Hulbert et al., 1999) como en la de cabra (Salama et al., 2003). Esto se debe al gran tamaño de la micela de CN, que impide que ésta pueda atravesar la vía paracelular aún estando debilitadas las TJ (Stelwagen et al., 1998b), y como consecuencia favorece su concentración en la leche

La plasmina, enzima proteolítica que proviene de la sangre y que llega a la leche a través de las TJ del epitelio mamario (Politis et al., 1989), es la principal responsable de la transformación de la β -CN a la γ -CN durante su almacenamiento en la ubre, y la principal responsable de la actividad proteolítica en la leche (Bastian and Brown, 1996).

La concentración de plasmina en la leche de los rumiantes aumenta con el estado de lactación (Korycka-Dahl et al., 1983; Bastian et al., 1991; Bastian y Brown, 1996; Bianchi et al., 2004), el número de lactación (Politis y Kwai Hang, 1989), y el nivel de células somáticas de la leche (Le Roux et al., 1995; Fantuz et al., 2001; Albenzio et al., 2004, 2005; Bianchi et al., 2004). Ahora bien, estudios realizados en vacuno, ponen de manifiesto que la disminución de la frecuencia de ordeños también puede causar el incremento de la actividad de la plasmina en la leche (Stelwagen et al., 1994c; Kelly et al., 1998). Dichos autores indicaron que el aumento de la permeabilidad de las TJ causado por 1X, y el consiguiente incremento del paso de solutos a través de la vía paracelular, pudo contribuir al aumento de la actividad proteolítica en la leche. Por el contrario, Klei et al. (1997) y O'Brien et al. (2002) no encontraron efectos significativos del cambio de la frecuencia de ordeño sobre la concentración de plasmina en la leche.

En pequeños rumiantes, no se conocen estudios realizados sobre el efecto del aumento o la disminución de la frecuencia de ordeños en la concentración de plasmina. Ahora bien, el incremento de la actividad de la plasmina se asocia con el deterioro de las propiedades de coagulación de la leche como consecuencia de la acción proteolítica de la plasmina sobre la CN (Srinivasan y Lucey, 2002). Por tanto, puesto que en los pequeños rumiantes

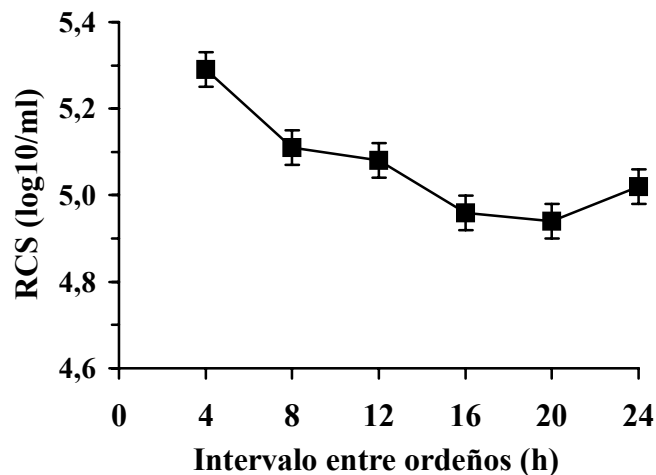
prácticamente la totalidad de la producción de leche es destinada a la elaboración de queso, la estimación de la plasmina al modificarse el intervalo entre ordeños puede ser un parámetro a tener en cuenta en un futuro.

5.2.1.3. Efecto sobre el recuento de células somáticas

En ovino hay muy pocos trabajos que estudian el efecto del aumento del intervalo entre ordeños sobre el RCS. La figura 23 muestra cómo al aplicar diferentes intervalos a corto plazo, el RCS tiende a disminuir hasta las 16 horas de llenado de la ubre, permaneciendo estable posteriormente hasta las 24 horas (McKusick et al., 2002a).

Por el contrario, Nudda et al. (2002) determinaron que al disminuir la frecuencia de ordeño de 2X a 1X el RCS aumentó en la raza Sarda y presentó tendencia a hacerlo en las razas Awassi y Merino. Este efecto sobre el RCS fue transitorio, puesto que revirtió completamente al volver a realizar 2X. Este aumento transitorio fue explicado por el aumento de la concentración de las células somáticas debido a las pérdidas productivas al disminuir la frecuencia de ordeño.

Figura 23. Efecto de diferentes intervalos entre ordeños sobre el RCS en ovino. Adaptado de McKusick et al. (2002a)



En caprino, al igual que en ovino lechero, el número de estudios realizados es muy limitado. Salama et al. (2003) no encontraron diferencias significativas entre 1X y 2X a lo largo de la lactación en cabras de raza Murciano-Granadina. Por otro lado, Boutinaud et al. (2003) observaron que el RCS tendió a aumentar al disminuir la frecuencia de ordeño en cabras de raza Saanen.

En vacuno lechero, la información que se tiene sobre el RCS al disminuir la frecuencia de ordeño es contradictoria. Rémond et al. (2004) no observaron diferencias significativas al realizar 1X durante toda la lactación. Igualmente, Stelwagen et al. (1994a), Lacy-Hulbert et al. (1999), O'Brien et al. (2002), y Pomiès et al. (2007) no encontraron diferencias estadísticamente significativas al aplicar dicho intervalo al final de la lactación y Patton et al. (2006) tampoco lo hicieron al inicio de la lactación. Por el contrario, otros estudios señalaron que al ordeñar 1X a lo largo de la lactación (Holmes et al., 1992; Clark et al., 2006) o durante un corto periodo de tiempo al inicio (Stelwagen y Lacy-Hulbert, 1996) o al final (Kelly et al., 1998) de la lactación se produce un aumento significativo del RCS de la leche. Este incremento puede deberse a un efecto concentración causado por el descenso de la producción de leche, y por el debilitamiento de las TJ que facilita el flujo paracelular de células somáticas hacia la leche (Stelwagen y Lacy-Hulbert, 1996).

Kamote et al. (1994) observaron que las vacas que presentan niveles bajos de RCS son más resistentes a los efectos adversos de 1X que las vacas que presentan altos niveles de células somáticas en la leche antes de aplicar la reducción de la frecuencia de ordeño. Sin embargo, en un estudio realizado a lo largo de 4 lactaciones, Lacy-Hulbert et al. (2005) observaron que 1X produjo un incremento aproximado del doble en el RCS de la leche de todos los animales, independientemente del estado de infección en el que se encontraban antes de iniciarse la disminución de la frecuencia de ordeño. Este estudio confirmó los resultados presentados previamente por Holmes et al. (1992). Ahora bien, cabe destacar que el incremento del RCS no se tradujo en un incremento de la prevalencia de mastitis, es decir, 1X no afectó a la incidencia de mastitis clínicas (Lacy-Hulbert et al., 2005).

5.2.2. Realización de tres ordeños cada dos días

Teóricamente existen otros posibles manejos del ordeño en lo referente a su supresión, basados en la aplicación de intervalos entre ordeños superiores a las 12 h (2X). En ovino lechero, son escasos los trabajos realizados para conocer cuál es el intervalo entre ordeños más apropiado. A corto plazo, los efectos de intervalos entre ordeños largos (16, 20 y 24 h) sobre la producción de leche han sido bien tolerados en el caso de ovejas de raza East-Friesian cruzada (McKusick et al., 2002a). Sin embargo, intervalos entre ordeños como el de 16h, que permite realizar frecuencias de ordeño de 3 ordeños cada 2 días, han sido muy poco estudiados a largo plazo.

Únicamente existe un trabajo realizado por McKusick et al. (2002a) en el que se compararon, a mitad de la lactación, tres ordeños cada 48 horas (intervalo de ordeño de 16

h) frente a 2X (intervalo de 12 horas). Estos autores observaron que las ovejas ordeñadas 3 veces cada dos días presentaban un nivel de producción de leche similar a las ovejas ordeñadas 2X. El contenido en grasa (5,29 y 5,27%) y en proteína (4,64 y 4,73%) de la leche, y el RCS (4,69 y 4,64 \log_{10}/ml) tampoco mostraron diferencias entre el intervalo entre ordeños de 12 y 16 h, respectivamente. Ahora bien, el tiempo destinado al ordeño por el ganadero disminuyó de modo muy marcado (27%) en las ovejas ordeñadas 3 veces cada dos días.

En el vacuno, al comparar la frecuencia de 3 ordeños en 2 días con 2 ordeños diarios, se obtuvieron pérdidas del 16% al inicio y del 10% a mitad de la lactación en las primíparas. En cambio, en las múltiparas no se observaron pérdidas de producción al inicio de lactación y tan sólo un 9% de pérdidas a mitad de la lactación (Remon y Boit, 1997)

5.2.3. Supresión de 1 o 2 ordeños durante el fin de semana

Con el objetivo de buscar alternativas para mejorar la calidad de vida de los ganaderos, y especialmente de aquellos que tienen explotaciones pequeñas o de tipo familiar, se han realizado diversos estudios en ovino (Casu y Labussière, 1972; Labussière et al., 1974a; Hervás et al., 2006), caprino (Le Mens, 1978; Mocquot, 1978) y vacuno (Labussière y Coindet, 1968) para evaluar los efectos de suprimir uno o 2 ordeños semanales (durante el fin de semana, preferiblemente) sobre la producción y la composición láctea.

5.2.3.1. Efecto sobre la producción de leche

La supresión de uno o dos ordeños por semana probablemente ofrece menos riesgos desde un punto de vista productivo y sanitario que la práctica de un ordeño diario durante largos períodos de tiempo en la lactación. Aún así, en los rumiantes lecheros, suprimir 1 o 2 ordeños semanales suele disminuir la producción de leche (Tabla 8).

La pérdida de leche al disminuir la frecuencia de ordeños presenta una gran heterogeneidad puesto que está relacionada con el nivel de producción del animal (Holmes et al., 1992), la raza (Nudda et al., 2002; Pomiès et al., 2007), el momento (Carruthers et al., 1993; Stelwagen y Knight, 1997; Hale et al., 2003) y la duración (Davis et al., 1999) de la aplicación de la disminución de la frecuencia de ordeño, la morfología de la ubre, en concreto el tamaño de la cisterna mamaria (Knight y Dewhurst, 1994; Stelwagen y Knight, 1997; Ayadi et al., 2003a; Salama et al., 2003), y con la marcada variabilidad individual existente (Holmes et al. 1992; Davis et al., 1999; Rémond y Pomiès, 2004).

En el ovino, suprimir un ordeño semanal (domingo tarde), y por tanto aplicar un intervalo de ordeño de 24 horas una vez por semana, produjo pérdidas de producción que oscilaron entre el 13 y el 26% (Casu y Labussière, 1972; Labussière et al., 1974a) con respecto a ordeñar 2 veces al día durante toda la semana. Sin embargo, estudios más recientes y realizados sobre diferentes razas, no han observado pérdidas productivas significativas al suprimir el ordeño de los domingos por la tarde (Huidobro, 1988; Knight and Gosling, 1995; Hervás et al., 2006).

Tabla 8. Pérdida de producción asociada a la supresión de 1 o 2 ordeños semanales en ovino, caprino y vacuno. Pérdidas de producción expresadas como porcentaje respecto a 2 ordeños (2X).

Raza	Nº Supresión ordeños semanales	Pérdida (%)	Estado lactación	Referencia
OVEJA				
Sarda	1	13	Inicio	Casu y Labussière, 1972
Préalpes du Sud	1	26	Inicio	Labussière et al., 1974a
Manchega	1	7 (NS)	Inicio	Huidobro, 1988
Poll Dorset	1	8 (NS)	Inicio	Knight y Gosling, 1995
Assaf Española	1	NS	Inicio	Hervás et al., 2006
Sarda	2	24	Inicio	Casu y Labussière, 1972
Assaf Española	2	10	Inicio	Hervás et al., 2006
CABRA				
Cabras lecheras	1	3-5	Inicio	Le Mens, 1978
“ ”	1	1	Final	“ ”
Saanen × Chamoisé	1	5	Inicio	Mocquot, 1978
VACA				
Française Frisenne	1	8	Inicio	Labussière y Coindet, 1968
Pie Noire	1	4	Inicio	Ayadi et al., 2003a
Holstein	1	4	Inicio	Ayadi et al., 2003a
Friesian	1	NS	Mitad/Final	O’Brien et al., 2002

NS: Pérdida de producción no significativa ($P > 0,05$)

La supresión de 2 ordeños semanales también ha sido estudiada en ovino. En este caso, las pérdidas productivas fueron del 10% para las ovejas de raza Assaf española (Hervás et al., 2006) y del 24% para las de raza Sarda (Casu y Labussière, 1972). Las pérdidas productivas observadas en ambos casos estuvieron dentro del rango descrito al suprimir un

sólo ordeño semanal (Tabla 8). Las ovejas de raza Sarda y Assaf española suelen ser animales de alto nivel productivo y grandes cisternas, por tanto, esto podría explicar que las pérdidas productivas derivadas de la supresión de 2 ordeños semanales fueran menores de lo que cabría esperar para ovejas de menor cisterna y nivel productivo (Ej: Préalpes du Sud). Cabe destacar también que la mayor tolerancia a la supresión de ordeños mostrada por la oveja Assaf española podría no deberse tanto a la diferencia entre las razas como a la forma de organizar la supresión de ordeños a lo largo de la semana. Mientras que en las ovejas Assaf las supresiones de ordeño se realizaron el sábado y el domingo por la tarde (intervalos entre ordeños de 24 h), en las ovejas de raza Sarda las supresiones de los dos ordeños semanales se realizaron el mismo domingo (intervalo entre ordeños de 36h). Por tanto, la estasis de leche a nivel alveolar y sus consecuencias negativas sobre la producción total de leche, cabía esperar que fueran mucho mayores en la raza Sarda que en la raza Assaf, lo que explicaría las mayores pérdidas productivas en el estudio realizado con esta raza.

En el caprino y en el vacuno la supresión de un ordeño semanal también provoca pérdidas sobre la producción total de leche. Estas pérdidas oscilan entre el 1 y el 5% en el caprino (Mocquot, 1978; Le Mens, 1978) y entre el 4 y el 8% en el vacuno (Labussière y Coindet, 1968; Ayadi et al., 2003a). Sin embargo, cuando la supresión de ordeños se realizó a partir de mitad-final de lactación, no se observaron diferencias significativas en vacuno lechero (O'Brien et al., 2002).

Le Mens (1978) observó en el caprino que las pérdidas fueron mayores cuando la supresión de ordeños se empezó a realizar a partir del primer (5%) y del segundo mes (4%) de lactación, que cuando se empezó a aplicar a partir del quinto mes de lactación (1%). Por tanto, las pérdidas de producción causadas por la supresión de un ordeño semanal, al igual que pasaba con 1X, son menores a medida que avanza la lactación.

En vacuno, Ayadi et al. (2003a) observaron mediante ecografía de la cisterna mamaria, que las pérdidas de producción dependían del tamaño cisternal y que los animales que tenían mayores cisternas presentaban menores pérdidas productivas, como se había concluido anteriormente al comparar 1X frente a 2X (Knight y Dewhurst, 1994; Stelwagen y Knight, 1997; Davis et al., 1998)

La cantidad de leche producida diariamente, cuando se suprime uno o dos ordeños semanales, se comporta de forma diferenciada según los distintos días de la semana. Así, tras suprimir el ordeño del domingo por la tarde, se observó una mayor producción de leche en el ordeño del día siguiente (lunes) por la mañana (+46%, Labussière et al., 1974a; +86%,

Casu y Labussière, 1972). Esta mayor producción puntual descendió por debajo del valor normal a partir del día siguiente (lunes) por la tarde, recuperando la estabilidad a partir del tercer día post-omisión (miércoles) (Casu y Labussière, 1972). En las ovejas de raza Assaf española, el día posterior a la omisión de 1 y 2 ordeños (lunes) se incrementó la producción de leche un 27 y un 16%, respectivamente (Hervás et al., 2006)

El caprino y el vacuno también responden a la supresión de ordeños incrementando la producción de leche en el ordeño posterior a la omisión. Así en cabras, el aumento fue de un 27% (Mocquot et al., 1978) y en vacas osciló entre el 9% (Ayadi et al., 2003a) y el 38-56% (Labussière y Coindet, 1968). Las producciones también disminuyeron a partir del lunes por la tarde y recuperaron el nivel previo a la omisión a partir del martes por la tarde (Labussière y Coindet, 1968) o miércoles (Ayadi et al., 2003a) en vacuno, y del miércoles (Le Mens, 1978) o del jueves por la mañana (Mocquot, 1978) en caprino.

5.2.3.2. Efecto sobre la composición de la leche

Diversos autores han estudiado la modificación de la composición química de la leche en ovejas sometidas a la supresión de 1 o 2 ordeños semanales (Casu y Labussière, 1972; Labussière et al., 1974a; Huidobro, 1988; Knight y Gosling, 1995; Hervás et al., 2006)

Según Labussière et al. (1974a), la eliminación de un ordeño semanal en ovejas de raza Préalpes du Sud incrementó, durante la lactación, la concentración de grasa (de 7,6 a 8,2%) y de proteína (de 5,6 a 6,2%) de la leche con respecto a las ovejas que no sufrieron la omisión de ordeños. Ahora bien, la pérdida de producción hizo que la cantidad total de grasa y de proteína producida disminuyera un 23 y un 18%, respectivamente, con respecto a las ovejas ordeñadas normalmente el fin de semana. Igualmente, Huidobro (1988) observó en ovejas de raza Manchega una mejora de la composición grasa de la leche en los animales que recibieron un ordeño semanal menos, y Knight y Gosling (1995) detectaron incrementos en el porcentaje de proteína en ovejas de raza Poll Dorset. Sin embargo, Casu y Labussière (1972), en ovejas de raza Sarda, no observaron variaciones ni en el contenido graso, ni en el contenido proteico de la leche al omitirse 1 o 2 ordeños semanales.

Al omitirse ordeños, el incremento que se produce en el contenido graso de la leche puede ser explicado por un efecto de concentración derivado de la disminución de la producción diaria de leche (Rémond et al., 2004), pero también puede ser consecuencia de cambios en el mecanismo de regulación de la secreción de la grasa respecto a los movimientos de la fase acuosa de la leche (Davis et al., 1999), o de variaciones en la

transferencia de la leche del compartimento alveolar al cisternal (McKusick et al., 2002a).

La omisión de ordeños hace que el intervalo entre ordeños pase a ser más prolongado de lo habitual (10-14h) en el ovino lechero. Por tanto, el aumento observado en el contenido proteico de la leche puede deberse tanto al flujo de proteínas séricas de la sangre a la leche (Stelwagen et al., 1994a; Stelwagen y Lacy-Hulbert, 1996) como al aumento en la concentración de las CN en el lumen alveolar (Stelwagen et al, 1998a) que se establece al aumentar la permeabilidad de las TJ a partir de las 18-20 h de acumulación de leche en la ubre (Stelwagen et al., 1994b, 1997).

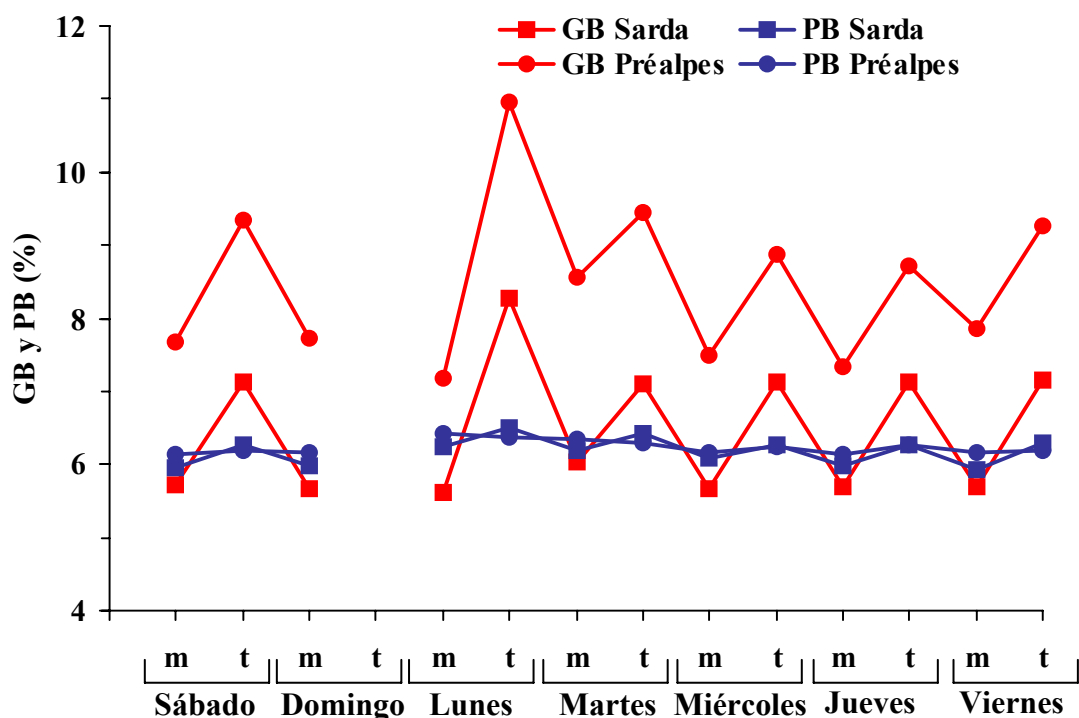
En el vacuno lechero, la supresión de un ordeño semanal no tuvo repercusiones sobre la composición de la leche a lo largo del periodo experimental (Labussière y Coindet, 1968; O'Brien et al., 2002; Ayadi et al., 2003a). En el caprino lechero, a diferencia del ovino y del vacuno, la omisión de un ordeño semanal produjo una importante disminución del porcentaje graso de la leche a lo largo de la lactación, mientras que la proteína, en cambio, se vio mínimamente afectada (Mocquot, 1978).

Al observar la variación de la composición de la leche a lo largo de los días de la semana, se detectó que las mayores fluctuaciones se produjeron en los días posteriores a la omisión del ordeño, y que la grasa fue el componente sujeto a mayores variaciones como consecuencia de las omisiones de ordeño (Figura 24).

En todos los estudios realizados en ovino en los que se valoró la variación diaria de la composición de la leche, la concentración de grasa se incrementó remarcablemente el día posterior a la omisión del ordeño (Casu y Labussière, 1972; Labussière et al., 1974a). Ahora bien, lo sorprendente fue observar que mientras que en el ordeño del lunes por la mañana el contenido en grasa fue normal, en el ordeño del lunes por la tarde el contenido en grasa aumentó de forma muy marcada. El contenido en grasa se mantuvo elevado hasta el martes por la tarde. En cambio, se puede observar que la omisión de 1 o 2 ordeños semanales no provocó efectos sobre el contenido en proteína de la leche (Figura 24).

El máximo contenido en grasa observado en la leche del lunes por la tarde, en el segundo ordeño post-omisión, se puede explicar por la recuperación de la materia grasa de la leche residual retenida el lunes por la mañana a nivel alveolar tras un largo intervalo entre ordeños (Labussière y Richard, 1965; McKusick et al., 2002a).

Figura 24. Variación diaria (mañana y tarde) del contenido en grasa (GB) y proteína (PB) de la leche al omitir el ordeño del domingo tarde en ovejás de raza Préalpes du Sud (Labussière et al., 1972) y Sarda (Casu y Labussière, 1974a).



Hervás et al. (2006), al omitir 2 ordeños semanales, también encontraron un aumento del 16% en el contenido en grasa de la leche obtenida durante el ordeño posterior a las omisiones de ordeño.

En el caprino y en el vacuno la supresión del ordeño del domingo por la tarde también produjo una elevación del contenido en grasa de la leche después de la omisión, y sobretodo en el ordeño del lunes por la tarde (Labussière y Coindet, 1968; Mocquot, 1978; Le Mens, 1978; Ayadi et al., 2003a). Los mismos autores describieron incrementos en el contenido en proteína de la leche, aunque éstos fueron mucho menores a los mostrados por el contenido en grasa.

Por tanto, parece no ser recomendable, en los rumiantes lecheros, realizar el control de producción de leche hasta pasadas un mínimo de 72 horas tras la omisión, para evitar variaciones extrañas en la composición de la leche.

5.2.3.3. Efecto sobre el recuento de células somáticas y la sanidad de la ubre

La omisión de 1 o 2 ordeños semanales no afectó negativamente a la sanidad de la ubre de las ovejás (Casu y Labussière, 1972; Labussière et al., 1974a; Huidobro, 1988; Hervás et

al., 2006), puesto que no se observó ningún caso de mamitis clínica. Sin embargo, la omisión de 1 o 2 ordeños semanales aumentó el número de leucocitos en la leche durante los 4 primeros ordeños posteriores a la omisión (Casu y Labussière, 1972). Hervás et al. (2006) detectaron incrementos de un 5% del RCS en la leche del día posterior a las 2 omisiones de ordeño, aunque el RCS medio no se vio afectado a lo largo de la lactación como consecuencia de la supresión de ordeños. Los mismos autores no observaron variaciones en las células somáticas al suprimir 1 sólo ordeño semanal.

La eliminación de 1 ordeño semanal tampoco afectó negativamente al estado sanitario de la ubre en el caprino (Le Mens, 1978), ni en el vacuno (Labussière y Coindet, 1968; Ayadi et al., 2003a).

CAPÍTULO 3: Objetivos

CAPÍTULO 3

OBJETIVOS

El **objetivo general** de este trabajo es la evaluación de distintas estrategias de ordeño, para mejorar la eficiencia productiva de las explotaciones de ovino lechero y favorecer la calidad de vida del ganadero, permitiendo la conciliación entre su vida laboral y el tiempo libre.

Para ello se han estudiado los efectos de los diversos intervalos entre ordeños sobre la secreción láctea y la sanidad de la ubre, así como de distintas estrategias de supresión de ordeños sobre la producción y la calidad de la leche. Se han utilizado animales de dos razas de ovino distintas, Manchega y Lacaune, caracterizadas por presentar diferentes niveles productivos y tamaños cisternales.

Los **objetivos específicos** fueron:

1. Efectos, a corto plazo, de diferentes intervalos entre ordeños (4, 8, 12, 16, 20, y 24 horas) en ovejas de raza Manchega y Lacaune:
 - 1.1. Sobre la secreción láctea, el RCS de la leche y la sanidad de la ubre (Capítulo 4).
 - 1.2. Sobre la permeabilidad de las TJ del epitelio mamario (Capítulo 4).
 - 1.3. Sobre la secreción y el RCS de las fracciones de leche (Capítulo 5).
 - 1.4. Acumulación de la leche en la ubre y cambios en el tamaño del compartimento cisternal (Capítulo 5).
2. Efectos de la práctica de uno frente a dos ordeños diarios, al inicio y a la mitad de la lactación, en ovejas lecheras de raza Manchega y Lacaune:
 - 2.1. Sobre la producción, la composición y el RCS de la leche (Capítulo 6).
 - 2.2. Sobre la permeabilidad de las TJ (Capítulo 6).
 - 2.3. Sobre la aptitud al ordeño y el tiempo de ordeño (Capítulo 6).
 - 2.4. Cambios en el volumen de las fracciones y en el tamaño del compartimento cisternal (Capítulo 6).
3. Efectos de suprimir dos ordeños semanales, al inicio y a la mitad de la lactación, en ovejas de raza Manchega y Lacaune:
 - 3.1. Sobre la producción, la composición y el RCS de leche a lo largo de la lactación (Capítulo 7).
 - 3.2. Sobre la evolución diaria de la producción, de la composición, del RCS de la leche, así como de la permeabilidad de las TJ mamarias (Capítulo 7).

CAPÍTULO 4: Intervalos entre ordeños en ovejas lecheras

(Milking intervals in dairy ewes)

CAPÍTULO 4

EFFECTO DEL INTERVALO ENTRE ORDEÑOS SOBRE LA SECRECIÓN DE LECHE Y LA PERMEABILIDAD DE LAS UNIONES ESTANCAS

EFFECT OF MILKING INTERVAL ON MILK SECRETION AND MAMMARY TIGHT JUNCTION PERMEABILITY IN DAIRY EWES

ABSTRACT

Twenty-four lactating ewes (Manchega, n = 12; and, Lacaune, n = 12) in mid-lactation were used to assess the short-term effects of different machine milking intervals (4, 8, 12, 16, 20 and 24 h) on milk yield, milk composition, and tight junction (TJ) permeability of mammary epitheli. Milk samples were analyzed for chemical composition, somatic cell count (SCC), and plasmin activity. Plasma lactose, and milk Na and K concentrations were used as indicators of TJ permeability. Milk accumulated linearly for up to 24 h, showing a different rate according to the milk yield of the breed (Manchega, 38 mL/h; and, Lacaune, 87 mL/h). Milking interval affected milk fat content, which decreased markedly from 4- to 24-h in both breeds, but no differences were observed in milk protein content. The milk contents of casein, true protein, lactose and total solids also varied according to milking interval. Values of SCC did not vary by breed (175×10^3 cells/mL, on average), showing the lowest \log_{10} values for the 4- and 24-h milking intervals in both breeds. Plasmin activity in milk increased with milking interval until 20 h of udder filling in both breeds, and was low but positively correlated with SCC content ($r = 0.39$). Plasma lactose increased dramatically after 20 h of milk accumulation, indicating an enhanced permeability of mammary TJ. As a result, an increase in Na concentration and in the Na:K ratio, and a decrease in K concentration, were observed in the milk of Manchega ewes. On the contrary, no differences in Na and K concentrations in milk were detected in Lacaune ewes. In conclusion, our results proved that Manchega and Lacaune dairy sheep could maintain high secretion milk rates during extended milking intervals in the short term, with no effects on udder health and few negative effects on milk yield. Increased TJ permeability, caused by the effect of udder filling, induced changes in milk composition which were more marked in Manchega than in Lacaune ewes.

INTRODUCTION

Southern European countries around the Mediterranean Basin account for more than 80% of the sheep milk collected in the world dairies (Dubeuf and Le Jaouen, 2005). Ewe milk is mainly processed for cheese, which is in increasing demand, and therefore, dairy sheep are becoming an interesting economic alternative for farmers. High producing dairy-sheep farms usually machine milk large flocks and conduct twice-daily milking throughout lactation. As a result, more than half of total daily labor in dairy sheep farms is spent on milking (Marnet and McKusick, 2001). Thus, milking is one of the main reasons that people are deterred from dairy sheep production.

The use of low milking frequency strategies could result in significant savings in labor and time spent in the milking parlor. McKusick et al. (2002a) reported a reduction of approximately 27% of total milking time, when milking frequency decreased from twice daily to thrice every 2 days, without losses in milk yield. Nevertheless, previous studies in sheep proved that milk secretion increased when milking frequency increased (Negrao et al., 2001), and that a decrease in milking frequency from twice- to once-daily reduces milk yield and alters milk composition (Morag, 1968; Labussière, 1988; Nudda et al., 2002). Mills (2004) also indicates the benefit of switching to once-a-day milking at mid-lactation, to save money on staff and energy, in high-yielding dairy ewes.

Differences in milk secretion in dairy species under extended milking intervals have been related to udder cistern size (Ayadi et al., 2003b; Salama et al., 2004) and tight junction leakiness (Stelwagen et al., 1994b; 1997). Tight junctions (**TJ**; zonulae occludentes) form part of the junctional complex between adjacent cells. They are semi-permeable extracellular structures that surround cells in a “gasket-like” manner and are located in proximity to the apical domain of the cell (Stelwagen et al., 1995). They act as a barrier between adjacent epithelial and endothelial cells, thus preventing paracellular transport and maintaining electrochemical gradient (Stelwagen et al., 1995). Permeability of TJ in lactating mammary glands increases with alveoli engorgement and switches to a leaky-state after 18 h of milk accumulation in cows (Stelwagen et al., 1997), and after 21 h in goats (Stelwagen et al., 1994b). This allows the movement of milk components into the interstitial fluid and vice versa (Stelwagen et al., 1997) and results in a decrease in milk yield (Stelwagen et al., 1995) and milk secretion (Stelwagen et al., 1994b, 1997). Lactose is not produced in any organ other than the mammary gland (Khun and Linzell, 1970) and it is not secreted basolaterally (Stelwagen et al., 1998a), so its presence in blood can only be

explained by its movement from milk into blood via leaky TJ. The use of plasma lactose as a reliable indicator of TJ permeability has been extensively studied in dairy cows and goats (Stelwagen et al. 1994b; 1995; 1997).

Although loss of TJ integrity may also be a key factor responsible for milk yield loss or milk component variation produced by milking omission in dairy ewes (McKusick et al., 2002; Nudda et al., 2002), no studies exist that prove that TJ open and if they do at what time this occurs in dairy sheep.

Extended milking intervals may also negatively affect milk composition and cheese yield as a result of increasing protease activity in milk. Plasmin (**PL**), a serine-proteinase associated to CN micelles, is the most responsible for protease activity in milk (Bastian and Brown, 1996). Stelwagen et al. (1994c) and Kelly et al. (1998) reported significant increments in the activity of PL in milk during extended milking intervals, indicating that paracellular leakage may contribute to increased protease activity in milk. Thus, losses of mammary TJ integrity may not only compromise milk yield but may also affect milk quality and cheese characteristics.

The primary aim of the present study was to elucidate if tight junctions open, and if they do at what time this occurs, in 2 different breeds of dairy sheep markedly differing in milk yield and milk composition, by varying the length of the milking interval. The secondary aim was to assess whether extended milking interval affects secretion of milk and milk components, as much as it compromises udder health.

MATERIALS AND METHODS

Animals and Management Conditions

Multiparous ewes of 2 dairy breeds (Manchega, n = 12; Lacaune, n = 12) were used in a short-term experiment done in wk 11 and 16 of lactation. Ewes with symmetrical and healthy udders were chosen from the flock of the SGCE (Servei de Granges i Camps Experimentals) of the Universitat Autònoma de Barcelona in Bellaterra (Spain), on the basis of similar stage of lactation (70 ± 3 DIM), milk yield by breed (Manchega, 1.11 ± 0.09 L/d; Lacaune, 2.32 ± 0.11 L/d) and SCC ($64 \pm 48 \times 10^3$ cells/mL) in the week previous (wk 10) to the start of the experiment. Absence of intramammary infections was checked by milk sample bacteriology according to Salama et al. (2003).

Ewes were allocated at wk 10 and 15 of lactation into 6 groups of 4 ewes each (Manchega, n = 2, and Lacaune, n = 2), and they were housed in a different barn of main flock, in order to avoid conditioned stimulation of milk letdown between planned milkings as a consequence of milking machine operation. Ewes received constant illumination to minimize diurnal and nocturnal differences. They were offered a mixture of dehydrated alfalfa and fescue hay fed ad libitum, and were supplemented with 0.8 Kg/d of concentrate mixture pellets containing 1.75 Mcal NE_L/Kg and 16.5% CP (DM basis).

Ewes were milked, after the weaning of their lambs (wk 5), in a double-12 stall parallel milking parlor (Westfalia Surge Ibérica, Granollers, Spain) equipped with recording jars and low-line milk pipeline. Milking was performed at a vacuum pressure of 42 kPa, a pulsation rate of 120 pulses/min, and a pulsation ratio of 50%. The milking routine for the regular daily milkings (0800 and 1800 h) as well as for irregular experimental milkings (daily schedule depending on experimental design; Table 1) included machine milking without udder preparation or teat cleaning, machine stripping, and teat dipping in an iodine solution (P3-ioshield, Ecolab Hispano-Portuguesa, Barcelona, Spain) after cluster removal.

Table 1. Experimental schedule for each studied group applied at wk 11 and 16 of lactation in Manchega and Lacaune dairy ewes.

Group	No. ewes	Treatment order					
		1 st	2 nd	3 rd	4 th	5 th	6 th
1	4	24 h	4 h	20 h	8 h	16 h	12 h
2	4	4 h	8 h	20 h	16 h	12 h	24 h
3	4	16 h	4 h	24 h	8 h	12 h	20 h
4	4	20 h	4 h	12 h	8 h	24 h	16 h
5	4	8 h	4 h	24 h	12 h	20 h	16 h
6	4	12 h	4 h	16 h	8 h	20 h	24 h

Experimental Procedures

The experiment consisted of a crossover with 6 milking intervals (4, 8, 12, 16, 20, and 24 h) at random, and repeated measurements in 2 test-days done in wk 11 and 16 of lactation. Milking interval schedule was applied successively without any period of washing-out between them, but milking order for groups of ewes was randomized in order to avoid possible carryover effects between experimental milking intervals (Table 1).

The experiment started (0 h) after the complete udder emptying by machine milking with the help of an i.v. injection of oxytocin (2 IU/ewe; Veterin Lobulor, Laboratorios

Andreu, Barcelona, Spain) to remove residual milk. Thereafter, one of the 6 milking interval treatments was randomly applied, and the same udder emptying procedure was repeated for each milking interval treatment.

Sampling and Analyses

Milk yield was recorded and milk samples were taken at each milking. For milk composition analysis, a sample of approximately 100 mL was collected and preserved with $K_2Cr_2O_7$ (0.3 g/L) at 4 °C. Unhomogenized milk samples were analyzed for main milk components by a near infrared spectrometer (Technicon InfraAlyzer-450, Bran+Luebbe SL, Nordersted, Germany), according to Albanell et al. (1999). For SCC, samples were preserved with an anti-microbial tablet (Bronopol, Broad Spectrum Micro-tabs II, D&F Control Systems Inc., San Ramon, CA) and kept at 4 °C until analysis. The SCC was determined in the Dairy Herd Improvement Laboratory of Catalonia (ALLIC, Cabrils, Barcelona, Spain) using an automatic cell counter (Fossomatic 5000, Foss Electric, Hillerød, Denmark).

Concentrations of Na and K in milk and of lactose in plasma were used as indicators of the leakiness of TJ. Milk samples (10 mL) were collected at each milking interval and frozen at -20 °C until analysis. Na and K content were determined using inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES) in the Chemical Analysis Service of the Universitat Autònoma de Barcelona. To determine concentrations of plasma lactose, blood samples (10 mL) of 8 experimental ewes (Manchega, n = 4, and Lacaune, n = 4) were collected from the jugular vein into heparinized tubes (Venoject, Terumo Europe, Belgium) by venipuncture for each milking-interval treatment, refrigerated at 4 °C and centrifuged at $490 \times g$ for 15 min. Plasma was collected and stored at -20 °C until analysis of lactose by use of an enzymatic assay (Lactose/D-Galactose UV-method; Boehringer Mannheim/R-Biopharm, Darmstadt, Germany) according to Stelwagen et al. (1994a).

Finally a third milk sample (10 mL) from each ewe at the first experimental period (wk 11) was collected and immediately frozen and preserved (-80 °C) until analysis of plasmin activity. Plasmin activity was determined according to Baldi et al. (1996). Assays were performed in duplicate by using 250 μ L of 0.1 M Tris-HCL buffer (pH 7.4), 0.6 mM Val-Leu-Lys-p-nitroanilide (Bachem AG, Bubendorf, Switzerland) and 30 μ L of the milk supernatant. The reaction mixture was incubated at 37 °C for 3 h and absorbance at 405 nm was recorded at 30-min intervals. A sample without supernatant served as a control for the detection of spontaneous breakdown of the substrate. The rate of p-nitroanilide formation

was calculated from the linear portion of the absorbance-versus-time curve. Plasmin was expressed as units, one unit being the amount of enzyme that produced a change in absorbance at 405 nm of 0.1 in 60 min.

Statistical Analyses

Data were analyzed by the PROC MIXED procedure for repeated measurements of SAS (SAS 9.1; SAS Inst. Inc., Cary, NC). The mixed model used included: the fixed effects of milking interval (4, 8, 12, 16, 20, and 24 h), breed (Manchega and Lacaune), group (1 to 6), period (wk 11 and 16), and order of treatment application (1st to 6th); the random effect of animal nested within the group and breed; the interactions between breed and milking interval, period and milking interval; and the residual error. Plasmin activity analysis did not include the effect of period and their interactions in the model. Differences between least square means were determined with the PDIFF test of SAS. Pearson's correlation coefficients between measurements were also calculated. Significance was declared as $P < 0.05$ unless otherwise indicated.

RESULTS AND DISCUSSION

Milk Yield and Milk Secretion Rate

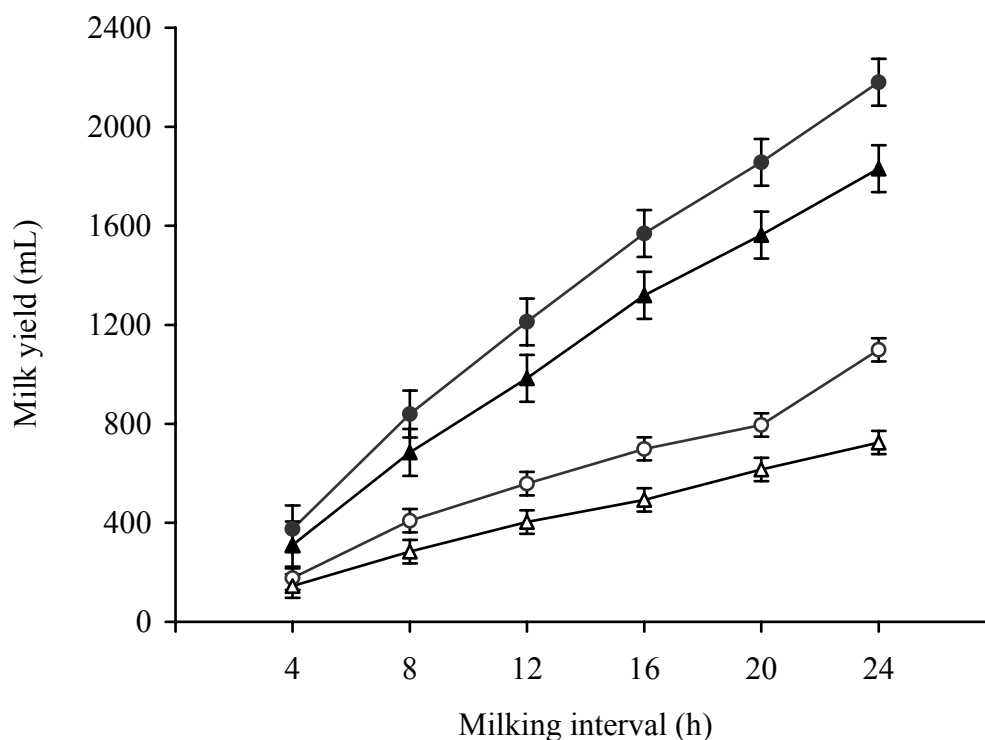
Breed and period affected ($P < 0.001$) milk yield, the Manchega ewes producing less milk than Lacaune ewes (averaged across all intervals, 0.53 vs. 1.23 L, respectively). Moreover, average milk yields in the first experimental period (wk 11) were greater ($P < 0.05$) than in the second period (wk 16) in both breeds (Manchega: 0.62 vs. 0.44 L; Lacaune: 1.34 vs. 1.15 L, respectively). Our results agreed with those of Such et al. (1995) and Rovai (2001), who showed a marked difference in potential for milk production between the two breeds and a significant diminution in daily milk yield as lactation advanced.

Milk yield was also affected ($P < 0.001$) by milking interval, and accumulated linearly ($P < 0.05$) up to 24 h in both breeds (Figure 1). Milk accumulation in the udder between milkings was described by the following equations (y = milk yield, mL; x = time after udder milking, h; average of both experimental periods):

$$\text{Manchega: } y = 37.5 \cdot x \quad (R^2 = 0.98)$$

$$\text{Lacaune: } y = 86.6 \cdot x \quad (R^2 = 0.99)$$

Figure 1. Effect of different milking intervals (4, 8, 12, 16, 20, and 24 h) on milk yield at wk 11 (○, ●) and 16 (△, ▲) of lactation in Manchega (in white) and Lacaune (in black) dairy ewes. Values are Least Squares Means. ^{a-c}Means within the same breed with different letters differ at $P < 0.05$. Vertical bars represent SEM. Milk yield (mL) = $a \times$ time after milking (h); where $a = 44.0, 31.1, 94.3$ and 78.9 in (○), (△), (●), and (▲), respectively; $R^2 = 0.99$ for all equations.

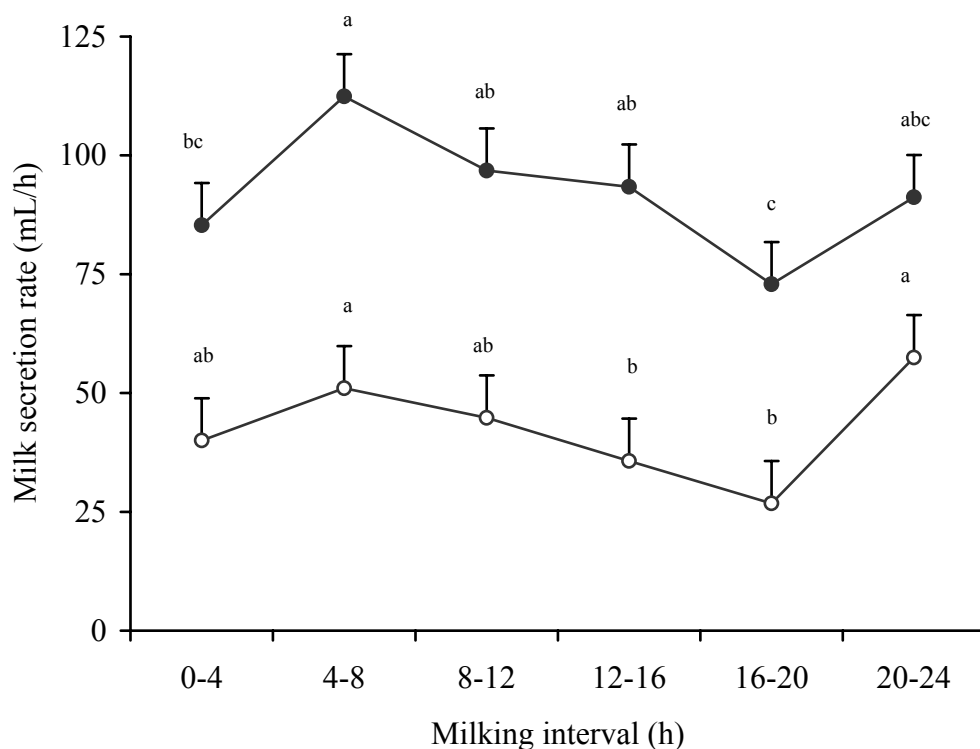


The lineal pattern of milk accumulation according to milking interval obtained in Manchega and Lacaune ewes agreed with earlier observations in other dairy ewe breeds (McKusick et al., 2002a) and dairy goats (Salama et al., 2004). Milk accumulation rate depended on the milk yield potential of the breed ($P < 0.001$), being greater in Lacaune than in Manchega ewes (87 vs. 38 mL/h; $P < 0.05$). In addition, the lineal milk accumulation was greater ($P < 0.05$) in wk 11 than in wk 16 (Figure 1), showing that milk secretion rate decreased throughout lactation. In both breeds, milk accumulation rate reached the greatest value at 8-h milking interval and the lowest one at 20 to 24 h (data not shown), indicating a secretion rate saturation effect with time, as reported in dairy ewes (McKusick et al., 2002a), goats (Salama et al., 2003), and cows (Knight et al., 1994a; Ayadi et al., 2003b). The reduction of milk accumulation rate, after reaching the maximum value, was more marked ($P < 0.05$) in Manchega than in Lacaune ewes (-20% and -11%, respectively, from 8

to 20-h milking interval), suggesting that Lacaune ewes tolerate extended milking intervals better than Manchega ewes.

In order to evaluate variations in milk secretion, we calculated milk secretion rate throughout each 4-h milking interval (Figure 2). Milk secretion rate reached the greatest values in the 4 to 8 h milking interval (Manchega: 51 mL/h, Lacaune: 112 mL/h) and decreased as time after milking increased. The lowest milk secretion values (Manchega: 27 mL/h, Lacaune: 73 mL/h) were obtained in the 16 to 20 h milking interval.

Figure 2. Milk secretion rates per milking interval in Manchega (○) and Lacaune (●) dairy ewes. Values are Least Squares Means. ^{a-c}Means within the same breed with different letters differ at $P < 0.05$. Vertical bars represent SEM.



Extended milking intervals in the present experiment were conducted in the short term, so reduction of milk secretion rate might be due to changes in the TJ permeability (Stelwagen et al., 1995) and increments of intra-alveolar pressure (Davis et al., 1999) or to the increase in the concentration of the putative feedback inhibitor of lactation in the mammary gland (Wilde et al., 1995).

Although lower milk secretion rates were expected for the 20- to 24-h milking interval, our results (Figure 2) showed a dramatic increase in milk secretion rate in Manchega (+115%, $P < 0.05$) and Lacaune (+25%, $P = 0.06$) after 20 h. This unexpected increment for

long milking intervals has not been previously reported and could be attributed to TJ leakiness, which might allow the flow of interstitial fluid into milk, generating an “apparent milk” secretion in both breeds. This increase in milk secretion after TJ opening agrees with the increase of milk secretion rate reported in dairy goats after inducing the disruption of mammary TJ with ethylene glycol-tetraacetic acid (Stelwagen et al., 1995).

Although the entrance of interstitial fluid into milk occurred in both breeds, the increase in milk secretion rate for the 20- to 24-h milking intervals was less evident in Lacaune than in Manchega ewes. Udders with large cisterns produce more milk and are more tolerant to longer milking intervals in ewes (Labussière, 1988; Rovai, 2001), goats (Salama et al., 2003) and cows (Knight and Dewhurst, 1994). Therefore, damage of TJ, and probably of mammary epithelial cells, should be less marked in Lacaune ewes, which are characterized by larger cistern volume and greater cistern milk fraction than Manchega ewes (68% vs. 53%, respectively, Rovai, 2001).

Milk Composition

Percentages of milk components (Table 2), except lactose, were affected by breed ($P < 0.001$). Early research on comparison of Manchega and Lacaune dairy ewes (Such et al., 1995; Rovai, 2001) reported that milk of the first contains more fat and protein than milk of Lacaune.

In the short term, milking interval affected ($P < 0.05$) the percentages of fat, CN, true protein, lactose and TS in milk. Milk fat content was the most markedly affected component in both breeds, decreasing ($P < 0.05$) with longer milking intervals. These results are in accordance with the previous observations of McKusick et al. (2002a) in a short-term experiment also done in dairy ewes. Changes in fat content according to milking interval are related to the regulatory mechanisms for secretion of big and high viscosity milk fat globules relative to the components in the aqueous phase of milk (Davis et al., 1999).

Although milk protein content numerically increased at a low rate with milking interval, between 4 and 20 h, the effect was not significant for the whole 24-h period. This was a consequence of the decrease observed in milk protein content for the last 20 to 24 h milking interval, which contrasted with the increase in milk protein content in dairy ewes for the 24 h milking interval reported by McKusick et al. (2002a).

Table 2. Short-term effects of milking interval on milk yield and milk composition in Manchega and Lacaune dairy breed ewes.¹

Item	Milking intervals (h)						SEM
	4	8	12	16	20	24	
Milk yield, mL							
Manchega	157 ^f	344 ^e	484 ^d	609 ^c	701 ^b	904 ^a	66
Lacaune	345 ^f	761 ^e	1,098 ^d	1,436 ^c	1,712 ^b	2,012 ^a	66
Milk composition, %							
Fat							
Manchega	8.52 ^{a,x}	8.22 ^{ab,x}	8.01 ^{ab,x}	7.94 ^{bc,x}	7.58 ^{c,x}	6.97 ^{d,x}	0.23
Lacaune	7.50 ^{a,y}	6.70 ^{b,y}	6.61 ^{b,y}	6.41 ^{b,y}	6.30 ^{b,y}	5.86 ^{c,y}	0.22
Protein							
Manchega	6.07 ^x	6.26 ^x	6.32 ^x	6.36 ^x	6.48 ^x	6.24 ^x	0.11
Lacaune	5.68 ^y	5.59 ^y	5.68 ^y	5.68 ^y	5.73 ^y	5.59 ^y	0.11
Casein							
Manchega	4.54 ^{c,x}	4.78 ^{b,x}	4.87 ^{ab,x}	4.90 ^{ab,x}	5.02 ^{a,x}	4.81 ^{b,x}	0.09
Lacaune	4.31 ^y	4.30 ^y	4.38 ^y	4.36 ^y	4.40 ^y	4.26 ^y	0.09
True protein							
Manchega	5.58 ^{c,x}	5.79 ^{bc,x}	5.84 ^{b,x}	5.87 ^{ab,x}	6.04 ^{a,x}	6.02 ^{ab,x}	0.12
Lacaune	5.24 ^{abc,y}	5.07 ^{c,y}	5.37 ^{ab,y}	5.28 ^{b,y}	5.47 ^{a,y}	5.32 ^{ab,y}	0.11
Lactose							
Manchega	4.72 ^{ab}	4.76 ^{ab}	4.77 ^a	4.83 ^a	4.81 ^a	4.68 ^b	0.19
Lacaune	4.82 ^a	4.74 ^{ab}	4.76 ^{ab}	4.72 ^{ab}	4.75 ^{ab}	4.68 ^b	0.26
Total solids							
Manchega	21.5 ^{a,x}	20.5 ^{ab,x}	20.0 ^{b,x}	20.1 ^{b,x}	19.6 ^{bc,x}	18.9 ^{c,x}	0.45
Lacaune	18.9 ^{a,y}	17.6 ^{b,y}	17.6 ^{b,y}	17.6 ^{b,y}	17.6 ^{b,y}	17.1 ^{b,y}	0.43
SCC, log ₁₀ cells/mL							
Manchega	5.14 ^b	5.53 ^a	5.35 ^b	5.39 ^{ab}	5.32 ^b	5.23 ^b	0.10
Lacaune	5.05 ^b	5.26 ^a	5.28 ^a	5.13 ^{ab}	5.15 ^{ab}	5.08 ^b	0.10

¹ Values are Least Squares Means.

^{a-f} Means with different superscripts within row differ ($P < 0.05$).

^{x,y} Means with different superscripts within a column for each component differ ($P < 0.05$).

The CN does not move through leaky mammary TJ and slightly increased as milk secretion progressed by effect of a concentration process. Nevertheless, for the last 20 to 24 h milking interval, a decrease in CN content was also detected in our results, the effect not being significant in the case of Lacaune ewes. This change, like those observed in milk protein content, could be related to the TJ leakiness and to the passage of interstitial fluid to the milk, resulting in a dilution effect on CN, and therefore on total protein.

In both breeds, true protein content increased with milking interval, reached the greatest value at 20-h milking interval and stabilized thereafter. True protein in milk contains the proteins that are synthesized in the mammary gland (e.g., CN) and the serum proteins that enter the milk when mammary TJ are disrupted. Therefore, in our experiment, the increase in true protein content at extended milking intervals was probably due to an increment in

serum proteins in milk caused by the loss of mammary TJ integrity. The entrance of serum proteins (e.g., serum albumin) into milk as a consequence of mammary TJ disruption was previously observed in dairy cows milked once daily (Stelwagen et al., 1994a; 1997).

Milk fat content was low at longer milking intervals and milk protein content did not significantly vary, which contrasts with results obtained from long-term experiments, where reducing milking frequency from 2 to 1 milking daily resulted in greater fat and protein contents in all breeds of ewes tested: Tsigay, Karagouniko, Lacaune, Sarda, Manchega, and Churra (Labussière, 1983). When extended milking interval is performed for long periods, the animal adapts to this situation by decreasing milk yield and concentrating milk components. Nevertheless, milking intervals tested in the current study were performed for short-term periods, which may explain the discrepancy between short- and long-term studies.

Lactose content dramatically changed and was lowest ($P < 0.05$) at the 24-h milking interval in Manchega and Lacaune ewes. This is in agreement with previous findings in Awassi and Merino ewes (Nudda et al., 2002), where a decrease in lactose content was observed in animals exposed to once-daily milking for a short period. Lactose in milk of Manchega ewes decreased (-3%, $P < 0.05$) from 20- to 24-h milking interval, but the effect was not significant in Lacaune ewes (-1.5%). Decreases of milk lactose percentage seem to be due to lactose passing from milk into blood through impaired TJ (Stelwagen et al., 1994a, b; 1995) associated with extended milking intervals.

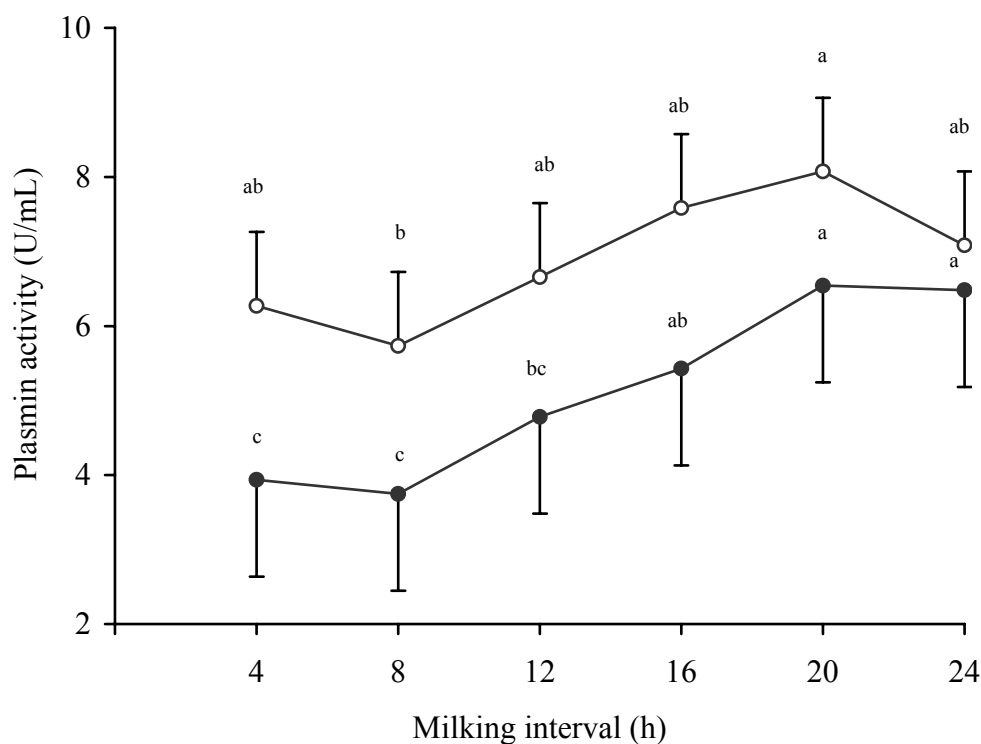
As milking interval increased, the yield of milk components augmented significantly in both breeds in accordance with the increase in milk yield (data not shown).

Regarding milk SCC, it was similar ($P > 0.10$) between ewes of both breeds, which showed a very low level of SCC at all milking intervals tested (211 and 144×10^3 cells/mL on average, respectively), indicating that sheep udders were healthy, and were not affected by different milking intervals in a short period. Nevertheless, milk SCC values (Table 2) varied slightly ($P < 0.001$) with milking interval. The greatest logSCC in milk was observed at 8-h milking interval in Manchega and at 8 to 12 in Lacaune, probably due to a concentration effect. Our results are in agreement with other studies conducted in dairy ewes (McKusick et al., 2002a) and in dairy goats (Salama et al., 2003), where milk obtained at short milking intervals had slightly greater logSCC values.

Plasmin Activity

The milk PL activity for the experimental milking intervals was similar in both breeds (Figure 3) and averaged 6.90 ± 0.86 units/mL in Manchega and 5.15 ± 1.24 units/mL in Lacaune ewes. Our data are lower than those found for ewes' milk in previous studies (Bianchi et al., 2004; Albenzio et al., 2005). These differences could be at least partially explained by diversity of SCC levels and stages of lactation of the animals used in each experiment, since PL activity in ewes' milk was reported to be markedly affected by SCC and stage of lactation (Albenzio et al., 2004; 2005; Bianchi et al., 2004).

Figure 3. Plasmin activity at 4-, 8-, 12-, 16-, 20-, and 24-h milking interval in Manchega (○) and Lacaune (●) dairy ewes. Values are Least Squares Means. ^{a-c}Means within the same breed with different letters differ at $P < 0.05$. Vertical bars represent SEM.



Milking interval affected ($P < 0.05$) PL activity in the milk of both breeds, which is in agreement with results shown in dairy cows by Stelwagen et al. (1994c) and Kelly et al. (1998), where the increase of milking interval significantly incremented PL activity. However, Klei et al. (1997) and O'Brien et al. (2002) did not find significant effects of different milking frequencies on PL concentrations in dairy cows.

In our case, PL activity increased with milking interval up to 20 h for both ewe breeds and stabilized thereafter. The PL activity may be augmented either by increasing leakage

from blood or by conversion of plasminogen from blood to plasmin in milk (Politis et al., 1989). It appears likely that, in our study, the increase in PL activity is the result of an enhanced influx of enzyme from the blood to the milk across damaged TJ, when extended milking intervals were performed (see discussion below).

A low and negative correlation between milk yield and PL activity ($r = -0.18$; $P < 0.05$) was observed. This may be related to the fact that ewes with greater milk yield usually have larger cisterns and are more tolerant to longer milking intervals (Labussière, 1988; Rovai, 2001). Therefore, it is possible that they do not suffer a high TJ leakiness and consequently, the plasminogen and plasmin entrance from the blood into the milk in large-cisterned ewes is less marked than in ewes with smaller cisterns.

On the contrary, positive correlations were observed between PL and SCC ($r = 0.39$; $P < 0.001$) in agreement with previous findings in sheep (Albenzio et al., 2004), bovine (Politis et al., 1989; Baldi et al., 1996), and goat milk (Fantuz et al., 2001). Milk protein ($r = 0.40$; $P < 0.001$), CN ($r = 0.37$; $P < 0.001$), and true protein ($r = 0.40$; $P < 0.001$) contents also correlated positively with PL activity. It is well known that plasminogen and plasminogen activators are associated with CN micelles (Richardson, 1983). Thus, it may be hypothesized that the higher the CN content, the greater the amount of plasminogen activator that remains bound into the micelles and converts the plasminogen to PL (Albenzio et al., 2004).

Tight Junction Permeability

Results described above suggest the impairment of TJ as one of the main causes of variations in milk secretion rate and milk composition when extended milking intervals are performed. In order to confirm this hypothesis, lactose concentration in plasma and mineral concentration (Na and K) in milk were used as indicators of the state of TJ (Figure 4 and Table 3) as indicated by Stelwagen et al. (1994a, b).

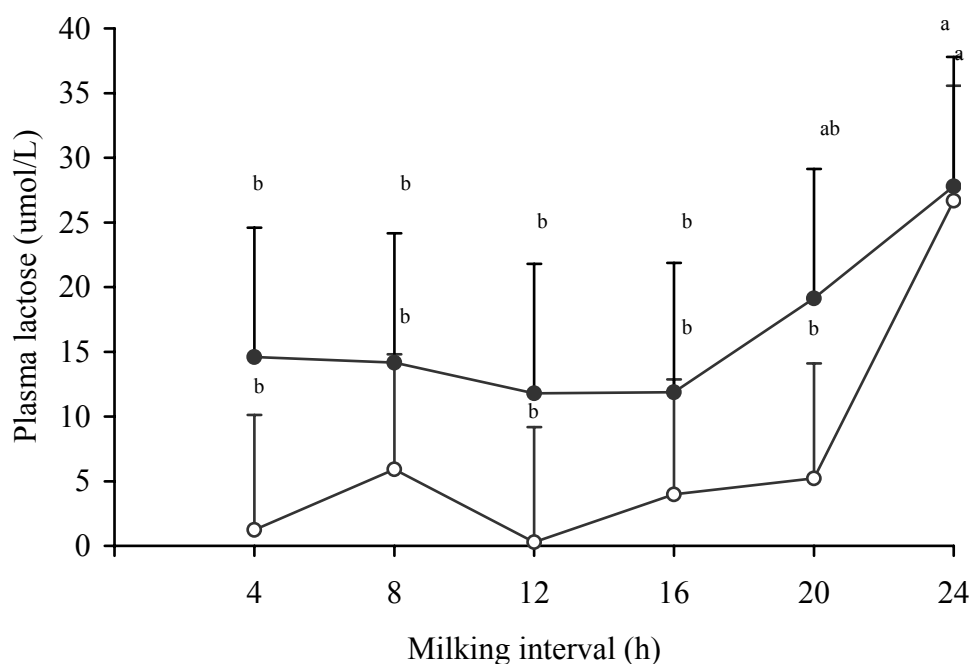
Lactose in plasma was considered the main indicator of mammary TJ permeability in the present study because changes in Na and K concentrations may simply reflect an alteration in the transport of these ions across transcellular rather than paracellular pathways.

Our results did not show interbreed differences in lactose concentration in plasma (Manchega: 7.2 ± 9.9 and Lacaune: 16.6 ± 9.9 $\mu\text{mol/L}$; $P = 0.35$) due to the high variability of lactose analyses. Basal levels of plasma lactose were also calculated based on 4-, 8- and

12-h milking interval values, being $2.5 \pm 1.1 \mu\text{mol/L}$ for Manchega and $13.5 \pm 3.8 \mu\text{mol/L}$ for Lacaune ewes. Despite the large difference observed by breed, basal values did not differ ($P = 0.25$).

Stage of lactation tended to affect ($P = 0.07$) the concentration of lactose in plasma. Average concentration of lactose at wk 11 ($15.7 \pm 5.3 \mu\text{mol/L}$) tended to be greater than at wk 16 ($8.1 \pm 5.3 \mu\text{mol/L}$). In the first experimental period, udder distention was greater than in the second one due to the greater milk production. This fact seemed to favor the TJ impairment during this period.

Figure 4. Plasma lactose concentrations obtained 4, 8, 12, 16, 20, and 24 h after the last milking. Values are least square means \pm SEM for 8 dairy ewes of Manchega ($n = 4$) (\circ) and Lacaune ($n = 4$) (\bullet) breed. Values are Least Squares Means. ^{a-b}Means within the same breed with different letters differ at $P < 0.05$. Vertical bars represent SEM.



Milking interval affected ($P < 0.01$) lactose concentration in plasma (Figure 4). In both breeds the concentration of lactose in plasma steadied until 20 h, when it dramatically increased. From 20 to 24-h interval, plasma lactose in Manchega increased by 5-fold (5.2 to $26.7 \mu\text{mol/L}$; $P < 0.01$), whereas in Lacaune it increased by only 1.5-fold (19.1 to $27.8 \mu\text{mol/L}$; $P = 0.28$), indicating that the TJ leakiness effect was greater in Manchega than in Lacaune. Our results showed that TJ became disrupted after 20 h of udder filling in dairy

ewes, but this effect was more marked in Manchega ewes. No previous data are available on the timing of TJ opening during extended milking intervals in dairy ewes.

In previous studies, TJ were leaky after 20 h in dairy goats (Stelwagen et al., 1994b), whereas in dairy cows (Stelwagen et al. 1997) TJ were leaky earlier (18 h), in accordance with the lower cisternal capacity in dairy cows compared to goats.

Table 3. Effect of different milking intervals (4, 8, 12, 16, 20, and 24 h) on the concentration of Na, K and the Na to K ratio in the milk of Manchega and Lacaune breed.¹

Item	Milking intervals (h)						SEM
	4	8	12	16	20	24	
Na, mmol/L							
Manchega	19.47 ^c	19.86 ^c	19.91 ^c	20.88 ^c	22.18 ^b	23.73 ^a	1.23
Lacaune	16.85	16.01	16.23	17.06	16.62	16.75	1.23
K, mmol/L							
Manchega	28.79 ^{bc}	30.90 ^a	30.90 ^a	29.08 ^{bc}	30.35 ^{ab}	28.41 ^c	0.97
Lacaune	33.14	35.30	35.39	35.53	35.36	34.70	0.97
Na:K							
Manchega	0.70 ^{bc}	0.65 ^c	0.66 ^c	0.76 ^b	0.76 ^b	0.86 ^a	0.05
Lacaune	0.52	0.46	0.46	0.49	0.49	0.50	0.05

¹Values are Least Squares Means.

^{a-c} Means with different superscripts within row differ ($P < 0.05$).

Ewe breed affected ($P < 0.01$) Na and K concentration in milk (Table 3). Manchega showed on average greater Na concentration (21.0 ± 1.2 vs. 16.6 ± 1.2 mmol/L; $P < 0.01$) and lower K concentration (29.7 ± 0.8 vs. 35.0 ± 0.8 mmol/L; $P < 0.001$) than Lacaune ewes. Interaction breed \times milking interval was significant ($P < 0.05$) for Na concentration and Na:K ratio. The Na concentration in milk for Manchega ewes steadied until 20 h, increasing markedly thereafter (Table 3). Milking interval did not modify Na content in milk for Lacaune ewes. Only slight changes were observed for K values in milk of Manchega, obtaining the lowest at 24-h interval in Manchega. No changes were observed for Lacaune ewes. Moreover, a greater Na:K ratio in the milk was observed at extended milking intervals in Manchega ewes, while in Lacaune this ratio was constant (Table 3). The Na and K balance between alveolar and blood compartments is controlled by TJ. Therefore, an increase in Na concentration and Na:K ratio in milk of Manchega should be a consequence of TJ opening at extended milking intervals, in accordance with the increased plasma lactose values observed (Figure 4). To our knowledge, this finding has not been reported before in dairy sheep. Despite the TJ leakiness after 20 h in Lacaune ewes (Figure 4), no changes in Na and K concentrations were detected at extended milking intervals. The

degree of TJ leakiness in Lacaune ewes was not sufficient to induce significant changes in ion transport from blood to milk and vice versa. The higher Na:K ratio in the milk from udders milked less frequently in Manchega breed in our study agreed with previous reports in dairy goats (Stelwagen et al., 1994b; 1997) and in dairy cows (Lacy-Hulbert et al., 1999).

Stelwagen et al. (1999) showed that the adverse effects of Na variations on milk secretion were not due to a high intracellular concentration of Na *per se*. Thus, either an increase or a reduction in the Na:K ratio was related to a low milk secretion. Therefore, in our experiment, the increment of the Na:K ratio after the 16-h milking interval in Manchega ewes, could also explain the decrease of milk secretion rate observed at 20 h of udder filling (Figure 2). Furthermore, the fact that variations of the ion concentration only took place significantly in the Manchega ewe milk, allow us to conclude on the lower capacity of adaptation of Manchega udders to extended milking intervals, and on a greater TJ weakening in comparison with Lacaune ewes.

CONCLUSIONS

Manchega and Lacaune dairy ewes were able to tolerate extended milking intervals during short-term experiments, maintaining lineal increases of milk production up to 24 h of udder filling with no negative effects on udder health. However, milk secretion rate and milk composition varied in extended milking intervals, especially in the case of milk fat and milk lactose, partially as a consequence of paracellular leakage across the mammary epithelium. Furthermore, the present experiment demonstrates that TJ disruption occurs in dairy sheep after 20 h of milk accumulation, as earlier reported in goats. However, degree of TJ leakiness differed according to breed, being more pronounced in Manchega (small udder cisterns) than in Lacaune ewes (large udder cisterns). Dairy ewes could support 20 h of udder filling without negative effects on milk yield or milk composition, making possible the use of once-a-day or occasional milking omission schedules. Nevertheless, further long-term studies are required.

CAPÍTULO 5: Fraccionamiento de la leche en la ubre
(Milk partitioning in the udder)

CAPÍTULO 5

CAMBIOS INDUCIDOS POR EL INTERVALO ENTRE ORDEÑOS SOBRE LOS COMPARTIMENTOS ALVEOLAR Y CISTERNAL EN OVINO LECHERO

CHANGES IN ALVEOLAR AND CISTERNAL COMPARTMENTS INDUCED BY MILKING INTERVAL IN THE UDDER OF DAIRY EWES

ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate the effects of milking interval (4, 8, 12, 16, 20, and 24 h) on cisternal size and milk partitioning (cisternal and alveolar) in the udders of dairy ewes. Twenty-four dairy ewes (Manchega, n = 12; and Lacaune, n = 12) were used in a 2-wk experiment during mid-lactation. Cisternal and alveolar milk yields were measured for all milking intervals and milk samples from each udder fraction were collected for analysis. Cisternal milk was machine milked after i.v. injection of an oxytocin receptor antagonist, and alveolar milk was obtained after i.v. injection of oxytocin. Enlargement of cisternal compartment due to milking intervals was measured by ultrasonography for each half udder. Volumes of cisternal and alveolar milk differed according to breed, being greater in Lacaune than in Manchega ewes. Alveolar milk increased linearly up to 16 h in Manchega and 20 h in Lacaune, and remained constant thereafter. Cisternal milk accumulated linearly up to 24 h milking interval in both breeds, demonstrating the ability of the cistern to dilate as a result of milk transfer from the alveolar to the cisternal compartment. Cisternal area increased as milking interval increased, reaching a plateau at 20-h in Manchega (21 cm²) and 16-h in Lacaune (37 cm²). Correlation between cisternal area and cisternal milk was highest at 8 h (Manchega: r = 0.70 and Lacaune: r = 0.56), which was conditioned by probe depth capability. Cisternal area also correlated with total milk, indicating that ultrasonography could be used for predicting milk yield in dairy ewes. Milk fat content varied markedly with milking intervals, increasing in alveolar milk (until 12 h in Manchega; and 20 h in Lacaune) and decreasing until 24 h in cisternal milk. Milk protein content increased in alveolar milk but steady in cisternal milk. Milk lactose content only varied in the 24-h milking interval in Manchega, in which decreased dramatically as a result of tight junction leakiness. In conclusion, our

results suggest that ewe cisterns played an important role in accommodating secreted milk when extended milking intervals were performed. Thus, long milking intervals could be a recommendable strategy for large-cisterned dairy sheep. Evidence suggests that ultrasonography provides accurate estimations of udder cistern size and could be used as an indicator for the selection of large-cisterned dairy ewes.

INTRODUCTION

In dairy ruminants, secreted milk is stored extracellularly within the anatomical udder compartments: alveolar compartment, which stores secreted milk within the lumen of alveolar tissue and empties its content only if milk letdown occurs; and, cisternal compartment, which receives milk drained from the alveolar compartment and stores it in large ducts and in gland and teat cisterns, and which is immediately available for removal. Milk partitioning between both compartments varies according to species, breed, age, stage of lactation and milking interval, and helps to explain the change of milk yield and milk composition that occurs when milking interval is extended to 24 h. McKusick et al. (2002a) reported in dairy ewes the changes observed in milk yield and milk composition in each compartment up to 24 h after milking.

The study of the anatomical structure of the mammary gland, and the pattern of milk accumulation and storage, are useful for improving milk yield, milking ability and adaptation to extended milking intervals in dairy ruminants. Animals that store a larger proportion of milk in the gland cistern produce more milk, and are more able to tolerate extended milking intervals than those that store larger proportion of milk in the alveolar compartment (Knight and Dewhurst, 1994; Davis et al., 1998; Salama et al., 2004). Dewhurst and Knight (1994) indicate that cows with small cisterns show a greater response when milking frequency increased from twice- to thrice-daily milking. Moreover, stripping can be suppressed in large-cisterned ewes with few effects on milk yield and a dramatic reduction in milking time (Labussière et al., 1988).

Ultrasonography allows the non-invasive exploration of the internal structure of the mammary gland and has been used for measuring cisternal size in ewes (Bruckmaier and Blum, 1992; Ruberte et al., 1994; Nudda et al., 2000), goats (Bruckmaier and Blum, 1992; Salama et al., 2004), cows (Bruckmaier and Blum, 1992; Ayadi et al., 2003a; Caja et al., 2004), and buffaloes (Thomas et al., 2004). Several studies have shown that ultrasonography could be useful for studying udder changes to accommodate milk during

different milking intervals and after milk letdown in cows (Ayadi et al., 2003b, Caja et al., 2004) and goats (Salama et al., 2004). However, as far as we know ultrasonography has not been used before to evaluate cisternal size changes when different milking intervals are performed in dairy ewes.

The main objective of this experiment was to study the effect of milking intervals on cisternal size and milk partitioning in the udder of 2 dairy ewe breeds (Manchega and Lacaune) differing in lactational performance. Composition of milk obtained from each udder compartment was also evaluated at different milking intervals. The experiment also allowed us to validate the udder scanning methodology in ewes of different cistern sizes and at different intervals after milking.

MATERIALS AND METHODS

Animals and Management Conditions

A total of 24 adult lactating dairy ewes of 2 breeds (Manchega, $n = 12$, 70.2 ± 2.4 kg BW; and, Lacaune, $n = 12$, 75.5 ± 2.2 kg BW) with symmetrical and healthy udders (SCC, $64 \pm 48 \times 10^3$ cells/mL; < 5 cfu/mL), from the experimental farm of SGCE (Servei de Granges i Camps Experimentals) of the Universitat Autònoma de Barcelona in Bellaterra (Spain) were used in a short-term experiment performed in wk 11 and 16 of lactation.

Ewes had similar stage of lactation (70 ± 3 DIM) and milk yield by breed (Manchega, 1.11 ± 0.09 L; and, Lacaune, 2.32 ± 0.11 L), in the week previous (wk 10) to the start of the experiment. Ewes were allocated at wk 10 and 15 of lactation into 6 groups of 4 ewes each (Manchega, $n = 2$, and Lacaune, $n = 2$), and were housed, fed and managed as described previously in Chapter 4.

Ewes were milked in a double-12 stall parallel milking parlor (Westfalia Surge Ibérica, Granollers, Spain), set to 42 kPa, 120 pulses/min, and 50% pulsation ratio, and equipped with recording jars and low milk pipeline. Before the experiment, animals were regularly milked twice daily (0800 and 1800 h) and the regular milking included machine milking without udder preparation or teat cleaning, machine stripping, and teat dipping in an iodine solution (P3-ioshield, Ecolab Hispano-Portuguesa, Barcelona, Spain).

Experimental Procedure

The experimental procedure consisted of a crossover with 6 milking intervals (4, 8, 12, 16, 20, and 24 h) at random, and repeated measurements made on 2 separate test-days, one in wk 11 and one in wk 16 of lactation. Milking interval schedule was applied successively without any period of washing-out between them, but milking order for groups of ewes was randomized in order to avoid possible carryover effects between experimental milking intervals (see Chapter 4 for details).

The experiment started (0 h) after the complete udder emptying by machine milking with the help of an i.v. injection of oxytocin (2 IU/ewe; Veterin Lobulor, Laboratorios Andreu, Barcelona, Spain) to remove residual milk. Thereafter, one of the 6 milking interval treatments was randomly applied, and the same udder emptying procedure was repeated for each milking interval treatment.

Scanning Methodology

To prevent undesired milk letdown during scanning and to enable recording of cisternal and alveolar milk fractions separately, each ewe was injected i.v. with 0.8 mg/ewe of atosiban, an oxytocin receptor blocking agent (Tractocile 7.5 mg/mL, Ferring, Spain) while in its pens before being taken to the milking parlor. Cisternal size was evaluated for each half udder by measuring cisternal area by ultrasonography. Ultrasonography was conducted using a real time B-mode ultrasonograph (Ultra Scan 900, Ami Medical Alliance Inc., Montreal, Canada) equipped with a 5-MHz sectorial probe (2 dB power, 80° scanning angle, 0.5 mm axial and 1.5 mm lateral resolution). Exploration depth was 14 cm. The probe was placed directly against the upper part of the medium suspensory ligament, caudally to the udder, and between the inguinal lymph nodes (Ruberte et al., 1994a; Rovai, 2001) using the teat as scan axis. Contact gel (Geleco, Laboratorios Carreras, Barcelona, Spain) was applied to udder skin to exclude air between probe and udder. Scans were done for each udder half and transferred to a personal computer for image analysis. Cisternal area was calculated in triplicate for each scan using image treatment software (MIP4 Advanced System, Microm España, Barcelona, Spain). Area in pixels was converted to cm² using a conversion rate of 1,024 pixels/cm².

As the calculated half life of atosiban is approximately 18 min (Wellnitz et al., 1999), a single dose was sufficient to prevent milk letdown while ewes were moved to the milking parlor (approximately 4 min) to perform scans on both half udders (approximately 5 min) and to evacuate cisternal milk by machine milking (less than 2 min).

Approximately 20 min after the atosiban injection, ewes were injected i.v. with 2 IU of oxytocin and machine-milked to obtain letdown alveolar milk.

Sampling and Analyses

For each milking and milking fraction, volume of milk was recorded and milk samples were collected. Samples of approximately 100 mL were preserved with $K_2Cr_2O_7$ (0.3 g/L) at 4°C until analysis of milk composition. Unhomogenized milk samples were analyzed with a near infrared spectrometer (Technicon InfraAlyzer-450, Bran+Luebbe SL, Nordersted, Germany) for content of total solids, fat, crude protein ($N \times 6.38$), true protein, casein, and lactose according to Albanell et al. (1999). Samples for SCC were preserved with an anti-microbial tablet (Bronopol, Broad Spectrum Micro-tabs II, D&F Control Systems Inc., San Ramon, CA) and kept at 4°C until analysis. The SCC was determined in the Dairy Herd Improvement Laboratory of Catalonia (Allic, Cabrils, Barcelona, Spain) using an automatic cell counter (Fossomatic 5000, Foss Electric, Hillerød, Denmark).

Statistical Analysis

Results were analyzed by the PROC MIXED procedure for repeated measurements of SAS (version 8.2). The mixed model used included: the fixed effects of milking interval (4, 8, 12, 16, 20, and 24 h), breed (Manchega and Lacaune), milk fraction (cisternal and alveolar), group (1 to 6), period (wk 11 and 16), and order of treatment application (1st to 6th); the random effect of animal nested within group and breed; the interactions breed \times milking interval, milk fraction \times milking interval, period \times milking interval, breed \times milk fraction, and period \times milk fraction; and, the residual error. Differences between least square means were determined with the PDIFF test of SAS and significance was declared at $P < 0.05$. Pearson's correlation coefficients between measurements were also calculated. Significance was declared as $P < 0.05$ unless otherwise indicated.

RESULTS AND DISCUSSION

Milk Volumes and Milk Partitioning in the Udder

Volumes of cisternal and alveolar milk were greater ($P < 0.001$) in Lacaune compared to Manchega ewes. Averaged values across all intervals were (Lacaune vs. Manchega): cisternal milk, 888 vs. 316 mL; and, alveolar milk, 338 vs. 218 mL, respectively. These

values are in accordance with those previously reported by Rovai (2001) in the same breeds. Experimental period also affected ($P < 0.001$) volumes of cisternal and alveolar milk in both breeds, being greater ($P < 0.05$) in the first period (wk 11) than in the second (wk 16). Average values for cisternal milk (680 vs. 525 mL) and alveolar milk (300 vs. 256 mL) decreased 23 and 15%, respectively.

Volumes of cisternal and alveolar milk also varied ($P < 0.001$) according to milking interval (Figure 1). Cisternal milk increased ($P < 0.05$) linearly until 24 h of udder filling (Figure 1a) in both breeds. Alveolar milk also increased linearly ($P < 0.05$) until 16 h in Manchega and 20 h in Lacaune dairy ewes, and tended ($P < 0.10$) to increase thereafter (Figure 1b). Thus, alveolar compartment, in contrast to cisternal compartment, saturated earlier in both breeds. These results agree with the pattern of milk accumulation for extended milking intervals reported in dairy ewes (McKusick et al., 2002a) and in dairy goats (Salama et al., 2004) whose alveolar milk reached a plateau 20 and 16 h after milking, respectively. These authors also reported that cisternal milk increased continuously until 24 h, either in ewes or goats.

Accumulation pattern of cisternal and alveolar milk volumes during the 4 to 24-h milking interval was also studied through regression analysis. The best determination coefficients were obtained for linear regression, the equations (y , mL of milk fraction; x , h of milking interval; $P < 0.001$) being:

Cisternal milk (mL):

$$\text{Manchega,} \quad y = 23.2 \cdot x \quad (R^2 = 0.976)$$

$$\text{Lacaune,} \quad y = 64.5 \cdot x \quad (R^2 = 0.992)$$

Alveolar milk (mL):

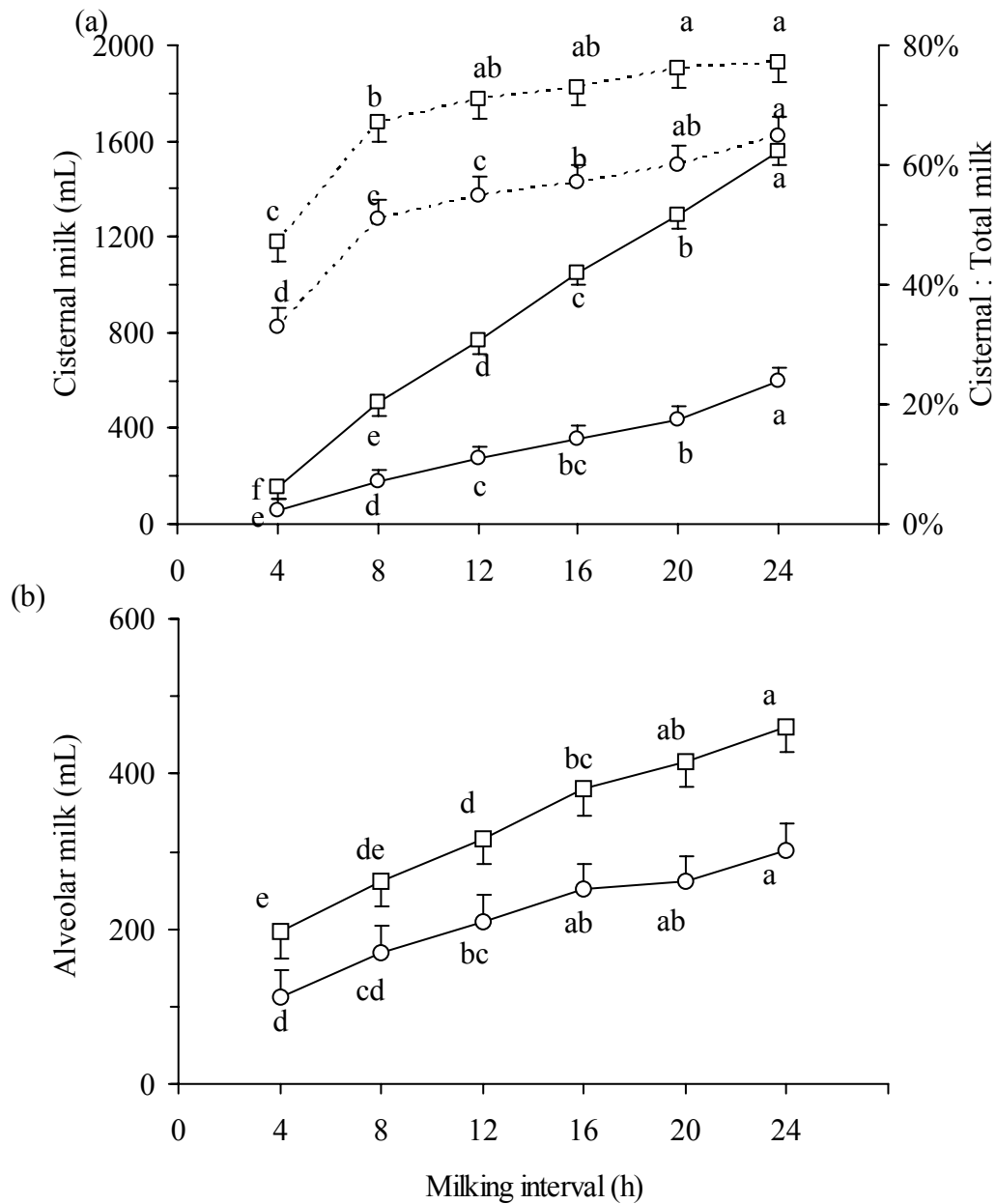
$$\text{Manchega,} \quad y = 92 + 9.0 \cdot x \quad (R^2 = 0.968)$$

$$\text{Lacaune,} \quad y = 153 + 13.2 \cdot x \quad (R^2 = 0.991)$$

The analysis of the regression lines showed that the dose of oxytocin administered was not enough to completely evacuate the alveolar compartment. Volume of milk left in the compartment, 66% greater in Lacaune than Manchega, agreed with the expected size of the alveoli population in each breed. Dose of oxytocin used (0.29 UI/kg BW, for a 70 kg BW ewe) was considered as supraphysiological and no differences were expected between animals in the response to the oxytocin dose. Lollivier and Marnet (2005) showed differences between cows in the dose necessary to induce milk ejection (0.25 to 4 IU), but

the doses used for these authors were markedly lower (0.005 to 0.008 UI/kg BW, for a 500 kg BW cow) than in our case.

Figure 1. Changes in volumes of (a) cisternal milk, and (b) alveolar milk in Manchega (○) and Lacaune (□) ewes at different milking intervals. Percentages of cisternal milk of total milk in the udder of Manchega (--○--) and Lacaune (--□--) ewes are also shown. Values are least squares means. Vertical bars represent SEM. ^{a-f}Means within the same breed with different letters differ at $P < 0.05$.



As expected, cisternal milk percentages were different ($P < 0.01$) between breeds. On average, the contribution of cisternal milk to total milk in the udder represented 53 and

68% in Manchega and Lacaune ewes, respectively. Values were always higher in Lacaune (47 to 77%) than in Manchega (33 to 65%) throughout milking intervals (4 to 24 h). Percentages of cisternal milk obtained in our results in Manchega ewes were similar to those reported by McKusick et al. (2002a) in East Friesian crossbred dairy ewes (32 to 57%) for a similar milking interval range (4 to 24 h). On the other hand, percentage of cisternal milk in Lacaune ewes was high and close to the value observed in Sarda ewes (82%) for a 24-h milking interval (Nudda et al., 2000). Moreover, the Sarda value may have been overestimated because the authors used adrenaline instead of atosiban to avoid spontaneous milk letdown.

Taken into account these differences, dairy sheep breeds could be classified according to their udder cistern features: the large-cisterned ewes, usually selected for high milk yield, present a great capacity of milk storage in cisternal compartment (e.g. Awassi, Lacaune and Sarda), and the medium-cisterned ewes, which have been selected as dual-purpose or local breeds, show a medium capacity for storing milk inside the cisterns (e.g. East Friesian crossbred and Manchega). Small-cisterned ewe breeds usually correspond to unselected or non dairy sheep.

Percentages of cisternal milk obtained for dairy ewes in our results (Figure 1a) were greater than values reported in Ripollesa meat sheep (24% at 4 h; Caja et al., 1999), Holstein dairy cows (46% at 24 h; Davis et al., 1998; 38% at 24 h, Ayadi et al., 2003b) and in Murrah buffaloes (5% at 12 h; Thomas et al., 2004), but close to the values reported in British Saanen goats (58% at 5 h; Knight et al., 1994) and in Murciano-Granadina goats (75% to 24 h; Salama et al., 2004). Consequently, efficient udder stimulation in dairy sheep does not seem to be a key to maximize machine-milking fraction and minimize stripping fraction during milking.

Percentages of cisternal milk increased ($P < 0.05$) with time after milking and reached the maximum at 24 h, although values did not differ from 20 h in Manchega and from 16 h in Lacaune ewes (Figure 1a). A similar evolution pattern of cisternal milk percentage with increasing milking interval was also found by McKusick et al. (2002a) in East Friesian crossbred ewes which had the maximum percentage of cisternal milk at 24 h but did not show differences between 12 and 20 h of udder filling. Several experiments carried out in dairy cows (Knight and Dewhurst, 1994; Stelwagen and Knight, 1997; Ayadi et al., 2003a) and in dairy goats (Salama et al., 2004) showed that the ability to tolerate extended milking intervals is related to the size of cisternal compartment. Thus, animals that store a larger proportion of milk in the gland cistern are able to tolerate extended milking

intervals better than those that store a relatively larger proportion in the alveolar compartment. In our experiment, higher percentages of cisternal milk were detected in Lacaune than in Manchega (Figure 1a), so we expect smaller milk losses in Lacaune than in Manchega ewes when once daily milking is done. Nudda et al. (2002) reported moderate milk yield losses in Awasi (18%) and Sarda (24%) ewes when a 24-h milking interval was applied for only 4 d. Salama et al. (2003) reported a 18% milk yield loss in dairy goats milked once daily throughout lactation. Studies on the long-term effect of once-daily milking have been scarce in dairy ewes, so further research is necessary to support our hypothesis on the possibility of applying at long-term reduced milking frequencies (e.g. once daily milking) in large-cisterned dairy ewes.

Transfer of milk from the alveoli to the cistern seemed to start really soon after milking (Figure 1), without requiring that the alveolar compartment reaches a saturation stage, which is consistent with early observations in dairy ewes (McKusick et al., 2002a), dairy goats (Peaker and Blatchford, 1988; Salama et al., 2004) and dairy cows (Knight et al., 1994; Stelwagen et al., 1996). In our results, milk transfer between cisternal and alveolar compartments according to time after milking, seems to be produced in different manners according to breed. Manchega and Lacaune ewes differed ($P < 0.05$) from the start in cisternal (57 vs. 161 mL, respectively) and alveolar (98 vs. 182 mL, respectively) milk compartments, and the differences were maintained until 24 h (Figure 1a) at which cisternal : alveolar ratio were 2.0:1 and 3.4:1, respectively. Data from East Friesian crossbred ewes (McKusick et al., 2002a) show intermediate volume of cisternal milk (126 mL) but greater alveolar milk (264 mL) at 4 h milking interval, although cisternal : alveolar ratio at 24-h was lower 1.4:1 than in our results. These results confirm the importance of cisternal compartment in accommodating milk storage when the milking interval is extended in dairy ewes, allowing significant increments of total milk yield until 24-h of udder filling (McKusick et al., 2002a).

Milk distribution and milk storage in udder compartments are also important for the local control of milk secretion. The fact that putative FIL (Feedback Inhibitor of Lactation) is only active when in contact with secretory cells means that it will be most effective when the ratio of cisternal to alveolar storage is low (Knight et al., 1998). Thus, ewes that stored more milk in the mammary cistern (i.e. Lacaune) produce more milk than those with medium cisterns (i.e. Manchega), and are more tolerant to longer milking intervals, as previously observed in cows (Knight and Dewhurst, 1994; Ayadi et al.,

2003a) and goats (Salama et al., 2004). Moreover, large-cisterned udders can also reduce alveolar pressure, thereby minimizing possible damage to secretory epithelium (Peaker, 1980) and disruption of their tight junctions as reported in cows (Stelwagen et al., 1994a), goats (Stelwagen et al., 1994b) and sheep (Castillo et al., 2008a).

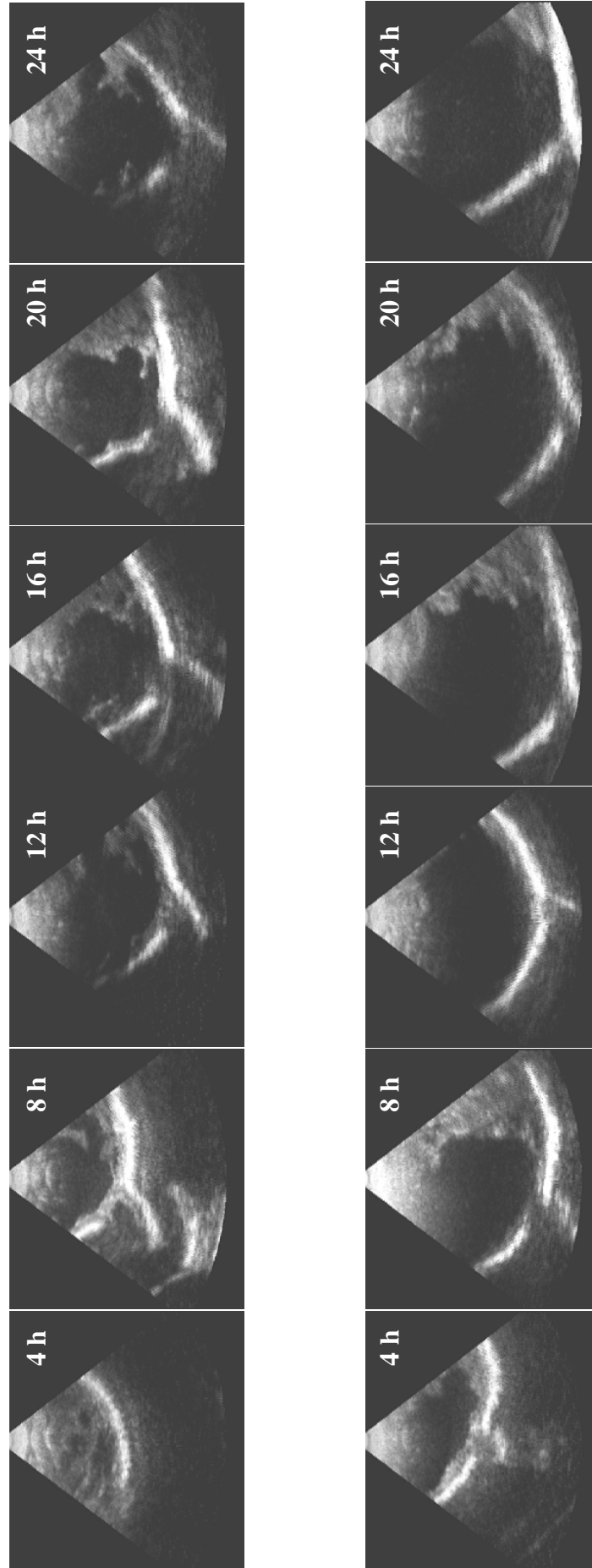
Cisternal Scans

During ultrasonography, milk in the gland cistern was clearly evident in the scans (Figure 2) as a dark area (anechogenic) and the glandular parenchyma as a gray-white area (echogenic), in agreement with other works carried out in ewes, goats, and cows (Bruckmaier and Blum, 1992; Ruberte et al., 1994; Ayadi et al., 2003b). No differences were detected between left and right half udder cisternal areas in our dairy ewes ($23.18 \pm 0.74 \text{ cm}^2$), probably because experimental ewes were selected on the basis of udder symmetry, and machine milking may also have contributed to the udder symmetry maintenance. Therefore, left and right udder half values were averaged and discussed jointly.

Manchega and Lacaune ewes differed significantly ($P < 0.001$) in cistern area values (Figure 3). Cistern area value for Manchega ewes was 52% smaller ($P < 0.001$) than for Lacaune ewes (average of all the milking intervals; Manchega: $15.01 \pm 1.00 \text{ cm}^2$ and Lacaune: $31.36 \pm 1.00 \text{ cm}^2$), which was similar to cisternal area values reported by Rovai et al. (2002; 14 and 24 cm^2 at 8 h of udder filling, respectively) for the same breeds. Other values of cisternal area reported in sheep are those obtained in East Friesian (Bruckmaier and Blum, 1992; Bruckmaier et al., 1997; 19 to 40 cm^2), Sarda (Nudda et al., 2000; 19 cm^2), Lacaune (Bruckmaier et al., 1997; 33 cm^2) and Ripollesa (Caja et al., 1999; 5.6 cm^2). Differences in sheep breed, stage of lactation, and hours of udder filling could explain the large variability among the studies previously cited.

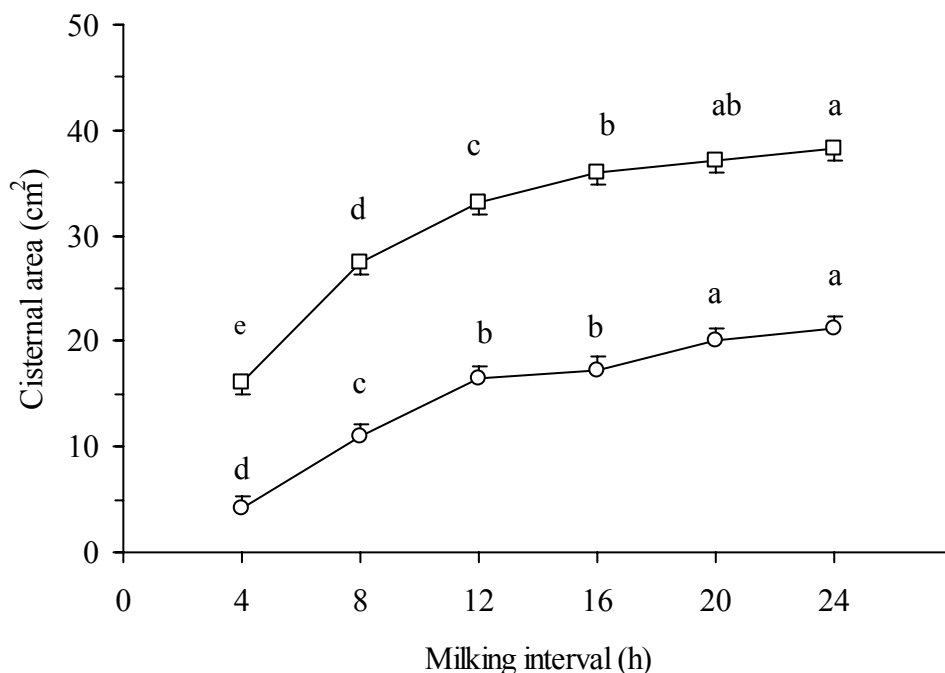
Cisternal area values in our experiment were similar or greater than those reported by using the same methodology for front quarters of dairy cows (10 to 21 cm^2 for 4- and 24-h interval, respectively; Ayadi et al., 2003b). Our results confirm the importance of the cisternal compartment in dairy ewes (Manchega: 4 to 21 cm^2 and Lacaune: 16 to 38 cm^2 , for 4- and 24-h interval, respectively), especially in Lacaune ewes which presented cisternal areas even greater than those of Murciano-Granadina dairy goats (9 to 28 cm^2 for 8- and 24-h interval; Salama et al., 2004).

Figure 2. Cisternal scans of the left half cistern of a Manchega (top line) and a Lacaune (bottom line) ewe at 4, 8, 12, 16, 20, and 24-h milking interval (from left to right), after i.v. administration of atosiban (oxytocin receptor blocking agent). Udder cisterns filled with milk appear as dark area and the glandular parenchyma as gray-white areas.



Values and changes in cisternal area were also affected ($P < 0.001$) by milking intervals (Figure 3). Cisternal areas showed curvilinear increases with milking interval, reaching a plateau at 20 h. These plateaus could be controversial because the cisternal milk volume increased linearly up to 24-h interval in both breeds. We hypothesize that, either the frequency probe used (5 MHz) or the exploration depth (14 cm) were not optimum to visualize the full extent of the cisternal-cross section in the scan at extended milking intervals. In dairy cows, Ayadi et al. (2003b) observed the same type of curvilinear increases in cisternal areas for the same milking intervals, reaching the plateau 16 h after milking.

Figure 3. Changes in cisternal area of mammary udder measured by ultrasonography in Manchega (○) and Lacaune (□) breed at different milking intervals. Values are least squares means. Vertical bars represent SEM. ^{a-e} Means within the same breed with different letters differ at $P < 0.05$.



Relationship between Cisternal Area and Milk Fractions

Correlations between cisternal area, and cisternal, alveolar and total milk were calculated for all the milking intervals tested (Table 1). Manchega and Lacaune ewes presented the highest correlation between cisternal area and cisternal milk at 8-h interval (Manchega, $r = 0.70$, $P < 0.001$; and Lacaune, $r = 0.56$, $P < 0.05$), being similar to those reported by Rovai (2001) in the same breeds (Manchega, $r = 0.89$; and Lacaune, $r = 0.57$)

and to those reported in dairy goats ($r = 0.72$ at 8 h; Salama et al., 2004), but lower than correlations reported in meat sheep ($r = 0.90$ at 4 h; Caja et al., 1999), in dairy cows ($r = 0.88$ at 8 h; Ayadi et al., 2003b), and in buffaloes ($r = 0.87$ at 11 to 12 h; Thomas et al., 2004), which correspond with their smaller cistern size.

Table 1. Correlations between cisternal area and different milk fractions in Manchega (above diagonal) and Lacaune (below diagonal) dairy ewes milked at 4, 8, 12, 16, 20, and 24 h of milking interval.

	Milking interval	Cisternal area	Cisternal milk	Alveolar milk	Total milk
Cisternal area	4		0.56***	0.32*	0.61***
	8		0.70***	-0.12	0.48**
	12		0.60***	0.11	0.60***
	16		0.64***	0.58***	0.76***
	20		0.47**	0.53***	0.66***
	24		0.62***	0.57***	0.71***
Cisternal milk	4	-0.17		0.11	0.83***
	8	0.56**		0.35*	0.92***
	12	0.32*		-0.10	0.87***
	16	0.25		0.30	0.89***
	20	-0.35*		-0.03	0.88***
	24	0.16		0.37*	0.93***
Alveolar milk	4	0.51**	-0.40*		0.64***
	8	0.50**	0.20		0.70***
	12	0.01	-0.19		0.41**
	16	0.01	0.32*		0.70***
	20	0.16	-0.07		0.45**
	24	-0.28	-0.06		0.68***
Total milk	4	0.37*	0.39*	0.69***	
	8	0.68***	0.83***	0.71***	
	12	0.30	0.83***	0.38*	
	16	0.18	0.89***	0.72***	
	20	-0.23	0.83***	0.50**	
	24	0.02	0.90***	0.38*	

* $P < 0.1$

** $P < 0.05$

*** $P < 0.01$

In Manchega ewes, cisternal area positively correlated with volume of cisternal milk at all the milking intervals ($r = 0.47$ to 0.70 ; $P < 0.05$), while in Lacaune ewes correlation was only significant at the 8-h interval ($r = 0.56$, $P < 0.05$). The greater cisternal volumes presented by Lacaune ewes and the use of a 5 MHz sectorial probe, with only 14 cm of exploration depth, could be the cause of the low correlations observed in this breed when extended milking intervals were applied, as also reported by Ayadi et al. (2003b). Nudda et al. (2000) reported a greater correlation ($r = 0.82$; 24 h after milking) in large-cisterned

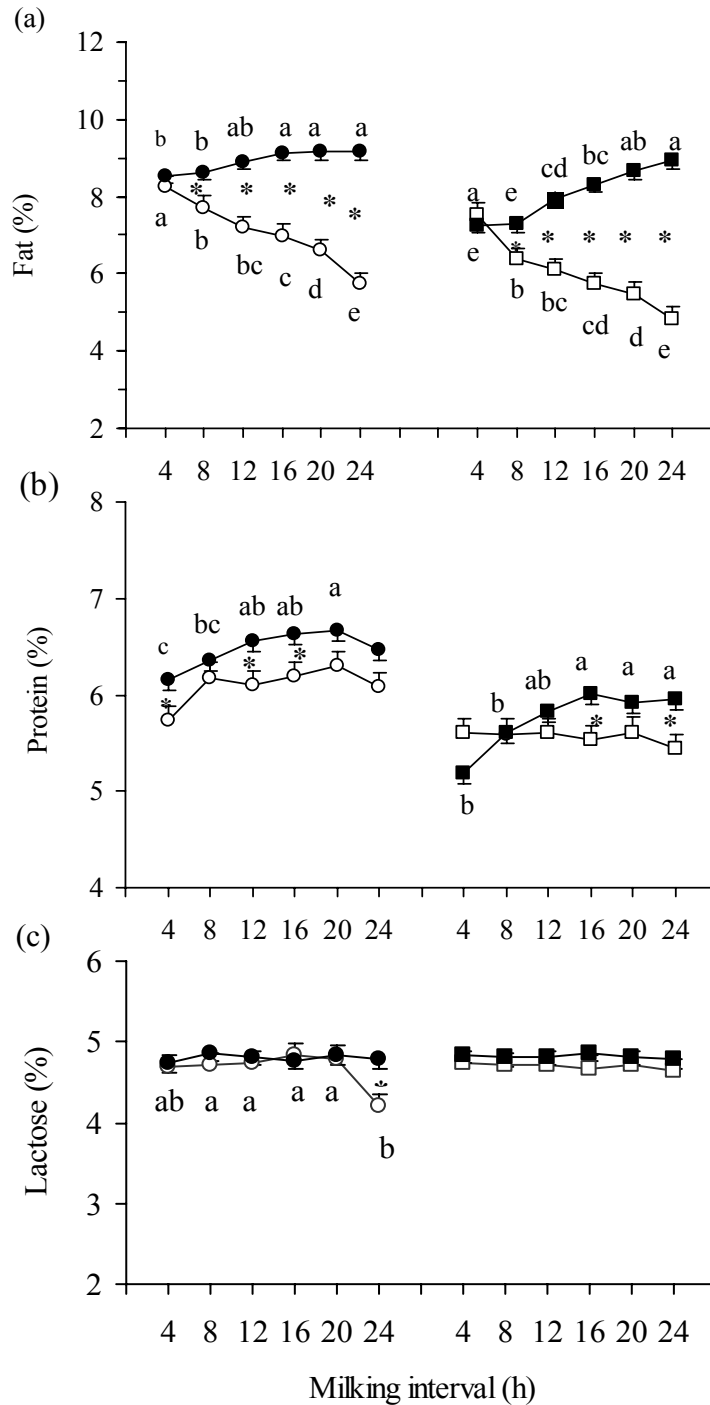
Sarda dairy ewes using a 3.5 MHz linear probe, which gives a deeper and wider exploration field and facilitates us to obtain better correlations at the longer milking intervals.

Correlation coefficients between cisternal area and total milk yield also varied according to breed and were smaller in Lacaune than in Manchega ewes (Table 1). Values in Manchega ranged between 0.48 and 0.76, indicating that udder cistern size was related to the amount of milk produced, and that ultrasonography could be used to estimate milk yield ability in this breed. In Lacaune ewes, correlation coefficients were lower and only significant at the 8-h interval ($r = 0.68$; $P < 0.01$), showing the methodological problem indicated above with regard to probe deepness. In both breeds, volumes of milk fractions (cisternal and alveolar) also correlated with total milk yield in all the milking intervals (Manchega, $r = 0.41$ to 0.93 ; Lacaune, $r = 0.38$ to 0.90 ; Table 1).

Composition of Milk Fractions

Percentage of fat in cisternal and alveolar fractions varied inversely at different milking intervals (Figure 4a). Fat content of milk fractions was affected by the breed ($P < 0.001$), being always greater in Manchega than in Lacaune ewes, which was also reported by Rovai (2001). Fat percentage in cisternal milk dramatically decreased ($P < 0.05$) as milking interval increased (Manchega, -30%; Lacaune, -36%; between 4- and 24-h interval). On the contrary, milk fat content in alveolar milk increased ($P < 0.05$) as milking interval increased but reached a plateau at 12 h of udder filling in Manchega (8.9% on average) and at 20 h in Lacaune (8.7% on average). Our data confirm that transfer of milk fat from the alveoli to the cistern slows down with the increase in milking interval, producing a back-up of milk fat in the alveolar compartment, as previously described in ewes (McKusick et al., 2002a) and cows (Davis et al., 1998; Ayadi et al., 2004). Fat content in alveolar milk was higher ($P < 0.05$) than percentage of fat in cisternal milk for all milking intervals studied (Manchega, 8.55 to 9.16% vs. 8.24 to 5.74 %; and, Lacaune, 7.26 to 8.93% vs. 7.54 to 4.84%, respectively), except for the 4-h interval. The large size of fat globules, in conjunction with the active expulsion required for their drainage to the cistern, favored its accumulation in the alveolar compartment. Thus, milk fat concentration is usually lower in cisternal than in alveolar milk in dairy ewes (Labussière, 1969; Rovai, 2001).

Figure 4. Changes in (a) fat, (b) protein, and (c) lactose contents for cisternal (in white) and alveolar (in black) milk fractions for different milking intervals in Manchega (○, ●) and Lacaune (□, ■) dairy ewes. Values are least squares means. Significant differences between alveolar and cisternal fractions within a time category are indicated by * ($P < 0.05$). Vertical bars represent SEM. ^{a-c} Means within the same breed with different letters differ at $P < 0.05$.



Milk protein and lactose contents were little affected by milking interval (Figure 4b and 4c). Milk protein content was greater ($P < 0.001$) in Manchega than in Lacaune ewes in both cisternal and alveolar milk fractions, as described by Rovai (2001). As milking interval increased, cisternal milk fraction did not modify its protein content (Manchega, $6.10 \pm 0.10\%$; Lacaune, $5.57 \pm 0.09\%$), but protein content increased in the alveolar milk, remaining constant after the 12-h interval (Manchega, $6.56 \pm 0.11\%$; Lacaune, $5.83 \pm 0.11\%$). On average, no significant differences were observed between milk protein percentage of cisternal and alveolar milk (Manchega: 6.10 vs. 6.47%, ESM, 0.09; Lacaune: 5.57 vs. 5.82%, ESM, 0.09; $P > 0.05$; respectively), which may be explained by the fact that milk protein is found primarily in the form of small casein micelles (Cowie and Tindal, 1971) within the aqueous fraction of milk. Thus, proteins pass freely from the alveolar to the cistern compartment without being as dependent on milk ejection reflex as fat content was. Nevertheless, at some milking intervals, we found a small increment of protein content in the alveolar fraction compared to the cisternal fraction. McKusick et al. (2002a) also observed differences of milk protein percentages between cisternal and alveolar fractions in East Friesian crossbred ewes, but only at the 24-h interval.

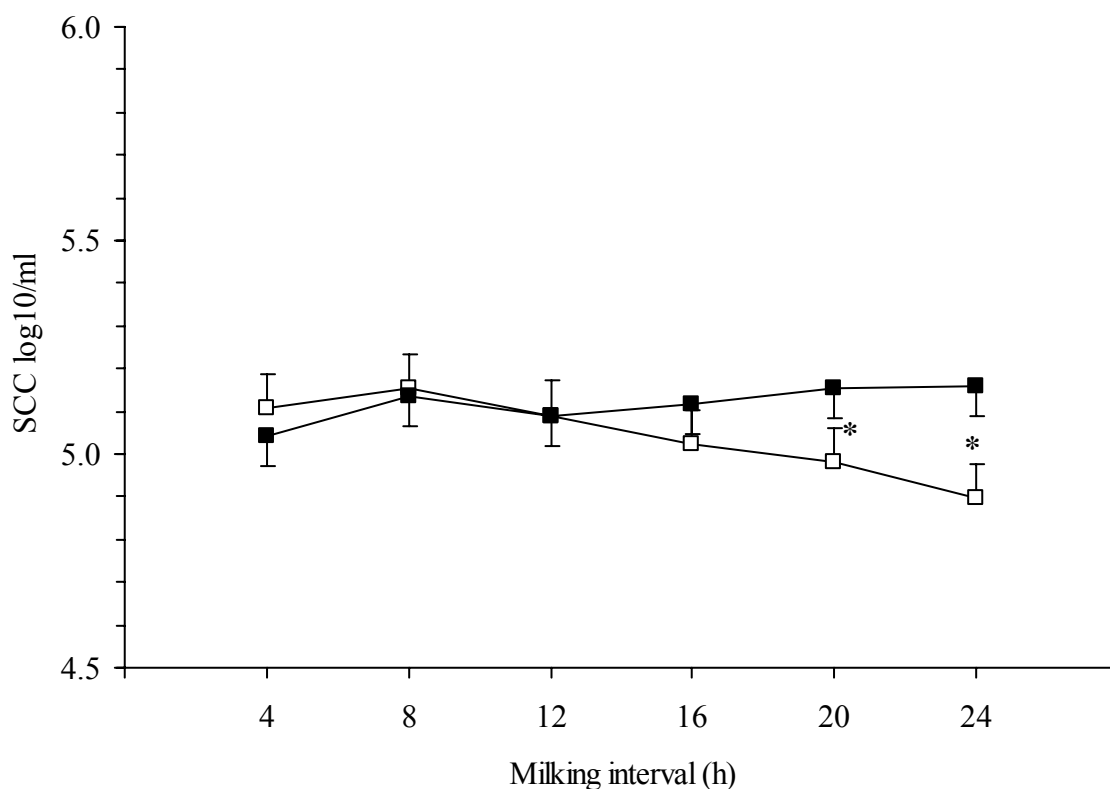
With respect to milk lactose, which is the most constant milk constituent, milking interval and breed did not affect lactose content either in alveolar or in cisternal milk, except at the 24-h interval, when a significant difference between cisternal and alveolar milk (4.20 vs. 4.79%, $P < 0.001$; respectively) was observed only in Manchega ewes, indicating that Manchega ewes should suffer greater milk yield losses than Lacaune ewes at the 24-h milking interval. Decreased lactose percentage associated with longer milking intervals appears to be due to leaky tight junctions between mammary epithelial cells. When mammary tight junctions are disrupted, the small lactose molecules pass freely from milk to blood (Stelwagen et al., 1994a) and the influx of interstitial fluid into the milk occurs (Stelwagen et al., 1997). Both events probably favored important changes in milk osmosis, provoking the decrease of lactose content observed in cisternal milk of Manchega ewes.

Content of total solids, as expected, showed similar trend to milk fat content (data not shown).

Intramammary infections were not observed during the experiment. Both breeds showed similar low SCC in alveolar (131×10^3 cells/ml, $P = 0.74$) and cisternal milk fractions (110×10^3 cells/ml, $P = 0.46$). Moreover, milking interval had no effect ($P > 0.10$) on SCC in both breeds. Regardless of milk fractions, SCC content was similar between

cisternal and alveolar milk when 4, 8 and 12-h intervals were performed. However, alveolar milk tended ($P < 0.10$) to have greater SCC than cisternal milk at the 16-h interval, and had a greater SCC ($P < 0.05$) at 20 and 24 h (Figure 5). Similar results were obtained in milk fractions of East Friesian crossbred ewes (McKusick et al., 2002a). Taking into account that the impairment of tight junctions starts from 20 h of udder filling in dairy ewes (Castillo et al., 2008), tight junctions disruption might have facilitated a paracellular influx of somatic cells into milk (Stelwagen and Lacy-Hulbert, 1996), provoking the significant differences observed between cisternal and alveolar milk fractions from 20 h after milking.

Figure 5. Evolution of somatic cell counts (SCC) within cisternal (□) and alveolar (■) milk at different milking intervals. Values are least squares means of averaged Manchega and Lacaune ewes data. Significant differences between alveolar and cisternal fractions within a time category are indicated by * ($P < 0.05$). Vertical bars represent SEM.



CONCLUSIONS

This study allowed us to evaluate udder compartments in 2 sheep breeds that differ in their productive capacity, under the same management conditions and using similar methodology. Manchega and Lacaune dairy ewes adapted to extended milking interval by increasing the milk volume stored in their cisternal compartment and, consequently, their

cisternal area. Both breeds were capable of storing large amounts of milk within the cisterns and presented a pattern of milk distribution similar to dairy goats. Nevertheless, differences in milk fractioning and cisternal size were detected between the 2 breeds. High yielding Lacaune ewes presented greater cisternal milk percentages, higher cisternal areas, and were able to store larger volumes of cisternal milk than the medium yielding Manchega ewes, suggesting an easier adaptation of large-cisterned Lacaune ewes to lower milking frequencies. Moreover, ultrasonography may be a tool of interest for evaluating changes in cisternal milk according to time after milking and for selecting ewes on the basis of cisternal area size. In both breeds, the 8-h milking interval provides the better estimation of the udder cistern size by ultrasonography, so this interval is proposed when an estimation of the udder cistern size is desired in dairy ewes.

CAPÍTULO 6: Un ordeño al día
(Once-daily milking)

CAPÍTULO 6

EFFECTOS A LARGO PLAZO DE UN ORDEÑO AL DÍA SOBRE LA PRODUCCIÓN, LA COMPOSICIÓN DE LECHE Y LA PERMEABILIDAD DE LAS UNIONES ESTANCAS

LONG-TERM EFFECTS OF MILKING ONCE-DAILY ON MILK YIELD, MILK COMPOSITION AND MAMMARY TIGHT JUNCTION PERMEABILITY IN DAIRY EWES

ABSTRACT

Fifty-three lactating ewes (Manchega; n = 27, and Lacaune; n = 26) were used to compare the effects of milking once- (1X) vs. twice-daily (2X) milking, in early and mid lactation, on milk yield, milk composition, and tight junction (TJ) permeability of mammary cells, throughout a long-period trial (wk 6 to 22). Recording was individually conducted weekly for milk yield, biweekly for milk composition (fat, protein, casein, whey protein, lactose, total solids), and monthly for somatic cell count (SCC). Cisternal size and milk fractioning was performed at wk 7, 12, 16 and 20. In early lactation, 1X only resulted in a significant reduction in milk yield in Manchega ewes (Manchega: 36.6%; $P < 0.05$, and Lacaune: 10.5%; $P = 0.13$), being those with small mammary cisterns more affected. Moreover, 1X increased milk whey protein content and decreased milk lactose concentration in this breed. In late lactation, no effects were detected either in milk yield or milk composition in both breeds. Throughout the experimental period, both breeds presented low levels of SCC in both milking treatments (1X: 115×10^3 cells/mL vs. 2X: 184×10^3 cells/mL), showing that udder health was not adversely affected by extended milking intervals applied for a long-term. Milk minerals (Na and K) and plasma lactose concentrations were used as indicators of tight junction (TJ) opening. Plasma lactose increased significantly when 1X was performed in early lactation (Manchega: +2.5 fold, $P < 0.05$, and Lacaune: +1.6 fold, $P = 0.07$) and indicated enhanced permeability of mammary TJ in both breeds. However, increases in Na concentration and Na to K ratio were only observed in Manchega milk. Cisternal area and cisternal milk varied according to breed and

milking frequency, becoming greater in 1X. Average milk flow and machine milk volume increased when 1X was performed. Nevertheless, total emission time did not increase in Manchega ewes but did slightly in Lacaune ewes. We conclude that application of 1X could be a suitable management throughout lactation in large-cisterned ewes, without negative effects on milk composition and udder health. In small-cisterned ewes, losses in milk yield would be reduced if 1X were practiced from mid lactation. An improvement in the farmer's standard of living and increments in labor productivity is also expected.

INTRODUCTION

The success of the dairy industry depends on performing an efficient milk production. Although many different ways of achieving a better profitability of the sheep sector exist, once-daily milking provides a major opportunity for increasing labor productivity and reducing cost of production. Furthermore, when animals are milked once daily, the reduction of time spent at milking allows farming families and staff to dispose of more free-time to devote to other activities off the farm, which is an increasing demand from employers and staff of the current sheep and agricultural sector.

Once daily milking of dairy cows is practiced in some countries either in early lactation to reduce metabolic stress or in late lactation to improve quality of farming life (Davis et al., 1999). In dairy goats, once-daily milking is also practiced throughout lactation in some Mediterranean areas, due to the custom of making traditional cheese straight after milking, which is a difficult task to accomplish twice a day (Capote et al., 1999).

Decreasing the milking frequency reduces milk yield in dairy ewes (Morag, 1968; Papachristoforou et al., 1982; Nudda et al., 2002), in dairy goats (Capote et al., 1999; Salama et al., 2003), and in dairy cows (Stelwagen and Knight, 1997; Davis et al., 1999; Rémond et al., 2004). Nevertheless, the magnitude of these losses could vary according to the sheep breed (Nudda et al., 2002), the experimental duration (Papachristoforou et al., 1982), the lactation stage (Carruthers et al., 1993; Stelwagen and Knight, 1997; Salama et al., 2003), and the individual differences (Rémond and Pomiès, 2005). Mammary cistern size, in relation to milk storage characteristics, may explain the negative effects of long milking intervals on milk yield in dairy ewes (Castillo et al., 2008b), dairy goats (Salama et al., 2004), and dairy cows (Knight and Dewhurst, 1994), as large-cisterned animals are more tolerant of longer milking intervals than those with smaller cisterns.

During an extended milking interval, mammary tight junctions (**TJ**) become disrupted in dairy sheep (after 20h; Castillo et al., 2008a), dairy goats (after 21h; Stelwagen et al. 1994b) and dairy cows (after 18h; Stelwagen et al. 1997). Loss of TJ integrity compromises milk secretion (Stelwagen et al., 1995) and become one of the most important regulatory mechanism operating during once-daily milking (Davis et al., 1999), being partially responsible for milk yield losses and many of the changes observed in milk composition: such as reduction in milk lactose and K content, and increase in milk Na (Stelwagen et al., 1995) and serum-derived proteins concentration (Stelwagen and Lacy-Hulbert, 1996). Nevertheless, no long-term studies exist that have evaluated the effects of 1X on TJ integrity in dairy ewes.

The objectives of this study were to assess the effects in 2 dairy ewe breeds (Manchega and Lacaune) differing in their productive capacity and cisternal size, of performing once-daily (**1X**) vs. twice-daily milking (**2X**) in early- and mid-lactation on: 1) milk yield and milk composition, 2) permeability of mammary tight junction, 3) milk partitioning and cisternal size, and 4) milk emission kinetics.

MATERIALS AND METHODS

Animals, Treatments, and Management Conditions

Twenty-seven Manchega and 26 Lacaune lactating ewes located in the experimental farm of the SGCE (Servei de Granges i Camps Experimentals) of the Universitat Autònoma de Barcelona were used.

After the weaning of the lambs (wk 4), ewes were milked twice daily (0700 and 1900 h) in order to get adapted to the milking machine routine. Ewes were randomly assigned to 2 milking frequency treatments; **1X** (once daily milking; Manchega, n = 10; Lacaune, n = 11) or **2X** (twice daily milking; Manchega, n = 17; Lacaune, n = 15), at wk 5 of lactation (early lactation). Treatments applied to ewes were switched at wk 14 (mid lactation) according to a crossover design, but 7 Manchega and 5 Lacaune ewes continued in group 2X as a control.

Average daily milk yields at the beginning of the experiment (wk 5) were 1.8 ± 0.09 L and 2.8 ± 0.10 L in Manchega and Lacaune, respectively, and SCC were inferior to 200,000 cells/mL. Moreover, ewes were sampled for bacteriological study in order to avoid unhealthy udder status of experimental ewes.

Ewes were milked 1X, at 1830 h, and 2X, at 0700 and 1900 h in a double-12 stall parallel milking parlor (Westfalia Surge Ibérica, Granollers, Spain) equipped with recording jars and low-line milk pipeline. Milking was performed at a vacuum pressure of 42 kPa, a pulsation rate of 120 pulses/min, and a pulsation ratio of 50%. Milking routine included cluster attachment without udder preparation or teat cleaning, machine milking, machine stripping before cluster removal, and teat dipping in an iodine solution (P3-ioshield, Ecolab Hispano-Portuguesa, Barcelona, Spain).

In order to study ewes' adaptation to milking frequencies (1X and 2X) according to their cisternal size, ewes within the same breed and group were classified at wk 7 of lactation into 2 different classes according to their cisternal milk volume. The classes were: large cisterns (ewes with cisternal milk volumes greater than the average of the breed and group; Manchega, 1X, n = 4 and 2X, n = 8; Lacaune, 1X, n = 5 and 2X, n = 7) and small cisterns (ewes with smaller cisternal milk volumes than the average of the breed and treatment group; Manchega, 1X, n = 6 and 2X, n = 9; Lacaune, 1X, n = 6 and 2X, n = 8). Average cisternal milk volumes were 485 and 1088 mL/d at 12-h milking interval, and 729 and 2004 mL/d at 24-h milking interval, in Manchega and Lacaune, respectively. Productive and cisternal size characteristics of the experimental ewes, divided according to cisternal milk volumes, are described in Table 1.

All animals were managed similarly throughout the experiment and maintained under the same feeding system during the course of the experiment, based on a dehydrated mixture of alfalfa hay and fescue hay fed ad libitum, and a supplement of 0.8 Kg/d of concentrate mixture pellets (1.75 Mcal NE_L/Kg and 16.5% CP; DM basis), distributed twice daily.

Experimental Procedures

Sampling and Analyses

Milk yield of individual ewes was recorded weekly at every milking from wk 5 to 22 of lactation by using the recording jars in the milking parlor. Milk samples from each ewe were taken biweekly for composition (100 mL) and monthly for SCC (50 mL). Milk samples were preserved with an anti-microbial tablet (Bronopol, Broad Spectrum Micro-tabs II, D&F Control Systems Inc., San Ramon, CA) and stored at 4 °C. Unhomogenized milk samples were analyzed with a near infrared spectrometer (Technicon InfraAlyzer-450, Bran+Luebbe SL, Nordersted, Germany), for content of TS, fat, protein (N × 6.38), true protein, CN, and lactose; as indicated by Albanell et al. (1999). The SCC was determined in

the Dairy Herd Improvement Laboratory of Catalonia (ALLIC, Cabrils, Barcelona, Spain) using an automatic cell counter (Fossomatic 5000, Foss Electric, Hillerød, Denmark).

Table 1. Productive and cisternal characteristics of the experimental ewes according to cisternal size (small or large) at wk 5 of lactation. ¹

Item	Milking interval			
	12 h		24 h	
	Small	Large	Small	Large
Milk yield, mL/d				
Manchega	1487 ± 177 ^y	1738 ± 125 ^y	1625 ± 173 ^y	1814 ± 140 ^y
Lacaune	2597 ± 199 ^x	3014 ± 131 ^x	2592 ± 249 ^x	3000 ± 237 ^x
Cisternal milk, mL				
Manchega	376 ± 25 ^{b,y}	608 ± 19 ^{a,y}	468 ± 32 ^{b,y}	1120 ± 177 ^{a,y}
Lacaune	878 ± 19 ^{b,x}	1329 ± 65 ^a	1733 ± 77 ^{b,x}	2330 ± 176 ^{a,x}
Cisternal milk, %				
Manchega	56 ± 3 ^{b,y}	65 ± 3 ^{a,y}	56 ± 5 ^{b,y}	79 ± 4 ^{a,y}
Lacaune	68 ± 3 ^x	75 ± 3 ^x	84 ± 2 ^x	84 ± 2 ^x
² Cisternal size, cm ²				
Manchega	17.8 ± 0.9 ^y	21.8 ± 1.6 ^y	43.5 ± 2.9 ^{b,y}	29.8 ± 1.9 ^{a,y}
Lacaune	32.2 ± 1.8 ^x	36.5 ± 3.4 ^x	40.4 ± 1.6 ^x	47.4 ± 2.9 ^x

¹Data are means ± standard error

²Average half udder cisternal area.

^{a-b}Means in the same breed, milking interval and within a row having different superscript letters differ ($P < 0.05$).

^{x-y} Means with different superscripts within column differ ($P < 0.05$).

Concentrations of Na and K in milk and of lactose in plasma were used as indicators of the leakiness of TJ (Stelwagen et al., 1995; Stelwagen et al., 1997). Milk samples (10 mL) were collected (wk 7, 12, 16, and 20) and frozen at -20 °C until being analyzed for Na and K content by inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES) in the Chemical Analysis Service of the Universitat Autònoma de Barcelona (Bellaterra, Barcelona, Spain). To determine concentrations of plasmatic lactose, blood samples (10 mL) were collected into heparinized tubes (Venoject, Terumo Europe, Belgium) from the jugular vein by venipuncture (wk 7, 12, 16, and 20) and were stored at 4 °C until centrifugation at 490 × g for 15 min. Plasma was collected and stored at -20 °C until being analyzed for lactose in the Veterinary Clinical Biochemistry Service of the Universitat Autònoma de Barcelona (Bellaterra, Barcelona, Spain) following the method described by Stelwagen et al. (1994a).

Milk Partitioning and Cisternal Scanning

Milk partitioning in the udder (cisternal and alveolar) and cisternal sizes of Manchega and Lacaune dairy ewes were determined at wk 7, 12, 16 and 20. Milk fractioning was

performed 12 or 24 h after milking, depending on the milking frequency applied to the ewes (2X or 1X, respectively). To prevent undesired milk letdown during evaluation of milk partitioning in the udder and cisternal scanning, all ewes received i.v. 10 µg/kg BW of Atosiban (Tractocile, Ferring Lab., Spain), an oxytocin receptor-blocking agent, while in their pens. Thereafter, ewes were taken to the milking parlor, where cisternal scanning and machine-milking to evacuate cisternal milk were performed. Approximately 20 min after the Atosiban injection, ewes received i.v. 2 IU of oxytocin (Veterin Lobulor, Laboratorios Andreu, Barcelona, Spain) and they were machine-milked to obtain the letdown alveolar milk. Samples of cisternal and alveolar milk were taken for analysis of fat, protein, lactose, and SCC as previously described. Cisternal size was evaluated by measuring cisternal area by ultrasonography. Ultrasonography was conducted using a real time B-mode ultrasonograph (Ultra Scan 900, Ami Medical Alliance Inc., Montreal, Canada) equipped with a 5 MHz sectorial probe (2 dB power, 80° scanning angle, 0.5 mm axial and 1.5 mm lateral resolution). Exploration depth was 14 cm. The probe was placed directly against the upper part of the medium suspensory ligament, caudally to the udder, and between the inguinal lymph nodes (Ruberte et al., 1994a) using the teat as scan axis. Scans were done for each udder half and transferred to a personal computer for image analysis. Cisternal area was calculated in triplicate for each scan using image treatment software (MIP4 Advanced System, Microm España, Barcelona, Spain). A conversion rate of 1,024 pixels/cm² was used.

Milking Kinetic Measurements

Milking kinetic measurements during machine milking for each udder half were recorded during the evening milking (1830 and 1900 h) on two successive days. Measurements were taken at 9 and 18 wk post-partum. Milk emission curves were classified into two groups (Labussière and Martinet, 1964): 1 peak (1P) or one emission (cisternal milk), and 2 peaks (2P) or two milking emissions (cisternal and alveolar milk). Also included was a third type of emission curve, 2 peaks-in-plateau (IP) that refers to ewes with larger emission curves that did not show a clear difference between peaks (Rovai et al., 2002). Lag time, total milk volume (mL), average flow rate (mL/min), and total emission time (s) were analyzed. When milk flow decreased to 1 mL/s, machine stripping was performed followed by removal of the milking unit.

Statistical Analyses

Data were processed by using a mixed-model procedure for repeated measurements (PROC MIXED; SAS 9.1; SAS Inst. Inc., Cary, NC). The model included the fixed effects of breed (Manchega and Lacaune), treatment (1X and 2X), period (early- and mid-lactation), cisternal milk volume (large and small cisterns), the random effect of animal, the significant interactions, plus the residual error. In order to analyze the carry-over effects of milking treatments on daily milk yield throughout lactation, another model that included the fixed effects of breed (Manchega and Lacaune), order of treatment application throughout the experimental period (1X-2X, 2X-1X, and 2X-2X), week (from 6 to 22) and cisternal milk volume (large and small cisterns), the random effect of animal, the significant interactions, plus the residual error, was used. Differences between least square means were determined with the PDIFF test of SAS. Logarithmic transformations (\log_{10}) of SCC values were used in the statistical analysis.

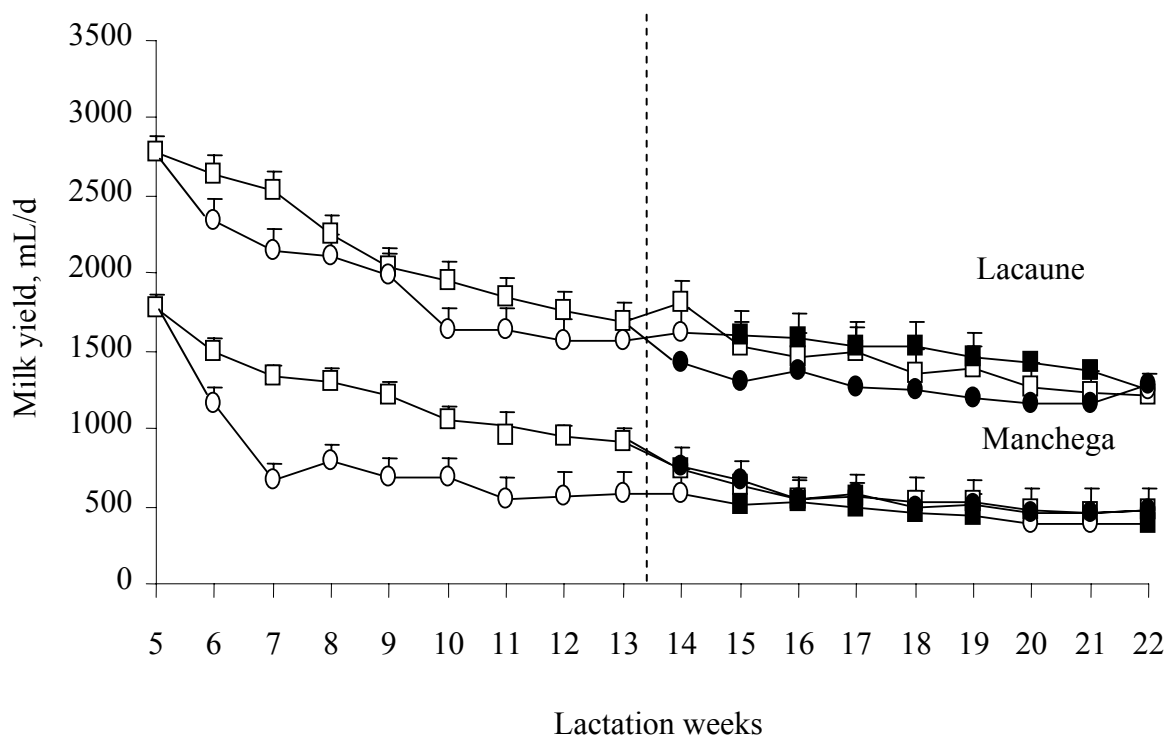
RESULTS AND DISCUSSION

Milk Yield

Manchega and Lacaune dairy ewes responded differently to the milking strategies applied (Figure 1). In Manchega, milking 1X during early lactation (wk 6 to 13) resulted in a milk yield loss of 36.6% compared to 2X (1X: 41 ± 6 vs. 2X: 65 ± 4 L; $P < 0.01$). Nevertheless, Lacaune ewes were more tolerant to lower milking frequencies, and did not present significant losses in milk production when milked 1X in early lactation (10.5%; 1X: 105 ± 7 vs. 2X: 117 ± 7 L; $P = 0.13$). When implemented during mid lactation (wk 14 to 22), 1X did not affect milk yield in either breeds (Manchega: 34 ± 4 vs. 36 ± 4 L, and Lacaune: 81 ± 6 vs. 91 ± 7 L, for 1X and 2X, respectively), indicating better tolerance to extended milking intervals as lactation advanced. Similar findings have been reported by Papachristoforou et al. (1982) in Chios ewes, which showed greater milk yield losses when 1X was implemented during the first phase of the trial (-21.6%; d 56 to 146) than during the second one (-13.3%; d 147 to 236). The same situation has been reported in dairy goats (the reduction of 19% in 4% FCM during the first 3 mo of lactation vs. 14% in late lactation; Salama et al., 2003) and in dairy cows (loss of 10 to 28% in early-mid lactation vs. 9 to 13% in late lactation; Carruthers et al., 1993; loss of 38% around the peak of lactation vs. 28% in late lactation; Stelwagen and Knight, 1997).

As expected, after changing milking frequency from 2X to 1X, milk yield decreased rapidly and significantly in dairy ewes. In early lactation, the first week applying 1X (wk 6), milk yield fell by 36% (-607 mL/d; $P < 0.001$) in Manchega and 16% (-427 mL/d; $P < 0.001$) in Lacaune ewes (Figure 1). In mid lactation (wk 14), a drop of milk yield (Manchega: 23%, -226 mL/d; $P < 0,001$, and Lacaune: 12%, -235 mL/d; $P < 0.01$) was also observed after switching from 2X to 1X, but it was smaller than those observed in early lactation and did not produce negative effects on total milk yield in either breeds (Manchega: 100 vs. 97 L, and Lacaune: 198 vs. 207 L, 2X-1X vs. Control, respectively). Our results agree with Nudda et al. (2002) who reported similar milk yield losses in Sarda (-18%, $P < 0.01$), Awassi (-24%, $P < 0.05$) and Merino breed (-23%, $P > 0.05$) 4 days after implementing 1X (wk 15 of lactation) and showed different responses to milking treatments according to breed.

Figure 1. Effect of milking once daily during early- or mid-lactation (○, ●) vs. twice daily (□, ■) on milk yield in Manchega and Lacaune ewes throughout the experimental weeks. Values are the total dairy milk yield and are Least Squares Means. Vertical bars represent SEM.



The recovery of milk yield once 2X is resumed has been previously reported in dairy cows (Knight and Dewhurst, 1994; Stelwagen et al., 1997; Patton et al., 2006). In our study, weekly lactation persistency was high before reverting to 2X in mid-lactation (Figure 1), so the increment of milking frequency (wk 14) did not significantly improve weekly lactation persistency. However, Manchega and Lacaune daily milk yields reached and kept similar values to those showed by the Control group during the rest of lactation, avoiding milk yield losses (Figure 1). Increasing milking frequency in early lactation was shown to increase mammary cell proliferation and milk yield in dairy cows (Hale et al., 2003). Nevertheless, both the longer duration of 1X during early lactation and the advanced lactation stage of ewes with the resumption of 2X, did not allow them to significantly increase and recover milk yield, which is in agreement with Rémond and Pomiès (2005) in dairy cows.

Cisternal storage of milk in the mammary glands may be limiting to milk secretion in dairy cows (Knight and Dewhurst, 1994; Stelwagen et al., 1996) and dairy goats (Salama et al., 2003) milked 1X, especially in early lactation when higher levels of milk are produced. In late lactation, milk yield decreases and cisterns may have been able to well accommodate produced milk, avoiding the effects of putative feedback inhibitor of lactation on milk secretion, the TJ leakiness of mammary epithelium, and consequently, the losses of milk production caused by extended milking intervals. Our results showed the importance of cistern capacity in maintaining milk yield in dairy ewes milked 1X (Table 2). Large-cisterned Manchega and all Lacaune ewes had similar milk yield when milked 1X or 2X either in early or mid lactation. However, small-cisterned Manchega ewes produced a lower ($P < 0.01$) quantity of milk when milked 1X than 2X in early- and mid-lactation. Thus, the reduction observed in milk yield of ewes switched to 1X during early-lactation (Figure 1) seemed to be mostly attributable to small-cisterned ewes because ewes and breeds with large cisterns were capable of adapting to a low milking frequency with no repercussions on milk yield.

Milk production of small-cisterned Manchega was lower compared to that of large-cisterned Manchega when 1X was performed. Nevertheless, when milking treatment was 2X, the productive differences between small- and large-cisterned ewes were reduced. Thus, mammary cisternal size should be considered when deciding to apply 1X if no milk losses are desired, especially in breeds with medium cisternal size (e.g., Manchega).

Table 2. Effects of once- (1X) vs. twice-daily milkings (2X) during early- and mid-lactation on daily milk yield (L/d) in Manchega and Lacaune dairy ewes with small or large cisternal milk volumes. ¹

Lactation stage	Breed	Cistern size	n	Milking Frequency		SED	P =
				1X	2X		
Early	Manchega	Small	15	0.53 ^y	1.04	0.09	<0.01
		Large	12	1.12 ^x	1.25	0.09	0.65
	Lacaune	Small	14	1.65 ^y	1.89 ^y	0.13	0.19
		Large	12	2.15 ^x	2.33 ^x	0.14	0.38
Mid	Manchega	Small	9	0.38 ^y	0.63	0.07	0.01
		Large	8	0.66 ^x	0.53	0.07	0.19
	Lacaune	Small	8	1.29	1.28	0.16	0.97
		Large	7	1.26	1.50	0.16	0.29

¹Values are least squares means and standard errors of the difference.

^{x,y}Means in the same breed, stage of lactation and within a column having different superscript letters differ ($P < 0.05$).

In breeds with large cisternal size (e.g., Lacaune), mammary cistern have low influence on effects produced by milking frequency, probably due to the fact that large cisterns of Lacaune seemed to be big enough to accommodate milk during extended milking intervals with no milk losses. The importance of the mammary cistern in avoiding milk yield losses when 1X is applied has been previously described in dairy goats (Capote et al., 1999; Salama et al., 2004) and dairy cows (Knight and Dewhurst, 1994), suggesting that cisternal capacity must be taken more into account for extended than for shorter milking intervals.

Milk Composition

Major milk constituents

Major milk components, except lactose, were affected by breed. This agreed with previous studies (Rovai, 2001, Castillo 2008a), where milk fat, protein and TS content were always greater ($P < 0.001$) in Manchega than in Lacaune ewes.

In both breeds, milking frequency only had effect on milk composition in early lactation. The interaction breed \times milking frequency was detected (Table 3), thus the variation of milk components was different according to breed. In Manchega ewes, milk contained the lowest concentration of lactose ($P < 0.001$) and the greatest concentration of whey protein ($P < 0.01$) when milked 1X in early lactation. The lower percentage of lactose could be due to lactose leaking into blood via disrupted TJ (Stelwagen et al., 1994a, b, and 1997) and was in agreement with results presented by Nudda et al. (2002) for Awassi and Merino ewes. Moreover, higher whey protein content in milk of 1X milked udders

suggested a specific leakage of serum proteins into milk after modification of the permeability of the mammary epithelium, as described previously in dairy cows (Stelwagen et al., 1994a; Stelwagen and Lacy-Hulbert, 1996; O'Brien et al., 2002) and in dairy goats (Boutinaud et al., 2003). In contrast, Lacaune ewes milked 1X showed a significant increase in milk protein and CN, and a slight, but non-significant, increase in fat content, agreeing with results obtained from long- and mid-term experiments where reducing milking frequency from 2X to 1X resulted in greater fat and protein contents in the breeds of ewes tested: Tsigay, Karagouniko, Lacaune, Sarda, Manchega, and Churra (Labussière, 1983) and Sarda, Awassi, and Merino (Nudda et al., 2002). The results observed in Lacaune ewes could be expected as a consequence of the concentration of milk components when milk yield decreased, despite the fact that milk yield losses were not significant in this breed. Nevertheless, results obtained in Manchega ewes made us suspect a probable modification in the milk component secretion.

Cistern capacity only affected ($P < 0.01$) milk composition of Manchega ewes. The greater percentages of milk stored by Lacaune ewes in their cisterns (62% vs. 77%, at wk 7, in Manchega and Lacaune ewes, respectively), could explain why the composition of their milk was not affected by cistern capacity when different milking frequencies were performed. In Manchega ewes, cistern capacity affected whey protein and lactose milk content, detecting the greatest whey protein content (1.02 vs. 0.81%) and the lowest lactose content (4.65 vs. 4.78%) in milk of small-cisterned Manchega ewes milked 1X. Therefore, we suspected susceptibility to TJ leakiness to be higher in small- than in large-cisterned ewes. Moreover, the interaction cistern \times milking frequency was detected ($P = 0.01$) in milk lactose content of Manchega ewes. Milk lactose content decreased significantly in small-cisterned Manchega when milked 1X and showed a tendency to decrease when milked 2X (1X: 4.78 vs. 4.54%, $P < 0.001$; and 2X: 4.82 vs. 4.74%, $P = 0.07$; in large and small-cisterned Manchega, respectively). Therefore, these results point out that small-cisterned Manchega did not adapt well to extended milking interval and suffered a greater level of TJ permeability than large-cisterned Manchega.

In Manchega ewes, 1X applied in early lactation produced lower daily yields of fat (49.7 vs. 74.1 g/d; $P < 0.001$), protein (41.3 vs. 60.9 g/d; $P < 0.001$), lactose (35.0 vs. 53.1 g/d; $P < 0.001$), and TS (134.1 vs. 200.8 g/d; $P < 0.05$) than 2X, in agreement with the significant reduction in the daily milk yield. In Lacaune ewes, 1X milking in early lactation did not make milk components vary, except daily fat yield, which was greater in 1X than 2X

(108.5 vs. 113.1 g/d, $P < 0.05$). In both breeds, standard milk yield showed the same pattern as those of daily milk yield (Table 3).

Table 3. Milk yield, milk composition (fat, protein, lactose, total solids) and somatic cell counts (SCC) in Manchega and Lacaune dairy ewes milked once (1X) or twice daily (2X) in early- and mid-lactation. ¹

Item	Early lactation			Mid lactation		
	Milking frequency		ESD	Milking frequency		ESD
	1X	2X		1X	2X	
Milk yield, L/d						
Manchega	0.74 ^{b,y}	1.16 ^{a,y}	0.13	0.57 ^y	0.58 ^y	0.08
Lacaune	1.87 ^x	2.09 ^x	0.17	1.29 ^x	1.45 ^x	0.15
SMY ² , L/d						
Manchega	0.70 ^{b,y}	1.03 ^{a,y}	0.09	0.56 ^y	0.62 ^y	0.08
Lacaune	1.59 ^x	1.66 ^x	0.13	1.14 ^x	1.28 ^x	0.16
Milk Composition						
Fat, %						
Manchega	6.77 ^x	6.80 ^x	0.32	7.96 ^x	8.25 ^x	0.27
Lacaune	5.91 ^y	5.56 ^y	0.24	6.57 ^y	6.65 ^y	0.27
Protein, %						
Manchega	5.62 ^x	5.57 ^x	0.21	6.09 ^x	6.50 ^x	0.16
Lacaune	5.10 ^{a,y}	4.63 ^{b,y}	0.18	5.55 ^y	5.65 ^y	0.22
Casein, %						
Manchega	4.46 ^x	4.43 ^x	0.17	4.81 ^x	5.19 ^x	0.13
Lacaune	4.03 ^{a,y}	3.76 ^{b,y}	0.12	4.39 ^y	4.51 ^y	0.09
Whey protein, %						
Manchega	0.96 ^a	0.82 ^b	0.06	0.94	0.94	0.06
Lacaune	0.85	0.78	0.06	1.01	0.94	0.07
Lactose, %						
Manchega	4.66 ^b	4.78 ^a	0.04	4.68	4.74	0.04
Lacaune	4.68	4.67	0.04	4.61	4.65	0.05
Total Solids, %						
Manchega	18.16 ^x	18.31 ^x	0.55	20.15 ^x	20.62 ^x	0.50
Lacaune	16.86 ^y	16.23 ^y	0.36	17.66 ^y	17.80 ^y	0.42
SCC, log ₁₀ /mL						
Manchega	4.97	5.11	0.13	5.02	5.13	0.15
Lacaune	5.11	5.28	0.18	5.20	5.44	0.21

¹Values are least squares means and standard errors of the difference.

²Standard milk yield (SMY) = milk yield (L) × (0.0071 × fat (g/L) + 0.0043 × protein (g/L) + 0.2224); Bocquier et al. (1993).

^{a,b} Means with different superscripts within the same row are different ($P < 0.05$).

^{x-y} Means in the same item with different superscripts within column differ ($P < 0.05$).

Somatic cell count

Manchega and Lacaune dairy ewes showed low levels of SCC throughout lactation, and both breeds showed similar values (113 and 186×10^3 cells/mL, $P = 0.06$; respectively), as previously reported by Castillo et al. (2008a) in the same breeds.

Neither mammary cistern nor milking frequency (1X: 115×10^3 cells/mL vs. 2X: 184×10^3 cells/mL) had an effect on SCC in both breeds (Table 3). In agreement with our results, East Friesian crossbred dairy ewes milked every 12 h had similar SCC in milk to ewes milked less frequently (every 16 h, McKusick et al., 2002a). Moreover, Nudda et al. (2002) observed no significant differences between Awassi and Merino dairy ewes when udder-halves were milked 1X or 2X. However, Sarda ewes showed the highest SCC values in the milk of 1X milked udder halves. In dairy goats, Salama et al. (2003) indicated no significant effect of 1X on milk SCC throughout lactation, and Boutinaud et al. (2003) only observed a tendency to increase SCC in 1X milked udder-halves. Despite increases in SCC being detected in dairy cows milked 1X (Rémond et al., 2002), other trials during early- (Patton et al., 2006), late- (Stelwagen et al., 1994a; Lacy-Hulbert et al., 1999), and throughout lactation (Rémond et al., 2004) did not observe significant changes in SCC when 1X was performed.

Mineral concentrations

In order to confirm the hypothesis according to which epithelium permeability is modified, mineral concentration in milk was measured to provide evidence of the state of the TJ. Sheep breed affected ($P < 0.01$) K and tended to affect ($P = 0.09$) Na concentration in milk, presenting similar values to those presented by Castillo et al. (2008a) for the same sheep breeds. Moreover, breed \times milking frequency interaction was significant ($P < 0.05$) for Na concentration and the Na:K ratio. The effects of milking frequency on mineral milk concentrations were only detected in early lactation and in Manchega ewes (Table 4). In this breed, an increase ($P < 0.05$) in milk Na content was observed in response to extended milking interval. Milk K content was unaffected by milking frequency. Consequently, the Na:K milk ratio increased when 1X was performed in early-lactation in Manchega ewes. The exchanges of ions between alveolar and blood compartments reflect mammary epithelial permeability (Stelwagen et al., 2001). The modifications of Na concentration and Na:K ratio observed in our study, suggested an exchange of ions between the blood and alveolar compartment as a consequence of an increase of the mammary epithelium

permeability when the number of milkings per day was reduced in Manchega breed. Moreover, Stelwagen et al. (1999a) reported in dairy goats that TJ leakage could decrease milk secretion by increasing Na:K ratio of milk. Thus, milk yield losses observed in Manchega ewes could be partially explained by the increase observed in the Na:K ratio of milk when milked 1X.

Table 4. Effect of milking once- (1X) or twice-daily (2X), during early- and mid-lactation, on the Na and K concentration in milk and the Na to K ratio in milk, and plasma lactose concentration in Manchega and Lacaune ewes. ¹

Item	Early lactation			Mid lactation		
	Milking frequency		SED	Milking frequency		SED
	1X	2X		1X	2X	
Na, mmol/L						
Manchega	21.75 ^{a,x}	14.79 ^b	2.18	26.97	22.62	3.91
Lacaune	15.22 ^y	15.22	2.18	23.05	20.44	4.35
K, mmol/L						
Manchega	27.62 ^y	26.86 ^y	1.79	21.74 ^y	21.23 ^y	1.79
Lacaune	32.99 ^x	31.20 ^x	1.79	27.62 ^x	26.85 ^x	2.05
Na:K						
Manchega	0.55 ^{a,x}	0.34 ^b	0.08	0.82 ^x	0.64	0.17
Lacaune	0.28 ^y	0.32	0.08	0.51 ^y	0.52	0.18
Lactose, µmol/L						
Manchega	9.04 ^{a,y}	3.54 ^{b,y}	2.37	4.54 ^{a,y}	2.68 ^{b,y}	1.05
Lacaune	21.52 ^x	13.55 ^x	4.22	18.84 ^x	12.88 ^x	4.74

¹Values are least squares means and standard errors of the difference.

^{a-b} Means with different superscripts within row differ ($P < 0.05$).

^{x-y} Means with different superscripts within column differ ($P < 0.05$).

Variations in mineral concentration in milk and increments in Na:K ratio has been also described in dairy goats (Boutinaud et al., 2003) and dairy cows (Stelwagen et al., 1994b; Lacy-Hulbert et al., 1999; Delamaire and Guinard-Flament, 2006) when milked 1X.

On the other hand, Lacaune ewes did not show any effect of milking frequency on mineral milk components, so mammary epithelial of Lacaune seemed to resist extended milking interval without increasing their permeability. These results were in agreement with a previous trial performed in the same breeds, in which different milking frequency were tested during a short-treatment period (Castillo et al., 2008a).

The effects of cistern capacity on Na and K milk content were only detected in early lactation (Table 5). Large-cisterned Manchega showed similar Na and K values, and consequently Na:K ratio, to large- and small-cisterned Lacaune. Nevertheless, small-cisterned Manchega showed greater Na and Na:K ratio and lower K milk concentration than

large-cisterned Manchega and Lacaune ewes, suggesting that changes in mammary permeability were more influenced by the mammary cistern size than by the sheep breed. Moreover, cistern size seemed to be an important point to consider when extended milking intervals are performed in early lactation.

Table 5. Influence of cistern capacity during early- and mid-lactation, on the Na and K concentration and the Na to K ratio in milk, and the plasma lactose concentration in Manchega and Lacaune ewes. ¹

Item	Early lactation			Mid lactation		
	Cistern		SED	Cistern		SED
	Small	Large		Small	Large	
Na, mmol/L						
Manchega	0.50 ^{a,x}	0.34 ^b	0.05	0.60	0.55	0.09
Lacaune	0.35 ^y	0.36	0.05	0.42	0.58	0.10
K, mmol/L						
Manchega	0.97 ^{b,y}	1.16 ^a	0.07	0.82 ^y	0.86 ^y	0.07
Lacaune	1.23 ^x	1.28	0.07	1.11 ^x	1.02 ^x	0.08
Na:K						
Manchega	0.59 ^{a,x}	0.30 ^b	0.08	0.77 ^x	0.68	0.17
Lacaune	0.29 ^y	0.30	0.08	0.39 ^y	0.64	0.18
Lactose, µmol/L						
Manchega	6.52 ^y	6.06 ^y	1.67	3.41 ^y	4.68 ^y	1.03
Lacaune	18.02 ^x	16.98 ^x	2.98	9.55 ^{a,x}	25.33 ^{b,x}	4.84

¹Values are least squares means and standard errors of the difference.

^{a-b} Means with different superscripts within row differ ($P < 0.05$).

^{x-y} Means with different superscripts within column differ ($P < 0.05$).

Plasma Lactose Concentration

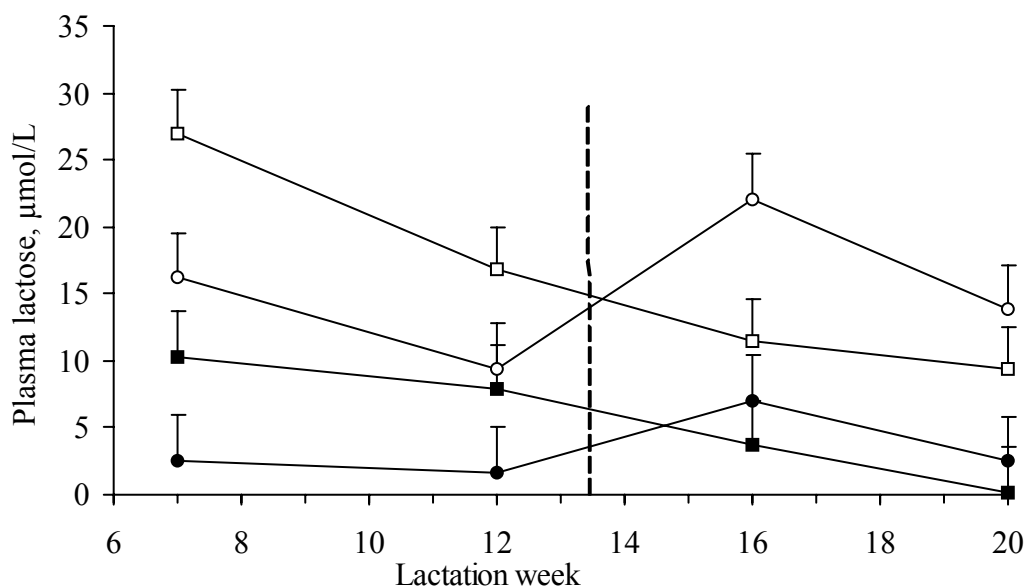
The concentration of lactose in plasma is shown in Table 4 and Figure 2. Plasma lactose were lower ($P < 0.001$) for Manchega (4.32 ± 1.38 µmol/L) than Lacaune ewes (16.02 ± 1.52 µmol/L), in agreement with values reported by Castillo et al. (2008a).

Plasma lactose was the main indicator of TJ permeability in this study. Plasma lactose concentration decreased throughout lactation (12.58 ± 1.49 to 7.47 ± 1.51 µmol/L; $P < 0.01$, at wk 7 and 20, respectively) in both, Manchega and Lacaune breed, indicating that greater levels of TJ permeability mainly occurred at the beginning of lactation, when large quantities of milk were produced and stored inside the udder.

In early lactation, plasma lactose concentration for 1X ewes was greater compared with 2X ewes. This finding suggest that the reduction in milk yield caused by 1X in early-lactation (Table 3) is associated with the opening of mammary TJ, which was greater in

Manchega (plasma lactose increased by 2.5 fold, $P < 0.05$) than in Lacaune ewes (plasma lactose increased by 1.6 fold, $P = 0.07$). In dairy ewes, TJ disruption and increments in mammary permeability began from the 20-h milking interval (Castillo et al., 2008a). In dairy goats, Stelwagen et al. (1994b) reported that TJ leakiness started after 21 h of milk accumulation in mid lactation, and in dairy cows, some studies have demonstrated increased permeability of the mammary gland caused by 1X milking during early- and late-lactation (Stelwagen et al., 1997; Lacy-Hulbert et al., 1999). As observed in our ewes, changes in TJ permeability were accompanied by higher concentrations of serum-derived components in milk (whey protein) and higher concentrations of lactose in plasma due to movements of these components via the leaky TJ between secretory cells. Nevertheless, the variations produced by TJ opening were only observed when 1X was performed in early lactation.

Figure 2. Effect of milking once daily (1X) during early- (□, ■) or mid-lactation (○, ●) on plasma lactose concentration in Manchega (in black) and Lacaune (in white) dairy ewes. Values are Least Squares Means with SEM indicated by vertical bars.



Cistern capacity did not affect ($P = 0.91$) plasma lactose concentrations throughout lactation, in Manchega ewes. Nevertheless, cistern capacity tended to affect ($P = 0.12$) plasma lactose in Lacaune ewes, which also showed a significant ($P = 0.02$) cistern milk volume \times milking frequency interaction. The effects observed in Lacaune ewes could be explained by the high variability of lactose analysis, the great individual differences, and the reduced number of Lacaune ewes used from mid-lactation (especially in the group used as a control; $n = 5$).

Observing the evolution of plasma lactose concentration throughout the experimental period (Figure 2), we noted that increases in plasma lactose concentration always occurred, in both breeds, after switching the milking frequency from 2X to 1X, either in early or in mid lactation, indicating that a decrease in milking frequency led to TJ leakiness and lactose passage from milk to blood. As expected, when 2X was resumed at mid lactation (wk 13), plasma lactose concentration gradually decreased. The decrease observed in lactose concentration could be explained by the effect of lactation, which reduces milk production, and allows the mammary glands to better accumulate milk inside their cistern, maintaining mammary TJ stability.

Milk Fractioning and Cisternal Area

Changes in milk partitioning and milk accumulation rates in the udder at different milking frequencies are summarized in Table 6. Breed affected ($P < 0.01$) cisternal area (Manchega: 22 cm² and Lacaune: 33 cm²), cisternal, alveolar and total milk (Manchega: 405, 218 and 635 mL and Lacaune: 1131, 292 and 1402 mL, respectively), and cisternal percentage (Manchega: 68% and Lacaune: 83%). Cisternal area and cisternal milk decreased ($P < 0.01$) as lactation advanced, in agreement with previous observations in dairy ewes (Rovai et al., 2002) and dairy cows (Caja et al., 2004).

When ewes were milked after 24 h of udder filling instead of 12 h, greater average cisternal area (Manchega: +40% (+8 cm²) and Lacaune: +30% (+13 cm²); $P < 0.01$) and higher cisternal milk volume (Manchega: +65% (+202 mL), and Lacaune: +87% (+672 mL); $P < 0.01$) were obtained, indicating that cisterns became larger in order to accommodate milk accumulation in the udder more efficiently, especially in early lactation. The same response to increasing milking intervals has been previously described by Rovai (2001) and Castillo et al. (2008b) in the same breeds, and are in agreement with results reported in East Friesian crossbred ewes (McKusick et al., 2002a), dairy goats (Salama et al., 2004), and dairy cows (Ayadi et al., 2003b). Moreover, the larger cisternal area shown in Lacaune ewes could explain the small negative effects of extended milking intervals on milk yield (-10.5%) during early lactation.

On the contrary, alveolar compartment did not differ between 1X and 2X in either breed. When milking interval increases, the cisternal compartment becomes more important in accommodating milk storage (McKusick et al., 2002a; Castillo et al., 2008b), which probably explained why alveolar milk volume did not increase in our trial. Therefore, our

results confirmed the determinant role of cisternal compartment in accommodating milk storage and favoring milk yield, especially when milking interval was extended in dairy ewes. Consequently, cisternal milk responded to both milking frequency, 1X and 2X, in the same way as total milk.

Table 6. Cisternal size, milk fractioning and milk accumulation rates in Manchega and Lacaune dairy ewes milked once (1X) or twice (2X) daily during early- and mid-lactation.¹

Item	Early lactation			Mid lactation		
	Milking frequency		SED	Milking frequency		SED
	1X	2X		1X	2X	
Cisternal area, cm ²						
Manchega	29.5 ^{a,y}	22.1 ^{b,y}	2.8	21.8 ^y	17.1	3.2
Lacaune	47.4 ^{a,x}	32.0 ^{b,x}	5.6	37.6 ^x	21.6	8.6
Cisternal milk, mL						
Manchega	657 ^{a,y}	409 ^{b,y}	63	374 ^y	203 ^y	104
Lacaune	1757 ^{a,x}	922 ^{b,x}	62	1137 ^{a,x}	624 ^{b,x}	116
Alveolar milk, mL						
Manchega	283	259 ^y	38	172 ^y	145	38
Lacaune	326	357 ^x	38	259 ^x	221	43
Total milk, mL						
Manchega	941 ^{a,y}	667 ^{b,y}	77	546 ^y	348 ^y	120
Lacaune	2084 ^{a,x}	1279 ^{b,x}	76	1396 ^{a,x}	846 ^{b,x}	134
Cisternal fraction, %						
Manchega	67 ^{a,y}	62 ^{b,y}	3	68 ^{a,y}	57 ^{b,y}	4
Lacaune	84 ^{a,x}	72 ^{b,x}	3	82 ^x	74 ^x	4
Milk accumulation (mL/h)						
Cisternal						
Manchega	27.4 ^y	34.7 ^y	3.5	15.6 ^y	16.9 ^y	4.6
Lacaune	73.2 ^x	76.8 ^x	3.5	43.4 ^x	52.0 ^x	5.2
Alveolar						
Manchega	11.8 ^b	21.6 ^{a,y}	2.7	7.2 ^y	12.1 ^{a,y}	1.9
Lacaune	13.6 ^b	29.8 ^{a,x}	2.3	10.8 ^x	18.5 ^{a,x}	2.1
Total						
Manchega	39.2 ^{b,y}	55.6 ^{a,y}	4.6	22.8 ^y	29.0 ^y	5.5
Lacaune	86.8 ^{b,x}	106.6 ^{a,x}	4.5	58.2 ^x	70.5 ^x	6.1

¹Values are least squares means and standard errors of the difference.

²Average half udder cisternal area.

^{a,b}Means with different superscripts within row differ ($P < 0.05$).

^{x,y}Means in the same item with different superscripts within column differ ($P < 0.05$).

Greater cisternal percentages were observed in Manchega and Lacaune ewes milked 1X during either early or mid lactation. Lacaune ewes milked 1X showed a similar cisternal percentage (83%, trial average) to those found in Sarda ewes (82%; Nudda et al., 2000) and a slightly greater percentage than those of dairy goats milked once-daily (73%, Salama et

al., 2003). Larger cisternal capacity, as observed in the present study in Lacaune ewes, allowed the reduction of alveolar pressure, thus avoiding possible damage to mammary epithelial cells (Peaker, 1980) and making impairment of their TJ more difficult. Although Manchega showed larger cisternal percentages (68%, trial average) than those reported in East Friesian crossbred milked at 24-h milking interval (57%, McKusick et al., 2002a), they did not reach the values presented by large-cisterned sheep breeds (e.g., Sarda and Lacaune). This fact could explain both, the productive differences observed between the experimental breeds and the lower adaptation of Manchega ewes to 1X during early lactation.

As expected, milk accumulation rate of all milk fractions was greater ($P < 0.01$) in Lacaune than in Manchega ewes. Cisternal milk accumulation tended ($P < 0.10$) to be higher in Manchega milked 2X than in those milked 1X during early lactation. Nevertheless, during mid-lactation, this parameter did not vary according to milking treatment. On the other hand, cisternal milk accumulation rate was not affected by milking strategy in Lacaune ewes. Alveolar milk accumulation rate was always higher in 2X than in 1X ewes, which could be explained by the limited capacity of the alveolar compartment and the increasing drainage of milk from the alveolar to the cisternal compartment in order to accommodate as much milk volume as possible in the udder when extended milking intervals were performed. As observed in milk yield, total milk accumulation of both breeds was only affected when 1X was performed in early lactation, being smaller than total milk accumulation of those ewes milked more frequently.

Milk Emission Kinetics

Evaluation of milking characteristics was made in Manchega and Lacaune ewes milked 1X and 2X (Table 7). The milking frequency \times wk interaction was not significant in either breed. Thus, data were presented as an average of early- (wk 9) and mid-lactation (wk 18) values.

As expected, all the milking parameters studied, were higher ($P < 0.01$) in the Lacaune ewes. This implies that, in Lacaune ewes, the emission curves have higher volumes and milk flows, and a longer duration of the milk emission (Manchega: 47 s and Lacaune: 63 s), and confirmed a better milkability for this breed. Nevertheless, Lacaune ewes presented greater lag times than Manchega ewes (Manchega: 11 s and Lacaune: 15 s; $P < 0.05$). Thus, Lacaune started milking emission slightly later than Manchega ewes.

Milk emission parameters (machine milk volumes, milk flow rates and total emission time) modified throughout lactation, decreasing significantly as lactation advanced in both breeds (data not shown). These results were in agreement with studies performed by Such et al. (1999) and Rovai (2001) on the same sheep breeds, and by Bruckmaier et al. (1997a) on Lacaune and East Friesian ewes.

Table 7. Milking characteristics according to milking frequency performed in Manchega and Lacaune dairy ewes.^{1,2}

Item	Milking frequency		SED	P =
	1X	2X		
Lag time, s				
Manchega	11.34 ^y	9.64 ^y	1.95	0.40
Lacaune	15.97 ^x	15.73 ^x	3.27	0.94
Total machine milk, mL				
Manchega	444.83 ^y	360.41 ^y	40.04	0.05
Lacaune	1464.86 ^x	718.43 ^x	110.23	<0.01
Average flow rate, mL/min				
Manchega	612.04 ^y	423.58 ^y	68.47	0.01
Lacaune	1236.61 ^x	861.98 ^x	72.23	<0.01
Milk volume at 60 s, mL				
Manchega	429.10 ^y	346.76 ^y	40.51	0.07
Lacaune	1183.52 ^x	663.28 ^x	95.80	<0.01
Maximum flow rate, mL/min				
Manchega	1157.07 ^y	1077.93 ^y	135.56	0.57
Lacaune	2375.07 ^x	1592.45 ^x	179.31	<0.01
Total emission time, s				
Manchega	45.20 ^y	48.33	4.17	0.46
Lacaune	71.23 ^x	51.29	5.65	<0.01

¹ The milking frequency × week interaction was not significant in either breed. Data are an average of early- (wk 9) and mid-lactation (wk 18) values.

² Values are least squares means and standard errors of the difference.

^{x-y} Means in the same item with different superscripts within column differ ($P < 0.05$).

Milking treatment affected ($P < 0.05$) both total machine milk and milk flow rate, which were greater when 1X was performed in both breeds. Increment in intra-mammary pressure, probably caused by milk accumulation during the 24-h milking interval, could allow the increase of milk flow rate observed in Manchega (+189 mL/min) and Lacaune (+375 mL/min) ewes. No known studies have been performed in this respect in dairy ewes. Nevertheless, the greater milk machine volume and average flow rate for the group milked 1X are in agreement with a report (Capote et al., 2006) for dairy goats milked 1X throughout lactation. Maximum flow rate was also markedly affected by 1X in Lacaune ewes, which almost increased twice the maximum flow rate, indicating that in this breed there are no limiting factors of milk emission rate until 24h of milk accumulation. However,

in Manchega ewes milked 1X, either milk accumulation or increment in the intra-mammary pressure did not seem to be enough to increase the maximum flow rate. Therefore, udder morphology in Manchega ewes (i.e. teat sphincters) could be restricting the increase of milk emission rate, indicating once more the lower milkability of this breed in contrast to Lacaune ewes. Milking interval did not modify lag time in both breeds.

Despite having greater machine milk volume when milked 1X, Manchega ewes did not show differences in total emission time according to milking interval, indicating that reducing once daily milking did not lengthen the time destined to the milking. Thus, the reduction of the time assigned to once-daily milking in Manchega ewes could economically compensate milk yield losses observed in early lactation in this breed. On the other hand, Lacaune ewes increased (+20 s/milking and ewe, $P < 0.01$) their total emission time when 1X was performed. Nevertheless, milking only once daily allows farmers to prepare milking parlor, to milk ewes, and to take ewes from their pens to the milking parlor and vice versa only once daily. Therefore, a great reduction of daily milking time is achieved, despite the observed increment in the total emission time.

In our trial, milk flow curves in Manchega were of type 1P, 2P and IP during early lactation in 4, 71 and 25% and during mid lactation in 37, 44 and 19%. In Lacaune, during early lactation 0, 8 and 92% and during mid lactation 4, 23 and 73% of milk flow curves were of types 1P, 2P and IP, respectively. Thus, we could observe that percentage of Manchega presenting the ejection reflex decreased (96% to 63%) as lactation advanced, while Lacaune ewes kept their ejection reflex (100% to 96%) throughout lactation, confirming previous results reported in these breeds (Manchega: 81 to 69% and Lacaune: 98 to 95%, from d 40 to d 100, respectively; Rovai, 2001) and in East Friesian, which decreased their milk flow type 2 from 25 to 7% during months 2 to 4 and months 5 to 8, respectively (Bruckmaier et al., 1997a). Moreover, the higher frequency of milk flow curves of type 2P and IP in Lacaune ewes showed a greater milk ejection reflex and milkability in this breed compared with Manchega, as reported by Rovai et al. (2002).

In the present study, milking frequency did not affect the type of milk flow curves in ewes (data not shown). Thus, we could suppose that milking frequency did not have any influence on OT release and milk ejection in dairy ewes. More in-depth studies are required in order to assess more accurately the possible effects of milking frequency on milk ejection and milk flow curves of dairy ewes.

CONCLUSIONS

Once daily milking, from early- and mid-lactation, was a suitable practice in high yielding dairy sheep with high cisternal storage capacity (i.e. Lacaune), and proved advisable, from mid lactation, for ewes with inferior cisternal capacity and milk production (i.e. Manchega), with no negative effects on milk yield, milk composition or udder health.

Tolerance to once daily milking depended on cisternal capacity of dairy ewes, being better in large-cisterned ewes, which stored higher milk volumes in the cisternal compartment and avoided milk mineral disequilibrium caused by mammary TJ disruption. Thus, once daily milking for small-cisterned ewes in early lactation may not be a suitable management decision because of higher losses. However, the important reduction in daily milking time when 1X is adopted allows farmers to improve their productivity and quality of life.

CAPÍTULO 7: Supresión de dos ordeños semanales
(Weekend milking omissions)

CAPÍTULO 7

EFECTOS A LARGO PLAZO Y DIARIOS DE LA SUPRESIÓN DE DOS ORDEÑOS SEMANALES SOBRE LA LACTACIÓN Y LA PERMEABILIDAD DE LAS UNIONES ESTANCAS EN OVEJAS LECHERAS

LONG TERM AND DAILY EFFECTS OF OMITTING TWO WEEKEND MILKINGS ON LACTATIONAL PERFORMANCE AND MAMMARY TIGHT JUNCTION PERMEABILITY IN DAIRY EWES

ABSTRACT

The long-term response and the daily effects of omitting 2 milkings weekly in early- (wk 7 to 15) and mid-lactation (wk 15 to 22) were investigated in two experiments conducted with 40 Manchega and 18 Lacaune dairy ewes. Ewes submitted to milking omissions were milked twice daily from Monday to Friday (0800 and 1800 h), and once daily on Saturday and Sunday (1600 and 1400 h, respectively). Data were individually collected for milk yield (weekly), milk composition (biweekly), and somatic cell count (SCC; monthly). Omitting 2 milkings weekly in early-lactation tended to decrease (-16%, $P = 0.07$) milk yield, but tended to increase fat content and total solids in Manchega ewes, whereas no effects were observed in Lacaune ewes. In late-lactation, milking omissions did not affect milk yield and milk composition in either breed. The SCC were unaffected by milking omissions in both breeds. A sample of 22 Manchega and 11 Lacaune experimental ewes were used to study the daily effects of 2 milking omissions weekly on milk yield and composition, udder health and tight junction permeability, both in early- (wk 12) and mid-lactation (wk 20). Milking omission decreased milk yield, milk fat and lactose content on the 1st omission day in both breeds, losses being more noticeable in early- than in mid-lactation. Protein content did not vary significantly and SCC was not negatively affected by the weekend milking omissions. After recovering twice-daily milking routine on Monday, milk yield showed a compensatory increase that was greater in large- than in small-cisterned ewes and allowed milk yield to return to Friday values in both breeds. Milk fat content increased during Sunday and Monday, reestablishing reference values thereafter, in both

breeds. Weekend milking omissions in early-lactation caused TJ leakiness in both breeds, but mammary epithelium adapted to extended milking intervals when applied successively, recovering their tight state after milking. In mid-lactation, mammary TJ showed leakiness only in Manchega ewes. In conclusion, 2 milkings weekly could be omitted with no negative effects on milk yield, milk composition and milk SCC values in large-cisterned dairy sheep. Losses in milk yield would be reduced if milking omissions were done from mid-lactation in small-cisterned ewes.

INTRODUCTION

It is important to find the adequate milking frequency for a dairy farm in order to optimise milk yield and milk composition in dairy animals, minimize milk production costs, and improve the farmers' quality of life.

Twice daily milking is the standard milking frequency used in dairy sheep farms of the Mediterranean basin, where sheep are mainly farmed in family based farms. Therefore, life style of families dedicated to dairy ewes production depends strictly on farm labor, and thus on the chosen milking frequency.

Although the reduction of daily milking frequency seems to be an interesting alternative for an improvement in the work conditions, performing once-daily milking reduces milk yield from 10 to 35% in dairy ewes (Labussière et al., 1974b; Papachristoforou et al., 1982; Nudda et al., 2002), from 6 to 26% in dairy goats (Capote et al., 1999; Boutinaud et al., 2003; Salama et al., 2003) and from 7 to 50% in dairy cows (Stelwagen et al., 1994a; Davis et al., 1999). Therefore, omission of some occasional milkings during the week (preferably during the weekend), would provide an alternative for family farms, reducing milk yield to a lesser extent than once daily milking.

There are scarce and varying studies on the effect of omitting 1 or 2 milkings weekly on milk yield in dairy animals, compared to twice a day milking. Omitting 1 milking weekly causes milk yield losses that range from 8 to 26% in ewes (Casu and Labussière, 1972; Labussière et al., 1974a; Huidobro, 1988), from 3 to 5% in goats (Mocquot, 1978; Le Mens, 1978), and from 4 to 8% in cows (Labussière and Coindet, 1968; Ayadi et al., 2003a). Omission of 2 milkings weekly using high-producing dairy sheep breeds showed decreases in milk yield ranging from 10% in Spanish Assaf (Hervás et al., 2006) to 26% in Sarda dairy ewes (Casu and Labussière, 1972), being quite similar to milk yield losses observed when

only 1 milking was omitted weekly (Huidobro, 1988; Knight y Gosling, 1995). The wide variation in yield losses reported by authors when milking frequency is decreased suggests that differences in breed, level of milk yield, udder morphology, lactation stage, and duration of the application of extended milking intervals are important factors determining the success or the failure of milking omission.

Omission of 1 milking weekly is reported to increase milk fat (Labussière et al., 1974a, Huidobro, 1988) and milk protein content throughout lactation in sheep (Labussière et al., 1974a; Knight and Gosling; 1995). However, large-cisterned sheep breeds (e.g. Sarda) showed no changes in milk components as a result of omitting 1 milking weekly (Casu and Labussière, 1972). Milking frequency modifications affect the content of milk components in dairy ewes (McKusick et al., 2002a, Castillo et al., 2008a), dairy goats (Salama et al., 2003), and dairy cows (Ayadi et al., 2004). Omitting 1 or 2 milkings weekly causes marked increases in fat and protein contents of the milk collected after the omission, both in ewes (Casu and Labussière, 1972; Labussière et al., 1974a; Hervás et al., 2006) and in cows (Labussière and Coindet, 1968; Ayadi et al., 2003a), which modifies bulk milk composition. However, milk composition is described as returning to normal values 2 or 3 d after the milking omission (Casu and Labussière, 1972, Labussière et al., 1974a, Ayadi et al., 2003a).

Although sheep breed (Nudda et al., 2002; Castillo et al., 2008a,b), udder cistern size (Ayadi et al., 2003a; Castillo et al., 2008b) and stage of lactation (Knight and Gosling, 1995) may affect the response of dairy ruminants to extended milking intervals, no studies have been carried out in dairy ewes to compare these effects under the same experimental conditions. The aim of the experiment presented in this paper was to determine, in medium- and large-cisterned Manchega and Lacaune dairy ewes, the long-term effects and the daily effects of omitting 2 milkings weekly in early- and mid-lactation on milk yield, milk composition, and tight junction permeability.

MATERIALS AND METHODS

Animals and Management Conditions

Forty Manchega and 18 Lacaune lactating ewes, located on the experimental farm of the SGCE (Servei de Granges i Camps Experimentals) of the Universitat Autònoma de Barcelona were used after the weaning of the lambs (wk 5) to wk 22 of lactation to study the

lactational effects induced by the omission of 2 milkings weekly when performed in early- (wk 7 to 14) or mid-lactation (wk 15 to 22).

Ewes were chosen on the basis of similar milk yield by breed (Manchega, 1327 ± 49 mL/d; Lacaune; 2303 ± 140 mL/d) and somatic cell count (SCC; Manchega, $118 \pm 58 \times 10^3$ cells/mL; Lacaune: $237 \pm 235 \times 10^3$ cells/mL) in the weeks previous (wk 5, 6, 7) to the start of the experiment. Absence of intramammary infections was checked by milk sample bacteriology to avoid unhealthy udder status of experimental ewes.

Cisternal scans and milk partitioning was performed, as indicated by Castillo et al. (2008b), 8 h after milking at week 6 of lactation, in order to classify ewes according to their cisternal size. Ewes were classified as large- (Manchega, >20 cm²; Lacaune, >30 cm²) or small-cisternal (Manchega: < 20 cm² and Lacaune: < 30 cm²) according to the average values measured in each breed (Table 1).

Table 1. Productive and cisternal characteristics of the experimental Manchega and Lacaune dairy ewes according to cisternal size (small or large) at 8-h milking interval at wk 6 of lactation. ¹

Items	Manchega		Lacaune	
	Small (n = 20)	Large (n = 20)	Small (n = 9)	Large (n = 9
Total milk, mL	537 ± 32^b	745 ± 40^a	862 ± 47^b	1157 ± 80^a
Cisternal milk, mL	309 ± 28^b	477 ± 30^a	609 ± 54^b	857 ± 90^a
Cisternal milk, %	56 ± 3^b	64 ± 2^a	70 ± 4	73 ± 3
Cisternal size, cm ²	16.0 ± 0.7^b	25.7 ± 1.1^a	24.2 ± 1.0^b	35.9 ± 0.5^a

¹Data are means \pm standard error.

^{a-b}Means in the same breed, within a row having different superscript letters differ ($P < 0.05$).

Ewes were randomly assigned to two machine milking treatments; **14X** (ewes were milked 14 times/week; Manchega, n = 29; Lacaune, n = 12) or **12X** (ewes were milked 12 times/week because of omitting 2 weekend milkings; Manchega, n = 11; Lacaune, n = 6), at week 7 of lactation (early lactation). Treatments applied to ewes were switched at wk 15 (mid lactation) according to a crossover design, but 17 Manchega and 6 Lacaune ewes continued in group 14X as a control. Ewes submitted to milking omission treatments (12X) were milked twice daily from Monday to Friday (0800 and 1800 h), and once daily at the weekends (Saturday, 1600 h; Sunday, 1400 h). Monday morning milking was done at the regular time (0800 h) due to labor organization reasons, resulting in unequal long milking intervals (Friday p.m. to Saturday, 22-h; Saturday to Sunday, 22-h; and, Sunday to Monday a.m., 18-h).

Ewes were managed similarly throughout the trial and maintained under the same feeding system during the course of the experiment, based on a dehydrated mixture of alfalfa hay and fescue hay fed ad libitum, and a supplement of 0.8 Kg/d of concentrate mixture pellets (1.75 Mcal NE_I/Kg and 16.5% CP; DM basis), distributed twice daily during milking.

Routine Milking

Milking was conducted in a double-12 stall parallel milking parlor (Westfalia Surge Ibérica, Granollers, Spain) equipped with recording jars and low-line milk pipeline. Milking was performed at a vacuum pressure of 42 kPa, a pulsation rate of 120 pulses/min, and a pulsation ratio of 50%. The milking routine for regular daily milking (0730 and 1730 h) included cluster attachment without udder preparation or teat cleaning, machine milking, machine stripping before cluster removal, and teat dipping in an iodine solution (P3-iodshield, Ecolab Hispano-Portuguesa, Barcelona, Spain).

Procedures, Sample Collection, and Analysis

Milk yield of individual ewes was recorded weekly at every milking from wk 5 to 22 of lactation by using the recording jars in the milking parlor. Milk samples from each ewe were taken biweekly for analysis of composition (100 mL) and monthly for SCC (50 mL). For analysis of milk composition, the a.m. and p.m. samples were composited in a daily sample according to milk yield at each milking.

Milk samples were collected and preserved with an anti-microbial tablet (Bronopol, Broad Spectrum Micro-tabs II, D&F Control Systems Inc., San Ramon, CA) at 4 °C. Unhomogenized milk samples were analyzed with a near infrared spectrometer (Technicon InfraAlyzer-450, Bran+Luebbe SL, Nordersted, Germany) for content of total solids, fat, protein ($N \times 6.38$), true protein, CN, and lactose, as indicated by Albanell et al. (1999). The SCC was determined in the Dairy Herd Improvement Laboratory of Catalonia (ALLIC, Cabrils, Barcelona, Spain) using an automatic cell counter (Fossomatic 5000, Foss Electric, Hillerød, Denmark).

During wk 12 and 20 of lactation, 33 of the experimental ewes were used to study the daily effects of omitting 2 milkings weekly when applied from early lactation (Manchega, n = 11; Lacaune, n = 6) or from mid lactation (Manchega, n = 11; Lacaune, n = 5).

Throughout the experimental weeks (wk 12 and 20), milk yield at each milking was recorded individually using the recording jars in the milking parlor. Milk samples of each ewe at each milking were taken every day to analyze daily milk composition changes. Milk composition analyses were performed as described previously. Average milk yield and composition for Friday was used as reference values to evaluate the effect of changing the milking frequency on Saturday and Sunday. Concentrations of Na and K in milk and of lactose in plasma were used as indicators of the leakiness of TJ (Stelwagen et al., 1995, 1997). Milk samples (10 mL) were frozen at -20 °C until being analyzed for Na and K content by inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES) in the Chemical Analysis Service of the Universitat Autònoma de Barcelona (Bellaterra, Barcelona, Spain). To determine concentrations of plasma lactose, blood samples (10 mL) were collected daily into heparinized tubes (Venoject, Terumo Europe, Madrid, Spain) from the jugular vein by venipuncture and were stored at 4 °C until centrifugation at $490 \times g$ for 15 min. Plasma was collected and stored at -20 °C until being analyzed from lactose in the Veterinary Clinical Biochemistry Service of the Universitat Autònoma de Barcelona (Bellaterra, Barcelona, Spain) according to the method described by Stelwagen et al. (1994a).

Statistical Analyses

Data were processed by using a mixed-model procedure for repeated measurements (PROC MIXED; SAS 9.1; SAS Inst. Inc., Cary, NC). The model included the fixed effects of breed (Manchega and Lacaune), treatment (12X and 14X), period (early- and mid-lactation), and cistern size (large and small), the random effect of animal, the significant interactions, plus the residual error. In order to analyze the carry-over effects of milking treatments on daily milk yield throughout lactation, another model that included the fixed effects of breed (Manchega and Lacaune), order of treatment application throughout the experimental period (12X-14X, 14X-12X, and 14X-14X), week (from 7 to 22) and cistern size (large and small), the random effect of animal, the significant interactions, plus the residual error, was used. A third model was used to evaluate the daily effects of omitting 2 weekend milking. The model included the fixed effects of breed (Manchega and Lacaune), experimental week (wk 12 or 20), day (Monday to Sunday), and cistern size (large and small), the random effect of animal, the significant interactions, plus the residual error. Differences between least square means were determined with the PDIFF test of SAS.

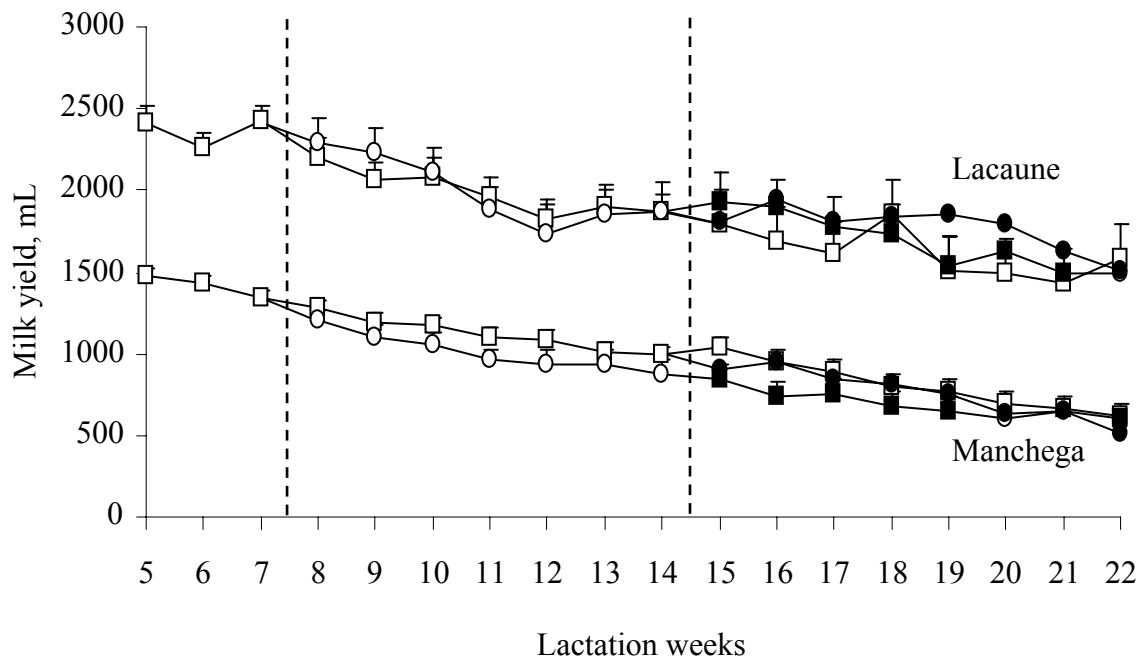
Significance was declared as $P < 0.05$ unless otherwise indicated. Logarithmic transformations (\log_{10}) of SCC values were used in the statistical analysis.

RESULTS AND DISCUSSION

Lactational Performance over the 15 Experimental Weeks

Responses to milking omissions varied according to breed and stage of lactation at which they were applied (Figure 1). In Manchega ewes, milking 12X weekly during early lactation (wk 8 to 14) tended to decrease milk yield (-16%, $P = 0.07$) compared to milking 14X weekly (Table 2). On the contrary, Lacaune ewes, which had larger cistern sizes ($P < 0.05$) and accommodate milk better than Manchega ewes (Castillo et al., 2008b), did not show milk yield losses when 2 milkings weekly were omitted.

Figure 1. Effect of omitting 2 milkings weekly during early- or mid-lactation (○, ●) vs. no milking omission (□, ■) on milk yield in Manchega and Lacaune ewes throughout the experimental weeks. Values are the total dairy milk yield and are Least Square Means. Vertical bars represent SEM.



Losses in milk yield attributable to milking omission have been previously demonstrated in sheep, varying from 13% in Sarda ewes to 26% in Préalpes du Sud ewes as a result of omitting 1 milking weekly in comparison with twice daily (Casu and Labussièrre,

1972; Labussière et al., 1974a), and from 10 to 24% when 2 milkings weekly were omitted (Casu and Labussière, 1972; Hervás et al., 2006). In contrast to these results, Huidobro (1988) and Knight and Gosling (1995) did not observe significant milk yield losses (-8% and -7%, $P > 0.05$, respectively) attributed to the omission of 1 milking weekly in Manchega and Poll Dorset ewes, respectively. Reductions in milk yield have also been described in dairy cows (4%; Ayadi et al., 2003a) and in dairy goats (3 to 5%; Mocquot, 1978; Le Mens, 1978) as a result of omitting one milking weekly in comparison with twice daily milking. According to Labussière (1988), variations between breeds (potential of production, mammary morphology and cisternal capacity) could be one of the main factors responsible for the variable and contradictory results reported in the literature examining the effects of milking omission in dairy ruminants. In agreement, our results suggested that large-cisterned breed ewes (Lacaune) suffered the smallest losses of milk yield attributable to milking omissions, confirming previous studies conducted in large- and small-cisterned dairy ewes (see Chapter 6), dairy goats (Salama et al., 2004), and dairy cows milked only once daily (Knight and Dewhurst, 1994; Stelwagen and Knight, 1997; Davis et al., 1998), and in dairy cows in which 1 milking weekly was omitted (Ayadi et al., 2003a). When extending the milking interval in dairy ruminants, large mammary cisterns might be capable of storing most of the secreted milk, favoring free drainage of alveoli to the cistern (Davis et al., 1998; Stelwagen, 2001). Thus, avoiding the negative effects on milk secretion caused by the TJ opening (Stelwagen et al., 1995), which occurs from 20 h of milking interval in dairy ewes (Castillo et al., 2008a), and by Feedback Inhibitor of Lactation (FIL), which is active when in contact with secretory alveolar tissue (Wilde et al., 1995).

Implementation of 12X during mid lactation (wk 15 to 22), did not affect milk yield in either breeds, indicating that possible effects of milking omission become less noticeable as milk yield declines throughout lactation in ewes (Knight and Gosling, 1995). In dairy cows, O'Brien et al. (2002) analyzed the short term effects of omitting one milking weekly to reduce labor requirements on dairy cow farms, and reported that milk yield was not affected in late lactation.

Lactation persistency index also varied in Manchega ewes in response to milking omission treatment according to the stage of lactation at which it was applied (Table 2). Thus, lactation persistency was negatively affected ($P < 0.05$) by the milking omission treatment (12X) in early lactation whereas it was not modified when performed from mid lactation.

Table 2. Milk yield, daily milk yield, lactation persistency, milk composition (fat, protein, lactose, total solids) and somatic cell counts (SCC) in Manchega and Lacaune dairy ewes milked twelve (12X) or fourteen times (14X) weekly in early- and mid-lactation.¹

Parameters	Early lactation				Mid lactation			
	Milking		ESD	<i>P</i> =	Milking		ESD	<i>P</i> =
	12X	14X			12X	14X		
Milk yield, L								
Manchega	53.4	62.6	4.9	0.07	37.3	39.9	3.0	0.88
Lacaune	110.7	111.4	8.7	0.93	87.7	79.5	8.7	0.39
Daily milk yield, mL/d								
Manchega	971	1138	96	0.08	759	806	97	0.63
Lacaune	1983	2011	181	0.88	182	1655	155	0.34
² Lactation persistency, % per week								
Manchega	94 ^b	98 ^a	1.8	0.02	93	95	2.8	0.50
Lacaune	98	97	2.4	0.85	98	99	2.8	0.85
Milk Composition								
Fat, %								
Manchega	6.61	7.02	0.21	0.06	7.62	7.74	0.28	0.66
Lacaune	5.86	6.16	0.24	0.29	5.79	6.01	0.21	0.30
Protein, %								
Manchega	5.59	5.72	0.16	0.16	6.15	6.22	0.28	0.80
Lacaune	4.80	5.06	0.22	0.33	5.08	5.10	0.24	0.93
CN, %								
Manchega	4.42	4.53	0.14	0.41	4.86	4.93	0.24	0.77
Lacaune	3.75	3.98	0.19	0.33	3.98	4.02	0.21	0.84
Whey protein, %								
Manchega	1.16	1.04	0.08	0.17	1.24	1.26	0.10	0.82
Lacaune	0.92	0.97	0.12	0.72	1.28	1.06	0.21	0.11
Lactose, %								
Manchega	4.72	4.72	0.07	0.99	4.67	4.59	0.05	0.08
Lacaune	4.56	4.59	0.06	0.57	4.47	4.42	0.06	0.41
Total Solids, %								
Manchega	17.94	18.60	0.35	0.07	19.6	19.9	0.51	0.52
Lacaune	16.47	17.01	0.44	0.32	16.6	16.9	0.36	0.44
SCC, log ₁₀ /mL								
Manchega	5.20	4.97	0.15	0.15	5.03	5.05	0.13	0.86
Lacaune	4.78	5.00	0.40	0.55	5.08	5.09	0.86	0.98

¹Values are Least Squares Means.

²Lactation persistency was calculated using daily milk yield obtained during early- (wk 8 to-15) and mid-lactation (wk 15 to 22).

^{a,b}Means with different superscripts within the same row are different (*P* < 0.05).

In Lacaune ewes, however, daily milk production showed an overall mean decay of 63 mL each week, with no significant (*P* > 0.05) differences between treatments in lactation persistency index either in early- or in mid-lactation. These results are in agreement with results reported by Hervás et al. (2006) in Spanish Assaf ewes, which did not show

differences between milking treatments in lactation persistency index regardless of the stage of lactation.

Cistern size affected ($P < 0.01$) milk yield in Manchega ewes and tended to affect it ($P = 0.07$) in Lacaune ewes, agreeing with Rovai (2001) and Castillo et al. (2008b), who reported significant correlations between cistern size and total milk yield in dairy ewes. Interaction cistern size \times treatment (12X, 14X) was not significant, so large- and small-cisterned ewes responded similarly to weekend milking omission treatment.

In relation to milk composition (Table 2), significant differences were detected between breeds ($P < 0.01$) and lactation stage ($P < 0.05$) for all the milk components analyzed except whey proteins. Omitting 2 milkings weekly tended to increase milk fat content ($P = 0.06$), and consequently, total milk solids ($P = 0.07$), in Manchega ewes in early lactation. Nevertheless, milking omission did not affect milk components when performed from mid lactation in the same breed. In Lacaune ewes, milking omission did not modify milk components throughout lactation either. Thus, milk composition seems to vary according to the lactation stage when milking suppression is conducted in those sheep breeds less adapted to extended milking interval (e.g., Manchega). The tendency to increase milk fat content in early lactation showed by Manchega could be caused by the decrease in total daily milk production during the same lactation stage, which is in accordance with previous results reported by Rémond et al. (2004) in dairy cows. Increases in the milk fat content attributed to the omission of 1 (Labussière et al., 1974a; Huidobro, 1988) or 2 milkings weekly (Hervás et al., 2006) have previously been reported in different sheep breeds. In contrast, high-producing Sarda and Spanish Assaf ewes did not modify their milk composition when only 1 milking omission was applied (Casu and Labussière, 1972; Hervás et al., 2006), which is in accordance with our results in Lacaune ewes. In dairy cows, omitting 1 milking weekly did not significantly affect milk yield composition when applied short-term during late lactation (O'Brien et al., 2002; Ayadi et al., 2003a) but is not in accordance with data from complete lactation. On the contrary, Labussière and Coindet (1968) obtained in Française Frisonne Pie Noir cows a reduction in milk fat (6.3%), milk protein (6.6%) and milk lactose (7.8%) when one milking was omitted.

In our study, omitting two milkings weekly did not significantly affect ($P > 0.05$) milk component yields (fat, protein and lactose) neither in early nor in mid lactation in both breeds (data not shown). Nevertheless, the tendency to reduce milk yield in early lactation

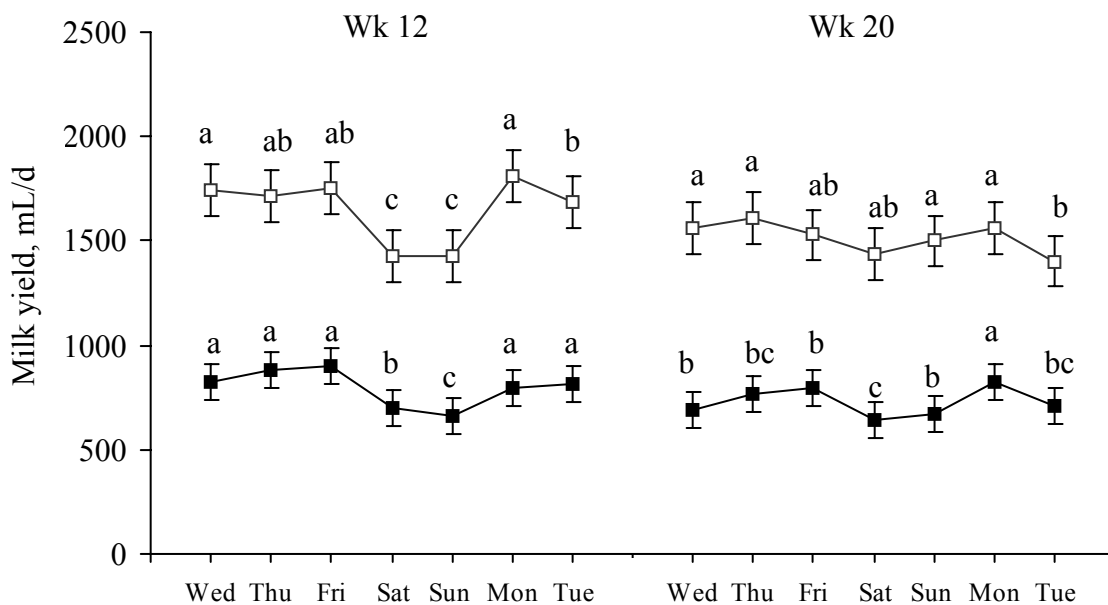
for 12X Manchega ewes tended to result in lower yields of fat (12X: 59 ± 7 vs. 14X: 75 ± 6 g/d; $P = 0.06$) and protein (12X: 50 ± 5 vs. 14X: 62 ± 4 g/d; $P = 0.07$).

Breed and lactation week effects on SCC were not statistically significant ($P > 0.05$). Omitting 2 milkings weekly did not affect ($P > 0.05$) the mean value of \log_{10} SCC, which was steadily constant both in early (4.99) and in mid lactation (5.07), and confirmed results obtained by Hervás et al. (2006) in Spanish Assaf ewes. Some authors have reported that a reduction in the number of milkings can increase SCC (Davis et al., 1999; Nudda et al., 2002), but this response was not demonstrated in other studies conducted in dairy cows (O'Brien et al., 2002; Ayadi et al., 2003a), dairy goats (Salama et al., 2003), or ewes submitted to the omission of the Sunday evening milking (Labussière et al., 1974a; Huidobro, 1988).

Daily Modifications of Milk Yield, Milk Composition, and Udder Health

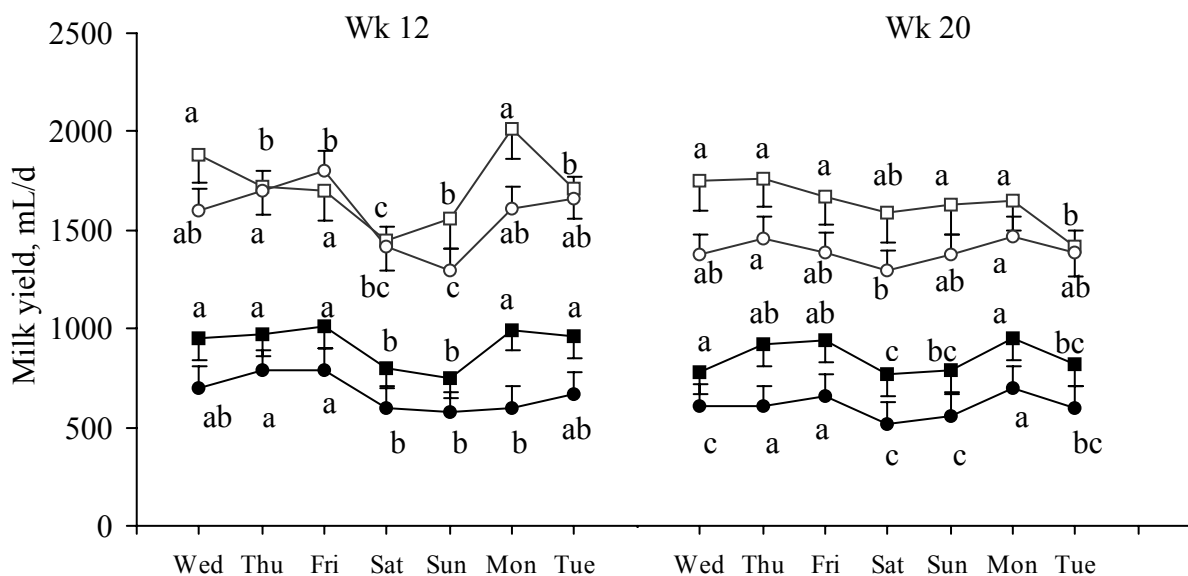
The evolution of milk yield for the different days of the week as a result of a change in milking frequency at the end of early- (wk 12) and mid- lactation (wk 20) is shown in Figure 2.

Figure 2. Effect of milking omissions (Saturday and Sunday) on daily milk yield during the wk 12 and 20 of lactation in Manchega (■) and Lacaune (□) dairy ewes. Values are Least Squares Means. Vertical bars represent SEM.



In early-lactation, daily milk yield (Manchega: 899 mL/d and Lacaune: 1750 mL/d) decreased ($P < 0.05$) by 24% in Manchega and by 18% in Lacaune ewes during the weekend, due to the milking omission application. Nevertheless, after recovering the habitual milking frequency (Monday), daily milk yield showed a significant increase in Manchega (20%) and in Lacaune ewes (27%), compensating milk yield losses, partly in Manchega and totally in Lacaune ewes. Compensatory increments following the omission of 1 or 2 milkings have been previously observed in Sarda (89%; Casu and Labussière, 1972), Préalpes du Sud (46%; Labussière et al., 1974a) and Spanish Assaf ewes (27% and 16%, respectively; Hervás et al., 2006), and in dairy cows (9%; Ayadi et al., 2003a). Moreover, the compensatory increase showed after milking omissions (Figure 3) was affected by breed ($P < 0.001$) and mammary cistern capacity to store milk ($P < 0.05$). Thus, after suffering milking omissions, milk yield increased in large-cisterned Manchega (32%, $P < 0.05$) and in all Lacaune ewes (29 and 24%, $P < 0.05$), whereas small-cisterned Manchega ewes did not significantly increase (4%, $P > 0.05$) their milk yield to reach normal levels.

Figure 3. Effect of milking omissions (Saturday and Sunday) on daily milk yield during wk 12 and 20 of lactation in large- (■, □) or small-cisterned (●, ○) Manchega (in black) and Lacaune (in white) dairy ewes. Values are Least Squares Means. Vertical bars represent SEM.



Small-cisterned ewes are limited to storing small quantities of milk in their cisterns, so when milking omissions and extended milking intervals are practiced, intrammary pressure rises (Peaker, 1980), alveolar drainage is reduced (Davis et al., 1998) or mammary TJ

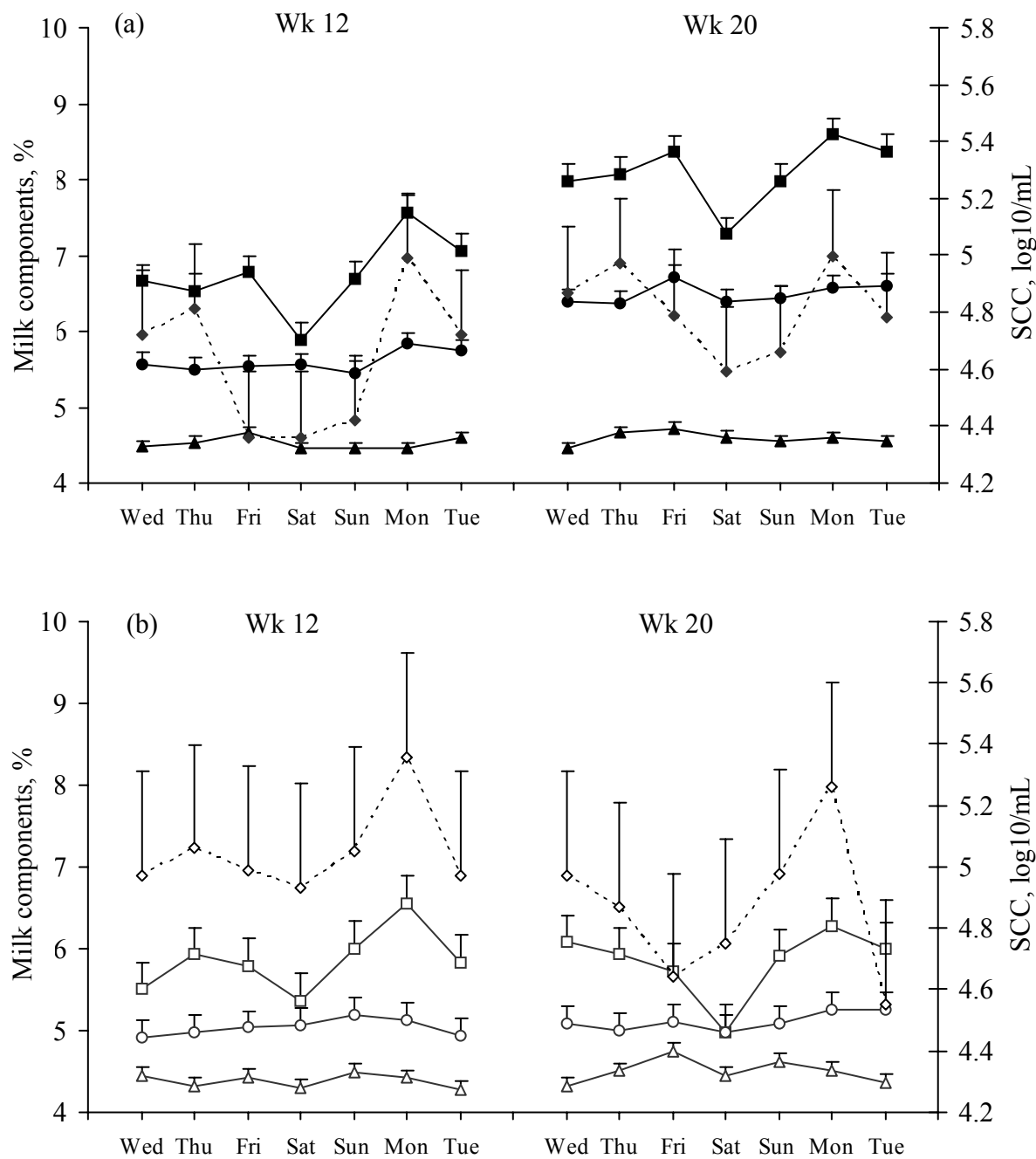
permeability increases (Stelwagen, 2001; Castillo et al., 2008a), which all negatively affects milk synthesis and secretion, and consequently, milk yield.

Milk yield rate also declined when milking omission was done in early-lactation, varying from 37.5 and 73.0 mL/h on Friday to 31.0 and 65.0 mL/h on Saturday and Sunday, in Manchega and Lacaune ewes, respectively. The decreases in milk yield rate lasted until Tuesday in both breeds, suggesting that mammary epithelial cell secretion was not completely recovered immediately after applying habitual milking frequency.

Practicing 2 milking omissions at mid-lactation caused less noticeable effects than at early-lactation (Figure 2 and 3). No effects on milk yield were observed, in Lacaune ewes. In Manchega ewes, although milk yield losses (20%, $P < 0.05$) were observed during the milking omission days (Saturday and Sunday), milk yield was completely recovered on Monday (23%, $P < 0.05$) in both, small- and large-cisterned ewes, with no repercussions on milk production throughout the rest of lactation (Figure 1). The fact that milking omission effects were lower in mid- (wk 20) than in early-lactation (wk 12) in both breeds, confirmed that impact of milking omission varies with stage of lactation (Hervás et al., 2006). Moreover, our results suggested that at advanced stages of lactation, mammary cistern size does not play such an essential role on milk yield maintenance as that played when milking omissions are applied at closer stages to the peak of lactation. As lactation progresses, milk yield decreases in dairy ruminants. Thus, medium mammary cisterns seem to be big enough to store secreted milk during extended milking intervals in medium-lactation, avoiding the deleterious effects on milk synthesis due to overaccumulation of milk within the alveoli (Peaker and Blatchford; 1988).

As observed in a long-term, fat was the milk component subjected to the largest fluctuations due to milking suppressions (Figure 4). Increasing milking interval produces milk fat content decreases in dairy ewes (McKusick et al., 2002a; Castillo et al., 2008a). Thus, the change in milking frequency applied on Saturday, made fat content (Manchega: 5.89 and 7.28%, and Lacaune: 5.37 and 4.98%, in early- and mid-lactation, respectively) decrease by 13% ($P < 0.05$) in early-lactation, and by 13% ($P < 0.05$) and 7% ($P > 0.10$) in mid-lactation, in Manchega and Lacaune ewes, respectively. On Sunday, although the milking interval (22h) was similar to that applied on Saturday, fat content increased and reached the percentage shown before applying milking omission (Friday), and kept increasing until reaching the maximum content on Monday (Manchega: 7.57 and 8.60%, and Lacaune: 6.56 and 6.29%, in early- and mid-lactation, respectively).

Figure 4. Effect of milking omissions (Saturday and Sunday) on daily fat (■, □), protein (●, ○), and lactose (▲, △) content, and on the daily SCC (◆, ◇) concentration in milk during wk 12 and 20 of lactation in Manchega (a, in black) and Lacaune (b, in white). Values are Least Squares Means. Vertical bars represent SEM.



Extended milking intervals favor the accumulation of fat in the alveolar compartment (McKusick et al, 2002a; Castillo et al., 2008b), causing an increase of fat content in the residual milk. This high-fat residual milk, which is recovered after 22h and 18h of milking interval on Sunday and Monday milkings, respectively, may have contributed to the

dramatic milk fat increase observed those days. After returning to the habitual milking routine, fat content in the residual milk is supposed to recover habitual levels and therefore, fat content in total milk.

These fluctuations in fat content were in agreement with results observed by Casu and Labussière (1972) and Labussière et al. (1974a) in ewes submitted to Sunday evening milking omission, which showed significant fat content increments the day after the milking omission. On the other hand, the same authors observed that milk protein content was less affected by milking omissions than milk fat content. In agreement, our results only showed milk protein increments (7%, $P < 0.05$) after the last milking omission in early-lactation, in Manchega ewes. Milk protein content was not affected by milking suppressions at any stage of lactation in Lacaune ewes.

In dairy ruminants, extended milking intervals favor mammary TJ opening, which allows lactose and other milk components to leak out from alveolar compartment to blood and vice versa (Stelwagen et al., 2001). In our study, extended milking intervals (22 h) were applied as a consequence of milking omissions, and consequently variations in lactose concentration were observed in both breeds, especially in early-lactation (wk 12). Lactose percentage decreased (5%, $P < 0.05$) from Friday to Saturday in Manchega ewes, and did not reach the reference lactose value (4.6%) until Tuesday, although habitual milking frequency had already been recovered on Monday. These results suggested TJ leakiness in Manchega ewes. Moreover, mammary TJ seemed to keep opening until the day following the last milking omission, which made us suspect that mammary TJ need time to adapt to changes in milking frequency. The most remarkable decrease of lactose percentage in Lacaune ewes was observed from Friday to Saturday both in early- and in mid-lactation. Nevertheless, reference lactose values were recovered rapidly, which could confirm a lesser effect of extended milking frequency on mammary TJ of this breed than on those of Manchega breed (Castillo et al., 2008a).

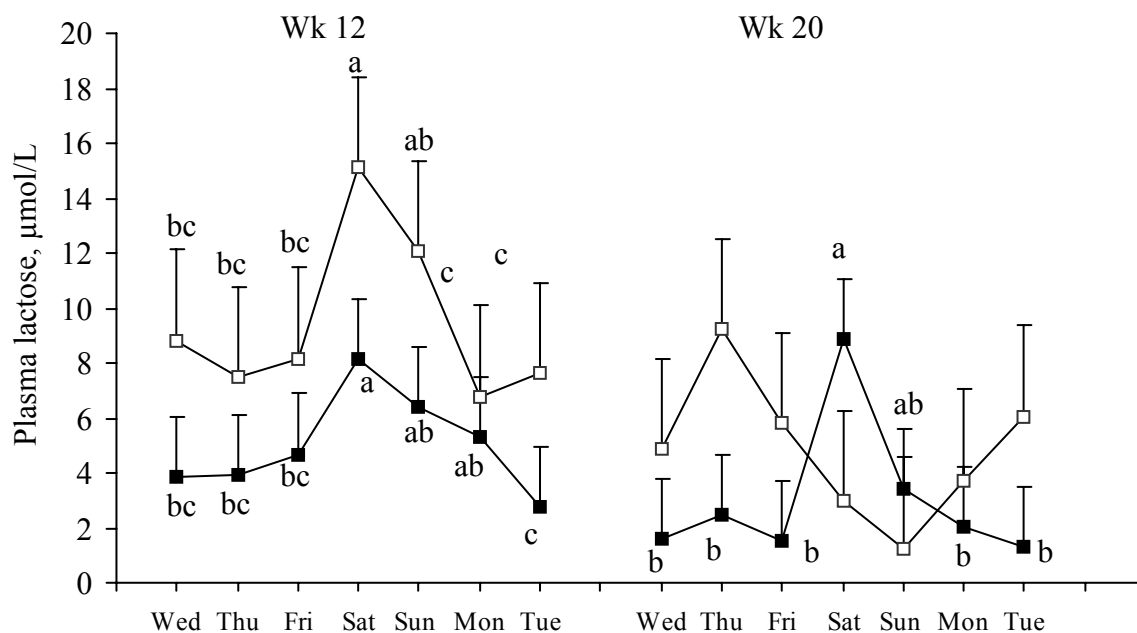
Ewes were free from clinical mastitis and showed low SCC during all the days of the experimental weeks (Manchega: 23 to 100×10^3 cells/mL and Lacaune: 44 to 229×10^3 cells/mL). The lowest SCC was observed during the milking omission days, as a consequence of milk dilution. After recovering regular milking frequency, SCC increased ($P < 0.05$) rapidly, reaching values similar to those of the days previous to milking omissions (Figure 4). No studies exist on the evolution of daily SCC after applying milking omissions in dairy ewes. In dairy cows, Ayadi et al. (2003a) reported significant increments in SCC

after omitting one milking weekly, but SCC decreased again after 4 milkings and no clinical mastitis was observed in any cow at any time.

Tight Junction Permeability

Lactose concentration in plasma and mineral concentration (Na and K) in milk were used as indicators of the state of TJ (Figure 5 and 6), as described by Stelwagen et al. (1994a). Milking omissions in early-lactation significantly affected plasma lactose concentration in both breeds, which dramatically increased (Manchega: +73% and Lacaune: +85%; $P < 0.01$) from Friday to Saturday, and maintained high values until Sunday in both breeds. These results confirm a leaky state of TJ in the mammary epithelium when extended milking intervals are applied at early stages of lactation, which is in accordance with results obtained by Castillo et al. (2008a) in the same dairy ewe breeds.

Figure 5. Effect of milking omissions (Saturday and Sunday) on daily concentration of plasma lactose (■, □) during wk 12 and 20 of lactation in Manchega (in black) and Lacaune (in white). Values are Least Squares Means. Vertical bars represent SEM.



In our study, high plasma lactose concentrations were also obtained on Sunday, thus plasma lactose concentration seemed to peak each time that milking omission or extended milking intervals are performed, which agrees with data observed in dairy cows (Stelwagen et al. 1997). Nevertheless, the plasma lactose peak shown on Sunday was numerically lower than that on Saturday and slightly greater than plasma lactose levels before applying

weekend milking omissions. This could suggest that mammary TJ adapted to extended milking intervals when they were applied successively in dairy ewes. In agreement, Stelwagen et al. (1997) observed in dairy cows that the amplitudes of lactose peaks decreased after the first 24 h of once-daily milking. Moreover, Stelwagen et al. (1995, 1997) reported that plasma lactose levels declined rapidly after removing the lactose from the gland during milking, suggesting that mammary TJ rapidly close after milking. In our experiment, Manchega and Lacaune ewes showed the lowest plasma lactose levels after recovering the habitual twice-daily milking routine (on Monday), suggesting the rapid closure of mammary TJ after milking including in dairy ewes. Nevertheless, the great variability shown by the plasma lactose analysis makes it difficult to conclude exactly what happens with mammary TJ during and after milking omissions. More studies are required on this topic.

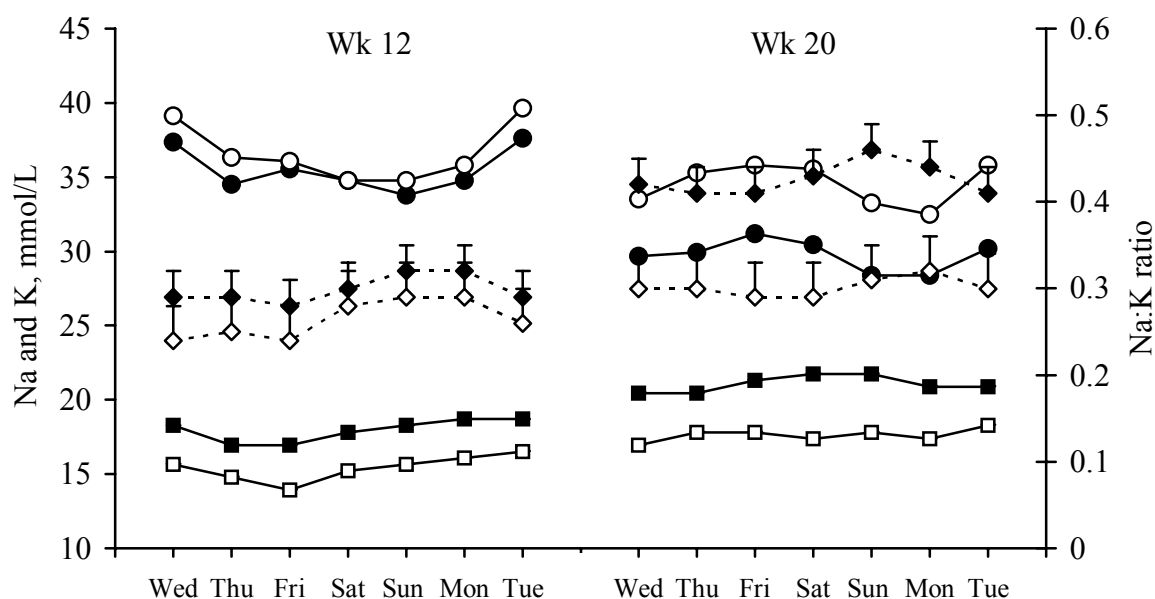
In mid-lactation, plasma lactose concentration varied in Manchega ewes as it did in early-lactation, but was not modified by weekend milking omissions in Lacaune ewes (Figure 5). These different responses to milking omissions according to breed might be explained by the fact that Lacaune breed is more tolerant to milk accumulation between milkings than Manchega breed (Rovai, 2001; Castillo et al., 2008a).

Variations of daily mean concentrations of Na and K, and of the Na:K ratio in milk due to milking omissions, are shown in Figure 6. In early-lactation, Na concentration increased after applying milking suppression on Saturday morning and steadied up until Wednesday, recovering reference values on Thursday. On the contrary, K concentration decreased, presenting the lowest values on Sunday and Monday. In mid-lactation, no variations were observed in Na concentration, but K concentration behaved as it had done in early-lactation. In dairy ewes, TJ opening is described as occurring after 20 h of udder filling (Castillo et al., 2008a). Moreover, it is well established that when TJ are disrupted, the concentration of Na in milk rises, whereas that of K declines (Stelwagen et al., 1995), resulting in a higher Na to K ratio. Therefore, our results confirmed that milking omission on Saturday and Sunday (22-h milking interval) caused mammary TJ destabilization, and thus changes in the ionic milk composition.

The Na:K ratio increased ($P < 0.001$) when milking suppressions were performed in early-lactation and tended ($P = 0.09$) to do it in medium-lactation, recovering reference values on Tuesday. Stelwagen et al. (1999a) reported that an increase in the Na to K ratio caused a transient reduction in milk secretion. Thus, the increase in the Na:K in milk

observed in our experiment, may at least partially explain the reduction in milk secretion and, consequently the reduction in milk yield shown, specially in early-lactation, during the milking-omission days.

Figure 6. Effect of milking omissions (Saturday and Sunday) on daily concentration of Na (■, □) and K (●, ○), and on the Na:K ratio (◆, ◇) in milk during wk 12 and 20 of lactation in Manchega (in black) and Lacaune (in white). Values are Least Squares Means. Vertical bars represent SEM.



CONCLUSIONS

Omitting two milkings weekly could be an interesting management approach to reduce farm labor with minimum effects on milk yield and no negative effects on milk composition and SCC values in healthy Manchega and Lacaune dairy ewes. Milk losses by milking omission depend on udder cistern size and stage of lactation. Thus, large-cisterned ewes adapted to two milking omissions weekly without losing milk yield both in early- and in mid-lactation, whereas ewes that store lower proportions of their total milk yield within the cistern (small-cisterned ewes) reduced losses in milk yield if the weekend milking omissions were done starting from mid-lactation.

In addition, this study showed that milk fat content markedly increased after milking omission in dairy ewes, recovering normal values 48 h after the last milking omission. Moreover, mammary TJ switched rapidly to a leaky state when milking omissions were

performed, and returned to a close state again after recovering twice-daily milking routine in dairy ewes. Therefore, milk recording should be conducted in the middle of the week to avoid milk component variations caused by the milking omissions and the associated mammary TJ leakiness. New research into the cause of these changes in tight junction permeability is required in dairy ewes.

CAPÍTULO 8: Conclusiones

CAPÍTULO 8

CONCLUSIONES

1. Efectos del intervalo entre ordeños

- Las ovejas lecheras de raza Manchega y Lacaune fueron capaces de adaptarse al aumento del intervalo entre ordeños a corto plazo, manteniendo un incremento lineal de la producción de leche hasta las 24 h de intervalo y sin presentar efectos negativos sobre el estado sanitario de la ubre.
- La apertura de las TJ mamarias se produjo a partir de las 20 h de acumulación de la leche en la ubre de ambas razas. Sin embargo, la apertura de las TJ pareció ser más marcada en las ovejas de raza Manchega, en las que los intercambios iónicos y el incremento de lactosa plasmática fueron más evidentes.
- Los largos intervalos entre ordeños afectaron al ritmo de secreción de leche y de componentes lácteos debido al flujo paracelular que se estableció a través de las TJ en los intervalos entre ordeños más largos. Los componentes que más variaron su contenido en la leche fueron la grasa, que disminuyó al aumentar el intervalo entre ordeños, y la lactosa, que disminuyó marcadamente al aplicarse un intervalo entre ordeños de 24 h.
- La actividad de la plasmina en la leche aumentó con el intervalo entre ordeños, alcanzando el valor máximo a las 20 h de intervalo en ambas razas.
- Valores elevados del área y del volumen de leche cisternal favorecieron la adaptación, de ambas razas a la prolongación de los intervalos entre ordeños.
- El compartimento cisternal, a diferencia del alveolar, jugó un papel fundamental tanto en el almacenamiento como en el mantenimiento de la producción de leche al realizarse intervalos entre ordeños largos.
- Las ovejas de raza Lacaune mostraron grandes áreas y mayores porcentajes y volúmenes de leche cisternal que las ovejas de raza Manchega, hecho que favoreció su mejor adaptación a los largos intervalos entre ordeños.
- La ecografía resultó una metodología útil para la evaluación de los cambios producidos en el compartimento cisternal por la acumulación de leche al aplicar diferentes intervalos entre ordeños. Las mejores estimaciones y correlaciones entre el área y el volumen cisternal se obtuvieron a las 8 h del ordeño.

2. Uno frente a dos ordeños diarios

- Un ordeño diario resultó ser una buena práctica de manejo en las ovejas de raza Lacaune, con gran tamaño cisternal, pudiendo aplicarse tanto al inicio como a la mitad de la lactación y sin observarse efectos negativos sobre la producción, la composición o la sanidad de la ubre. En las ovejas de raza Manchega, con una inferior capacidad cisternal, la práctica de un ordeño al día también fue adecuada cuando se empezó a realizar a partir de la mitad de la lactación, sin pérdidas significativas en la producción de leche ni cambios negativos en la composición de la leche o en el estado sanitario de la ubre.
- Realizar un solo ordeño al día reduce considerablemente el tiempo diario destinado a esta tarea, permitiendo aumentar la productividad de la mano de obra y la calidad de vida de los ganaderos.

3. Supresión de dos ordeños semanales

- La supresión de dos ordeños semanales durante el fin de semana resultó ser una práctica de manejo interesante para reducir el trabajo semanal de ordeño con reducidos efectos negativos sobre la producción de leche, su composición y el RCS en ovino lechero sano.
- Las pérdidas productivas observadas, al suprimir ordeños, dependieron del estado de la lactación y del tamaño cisternal de los animales. Las ovejas con grandes cisternas se adaptaron a la supresión de dos ordeños semanales sin pérdidas productivas tanto al inicio como a mitad de lactación.
- Las ovejas con pequeñas cisternas mostraron mayores pérdidas productivas al suprimir los ordeños al inicio de la lactación, mientras que vieron reducidas dichas pérdidas al realizar la supresión a partir de la mitad de la lactación.
- En todos los animales, el contenido en grasa de la leche disminuyó el primer día de la supresión, aumentando a partir del segundo, y recuperando los valores normales a las 48 h de la última supresión de ordeños. Los contenidos en proteína y lactosa de la leche no variaron marcadamente.
- Las TJ mamarias se abrieron al realizarse la supresión de ordeños, pero recuperaron su estado y se estabilizaron al volver a aumentar la frecuencia de ordeños a dos ordeños diarios.

- Los controles lecheros deberían de realizarse como mínimo 72 horas después de la supresión, es decir, a partir del miércoles si ésta se realiza durante el fin de semana, para evitar las variaciones causadas por la omisión de ordeños, asociadas gran parte de ellas a la desestabilización de las TJ mamarias.

CAPÍTULO 9: Implicaciones

CAPÍTULO 9

IMPLICACIONES Y APLICACIONES EN LA PRÁCTICA

Las estrategias de ordeño estudiadas en esta tesis podrían ser aplicadas por los ganaderos. Ahora bien, deberían tenerse en cuenta ciertas premisas:

Premisas generales

1. Los animales deben de estar sanos, con recuentos celulares bajos y sin infecciones mamarias clínicas o subclínicas.
2. La reducción del tiempo destinado al ordeño reducirá los costes fijos de la explotación: mano de obra, electricidad, agua y mantenimiento de la máquina de ordeño, etc., compensando las pérdidas económicas que se puedan derivar cuando al disminuir el número de ordeños se produzca pérdidas de producción.

Un ordeño diario

1. Las ovejas con grandes cisternas pueden tolerar ser ordeñadas una vez al día desde el inicio de la lactación con pérdidas productivas reducidas. Ahora bien, para minimizar dichas pérdidas sería prudente iniciar la lactación tras el destete con dos ordeños diarios, durante algunas semanas, pasando posteriormente a un ordeño al día.
2. Las ovejas con cisternas medias o pequeñas presentan mayores pérdidas productivas al disminuir la frecuencia de ordeños a uno al día. Se recomienda, por tanto, aplicarlo en estas ovejas a partir de la mitad de la lactación.
3. El contenido en materias útiles de la leche no parece verse afectado negativamente por la frecuencia de ordeño en ninguno de los dos casos.

Supresión de 2 ordeños semanales

1. En las ovejas que presentan grandes cisternas puede realizarse la supresión de ordeños en cualquier momento de la lactación.
2. Las ovejas con cisternas de tamaño medio se adaptarán bien a esta práctica de manejo. Para compensar las pérdidas productivas que se puedan derivar, la supresión podría empezarse a realizar a partir de la mitad de la lactación.
3. Los controles lecheros deberán realizarse a partir del 3er día tras la supresión de ordeños, a fin de evitar los cambios en la composición de la leche derivados de la supresión de los dos ordeños.

CAPÍTULO 10: Referencias bibliográficas

CAPÍTULO 10

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akers, R. M. 2002. Lactation and the Mammary Gland. 1st ed. Iowa State Press, USA.
- Akers, R. M. 2006. Major advances associated with hormone and growth factor regulation on mammary growth and lactation in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 89:1222-1234.
- Akers, R. M., and A. M. Lefcourt. 1982. Milking- and suckling- induced secretion of oxytocin and prolactin in parturient dairy cows. *Horm. Behav.* 16:87-93.
- Albanell, E., P. Cáceres, G. Caja, E. Molina, and A. Gargouri. 1999. Determination of fat, protein, and total solids in ovine milk by near-infrared spectroscopy. *J. AOAC* 82:753-758.
- Albenzio, M., M. Caroprese, A. Santillo, R. Marino, A. Muscio, and A. Sevi. 2005. Proteolytic patterns and plasmin activity in ewes' milk as affected by somatic cell count and stage of lactation. *J. Dairy Res.* 72:86-92.
- Albenzio, M., M. Caroprese, A. Santillo, R. Marino, L. Taibi, and A. Sevi. 2004. Effects of somatic cell count and stage of lactation on the plasmin activity and cheese-making properties of ewe milk. *J. Dairy Sci.* 87:533-542.
- Anderson, J. M., y I. C. Van. 1995. Tight junctions and the molecular basis for regulation of paracellular permeability. *Am. J. Physiol.* 269:G467-G475.
- Ayadi, M., G. Caja, X. Such, and C. H. Knight. 2003a. Effect of omitting one milking weekly on lactational performances and morphological udder changes in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 86:2352-2358.
- Ayadi, M., G. Caja, X. Such, and C. H. Knight. 2003b. Use of ultrasonography to estimate cistern size and milk storage at different milking intervals in the udder of dairy cows. *J. Dairy Res.* 70:1-7.
- Ayadi, M., G. Caja, X. Such, M. Rovai, and E. Albanell. 2004. Effect of different milking intervals on the composition of cisternal and alveolar milk in dairy cows. *J. Dairy Res.* 71:304-310.
- Baldi, A., S. Modina, F. Cheli, F. Gandolfi, L. Pinotti, L. Baraldi Scesi, F. Fantuz, and V. Dell'Orto. 2002. Bovine somatotropin administration to dairy goats in late lactation: effects on mammary gland function, composition and morphology. *J. Dairy Sci.* 85:1093-1102.
- Baldi A., G. Savoini, F. Cheli, F. Fantuz, E. Senatore, L. Bertocchi, and I. Politis. 1996. Changes in plasmin-plasminogen-plasminogen activator system in milk from Italian friesian herds. *Int. Dairy J.* 6:1045-1053.

- Banks, W. 1986. Applied Veterinary Histology. Mosby-year book. Missouri, USA.
- Barone, R. 1978. Mamelles de la brebis et de la chèvre. Pages 491-495 in Anatomie Comparée des Mammifères Domestiques. Tome 3. Splanchnologie. Fascicule 2. Tixier & Fils, S. A., Lyon, France.
- Bar-Peled, U., E. Maltz, I. Bruckental, Y. Folman, Y. Kali, H. Gacitua, A. R. Lehrer, C. H. Knight, B. Robinzon, H. Voet, and H. Tagar. 1995. Relationship between frequent milking or suckling in early lactation and milk production on high producing dairy cows. *J. Dairy Sci.* 78:2726-2736.
- Bastian, E. D. and R. J. Brown. 1996. Plasmin in milk and dairy products: an update. *Int. Dairy J.* 6:435-457.
- Bastian, E. D., R. J. Brown, and C. A. Ernstrom. 1991. Plasmin activity and milk coagulation. *J. Dairy Sci.* 74:3677-3685.
- Bauman, D. E., R. W. Everett, W. H. Weiland, and R. J. Collier. 1999. Production responses to bovine somatotropine in northeast dairy herds. *J. Dairy Sci.* 82:2564-2573.
- Bennett, C. N., C. H. Knight, and C. J. Wilde. 1990. Regulation of mammary prolactin binding by secreted milk proteins. *J. Endocrinol.* 127 (Suppl) 141.
- Bianchi, L., A. Bolla, E. Budelli, A. Caroli, C. Casoli, M. Pauselli, and E. Duranti. 2004. Effect of udder health status and lactation phase on the characteristics of Sardinian ewe milk. *J. Dairy Sci.* 87:2401-2408.
- Blatchford, D. R., and M. Peaker. 1982. Effects of frequent milking on milk secretion during lactation in the goat: relation to factors which limit the rate of milk secretion. *Quarterly Journal of Experimental Physiology.* 67:303-310.
- Blum, J. W., D. Schams, and R. M. Bruckmaier. 1989. Catecholamines, oxytocin and milk removal in dairy cows. *J. Dairy Res.* 56:167-177.
- Bocquier, F., F. Barillet, P. Guillouet, and M. Jacquin. 1993. Prévission de l'énergie du lait de brebis à partir de différents résultats d'analyses : proposition de lait standard pour les brebis laitières. *Ann. Zootech.* 42:57-66.
- Boutinaud, M., C. Rousseau, D. H. Keisler, and H. Jammes. 2003. Growth hormone and milking frequency act differently on goat mammary gland in late lactation. *J. Dairy Sci.* 86:509-520.
- Bruckmaier, R. M. 2003. Chronic oxytocin treatment causes reduced milk ejection in dairy cows. *J. Dairy Res.* 70:123-126.

- Bruckmaier, R. M., and J. W. Blum. 1992. B-Mode ultrasonography of mammary glands of cows, goats and sheep during α - and β -adrenergic agonist and oxytocin administration. *J. Dairy Res.* 59:151-159.
- Bruckmaier, R. M., and J. W. Blum. 1994. Central and peripheral inhibition of milk ejection. Pages: 96-101 in *Proc. Int. Symp. Prospects for Future Dairying: A Challenge for Science and Industry*, Tumba and Uppsala, Sweden. O. Lind and K. Svennersten, ed. Alfa Laval Agri AB, Tumba, Sweden.
- Bruckmaier, R. M., and J. W. Blum. 1996. Simultaneous recording of oxytocin release, milk ejection and milk flow during milking of dairy cows with and without prestimulation. *J. Dairy Res.* 63:201-208.
- Bruckmaier, R. M., and J. W. Blum. 1998. Oxytocin release and milk removal in ruminants. *J. Dairy Sci.* 81:939-949.
- Bruckmaier, R. M., H. Mayer, and D. Schams. 1991. Effects of α - and β -adrenergic agonists on intramammary pressure and milk flow in dairy cows. *J. Dairy Res.* 58:411-419.
- Bruckmaier, R. M., G. Paul, H. Mayer, and D. Schams. 1997a. Machine milking of Ostfriesian and Lacaune dairy sheep: udder anatomy, milk ejection and milking characteristics. *J. Dairy Res.* 64:163-172.
- Bruckmaier, R. M., H. U. Pfeilsticker, and J. W. Blum. 1996. Milk yield, oxytocin and β -endorphin gradually normalize during repeated milking in unfamiliar surroundings. *J. Dairy Res.* 63:191-200.
- Bruckmaier, R. M., E. Rothenanger, and J. W. Blum. 1994a. Measurement of mammary gland cistern size and determination of the cisternal milk fraction in dairy cows. *Milchwissenschaft.* 49:543-546.
- Bruckmaier, R. M., D. Schams, and J. W. Blum. 1992. Aetiology of disturbed milk ejection in parturient primiparous cows. *J. Dairy Res.* 59:479-489.
- Bruckmaier, R. M., D. Schams, and J. W. Blum. 1993. Milk removal in familiar and unfamiliar surroundings: concentration of oxytocin, prolactin, cortisol and β -endorphine. *J. Dairy Res.* 60:449-456.
- Bruckmaier, R. M., D. Schams, and J. W. Blum. 1994b. Continuously elevated concentrations of oxytocin during milking are necessary for complete milk removal in dairy cows. *J. Dairy Res.* 61:323-334.
- Bruckmaier, R. M., O. Wellnitz, and J. W. Blum. 1997b. Inhibition of milk ejection in cows by oxytocin receptor blockade, α -adrenergic receptor stimulation and in unfamiliar surroundings. *J. Dairy Res.* 64:315-325.

- Buys, N., D. Vanmontfort, R. Peeters, J. van Isterdael, E. Decuypere, and E. R. Khun. 1995. Bromocryptine is effective in reducing milk production in ewes during lactation, but has no additional effect during drying off. *Anim. Sci.* 60:203-208.
- Caja, G., X. Such, and M. Rovai. 2000. Udder morphology and machine milking ability in dairy sheep. Pages: 17-40 in 6th Great Lakes Dairy Sheep Symposium, Ontario, Canada.
- Caja, G., M. Ayadi, and C. H. Knight. 2004. Changes in cisternal compartment based on stage of lactation and time since milk ejection in the udder of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 87:2409-2415.
- Caja, G., X. Such, J. Ruberte, A. Carretero, and M. Navarro. 1999. The use of the ultrasonography in the study of the mammary gland cisterns during lactation in sheep. Pages 91-96 in *Milking and Milk Production of Dairy Sheep and Goats*. EAAP Publication n° 95. Wageningen Pers., Wageningen, The Netherlands.
- Capote, J., J. L. López, G. Caja, S. Peris, A. Argüello, and N. Darmanin. 1999. The effects of milking once or twice daily throughout lactation on milk production of Canarian dairy goats. Pages 267-273 in *Milking and Milk Production of Dairy Sheep and Goats*. F. Barillet and N. P. Zervas., ed. Wageningen Pers, Wageningen, The Netherlands.
- Capote, J., A. Argüello, N. Castro, J. L. López, and G. Caja. 2006. Short communication: correlation between udder morphology, milk yield, and milking ability with different milking frequencies in dairy goats. *J. Dairy Sci.* 89:2076-2079.
- Capuco, A. V., D. L. Word, R. Baldwin, K. Mcleod, and M. J. Paape. 2001. Mammary cell number, proliferation, and apoptosis during a bovine lactation: relation to milk production and effect of bST. *J. Dairy Sci.* 84:2177-2187.
- Carruthers, V. R., S. R. Davis, A. M. Bryant, H. V. Henderson, C. A. Morris, and P. J. A. Copeman. 1993. Response of Jersey and Friesian cows to once a day milking and prediction of response based on udder characteristics and milk composition. *J. Dairy Res.* 60:1-11.
- Castillo, V., X. Such, G. Caja, E. Albanell, and R. Casals. 2004. Short term effects of different milking intervals on cisternal and alveolar milk in dairy ewes. *J. Dairy Sci.* 87(Suppl. 1):173(Abstr.)
- Castillo, V., X. Such, G. Caja, R. Casals, E. Albanell, and A. A. K. Salama. 2008a. Effect of milking interval on milk secretion and mammary tight junction permeability in dairy ewes. *J. Dairy Sci.* (submitted).

- Castillo, V., X. Such, G. Caja, A. A. K. Salama, E. Albanell, and R. Casals. 2008b. Changes in Alveolar and Cisternal Compartments Induced by Milking Interval in the Udder of Dairy Ewes. *J. Dairy Sci.* (submitted).
- Casu, S. 1967. La pecora Sarda e la mungitura meccanica. *Rivista di Zootecnia*, 40-52.
- Casu, S. and J. Labussière. 1972. Premiers résultats concernant la suppression d'une ou plusieurs traits par semaine chez la brebis Sarde. *Ann. Zootech.* 21:223-232.
- Claesson, O., A. Hansson, N. Gustaffsson, and E. Brannang. 1959. Studies on monozygous cattle twins XVII. Once-a-day milking compared with twice-a-day milking. *Acta Agric. Scand.* 9:38-58.
- Clark, D. A., C. V. C. Phyn, M. J. Tong, S. J. Collis, and D. E. Dalley. 2006. A systems comparison of once- versus twice-daily milking of pastured dairy cows. *J. Dairy Sci.* 89:1854-1862.
- Collier, R. J. 1985. Nutritional, metabolic, and environmental aspects of lactation. Pages 80-128 in *Lactation*. B. L. Larson, ed. The Iowa State University Press, Ames, USA.
- Cowie, A. T., and J. S. Tindal. 1971. *The Physiology of Lactation*. Camelot Press Ltd., London.
- Dahl, G. E., T. L. Auchtung, J. P. Underwood, and J. K. Drackley. 2002. Frequent milking in early lactation that increases milk yield also increases prolactin receptor mRNA expression. *J. Anim. Sci.* 80(Suppl. 1):53. (Abstr.)
- Dahl, G. E., R. L. Wallace, R. D. Shanks, and D. Lueking. 2004. Hot topic: effects of frequent milking in early lactation on milk yield and udder health. *J. Dairy Sci.* 87:882-885.
- Davis, S. R., and G. A. Hughson. 1989. Measurement of functional udder capacity in lactating Jersey cows. *Aust. J. Agric. Res.* 39:1163-1168.
- Davis, S. R., V. C. Farr, P. J. A. Copeman, V. R. Carruthers, C. H. Knight, and K. Stelwagen. 1998. Partitioning of milk accumulation between cisternal and alveolar compartments of the bovine udder: relationship to production loss during once daily milking. *J. Dairy Res.* 65:1-8.
- Davis, S. R., V. C. Farr, and K. Stelwagen. 1999. Regulation of yield loss and milk composition during once-daily milking: a review. *Livest. Prod. Sci.* 59:77-94.
- Delamaire, E., and J. Guinard-Flament. 2006. Increasing milking intervals decreases the mammary blood flow and mammary uptake of nutrients in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 89:3439-3446.

- Delouis, C., and Ph. Richard. 1991. La lactation. Pages 487-514 in *La Reproduction chez les Mammifères et l'Homme*. C. Thibault and M. C. Levasseur, ed. INRA Ellipses. Paris, France.
- Delouis, C., L. M. Houdebine, and P. Richard. 2001. La Lactation. Page 580 in *La Reproduction chez les Mammifères et l'Homme*. INRA ed. Paris, France.
- de Rancourt, M., N. Fois, M. P. Lavín, E. Tchakérian, and F. Vallerand. 2006. Mediterranean sheep and goats production: An uncertain future. *Small Rum. Res.* 62:167-179.
- Dewhurst, R. J., and C. H. Knight. 1993. Changes in the sites of milk storage over the lactation cycle of primiparous and multiparous dairy cows. *Anim. Prod.* 56:428-429.
- Dewhurst, R. J., and C. H. Knight. 1994. Relationship between milk storage characteristics and the short-term response of dairy cows to thrice-daily milking. *Anim. Prod.* 58:181-187.
- Donker, J. D., J. H. Koshi, and W. E. Petersen. 1954. The effect of exogenous oxytocin in blocking the normal relationship between endogenous oxytocic substance and the milk ejection phenomenon. *Science* 119:67.
- Dubeuf, J. P., and J. C. Le Jaouen. 2005. The sheep and goat dairy sectors in the European Union: present situation and stakes for the future. Pages 1-6 in *Special Issue of the International Dairy Federation 0501/Part 1. Future of the sheep and goats dairy sectors*. Zaragoza, Spain.
- Ely, E., and W. E. Patersen. 1941. Factors involved in the ejection of milk. *J. Dairy Sci.* 24:211-223.
- Erdman, R. A., and M. Varner. 1995. Fixed yield responses to increased milking frequency. *J. Dairy Sci.* 78:1199-1203.
- Fantuz, F., F. Polidori, F. Cheli, and A. Baldi. 2001. Plasminogen activation system in goat milk and its relation with composition and coagulation properties. *J. Dairy Sci.* 84:1786-1790.
- FAOSTAT data, 2004. www.fao.org/faostat/ Accessed Feb. 15, 2008.
- Farr, V. C., C. G. Prosser, and S. R. Davis. 2000. Effects of mammary engorgement and feed withdrawal on microvascular function in lactating goat mammary glands. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 279:H183-H188.
- Fernández, N. 1985. Estudio de las características y aptitud al ordeño mecánico de la raza de ovejas "Manchega" (PROYECTO FAO M-4). PhD Thesis. Universidad Politécnica de Valencia, Spain.

- Fernández, G., P. Álvarez, F. San Primitivo, L. F. de la Fuente. 1995. Factors affecting variation of udder traits of dairy ewes. *J. Dairy Sci.* 78:842-849.
- Fernández, N., J. Arranz, G. Caja, A. Torres, and L. Gallego. 1983. Aptitud al ordeño mecánico de ovejas de raza manchega:1. Biometría corporal, características morfológicas de la ubre, caída de pezoneras y cría de corderos. Pages 653-666 in III Symposium Internacional ordeño mecánico pequeños rumiantes, Valladolid, Spain.
- Fernández, N., G. Caja, A. Torres, M. P. Molina, and L. Gallego. 1989. Cinética de la emisión de leche de ovejas de raza Manchega: II. Relación con otros criterios de aptitud al ordeño mecánico. *Investigación Agraria: Producción y Sanidad Animal* 4:23-33.
- Fernández, N., M. P. Molina, S. Balasch, A. Torres, and F. Adriaens. 2001. Bovine somatotropin dose titration in lactating dairy ewes. 3. Treatment interval. *J. Dairy Sci.* 84:2170-2176.
- Fitzpatrick, R. J. 1961. The estimation of small amounts of oxytocin in blood. Pages 51-73 in *Oxytocin*. Caldeyro-Barcia, R., H. Sëller eds. Pergamon Press, Oxford, UK.
- Fleet, I. R., and M. Peaker. 1978. Mammary function and its control at the cessation of lactation in the goat. *J. Physiol.* 279:491-507.
- Flieger, S. 1976. Experimental investigations on the localization of the nerve centre of the mammary gland in the sheep. *Ann. Univ. Mariae Curie-Sklodowska.* 31:57-66.
- Folley, S. J., and G. S. Knagg. 1966. Milk ejection activity (oxytocin) in the external jugular vein blood of the cow, goat and sow in relation of the stimulus of milking or suckling. *J. Endocrinol.* 34:197-214.
- Fuchs, A. R., J. Ayromlooi, and A. B. Rasmussen. 1987. Oxytocin response to conditioned and non-conditioned stimuli in lactating ewes. *Biol. Reprod.* 37:301-305.
- Gallego, L. 1983. Análisis de la lactación y respuesta al ordeño mecánico en ovejas de raza Manchega. PhD Thesis. Universidad Politécnica de Valencia, Spain.
- Gallego L., G. Caja, and A. Torres. 1983. Estudio de la tipología y características morfológicas de las ubres de ovejas de raza Manchega durante la lactación. Pages 100-116 in III Symposium Internacional ordeño pequeños rumiantes. Valladolid, Spain.
- Gargouri, A., X. Such, G. Caja, R. Casals, A. Ferret, H. Vergara, and S. Peris. 1993. Estrategias de cria-ordeño en ovino lechero: 1. Efecto del tipo de cría (libre o restringida) y número de ordeños diarios (2 ó 3) sobre la producción de leche de ovejas de raza Manchega. *ITEA*, 12:30-32.

- Ghosal, N. G., T. Koch, and P. Popesko. 1981. Branches of the external iliac vein: The pudendoepigastric vein and its branches. Pages 130-134 in *The Venous Drainage of the Domestic Animals*. W. B. Saunders Company Philadelphia, USA.
- Gleeson, D. E., B. O'Brien, L. Boyle, and B. Earley. 2007. Effect of milking frequency and nutritional level on aspects of the health and welfare of dairy cows. *Animal* 1:125-132.
- Gonzalo, C. 1992. Ordeñabilidad en la raza Churra. *Ovis*. 18:41.
- Gorewit, R. C., K. Svennersten, W. R. Butler, and K. Uvnäs-Moberg. 1992. Endocrine responses in cows milked by hand and machine. *J. Dairy Sci.* 75:443-448.
- Hale, S. A., A. V. Capuco, and R. A. Erdman. 2003. Milk yield and mammary growth effects due to increased milking frequency during early lactation. *J. Dairy Sci.* 86:2061-2071.
- Hammon, H. M., R. M. Bruckmaier, U. E. Honegger, and J. W. Blum. 1994. Distribution and density of α - and β -adrenergic binding sites in the bovine mammary gland. *J. Dairy Res.* 61:47-57.
- Hendersson, A. J.; D. R. Blatchford, and M. Peaker. 1983. The effects of milking thrice instead of twice daily on milk secretion in the goat. *Quart. J. Exp. Physiol.* 68:645-652.
- Hendersson, A. J.; D. R. Blatchford, and M. Peaker. 1985. The effects of long-term thrice-daily milking on milk secretion in the goat : evidence for mammary growth. *Quart. J. Exp. Physiol.* 70:557-565.
- Henderson, A. J., and M. Peaker. 1984. Feedback control of milk secretion in the goat by a chemical in milk. *J. Physiol. (London)*. 351:39-45.
- Henderson, A. J., and M. Peaker. 1987. Effect of removing milk from the mammary ducts and alveoli, or of diluting stored milk, on the rate of milk secretion in the goat. *Quart. J. Exp. Physiol.* 72:13-19.
- Hernandez, H., P. Poindron, J. A. Delgadillo, G. Kann, and P. G. Marnet. 1999. Restriction of the mother young contact and identity of the young influence hormonal response to suckling or milking in double purpose dairy goats. Page 31 in *Proceedings International Symposium on Suckling*. SLU Repro, Uppsala, Stockholm, Sweden.
- Hervás, G., J. L. Ramella, S. López, J. S. González, and A. R. Mantecón. 2006. Effect of omitting one or two milkings weekly on lactational performance in dairy ewes. *J. Dairy Res.* 73:207-215.
- Hillerton, J. E., and A. Winter. 1992. The effects of frequent milking on udder physiology and health. Pages 201-212 in *Proc. Int. Symp. Prospects for Automatic Milking*. EAAP Publication No 65, Wageningen, The Netherlands.

- Hillerton, J. E., C. H. Knight, A. Turvey, S. D. Wheatley, and C. J. Wilde. 1990. Milk yield and mammary function in dairy cows milked four times daily. *J. Dairy Res.* 57:285-294.
- Hollman, K. H. 1974. Cytology and fine structure of the mammary gland. Pages 3-95 in B. L. Larson, V. R. Smith eds. *Lactation*, Academic Press, New York, USA.
- Holmes, C. W., G. F. Wilson, D. D. S. Mackenzie, and J. Purchas. 1992. The effects of milking once daily throughout lactation on the performance of dairy cows grazing on pasture. *Proc. N. Soc. Anim. Prod.* 52:13-16.
- Huidobro, F. 1988. Effects of suppressing Sunday afternoon milking in Manchega sheep. *ITEA Prod. Animal* 78:33-37.
- Hurley, W. L. 2001. *Lactation Biology Website*. Department of Animal Sciences. University of Illinois. <http://classes.ansci.uiuc.edu/ansc438/> Accessed Feb. 10, 2008.
- Huston, G. E., and S. Patton. 1990. Factors related to the formation of cytoplasmic crescents on milk fat globules. *J. Dairy Sci.*, 73:2061-2066.
- Inderwies, T., J. Riedl, E. Kiossis, and R. M. Bruckmaier. 2003. Effects of α -y β -adrenergic receptor stimulation and oxytocin receptor blockade on milking characteristics in dairy cows before and after removal of the teat sphincter. *J. Dairy Res.* 70:289-292.
- Kamote, H. I., C. W. Holmes, D. D. S. Mackenzie, R. J. Holdaway, and B. W. Wickham. 1994. Effects of once daily milking in later lactation on cows with either low or high initial somatic cell count. *Proc. N. Z. Soc. Anim. Prod.* 54:285-287.
- Kelly, A. L., S. Reid, P. Joyce, W. J. Meaney, and J. Foley. 1998. Effect of decreased milking frequency of cows in late lactation on milk somatic cell count, polymorphonuclear leucocyte numbers, composition and proteolytic activity. *J. Dairy Res.* 65:365-373.
- Klei, R. L., J. M. Lynch, D. M. Barbano, P. A. Oltenacu, A. J. Lednor, D. K. Bandler. 1997. Influence of milking three times a day on milk quality. *J. Dairy Sci.* 80:427-436.
- Knight, C. H. 1992. Milk yield responses to sequential treatments with recombinant bovine somatotrophin and frequent milking in lactating goats. *J. Dairy Res.* 59:115-122.
- Knight, C. H. 1994. Short-term oxytocin treatment increases bovine milk yield by enhancing milk removal without any direct action on mammary metabolism. *J. Endocrinol.* 142:471-473.
- Knight, 2001. Overview of prolactin's role in farm animal lactation. *Livest. Prod. Sci.* 70:87-93.
- Knight, C. H., and R. J. Dewhurst. 1994. Once daily milking of dairy cows: relationship between yield loss and cisternal milk storage. *J. Dairy Res.* 61:441-449.

- Knight, C. H., and C. J. Wilde. 1993. Mammary cell changes during pregnancy and lactation. *Livest. Prod. Sci.* 35:3-19.
- Knight, C. H., P. A. Fowler, and C. J. Wilde. 1990. Galactopoietic and mammogenic effects of long-term treatment with bovine growth hormone and thrice daily milking in goats. *J. Endocrinol.* 127:129-138.
- Knight, C. H., D. Hirst, and R. J. Dewhurst. 1994a. Milk accumulation and distribution in the bovine udder during the interval between milkings. *J. Dairy Res.* 61:167-177.
- Knight, C. H., M. Peaker, and C. J. Wilde. 1998. Local control of mammary development and function. *Rev. Reprod.* 3:104-112.
- Knight, C. H., K. Stelwagen, V. C. Farr, and S. R. Davis. 1994b. Use of oxytocin analogue to determine cisternal and alveolar milk pool sizes in goats. *J. Dairy Sci.* 77(Suppl. 1):84. (Abstr.)
- Knight, T. W., and L. S. Gosling. 1995. Effects of milking frequency and machine-stripping on the yield and composition of milk from Poll Dorset ewes. *N. Z. J. Agric. Res.* 38:123-130.
- Knight, T. W., D. S. Atkinson, N. A. Haack, C. R. Palmer, and K. H. Rowland. 1993. Effects of suckling regime on lamb growth rates and milk yield of Dorset ewes. *N. Z. J. Agric. Res.* 36:215-222.
- Knutson, R. J., D. D. S. Mackenzie, S. R. Davis, and S. N. McCutcheon. 1993. The effect of once daily milking on concentrations and yields of plasminógeno, plasmin and other whey proteins. *Proc. N. Z. Soc. Anim. Prod.* 53:155-158.
- Koprowski, J. A., and H. A. Tucker. 1973. Serum prolactin during various physiological states and its relationship to milk production in the bovine. *Endocrinol.* 92:1480-1487.
- Korycka-Dahl, M., B. Ribadeau Dumas, N. Chene, and J. Martal. 1983. Plasmin activity in milk. *J. Dairy Sci.* 66:704-711.
- Kuhn, N. J. 1983. In *Biochemistry of Lactation*, Ch. 6. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
- Kuhn, N., and J. L. Linzell. 1970. Measurement of the quantity of lactose passing into mammary venous plasma and lymph in goats and in a cow. *J. Dairy Res.* 37:203-208.
- Labussière, J. 1969. Importance, composition et signification des différentes fractions de lait obtenues successivement au cours de la traite mécanique des brebis. *Ann. Zootech.* 18:185-196.

- Labussière, J. 1976. Physiologie de la lactation et problèmes posés par la traite. In Institut Agronomique Méditerranéen de Zaragoza. Cours Supérieur de Production Animal. IAMZ, Zaragoza, Spain.
- Labussière, J. 1982. Aspectos fisiológicos y tecnológicos del ordeño mecánico de ovejas. ITEA, Vol. Extra. 1:257-303.
- Labussière, J. 1983. Projet d'étude des caractéristiques de traite des différentes races de brebis laitières exploitées dans de bassin méditerranéen. Pages 730-768 in III Symposium Internacional de Ordeño Mecánico de Pequeños Ruminantes. Valladolid, Spain.
- Labussière, J. 1988. Review of physiological and anatomical factors influencing the milking ability of ewes and the organization of milking. *Livest. Prod. Sci.* 18:253-274.
- Labussière, J., and J. Coindet. 1968. Effets de la suppression de la traite du dimanche soir, chez les bovines de race Française Frisonne Pie Noire. *Ann. Zootech.* 17:231-244.
- Labussière, J., and J. Martinet. 1964. Description de deux appareils permettant le contrôle automatique des débits de lait au cours de la traite à la machine. Premiers résultats obtenues chez la brebis. *Ann. Zootech.* 13:199-212.
- Labussière, J., and P. Richard. 1965. La traite mécanique : aspects anatomiques, physiologiques et technologiques. Mise au point bibliographique. *Ann. Zootech.* 14:63-126.
- Labussière, J., and G. Ricordeau. 1970. Aptitude à la traite mécanique des brebis de race Préalpes du Sud et croisées Frisons × Préalpes ; étude à différents stades de la lactation. *Ann. Zootech.* 19:159-190.
- Labussière, J., J. F. Combaud, et P. Petrequin. 1974a. Effets de la suppression de la traite du dimanche soir sur les brebis de race Préalpes du sud. *Ann. Zootech.* 23:435-444.
- Labussière, J., J. F. Combaud, et P. Petrequin. 1974b. Influence de la fréquence des traites et des tétées sur la production laitière des brebis Préalpes du sud. *Ann. Zootech.* 23:445-457.
- Labussière, J., P. G. Marnet, J. F. Combaud, M. Beaufils, and F. A. de la Chevalerie. 1993. Influence of the number of corpora lutea on the release of luteal oxytocin, the transfert of milk from alveolar to cistern lumen and milk production in ewes. *Reprod. Nutr. Dev.* 33:383-393.
- Lacasse, P., and C. G. Prosser. 2003. Mammary blood flow does not limit milk yield in lactating goats. *J. Dairy Sci.* 86:2094-2097.
- Lacy-Hulbert, S. J., D. E. Dalley, and D. A. Clark. 2005. The effects of once a day milking on mastitis and somatic cell count. *Proc. N. Z. Soc. Anim. Prod.* 65:137-142.

- Lacy-Hulbert, S. J., M. W. Woolford, G. D. Nicholas, C. G. Prosser, and K. Stelwagen. 1999. Effect of milking frequency and pasture intake on milk yield and composition of late lactation cows. *J. Dairy Sci.* 82:1232-1239.
- Larson, B. L. 1979. Biosynthesis and secretion of milk proteins: A review. *J. Dairy Res.*, 46:161-174.
- Larson, B. L. 1985. Biosynthesis and cellular secretion of milk. Pages 129-163 in *Lactation*. B. L. Larson ed. The Iowa State University Press, Ames, USA.
- Lefcourt, A. M., and R. M. Akers. 1984. Small increases in peripheral noradrenaline inhibit the milk-ejection response by means of a peripheral mechanism. *J. Endocrinol.* 100:337-344.
- Le Mens, P. 1978. La suppression de la traite du dimanche soir chez la chèvre : conséquences sur la production laitière et la composition du lait. Pages 277-287 in *Proc. 2nd Int. Symp. Milking Small Ruminants*. Alghero, Italy.
- Le Roux, Y., O. Colin, and F. Laurent. 1995. Proteolysis in samples of quarter milk with varying somatic cell counts. 1. Comparison of some indicators of endogenous proteolysis in milk. *J. Dairy Sci.* 78:1289-1297.
- Linzell, J. L. 1955. Some observations on the contractile tissue of the mammary glands. *J. Physiol.* 130:257-267.
- Linzell, J. L., and M. Peaker. 1971. The effects of oxytocin and milk removal on milk secretion in the goat. *J. Physiol. (London)*. 216:717-734.
- Lollivier, V., and P. G. Marnet. 2005. Galactopoietic effect of milking in lactating Holstein cows: role of physiological doses of oxytocin. *Livest. Prod. Sci* 95:131-142.
- Macuhova, J., V. Tancin, and R. M. Bruckmaier. 2004. Effects of oxytocin administration on oxytocin release and milk ejection. *J. Dairy Sci.* 87:1236-1244.
- Marie, C., M. Jacquin, M. Aurel, F. Paillet, D. Porte, P. Autran., and F. Barillet. 1999. Déterminisme génétique de la cinétique d'émission du lait selon le potentiel laitier en race ovine de Lacaune et relations phénotypiques avec la morphologie de la mamelle. Pages 381-388 in *Milking and Milk Production of Dairy Sheep and Goats*. EAAP Publication. 95. Wageningen Pers., Wageningen, The Netherlands.
- Marnet, P. G. 1998. Physiologie de l'éjection du lait et importance pour la lactation. *Renc. Rech. Ruminants* 5:313-320.
- Marnet, P. G., and B. C. McKusick. 2001. Regulation of milk ejection and milkability in small ruminants. *Livest. Prod. Sci.* 70:125-133.

- Marnet, P. G., J. A. Negrão, and J. Labussière. 1998. Oxytocin release and milk ejection parameters during milking of dairy ewes in and out of natural season of lactation. *Small Rum. Res.* 28:183-191.
- Marnet, P. G., and J. A. Negrão. 2000. The effect of a mixed management system on the release of oxytocin, prolactin and cortisol during suckling and machine milking. *Reprod. Nutr. Dev.* 40:271-281.
- Marnet, P. G., H. Volland, P. Pradelles, J. Grassi, and M. Beaufiles. 1994. Subpicogram determination of oxytocin by an enzyme immunoassay using acetylcholinesterase as label. *J. Immunoassay.* 15:35-53.
- Maule Walker, F.M., and M. Peaker. 1980. Local production of prostaglandins in relation to mammary function at the onset of lactation in the goat. *J. Physiol.* 309:65-79.
- Mayer, H., F. Weber, and V. Segessemann. 1989. Une méthode pour enregistrer et déterminer les courbes d'écoulement du lait de brebis pendant la traite mécanique routinaire. Pages 564-575 in IV Symposium International sur la Traite Mécanique des Petits Ruminants, Tel-Aviv, Israel.
- McKusick, B. C., D. L. Thomas, Y. M. Berger, and P. G. Marnet. 2002a. Effect of milking interval on alveolar versus cisternal milk accumulation and milk production and composition in dairy ewes. *J. Dairy Sci.* 85:2197-2206.
- McKusick, B. C., D. L. Thomas, J. E. Romero, and P. G. Marnet. 2002b. Effect of weaning system on milk composition and distribution of milk fat within the udder of east frisean dairy ewes. *J. Dairy Sci.* 85:2521-2528.
- McManaman, J. L., and M. C. Neville. 2003. Mammary physiology and milk secretion. *Adv. Drug Delivery Rev.*, 55:629-641.
- Melin, P. 1994. Development of an oxytocin antagonist-Atosiban. *Res. Clinical Forums.* 16:155-170.
- Mephram, T. B. 1982. Amino acid utilization by lactating mammary gland. *J. Dairy Sci.* 65:287-298.
- Mielke, H. 1969. Intramammary milk storage as a complex function of lactation in cattle. *Wissenschaftliche Zeitschrift. Karl Marx Universität. Leipzig. Mathematisch-naturwissenschaftliche Reihe.* 18:421-429.
- Mikus, M. 1968. A study on relation between the quantity of milk and dimensions of udder in sheep during lactation. *Vedecke Prace VUO Trecin.* 4:131 (citado por Fernández, 1995).

- Mikus, M. 1969. Manual stripping in the case of machine milking of sheep in relation to the measurements of udder, to the lactation days and certain further indices. *Zyvocisna Vyroba*. 14 (12), 827 (citado por Fernández, 1995).
- Mikus, M. 1978. Study of the mutual relationships between dimensions of the udder with regard to improvement of sheep for machine milking. Pages 102-112 in II Symposium International sur la traite mécanique des petits ruminants. INRA-ITOVIC ed. Alghero, Italy.
- Mills, O. 2004. Sheep husbandry. Milking management. Pages 2507-2517 in *Encyclopedia of Dairy Sciences*. H. Roginski, ed. Academic Press, Amsterdam, The Netherlands.
- Mocquot, J. C. 1978. Effets de l'omission régulière et irrégulière d'un traite sur la production laitière de la chèvre. Pages 175-201 in Proc. 2nd Int. Symp. Milking Small Ruminants. Alghero, Italy.
- Morag, M. 1968. The effect of varying the daily milking frequency on the milk yield of the ewe and evidence on the nature of the inhibition of milk ejection by half-udder milking. *Ann. Zootech.*, 17:351-369.
- Negrão, J. A., P. G. Marnet, and J. Labussière. 2001. Effect of milking frequency on oxytocin release and milk production in dairy ewes. *Small Rum. Res.* 39:181-187.
- Neville, M. C., and M. Peaker. 1981. Ionized calcium in milk and the integrity of the mammary epithelium in the goat. *J. Physiol.* 313:561-570.
- Neville, M. C., J. C. Allen, and C. Watters. 1983. The mechanism of milk secretion. Page 50 in *Lactation: Physiology, Nutrition and Breast-Feeding*. M. C. Neville, M. R. Neifert eds. Plenum Press, New York, USA.
- Neville, M. C., T. B. McFadden, and I. Forsyth. 2002. Hormonal regulation of mammary differentiation and milk secretion. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, Vol. 7, N° 1:49-65.
- Nguyen, D. A., and M. C. Neville. 1998. Tight junction regulation in the mammary gland. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, 3:233-246.
- Nickerson, S. C. 1992. Anatomy and physiology of the udder. Pages 37-68 in *Machine Milking and Lactation*. Insight Books ed. Vermont, USA.
- Nickerson, S. C., J. J. Smith, and T. W. Keenan. 1980. Role of microtubules in milk secretion-action of colchicine on microtubules and exocytosis of secretory vesicles in rat mammary epithelial cells. *Cell Tissue Res.* 207:361-376.

- Nudda, A., R. Bencini, S. Mijatovic, and G. Pulina. 2002. The yield and composition of milk in Sarda, Awassi, and Merino sheep milked unilaterally at different frequencies. *J. Dairy Sci.* 85:2879-2884.
- Nudda, A., G. Pulina, R. Vallebella, R. Bencini, and G. Enne. 2000. Ultrasound technique for measuring mammary cistern size of dairy ewes. *J. Dairy Res.* 67:101-106.
- O'Brien, B., G. Ryan, W. J. Meaney, D. McDonagh, and A. Kelly. 2002. Effect of frequency of milking on yield, composition and processing quality of milk. *J. Dairy Res.* 69:367-374.
- Paniagua, R. G. A., and N. M. S. Nistal. 1983. *Introducción a la Histología Animal Comparada*. Labor Universitaria ed. Barcelona, Spain.
- Papachristoforou, C., A. Roushias, and A. P. Mavrogenis. 1982. The effect of milking frequency on the milk production of Chios ewes and Damascus goats. *Ann. Zootech.* 31:37-46.
- Patton, J., D. A. Kenny, J. F. Mee, F. P. O'Mara, D. C. Wathes, M. Cook, and J. J. Murphy. 2006. Effect of milking frequency and diet on milk production, energy balance, and reproduction in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 89:1478-1487.
- Peaker, M. 1980. The effect of raised intra-mammary pressure on mammary function in the goat in relation to the cessation of lactation. *J. Physiol.* 301:415-428.
- Peaker, M., and D. R. Blatchford. 1988. Distribution of milk in the goat mammary gland and its relation to the rate of control of milk secretion. *J. Dairy Res.* 55:41-48.
- Peeters, G., R. De Bruycker, W. Quintelier, and M. Paape. 1973. Contractions of the teat muscles of lactating cows. *Acta Endocrinol.* 177 (Suppl.):50.
- Peris, S., X. Such, and G. Caja. 1996. Milkability of Murciano-Granadina dairy goats. Milk partitioning and flow rate during machine milking according to parity, prolificacy and mode of suckling. *J. Dairy Res.* 63:1-9.
- Pfeilsticker, H. U., R. M. Bruckmaier, and J. W. Blum. 1996. Cisternal milk in dairy cow during lactation and after preceding teat stimulation. *J. Dairy Res.* 63:509-515.
- Pirisi, A., A. Lauret, and J. P. Dubeuf. 2007. Basic and incentive payments for goat and sheep milk in relation to quality. *Small Rum. Res.* 68:167-178.
- Plaut, K., D. E. Bauman, N. Agergaard, and R. M. Akers. 1987. Effect of exogenous prolactin on lactational performance of dairy cows. *Domest. Anim. Endocrinol.* 4:279-290.
- Politis, I., and K. F. NG. Kwai Hang. 1989. Environmental factors affecting plasmin activity in milk. *J. Dairy Sci.* 72:1713-1718.

- Politis, I., E. Lachance, E. Block, and J. D. Turner. 1989. Plasmin and plasminogen in bovine milk: a relationship with involution? *J. Dairy Sci.* 72:900-906.
- Pomiès, D., B. Martin, Y. Chilliard, P. Pradel, and B. Rémond. 2007. Once-a-day milking of Holstein and Montbéliarde cows for 7 weeks in mid-lactation. *Animal* 1:10 pp 1497-1505.
- Prosser, C. G., and S. R. Davis. 1992. Milking frequency alters the milk yield and mammary blood flow response to intra-mammary infusion of insulin-like growth factor-I in the goat. *J. Endocrinol.* 135:311-316.
- Purroy, A. 1997. Fisiología de la lactación y la aptitud al ordeño mecánico en la oveja. Pages 137-153 in *Ovino de leche: Aspectos claves*. C. Buxadé. Mundi Prensa ed. Madrid, Spain.
- Rastani, R. R., N. Silva del Rio, T. F. Gressley, G. E. Dahl, and R. R. Grummer. 2007. Effects of increasing milking frequency during the last 28 days of gestation on milk production, dry matter intake, and energy balance in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90:1729-1739.
- Remon, B., and M. P. Boit. 1997. Effects of milking three times in 2 days for 3 weeks in early lactation or in the declining phase on milk production in primiparous and multiparous dairy cows. *Ann. Zootech.* 46:339-348.
- Rémond, B. and D. Pomiès. 2005. Once-daily milking of dairy cows: a review of recent French experiments. *Anim. Res.* 54:427-442.
- Rémond, B., S. Aubailly, Y. Chilliard, D. Dupont, D. Pomiès, and M. Petit. 2002. Combined effects of once-daily milking and feeding level in the first three weeks of lactation on milk production and enzyme activities, and nutritional status, in Holstein cows. *Anim. Res.* 51:101-117.
- Rémond, B., D. Pomiès, D. Dupont, Y. Chilliard. 2004. Once-a-day milking of multiparous Holstein cows throughout the entire lactation: milk yield and composition, and nutritional status. *Anim. Res.* 53:201-212.
- Rennison, M. E., M. Kerr, C. V. P. Addey, S. E. Handel, M. D. Turner, C. J. Wilde and R. D. Burgoyne. 1993. Inhibition of constitutive protein secretion from lactating mouse mammary epithelial cells by FIL (feedback inhibitor of lactation), a secreted milk protein. *J. Cell Sci.* 106:641-648.
- Ribadeau-Dumas, B. 1981. Actualités dans le domaine de la connaissance de la structure et des propriétés biochimique des protéines laitières. *Rev. Lait. Franç.* 400:17-32.

- Richardson, B. C. 1983. The proteinases of bovine milk and the effect of pasteurization on their activity. *N. Z. J. Dairy Sci. Technol.* 18:233-245.
- Roets, E., and G. Peeters. 1985. Identification and characterization of ^3H -Prazosin binding to α_1 -adrenoceptors in bovine teat muscles. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 275:189-198.
- Roets, E., and G. Peeters. 1986. A comparison of the binding characteristics of the α_2 -adrenoceptor antagonist ^3H -Yohimbine and ^3H -Rauwolscine in bovine teat muscles. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 279:212-222.
- Roets, E., G. Vandeputte- Van Messom, C. Burvenich, and G. Peeters. 1989. Relationship between numbers of α_2 - and β_2 -adrenoceptors in teat tissue and blood cells and milkability of primiparous cows. *J. Dairy Sci.* 72:3304-3313.
- Roets, E., G. Vanquelin, G. Peeters, and R. Braeckman. 1985. Homogeneity of β -adrenoceptors on bovine teat muscles. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 276:44-49.
- Rovai, M. 2001. Caracteres morfológicos y fisiológicos que afectan la aptitud al ordeño mecánico en ovejas de raza Manchega y Lacaune. PhD Thesis. Universitat Autònoma de Barcelona, Spain. http://www.tesisenxarxa.net/TESIS_UAB/AVAILABLE/TDX-0226102-145915 Accessed Feb. 15, 2008.
- Rovai, M., X. Such, G. Caja, and C. Knight. 2000. Interbreed differences in cisternal and alveolar milk partitioning in the udder according to yield in dairy sheep. *J. Dairy Sci.* 83 (Suppl. 1), 166. (Abstr.)
- Rovai, M., X. Such, G. Caja, and J. Piedrafita. 2002. Change in cisternal and alveolar milk throughout lactation in dairy sheep. *J. Dairy Sci.* 85 (Suppl.1) 4. (Abstr.)
- Ruberte, J., A. Carretero, M. Fernandez, M. Navarro, G. Caja, F. Kirschner, and X. Such. 1994a. Ultrasound mammography in the lactating ewe and its correspondence to anatomical section. *Small Rum. Res.* 13:199-204.
- Ruberte, J., A. Carretero, M. Fernández, J. Pons, J. M. Giné, and J. Sautet. 1994b. Anatomía de la ubre de la oveja. *Ovis.* 32:9-16.
- Saeman, A. I., R. J. Verdi, D. M. Galton. 1988. Effect of mastitis on proteolytic activity in bovine milk. *J. Dairy Sci.* 71:505-512.
- Salama, A. A. K., G. Caja, X. Such, R. Casals, and E. Albanell. 2005. Effect of pregnancy and extended lactation on milk production in dairy goats milked once daily. *J. Dairy Sci.* 88:3894-3904.
- Salama, A. A. K., G. Caja, X. Such, S. Peris, A. Sorensen, and C. H. Knight. 2004. Changes in cisternal udder compartment induced by milking interval in dairy goats milked once or twice daily. *J. Dairy Sci.* 87:1181-1187.

- Salama, A. A. K., X. Such, G. Caja, M. Rovai, R. Casals, E. Albanell, M. P. Marín, and A. Martí. 2003. Effects of once versus twice daily milking throughout lactation on milk yield and milk composition in dairy goats. *J. Dairy Sci.* 86:1673-1680.
- Schams, D. 1983. Oxytocin determination by radioimmunoassay. III. Improvement to subpicogram sensitivity and application to blood levels in cyclic cattle. *Acta Endocrinol.* 103:180-183.
- Schwarze, E., and L. Schröder. 1984. *Compendio de Anatomía Veterinaria*. Acribia ed. Zaragoza, Spain.
- Scott, R. A., D. E. Beuman, and J. H. Clark. 1976. Cellular gluconeogenesis by lactating bovine mammary tissue. *J. Dairy Sci.* 59:50-56.
- Silveira, P. A., R. A. Spoon, D. P. Ryan, and G. L. Williams. 1993. Evidence for maternal behavior as a requisite link in suckling-mediated anovulation in cows. *Biol. Reprod.* 49:1338-1346.
- Smith, J. W., L. O. Ely, W. M. Graves, and W. M. Gilson. 2002. Effect of milking interval in DHI performance measures. *J. Dairy Sci.* 85:3526-3533.
- Stelwagen, K. 2001. Effect of milking frequency on mammary functioning and shape of the lactation curve. *J. Dairy Sci.* 84 (E. Suppl.):E204-E211.
- Stelwagen, K., and C. Knight. 1997. Effect of unilateral once or twice daily milking of cows on milk yield and udder characteristics in early and late lactation. *J. Dairy Res.* 64:487-494.
- Stelwagen, K., and S. J. Lacy-Hulbert. 1996. Effect of milking frequency on milk somatic cell count characteristics and mammary secretory cell damage in cows. *Anim. J. Vet. Res.* 57:902-905.
- Stelwagen, K., S. R. Davis, V. C. Farr, and S. J. Eichler. 1994a. Effect of once daily milking and concurrent somatotropin on mammary tight junction permeability and yield of cows. *J. Dairy Sci.* 77:2994-3001.
- Stelwagen, K., S. R. Davis, V. C. Farr, C. G. Prosser, and R. A. Sherlock. 1994b. Mammary epithelial cell tight junction integrity and mammary blood flow during an extended milking interval in goats. *J. Dairy Sci.* 77:426-432.
- Stelwagen, K., V. C. Farr, S. R. Davis, and C. G. Prosser. 1995. EGTA-induced disruption of epithelial cell tight junctions in the lactating caprine mammary gland. *Am. J. Physiol.* 269:R848-R855.
- Stelwagen, K., V. C. Farr, and H. A. McFadden. 1999a. Alteration of the sodium to potassium ratio in milk and effect on milk secretion in goats. *J. Dairy Sci.* 88:52-59.

- Stelwagen, K., V. C. Farr, H. A. McFadden, C. G. Prosser, and S. R. Davis. 1997. Time course of milk accumulation-induced opening of mammary tight junctions and blood clearance of milk components. *Am. J. Physiol.* 273:R379-R386.
- Stelwagen, K., C. H. Knight, V. C. Farr, S. R. Davis, C. G. Prosser, and T. B. McFadden. 1996. Continuous versus single drainage of milk from the bovine mammary gland during a 24 hour period. *Exp. Phys.* 81:141-149.
- Stelwagen, K., H. A. McFadden, and J. Demmer. 1999b. Prolactin, alone or in combination with glucocorticoids, enhances tight junction formation and expression of the tight junction protein occluding in mammary cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 156:55-61.
- Stelwagen, K., R. D. McLaren, S. A. Turner, H. A. McFadden, and C. G. Prosser. 1998a. No evidence for basolateral secretion of milk protein in the mammary gland of lactating goats. *J. Dairy Sci.* 81:434-437.
- Stelwagen, K., I. Politis, J. H. White, B. Zavizion, C. G. Prosser, S. R. Davis, and V. C. Farr. 1994c. Effect of milking frequency and somatotropin on the activity of plasminogen activator, plasminogen, and plasmin in bovine milk. *J. Dairy Sci.* 77:3577-3583.
- Stelwagen, K., D. C. van Espen, G. A. Verkerk, H. A. McFadden, and V. C. Farr. 1998b. Elevated plasma cortisol reduces permeability of mammary tight junctions in the lactating bovine mammary epithelium. *J. Endocrinol.* 159:173-178.
- Stevenson, B. R., J. M. Anderson, and S. Bullivant. 1988. The epithelial tight junction: Structure, function and preliminary biochemical characterization. *Mol. Cell Biochem.* 83:129-145.
- Stojanowic, V. 1975. Die Blutgejabversorgung des Euters vom schaf. *Anat. Anz.* 138:240-250.
- Such, X. 1990. Factores condicionantes de la aptitud al ordeño mecánico de ovejas de raza Manchega: influencia de la simplificación de rutina y las características de la máquina de ordeño. PhD Thesis. Universidad Autònoma de Barcelona, Spain.
- Such, X., G. Caja, and L. Pérez. 1999. Comparison of milking ability between Manchega and Lacaune dairy ewes. Pages 45-50 in *Milking and Milk Production of Dairy Sheep and Goats*. F. Barillet and N. P. Zervas, ed. Wageningen Pers, Wageningen, The Netherlands.
- Such, X., G. Caja, L. Pérez, y S. Peris. 1995. Primeros resultados de la comparación de la aptitud al ordeño mecánico de ovejas Lacaune y Manchega: 1. Estudio del fraccionamiento de leche y la morfología mamaria. *ITEA*, 16:708-710.

- Srinivasan, M., and J. A. Lucey. 2002. Effects of plasmin on the formation and rheological properties of rennet-induced skim milk gels. *J. Dairy Sci.* 85:1070-1078.
- Svennersten, K., and B. Samuelsson. 1992. The effect of feeding during milking on milk production and milk flow. En: *Prospects for Automatic Milking Proceedings of the International Symposium on Prospects for Automatic Milking*. Ipema, A. H., A. C. Lippus, J. H. M. Metz, W. Rossing, EAAP Publication Eds. Wageningen, The Netherlands, 65:233-236.
- Tancin, V., L. Harcek, J. Broucek, M. Uhrincat, and S. Mihina. 1995. Effect of suckling during early lactation and changeover to machine milking on plasma oxytocin and cortisol levels and milking characteristics in Holstein cows. *J. Dairy Res.* 62:249-256.
- Thomas, C. S., K. Svennersten-Sjaunja, M. R. Bhosrekar, and R. M. Bruckmaier. 2004. Mammary cisternal size, cisternal milk and milk ejection in Murrah buffaloes. *J. Dairy Res.*, 71:162-168.
- Thompson, G. E. 1980. The distribution of blood flow in the udder of the sheep and changes brought about by cold exposure and lactation. *J. Physiol.* 302:379-386.
- Tucker, H. A. 1987. Quantitative estimates of mammary growth during various physiological states: a review. *J. Dairy Sci.*, 70:1958-1966.
- Tucker, H. A. 2000. Hormones, mammary growth and lactation: A 41-years perspective. *J. Dairy Sci.* 83:874-884.
- VanBaale, M. J., D. R. Ledwith, J. M. Thompson, R. Burgos, R. J. Collier, and L. H. Baumgard. 2005. Effect of increased milking frequency in early lactation with or without recombinant somatotropin. *J. Dairy Sci.* 88:3905-3912.
- Vijil, E. 1993. Fisiología de la lactación. Curvas de lactación. Morfología mamaria. VI Curso sobre ganado ovino: Producción y calidad de leche y queso.
- Wall, E. H., and T. B. McFadden. 2007. The milk yield response to frequent milking in early lactation of dairy cows is locally regulated. *J. Dairy Sci.* 90:716-720.
- Wall, E. H., H. M. Crawford, S. E. Ellis, G. E. Dahl, T. B. McFadden. 2006. Mammary responses to exogenous prolactin or frequent milking during early lactation in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 89:4640-4648.
- Wehowsky, G., P. Moritz, F. Trogër, and H. Lohr. 1986. Deliberate initiation of incomplete alveolar milk ejections for determining the effect of stimuli. *Wissenschaftliche Zeitschrift. Karl Marx Universität. Leipzig. Mathematisch-naturwissenschaftliche Reihe.* 35:273-282.

- Wellnitz, O., R. M. Bruckmaier. 2001. Central and peripheral inhibition of milk ejection. *Livest. Prod. Sci.* 70:135-140.
- Wellnitz, O., R. M. Bruckmaier, C. Albrecht, and J. W. Blum. 1999. Atosiban, an oxytocin receptor blocking agent: pharmacokinetics and inhibition of milk ejection in dairy cows. *J. Dairy Res.*, 66:1-8.
- Wilde, C. J., C. V. Addey, C. H. Knight. 1989. Regulation of intracellular casein degradation by secreted milk proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 992:315-319.
- Wilde, C. J., and C. H. Knight. 1989. Metabolic adaptations in mammary gland during the declining phase of lactation. *J. Dairy Sci.* 72:1679-1692.
- Wilde, C. J., and C. H. Knight. 1990. Milk yield and mammary function in goats during and after once-daily milking. *J. Dairy Res.* 57:441-447.
- Wilde, C. J., C. H. Knight, and M. Peaker. 1996. Autocrine regulation of milk secretion. Pages 311-332 in *Progress in Dairy Science*. C. J. C. Phillips ed. CAB International. Wallingford, Oxon OX10, 8DE UK.
- Wilde, C. J., C. V. Addey, L. M. Boddy, and M. Peaker. 1995. Autocrine regulation of milk secretion by a protein in milk. *Biochem. J.* 305:51-58.
- Wilde, C. J., C. V. P. Addey, M. J. Casey, D. R. Blatchford, and M. Peaker. 1988. Feedback inhibition of milk secretion: the effect of a fraction of goat milk on milk yield and composition. *Quarterly J. Exp. Phys.* 73:391-397.
- Wilde, C. J., D. T. Calvert, A. Daly, and M. Peaker. 1987a. The effect of goat milk fractions on synthesis of milk constituents by rabbit mammary explants and on milk yield in vivo. *Biochem. J.* 242:285-288.
- Wilde, C. J., A. J. Henderson, C. H. Knight, D. R. Blatchford, A. Faulkner, and R. G. Vernon. 1987b. Effects of long-term thrice-daily milking on mammary enzyme activity, cell population and milk yield in the goat. *J. Anim. Sci.* 64:533-539.
- Wilde, C. J., L. H. Quarrie, E. Tonner, D. J. Flint, and Peaker. 1997. Mammary apoptosis. *Livest. Prod. Sci* 50:29-37.
- Wiking, L., J. H. Nielsen, A.-K. Bavius, A. Edvardsson, and K. Svennersten-Sjaunja. 2006. Impact of milking frequencies on the level of free fatty acids in milk, fat globules size, and fatty acid composition. *J. Dairy Sci.* 89:1004-1009.
- Wójtowski, J., P. Slószarz, A. Junkuszew, M. Milerski, A. Szymanowska, and M. Szymanowski. 2006. Application of ultrasound technique for cistern size measurement in dairy goats. *Arch. Tierz., Dummerstorf* 49:382-388.

Zaks, M. G. 1962. The Motor Apparatus of the Mammary Gland. Oliver and Boyd ed. Edinburgh, UK.