

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

MASTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA

ALIMENTARIA

**VARIACIONES DE LA EXPRESIÓN DE
MIARN EN LECHE CRUDA DE TANQUE
DE EXPLOTACIONES LOCALIZADAS
CERCA O LEJOS DE FOCOS DE
CONTAMINACIÓN**

TRABAJO FIN DE MASTER

POR

LARA VARELA COLLIA

JULIO, 2023



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, a mi tutor, Luis, que a pesar todos los cambios y contratiempos conseguimos llevar esto a cabo. Gracias por tus explicaciones y por tu tiempo dedicado a este trabajo.

A mis compañeros del máster, por hacer más amenos los descansos entre clases y por las conversaciones en las prácticas de laboratorio.

A toda mi familia, tanto de Asturias como de Barcelona, Sevilla y Bélgica, que confió en mí mientras estudiaba la carrera y que lo siguen haciendo hoy en día. A Paz, a Suso, a Paloma y, en especial, a mis padres, por cuidarme con la mejor de sus intenciones a lo largo de este año tan duro de médicos y complicaciones.

A Javier, Rodrigo y Martín, los amigos con los que llevo toda la vida, que me ayudan a tomar mis decisiones cuando a mí sola se me hace difícil y con los que hablo todas las horas del día, aunque a veces tenga que ser a distancia. Las mejores personas que pude encontrar y de las que estoy muy orgullosa por todo lo que están consiguiendo.

A Jairo, la persona que lleva casi dos años a mi lado, que siempre está ahí para escuchar mis problemas, aportarme el optimismo que a veces me ha faltado en estos últimos meses y contagiarme la pasión por todo lo que hace.

Por último, y para mí más especial, a mi abuela Carmen, que ya no está conmigo para poder ver cómo acabo este trabajo y mis estudios, pero sé que habría sido la persona a la que más ilusión le habría hecho.

Gracias a todos vosotros.



ÍNDICE

RESUMEN.....	3
ABSTRACT	4
ÍNDICE DE FIGURAS.....	5
ÍNDICE DE TABLAS.....	6
1. INTRODUCCIÓN.....	7
2. CONSIDERACIONES TEÓRICAS.....	10
2.1. Leche	10
2.1.1. Tendencias en el consumo de leche	10
2.2. Tipos de leche	11
2.3. Composición nutricional	12
2.4. Grasa de la leche	14
2.5. Producción de leche	15
2.5.1. Sistemas de producción lechera	15
2.5.2. Sistemas de producción lechera en Asturias	17
2.6. miRNA	18
2.6.1. Biogénesis de miRNA.....	20
2.6.2. miRNA en leche de vaca.....	23
2.7. Contaminantes de la leche.....	25
2.7.1. Cadmio	26
2.7.2. Plomo	27
2.7.3. Arsénico	28
3. METODOLOGÍA UTILIZADA.....	28
3.1. Muestreo.....	28
3.2. Extracción del RNA total de la grasa de la leche	30
3.3. Síntesis de cDNA a partir de RNA total.....	31
3.4. PCR a tiempo real (rtPCR).....	34
3.5. Selección de miRNA utilizados	35
3.6. miRNA normalizadores.....	36
4. RESULTADOS EXPERIMENTALES.....	37
4.1. Análisis de datos de expresión	37
4.2. Análisis en función de la distancia.....	38
4.3. Análisis de contaminantes	39
4.4. Discusión de resultados.....	40
5. CONCLUSIONES	43
6. BIBLIOGRAFÍA	44



RESUMEN

La producción lechera constituye una parte importante de la economía asturiana, que en la actualidad está sufriendo un proceso de intensificación, disminuyendo el número de ganaderías familiares de pequeño tamaño, aumentando el número de cabezas por explotación y de producción diaria por vaca, lo que conlleva problemas ambientales y bienestar animal. La ganadería extensiva ofrece grandes ventajas en cuanto al mantenimiento del paisaje y preservación de ecosistemas y representa una alternativa sostenible a las explotaciones intensivas.

Al tratarse de un territorio con una arraigada tradición minera e industrial, la calidad de la leche puede verse afectada por la cercanía de las ganaderías con sistemas de producción intensivos y que, por tanto, alimenten al ganado a base de producción propia a zonas con elevada presencia de elementos potencialmente tóxicos (EPT).

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es evaluar las diferencias de los niveles de expresión de miRNA en la grasa de la leche de vaca con el fin de comprobar si estos pueden ser utilizados como biomarcadores que informen acerca de la calidad ambiental del entorno. Para ello, se han seleccionado 3 marcadores de miRNA: bta-miR-26a; bta-miR-146a; bta-miR-223 y se ha comparado y agrupado su expresión en función de la distancia de las ganaderías a focos de contaminación. Para el grupo “cerca” se tomaron 24 muestras de diez explotaciones situadas a menos de cinco kilómetros de zonas de alta actividad industrial y para el de “lejos” 16 muestras de seis ganaderías a más de cinco kilómetros de estas zonas.

Se hallaron diferencias significativas en función de la distancia de los tres miRNAs analizados, aunque se hace necesaria la realización de estudios que puedan confirmar esta asociación, siendo menores en las muestras cercanas a las fuentes de contaminación. Los tres miRNA estaban fuertemente asociados entre ellos, pero no estaban asociados a un contaminante concreto. Se ha demostrado que los perfiles de miRNA en grasa de la leche cambian como consecuencia de la distancia a focos de contaminación, aunque no sabemos el contaminante concreto que puede estar detrás de las diferencias de expresión.

Palabras clave: microARN, producción de leche, contaminación, qPCR



ABSTRACT

Milk production is an important part of the Asturian economy, which is currently undergoing a process of intensification, decreasing the number of small family farms and increasing the number of heads per farm of daily production per cow, leading to environmental problems and animal welfare. Extensive livestock farming offers great advantages in terms of landscape maintenance and ecosystem preservation and represents a sustainable alternative to intensive farming.

As this is an area with a long-standing mining and industrial tradition, the quality of milk can be affected by the proximity of livestock farming to intensive production systems, which therefore, feed livestock from own production to areas with high presence of potentially toxic elements (PTE).

Hence, the objective of this work is to evaluate the differences in miRNA expression levels in cow's milk fat in order to check if these can be used as biomarkers that inform about the environmental quality of the environment. To do this, 3 miRNA markers have been selected: bta-miR-26a; bta-miR-146a; bta-miR-223 and their expression has been compared and grouped according to the distance from livestock to pollution sources. For the "fence" group, 24 samples were taken from ten farms located less than five kilometres from areas of high industrial activity and for the "far" group, 16 samples from six farms more than five kilometres from these areas.

Significant differences were found based on the distance of the three miRNAs analyzed, although it is necessary to conduct studies that can confirm this association. being lower in samples close to sources of contamination. The three miRNAs were strongly associated with each other, but were not associated with a particular contaminant. It has been shown that miRNA profiles in milk fat change as a result of the distance to pollution foci, although we do not know the specific contaminant that may be behind the differences in expression.

Keywords: microRNA, milk production, pollution, qPCR



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Gráfico de tendencias de consumo de leche líquida en España (2006-2021). Elaborado a partir de los últimos datos del INE y MAPA.	11
Figura 2. Esquema del proceso de biosíntesis del glóbulo de grasa láctea durante la lactación. Modificado de Kosmerl et al., 2021.....	15
Figura 3. Evolución del número de ganaderías, número de cabezas por explotación y de producción de leche por vaca ordeñada entre los años 1993 y 2006. Extraído de Barrio- Pedro, 2008.....	18
Figura 4. Esquema de biogénesis de RNA por vías canónicas (A) y no canónicas. Extraído de Bartel, 2018.....	22
Figura 5. Esquema del proceso de biogénesis de exosomas. Extraído de de la Torre Gomez et al., 2018.....	24
Figura 6. Curva de amplificación de PCR de las dos réplicas de una muestra	35
Figura 7. Gráfico que representa la expresión de los miRNAs seleccionados en función de su distancia a las fuentes de contaminación.....	38



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ganadería muestreada, distancia a foco de contaminación, época de muestreo, y valores de presencia de contaminantes en leche: cadmio, plomo y arsénico (expresados en $\mu\text{g kg}^{-1}$).	29
Tabla 2. Protocolo de temperaturas introducido en el termociclador para la reacción de poliadenilación	32
Tabla 3. Programa de temperaturas introducido en el termociclador para la reacción de unión del adaptador	32
Tabla 4. Programa de temperaturas introducido en el termociclador para la transcripción reversa.....	33
Tabla 5. Programa de temperaturas introducido en el termociclador para la reacción de amplificación	34
Tabla 6. Programa de temperaturas introducido en el termociclador a tiempo real StepOnePlus Real-Time PCR System	34
Tabla 7. Secuencias de miRNAs utilizados.....	36
Tabla 8. Secuencias de miRNAs normalizadores.....	37
Tabla 9. Media y desviación de la expresión de miRNAs expresados en escala logarítmica.	37
Tabla 10. Valores p de la prueba T de student de miRNAs seleccionados	39
Tabla 11. Test de correlación lineal de Pearson de miRNAs	39
Tabla 12. Valores p de la prueba T de student de contaminantes en leche	40
Tabla 13. Test de correlación lineal de Pearson de los datos de plomo con los tres miRNA analizados	40



1. INTRODUCCIÓN

Un rasgo común de los modelos de producción de leche en la cornisa cantábrica es el carácter familiar de las explotaciones y la producción forrajera propia. Las explotaciones son en general de pequeña dimensión, situadas en zonas de vocación y tradición lechera, que emplea mano de obra familiar y cuya capacidad de crecimiento se ve limitada por la disponibilidad de la tierra. Estas explotaciones pequeñas constituyen el 60 % de las granjas y son responsables del 20 % de la producción de leche. De éstas, más del 85 % emplean la hierba fresca en la alimentación de vacuno de leche, fundamentalmente como pastoreo, y algo menos del 75 % emplean ensilado de hierba como principal forraje conservado (Flores-Calvete et al., 2016).

Actualmente, la nueva estrategia europea y nacional en materia agraria intenta promover la agricultura sostenible, la cual se entiende como una gestión ecosistémica de complejas interacciones entre el suelo, el agua, las plantas, los animales de producción y los silvestres, el clima y el ser humano cuyo objetivo es integrar todos estos factores en un sistema de producción que sea óptimo tanto para el medio ambiente como para sus habitantes y, al mismo tiempo, para obtener el mayor rendimiento económico posible. Las granjas deberían llegar a ser y perpetuarse como sostenibles, mimetizándose en la medida de lo posible con el paisaje natural que les rodea.

Este panorama actual, en el que los suministros de alimento para el ganado se ven seriamente comprometidos, junto con la nueva reforma PEPAC, plantea a los ganaderos el reto de mantener las necesidades nutricionales para su ganado asegurando al mismo tiempo que sus suministros son seguros y a la vez rentables. La cada vez más elevada demanda de uso de alimentos de alto valor nutritivo no sólo se fundamenta en proveer al animal de los macro y micronutrientes esenciales, sino que también requiere que este alimento esté libre de factores no-nutritivos y de riesgos microbiológicos y toxicológicos. Aunque la prevalencia de los contaminantes químicos es menor que los riesgos microbiológicos derivados del manejo y consumo de alimentos de origen animal, existe gran preocupación por los efectos subclínicos que pueden provocar. Los animales actúan como filtros en los cuales la toxina ingerida a través del alimento contaminado es reducida como resultado de su biotransformación y eliminación por el propio animal. Sin embargo,



hay varias excepciones a este paradigma ya que existen contaminantes persistentes que se acumulan en el organismo de los animales (Fink-Gremmels, 2012).

Como se ha mencionado anteriormente, el sistema de producción de vacuno de leche en Asturias está basado en pequeñas ganaderías ampliamente distribuidas por el territorio con producción propia de los alimentos para los animales (Flores-Calvete et al., 2016). Por tanto, la calidad y la seguridad química y microbiológica tanto de los insumos como del producto final (la leche) van a depender en gran medida de las características del entorno de la ganadería.

En este sentido, el noroeste de España en general y Asturias en particular, tienen una larga tradición minera e industrial. En algunas zonas, principalmente la Zona Central interior y costera de Asturias, donde se concentran muchas de las ganaderías de vacuno de leche, esta huella antropogénica se hace patente. Principalmente, la presencia de industrias metalúrgicas, minas de carbón y de metales y una elevada densidad de población y de tráfico de vehículos en esta zona provocan una elevada presencia de elementos potencialmente tóxicos (EPT) (Boente et al., 2017; Ordóñez et al., 2013; Sanz-Prada et al., 2020) y contaminantes orgánicos (García-Martínez et al., 2018) en los suelos, así como partículas PM10 (tamaño entre 2,5 – 10 μm) en la atmósfera (Almeida et al., 2013). Varios estudios en la región han mostrado diferencias significativas en la concentración de algunos EPT en animales criados en zonas industrializadas respecto a las zonas rurales (Miranda et al., 2003, 2005). Otros estudios también han puesto de manifiesto la transferencia de algunos de estos EPT y de otros contaminantes orgánicos a la leche (González-Montaña et al., 2019; Ramos et al., 1997).

Estudios previos han demostrado que los perfiles de miRNA pueden variar dependiendo del grado de contaminación en el entorno de explotaciones (Forcada, 2023), donde incluso se ha encontrado un marcador (miR-7-5p) cuya abundancia es significativamente menor en leche de granjas que se encuentran cerca de focos de contaminación. Esta evidencia nos permite pensar que la variación de los perfiles de miRNA en leche puede utilizarse como un biomarcador que informe de manera indirecta sobre la calidad ambiental del entorno de las granjas. Además, trabajos recientes, indican que la exposición tanto a cadmio (Chen et al., 2021) como a plomo (Chen et al., 2022)



promueven la inflamación en la glándula mamaria por mecanismos relacionados con los miRNA.

El Área de Nutrición, Pastos y Forrajes del SERIDA investiga en las características productivas de los prados, praderas, cultivos forrajeros y sus rotaciones o asociaciones, evaluando in vivo e in vitro sus valores nutricionales para las explotaciones lecheras. Además, ofrece un servicio analítico de carácter multidisciplinar con herramientas de control que garanticen la inocuidad y la calidad de los alimentos para animales y sus producciones. En este contexto, ante las directrices europeas (PEPAC 2022) hacia una ganadería sostenible, basada en la alimentación de recursos propios, que no dependa de insumos procedentes del exterior que la hagan dependiente de la alta volatilidad de precios y que, al mismo tiempo garantice la calidad y seguridad a lo largo de la cadena agroalimentaria, se hace necesario desarrollar estrategias alternativas de control y cribado rápido de la situación ambiental y sanitaria de estas ganaderías, muy vinculadas al entorno donde desarrollan su actividad.

La presente memoria de Trabajo Fin de Master está vinculada a los proyectos ID2021-126010OR-I00: Desarrollo de una plataforma genérica para la identificación de ácidos nucleicos en la industria láctea: Autenticación de la leche ecológica (NanoNAMilk); IDI/2021/000102: GRUPIN NySA, y RTA2015-00061-C02-01: Desarrollo de validación de estrategias de monitorización del impacto ambiental y sanitario en producción lechera, desarrollados en el Área de Nutrición, Pastos y Forrajes del Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA) del Principado de Asturias y en colaboración con la Universidad de Oviedo. Estos proyectos persiguen el desarrollo de herramientas alternativas y novedosas para su aplicación en el control y la monitorización de contaminantes químicos y sanitarios a lo largo de la cadena de producción láctea.

El objetivo de este Trabajo Fin de Máster es el estudio del impacto ambiental en explotaciones ganaderas sostenibles de vacuno de leche, en concreto la asociación entre la presencia de contaminación ambiental en forma de metales pesados como cadmio, plomo y arsénico, así como la abundancia relativa de microRNA, relacionados con el proceso inflamatorio de la glándula mamaria, en la grasa de la leche cruda.



2. CONSIDERACIONES TEÓRICAS

2.1. Leche

Según la definición del Código alimentario español: “se entiende por leche natural el producto íntegro, no alterado ni adulterado y sin calostros del ordeño higiénico, regular y completo e ininterrumpido de las hembras domésticas sanas y bien alimentadas”. La leche ha formado parte de la nutrición humana desde la aparición de las sociedades agrícolas, en primer lugar como constituyente de alimentos fermentados y, posteriormente, en un periodo de entre hace 5.000 y 20.000 años, en forma de leche líquida, con la mutación y el surgimiento del fenotipo LP (lactase persistence) entre las poblaciones del norte de Europa, ya que la digestión de este alimento requiere de la producción de lactasa, un enzima que no es expresado de forma constitutiva en el sistema digestivo de los mamíferos (Brüssow, 2013; Silanikove et al., 2015).

2.1.1. Tendencias en el consumo de leche

La leche representa un producto de gran importancia en la industria alimentaria, especialmente en España, donde un amplio porcentaje del consumo de lácteos total corresponde a la leche líquida, en contraste con los hábitos de consumo de otros países europeos, en los cuales el queso y los productos lácteos en polvo y derivados concentran mayores cifras. Según los últimos datos, en noviembre de 2022 se consumieron un total de 4.720,15 millones de kilogramos de productos lácteos, y de ellos, 3.268,70 millones de kg de leche líquida, un 69,24% (MAPA, 2022).

En lo que concierne a la evolución en el tiempo del consumo de leche líquida, se observa una disminución general. Sin embargo, se realiza un mayor gasto per cápita debido al incremento del precio medio a causa de la situación actual.

En cuanto al tipo de leche, a lo largo de los años se ha ido reduciendo el consumo de leche entera en detrimento de la desnatada y semidesnatada, que desde el año 2006 han experimentado un aumento notable de la cantidad media por persona, desde los 33,6 hasta los 50,56 litros anuales (MAPA, 2022).

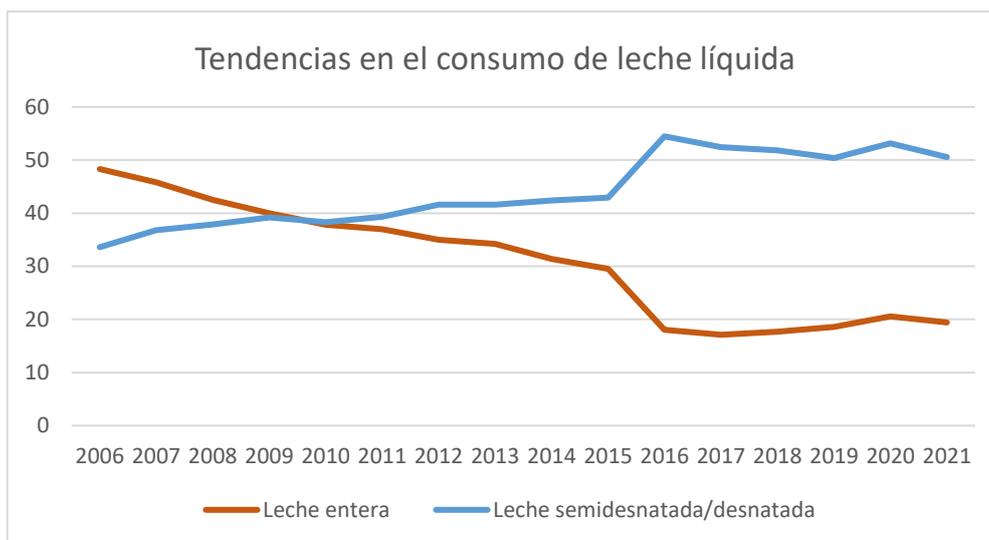


Figura 1. Gráfico de tendencias de consumo de leche líquida en España (2006-2021). Elaborado a partir de los últimos datos del INE y MAPA.

Asimismo, la leche de corta duración aumenta su importancia y los hogares sin hijos son los mayores consumidores de leche líquida (INE, 2015) (MAPA, 2022). Algunas posibles causas del incremento del consumo de leche cruda son la tendencia de la sociedad hacia productos de origen más natural y el enaltecimiento de la compra local. Este crecimiento se nutre de la percepción de que el calentamiento de la leche destruye ciertas propiedades nutricionales y que, incluso, puede tener efectos perjudiciales. Sin embargo, debido a sus características nutricionales, a su pH cercano a la neutralidad, de 6,6 en el caso de la leche cruda de vaca y a una actividad del agua elevada, la leche constituye un medio óptimo para el crecimiento de microorganismos. Para garantizar la seguridad alimentaria y prolongar la vida útil del producto, se han desarrollado procesos que incluyen tratamientos térmicos (Claeys et al., 2013; Moazami Goodarzi et al., 2020).

La pasteurización, introducida hace más de 100 años, contribuyó a reducir la incidencia de enfermedades asociadas al consumo de leche cruda y la prevalencia de patógenos en este alimento. A inicios del siglo XX, hasta un tercio de muestras de leche cruda contenían microorganismos patógenos, incluso cuando estas procedían de animales clínicamente sanos (Lucey, 2015; Sozańska, 2019).

2.2. Tipos de leche

Los tratamientos térmicos de la leche líquida de vaca se pueden llevar cabo mediante tres procedimientos: pasteurización, esterilización y UHT, siendo el primero de ellos



considerado como tratamiento suave y los otros dos como intensos (S. Li et al., 2021; Xing et al., 2020).

La leche pasteurizada es sometida a altas temperaturas en un corto tiempo (HTST), en torno a 72°C durante 15-20 segundos, sin producir cambios significativos en las propiedades nutricionales y organolépticas, aunque se han observado ciertos daños en proteínas del grupo B (Tadjine et al., 2019). A través de este método no se consigue la destrucción de las esporas resistentes al calor que se generan en la materia prima y la vida útil es de apenas una semana en condiciones de refrigeración (S. Li et al., 2021).

En segundo lugar, la esterilización de la leche se lleva a cabo después de su envasado. Este método busca prolongar la vida útil y destruir microorganismos patógenos, así como las formas esporuladas, aunque también produce la inactivación de enzimas y la eliminación de microorganismos banales, además de alteraciones en su sabor y color, ya que la leche constituye un medio ideal para las reacciones de Maillard (Aalaei et al., 2019; Bylund, 2003; van Asselt et al., 2008).

Por último, durante el proceso UHT se producen cambios deseables, como la destrucción de patógenos y la desactivación de enzimas y efectos indeseables tales como oscurecimiento, pérdida de nutrientes, sedimentación, separación de grasas y sabor a cocido (Chavan et al., 2011). Este tratamiento UHT se basa en la concepción de que la degradación de ciertos componentes de la leche cruda sigue la misma cinética de destrucción que los microorganismos patógenos. Por lo tanto, la aplicación de altas temperaturas (130-145°C) durante tiempos reducidos permite minimizar la degradación de compuestos beneficiosos (S. Li et al., 2021).

2.3. Composición nutricional

Una cantidad mayoritaria de la leche comercializada a nivel mundial procede del ganado vacuno. En términos de composición, la leche cruda de vaca representa un alimento formado un 87% de agua y en torno a un 13% de extracto seco total (Bylund, 2003; Pendini, 2012). El componente mayoritario de este EST es la lactosa, principal azúcar de la leche y que, al igual que una parte de los minerales, se encuentran en disolución verdadera. Los minerales restantes se encuentran unidos a fracción proteica, que se puede englobar en tres principales grupos:



- Caseínas, que forman polímeros de estructura micelar debido a la asociación de submicelas mediante puentes de fosfato cálcico y que a su vez se pueden clasificar en α -caseína, κ -caseína y β -caseína.
- Proteínas del lactosuero, que son aquellas que permanecen en disolución cuando se produce un cuajado tanto ácido como enzimático. Poseen un gran valor biológico, ya que su aminograma se asemeja al de una proteína óptima. Dentro de este grupo de proteínas, la que se encuentra en la leche en mayor proporción es la beta-lactoglobulina, seguida de la alfa-lactoalbúmina (que posee un papel fundamental en el proceso de síntesis de lactosa en la ubre de la vaca) y las inmunoglobulinas (Alais, 2003; Pardini, 2012).
- El tercer grupo, y a su vez el más minoritario, es el conjunto de proteínas de la membrana del glóbulo graso, que ayudan a la estabilización de la emulsión aceite/agua presente en la leche (Bylund, 2003).

Otro de los componentes proteicos presentes en la leche son las enzimas, cuyas propiedades más significativas derivan de su elevada y estricta especialidad en las reacciones que catalizan y de su sensibilidad (Bylund, 2003; Pardini, 2012). La leche cruda de vaca posee distintos sistemas con propiedades antimicrobianas que van a contribuir en la inmunidad del ternero, entre ellos, se encuentran varios enzimas. Un ejemplo son las peroxidasa, oxidoreductasa secretadas por las glándulas mamarias, salivales y lagrimales de los mamíferos y de ellas, la que es aislada de la leche recibe el nombre de lactoperoxidasa. El sistema lactoperoxidasa representa un método alternativo y naturalmente presente en la leche de defensa frente a hongos, virus y bacterias, así como de participación en la degradación de componentes carcinógenos y de especies reactivas de oxígeno (ROS). A su vez, este sistema antimicrobiano ha sido utilizado en zonas donde la conservación de la leche por refrigeración no representa una alternativa viable (Claeys et al., 2013; Lara-Aguilar & Alcaine, 2019; Seifu et al., 2005; Silva et al., 2020).

Otros de los enzimas presentes son la xantina oxidoreductasa, que contribuye a la activación de la lactoperoxidasa, la lisozima, activo contra bacterias de tipo Gram positivo y de efectos bactericidas al combinar su acción con la lactoferrina y la fosfatasa alcalina, de gran utilidad en la industria láctea como indicador de una suficiente pasteurización (Claeys et al., 2013; Fox & Kelly, 2006).



Asimismo, es posible encontrar en la leche cruda componentes como: células somáticas cuyo recuento, con un máximo establecido en torno a las 200.000 células/ml representa una herramienta de gran utilidad para diagnosticar la mastitis subclínica; microorganismos (ya que la leche cruda constituye un medio óptimo para el crecimiento de un amplio espectro de especies de bacterias, aunque los recuentos indican cada vez una menor presencia de microorganismos, en especial debido a las mejores condiciones e higiene de los animales y del proceso del ordeño); y gases disueltos (Robles et al., 2020; Yuan et al., 2019; Zecconi et al., 2020).

2.4. Grasa de la leche

La grasa está presente en la leche en forma de emulsión, constituyendo ésta la fase dispersa y la leche desnatada la fase continua. Estos glóbulos grasos, de un tamaño de 1,5 a 10 μm , poseen propiedades estructurales complejas y en numerosas ocasiones se ha propuesto su uso como nutracéutico debido a sus efectos beneficiosos sobre la salud humana (Kielczewska et al., 2021; Liu et al., 2021; Tokas & Punia, 2019). Entre otros, los componentes que llevan a considerar estas estructuras como útiles en este aspecto son los inhibidores del crecimiento de: células cancerosas, de la proliferación de *Helicobacter pylori*, de la beta-glucuronidasa de *Escherichia coli* en el intestino, el factor reductor de colesterolemia o las posibles acciones de la butirofilina como supresor de la esclerosis múltiple (Spitsberg, 2005; Tokas & Punia, 2019).

En cuanto a su composición, los glóbulos de grasa están formados por microgotas de lípidos, principalmente triglicéridos, que tienen su origen en el retículo endoplasmático de las células secretoras de la glándula mamaria, cada una recubierta por una estructura protectora que adquieren durante la secreción, la membrana del glóbulo de grasa láctea (*milk fat globule membrane*, MFGM), que evita la floculación y la coalescencia de los lípidos, permitiendo que estos formen la fase dispersa de la emulsión. Estos glóbulos de grasa de la leche y, en especial, la MFGM, adquieren un papel relevante en los procesos industriales a los que es sometida la materia prima, como son la homogenización o la formación de mantequilla, por lo que entender las propiedades de estas estructuras es crucial para llevar a cabo la fabricación de productos lácteos con propiedades homogéneas (Kielczewska et al., 2021; Spitsberg, 2005; Vanderghem et al., 2008; Ye et al., 2002; Zamora et al., 2012).

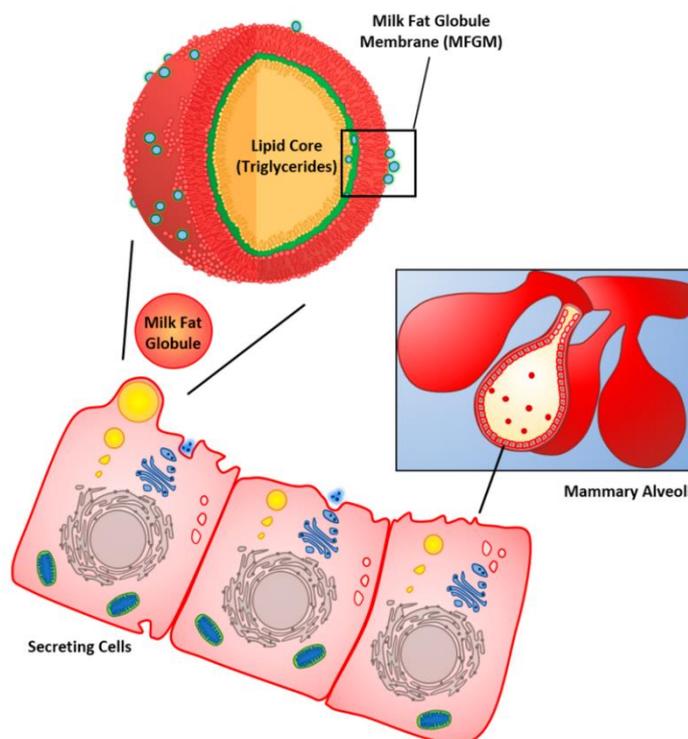


Figura 2. Esquema del proceso de biosíntesis del glóbulo de grasa láctea durante la lactación. Modificado de Kosmerl et al., 2021.

2.5. Producción de leche

2.5.1. Sistemas de producción lechera

A grandes rasgos, se pueden distinguir dos sistemas de producción láctea: intensivo y extensivo. Considerando estos dos modelos como los extremos de un gradiente, entre ambos se pueden definir una gran variedad de sistemas de producción en función de sus características individuales (Abou el qassim et al., 2022).

En el caso de las granjas extensivas, su impacto sobre el medio ambiente es reducido respecto a otros sistemas de producción debido a la menor densidad de animales por explotación, a los efectos del pastoreo y a la no estabulación. Respecto a su alimentación, ésta está basada en el pasto de la zona. Generalmente este tipo de sistemas de producción se utilizan en zonas templadas, en las cuales el pasto representa el alimento más barato para la producción de leche (Wróbel et al., 2023). Según estudios recientes, algunos factores endógenos de las plantas son capaces, cuando son incluidos de forma adecuada a la dieta de los rumiantes, de modular la digestión del alimento y mejorar la absorción de nutrientes, aumentando la eficacia del sistema y, por lo tanto, su sostenibilidad



(Cabiddu et al., 2019). Asimismo, los productos resultantes poseen una mayor calidad nutricional, ya que, en comparación con el ganado alimentado a través de una dieta convencional basada en granos o ensilado de maíz, la alimentación con pasto de mayor diversidad botánica desemboca en cambios acusados en el perfil de ácidos grasos (niveles más altos de ácidos grasos poliinsaturados de la serie n-3, particularmente ácido α -linolénico, menos ácidos grasos saturados y una ratio omega 6:omega 3 menor, con un aumento asociado del ácido linoleico conjugado (CLA) de un 300%) junto con una mayor cantidad de vitaminas A y E, terpenos y carotenoides, todos ellos compuestos beneficiosos para la salud y el bienestar de los consumidores (Faulkner et al., 2018; Veskoukis et al., 2019). Estos ácidos grasos y los metabolitos secundarios de las plantas digeridas (compuestos orgánicos volátiles presentes en el forraje en concentraciones muy bajas pero que son transferidos al alimento), también pueden afectar al sabor y a otros atributos organolépticos y tecnológicos de los productos finales, como su estabilidad oxidativa, su textura y su sabor (Cabiddu et al., 2019; Marshall et al., 2020).

Otro aspecto de vital importancia acerca de los sistemas de producción extensivos es su contribución al mantenimiento del paisaje, brindando servicios ecosistémicos que incluyen la regulación de flujos de agua, el ciclo de nutrientes a través de los ecosistemas y el secuestro de carbono (Wróbel et al., 2023). Asimismo, constituyen un elemento clave para evitar la despoblación y la degradación de las zonas rurales, mejorando el estilo de vida de los agricultores, la salud animal y creando una imagen positiva de la ganadería (Abou el qassim et al., 2022; Elgersma, 2015).

Las granjas intensivas se basan en una alta carga ganadera. Sus principales objetivos difieren en gran medida de aquellas extensivas, ya que estas buscan maximizar la producción de leche y reducir los costes de las instalaciones. A lo largo de las últimas décadas ha habido una tendencia creciente hacia la adopción de sistemas más intensivos, principalmente a través de la adquisición de ganado lechero mejorado genéticamente, el aumento del número de vacas por hectárea de tierra y la utilización de concentrados en la dieta (Alvarez et al., 2008). Los animales se encuentran estabulados permanentemente y se alimentan principalmente con forrajes conservados o concentrados (Wróbel et al., 2023).



Existen otras explotaciones que combinan ciertas características propias de ambos sistemas de producción, permaneciendo en establos o pastando y alimentándose de concentrados, de forrajes ensilados o de pasto en función de las condiciones climáticas de la zona (Abou el qassim et al., 2022).

2.5.2. Sistemas de producción lechera en Asturias

En el caso de Asturias, la producción de leche constituye una parte importante de su economía. Esto se debe a algunas de sus características, que la convierten en una región idónea para la actividad lechera: un clima atlántico lluvioso marcado por temperaturas suaves, elevada humedad y precipitaciones de forma regular que, en conjunto, permiten el mantenimiento de abundantes praderas naturales y la presencia de zonas ricas en nutrientes. Además de por sus factores medioambientales, la producción de leche en Asturias también se ve impulsada por su arraigada tradición ganadera, así como por el apoyo institucional y las cooperativas creadas, ocupando esta región el cuarto puesto en términos de producción de leche cruda, únicamente superada por Castilla y León, Cataluña y Galicia (Arango Fernández, 2001; Chao, 2002).

En la actualidad, se observa una tendencia a la desaparición de las explotaciones de pequeño tamaño y, en general, del número de ganaderías en funcionamiento. Según la información publicada por el MAPA (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación), el número total de ganaderos en el Principado de Asturias se ha visto reducido de 2.172 en 2015 a 1.513 en 2023, es decir, en torno a un 30 %. Asimismo, se ha registrado un aumento del número de vacas por explotación (Lopez Iglesias et al., 2022).

Una de las principales causas de esta pérdida generalizada de ganaderías familiares y de pequeño tamaño es el aumento del coste de producción. El impacto económico derivado de la interrupción de las exportaciones de cereales causada por la guerra de Rusia y Ucrania ha provocado un aumento del coste de las materias primas necesarias para la alimentación del ganado, resultando en un acercamiento del precio de los productos y su coste de producción (Rose et al., 2023; MAPA, 2023).

Otros de los cambios observados a lo largo de los últimos años en el sector ganadero de Asturias han sido el aumento de la producción media por explotación y la reducción del número de vacas ordeñadas, como se observa en la Figura 3. Por lo tanto, se está produciendo un proceso de intensificación en el cual cada vez se hace mayor uso de alimentación externa para suplir las necesidades nutricionales de los animales y menor de los pastos propios (Abou el qassim et al., 2022; Barrio-Pedro, 2008; SERIDA, 2008).

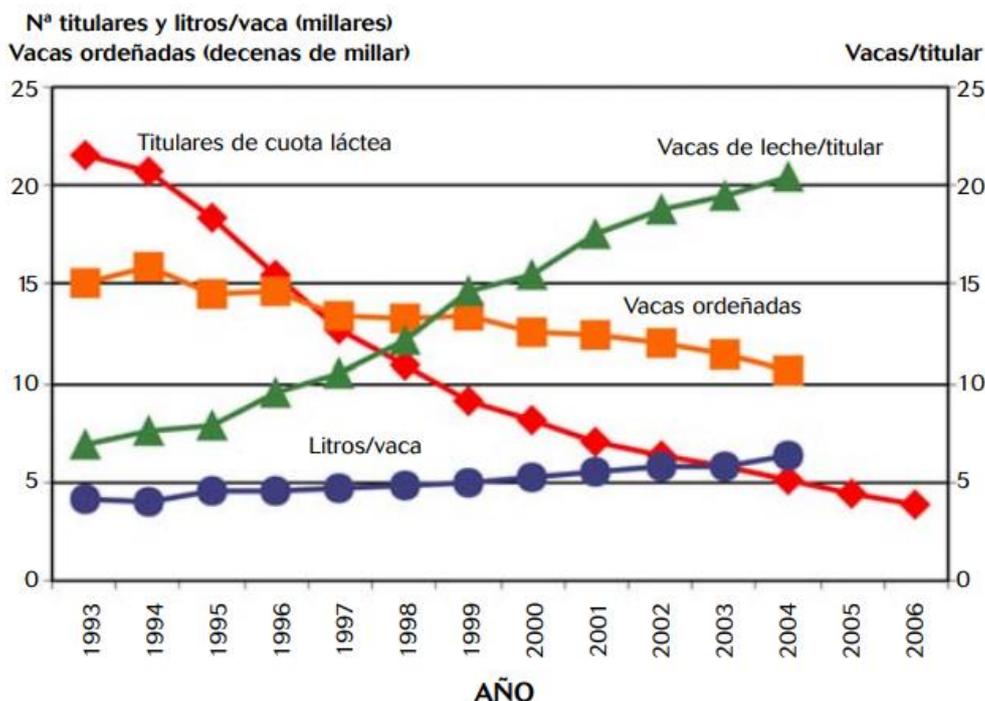


Figura 3. Evolución del número de ganaderías, número de cabezas por explotación y de producción de leche por vaca ordeñada entre los años 1993 y 2006. Extraído de Barrio-Pedro, 2008.

2.6.miRNA

Los miRNA son pequeños fragmentos de ARN no codificante altamente conservados que, con una longitud aproximada de entre unos 18 y 25 nucleótidos, son producidos en un tejido y un tiempo específico con el fin de llevar a cabo un papel fundamental en la regulación postranscripcional de la expresión génica. Estas moléculas inducen la supresión postranscripcional mediante la hibridación con secuencias complementarias en las regiones no traducidas (3'UTR) del ARNm diana a través del apareamiento de bases para posteriormente producir la desestabilización y degradación del ARN mensajero o



bloquear la maquinaria de traducción (Bavelloni et al., 2017; Dasgupta & Chatterjee, 2021; Hossain et al., 2012).

En el año 1993 fue descubierto el primer gen de miRNA, *lin-4*, implicado en el desarrollo larvario de *Caenorhabditis elegans*. Este nematodo saprófito, de en torno a 1mm de longitud y perteneciente a la familia Rhabditidae posee unas características ideales que lo han convertido en uno de los seres vivos más ampliamente utilizados a lo largo de la historia de la investigación en biología del desarrollo, genética y biología molecular (Hunt, 2017). Las razones que han contribuido al éxito de este organismo como modelo animal son su manipulabilidad genética (ya que su genoma ha sido completamente secuenciado, por lo que es posible modificar genes con el fin de conocer su función específica), su ciclo de vida (de aproximadamente tres días y con una capacidad reproductiva de en torno a 300 descendientes por adulto hermafrodita por autofertilización), un programa de desarrollo invariable y completamente descrito y sus pequeñas dimensiones corporales. Asimismo, comparte una gran similitud genética y procesos fisiológicos básicos, como la respuesta al estrés, con organismos superiores. (Kaufman & Miska, 2010; Leung et al., 2008).

El gen *lin-4* es complementario a las secuencias de la región no traducida (3'UTR) de *lin-14*, un mensajero que forma parte de la vía reguladora que desencadena la transición de las divisiones celulares de la primera etapa larvaria a la segunda. Este gen actúa reprimiendo la expresión de *lin-14* y, por lo tanto, la acumulación de la proteína LIN-14, sin un cambio apreciable de los niveles de mRNA de *lin-14* (Bartel, 2004; Olsen & Ambros, 1999).

Años después del hallazgo de este primer miRNA, no existían evidencias de la existencia de otros genes no codificantes en nemátodos, hasta que, en el año 2000, se observó que *let-7*, otro gen implicado en la vía heterocrónica de *C.elegans*, codificaba un fragmento de RNA de 22 nucleótidos implicado en la transición del primer estado larval al segundo, de forma similar a *lin-14*. Asimismo, ese mismo año, fueron identificados genes homólogos y el propio gen *let-7* en el genoma humano, organismos del género *Drosophila* y otros once animales bilaterales, lo cual llevó a pensar en el posible papel universal de estos fragmentos de RNA (Bartel, 2004; Reinhart et al., 2000; Vella & Slack, 2005).



Escasos meses después, tres laboratorios informaron de un total de más de cien genes de RNA no codificante en gusanos, moscas y humanos (Lagos-Quintana et al., 2001).

Desde el año 2001 hasta el momento actual, el número de miRNA encontrados ha ido creciendo exponencialmente, habiéndose encontrado en organismos eucariotas y virus (Annese et al., 2020). Estos hallazgos se han incluido en una base de datos denominada miRBase, considerado el principal repositorio público que cataloga, nombra y ordena las secuencias de genes de miRNA y contiene unas 38.000 entradas correspondientes a más de 270 organismos (Kozomara et al., 2019). De estos, en torno a 4500 corresponden a los seres humanos y se estima que regulan más del 30% de los genes codificadores de proteínas involucrados en multitud de procesos biológicos (Dasgupta & Chatterjee, 2021).

Debido a que, según las evidencias, la desregulación o disfunción de genes de miRNA pueden estar asociados al inicio y progresión de patologías como el cáncer, trastornos de retina y otras enfermedades genéticas, neurodegenerativas, inflamatorias e infecciosas, en estas últimas décadas ha habido un aumento drástico del interés por las terapias basadas en este tipo de material genético. A modo de ejemplo, en el caso de circunstancias en las cuales la reducción de la expresión de miRNA produce la enfermedad, puede ser adecuado el uso de moléculas miméticas que restauren su función, existiendo asimismo oligonucleótidos antisentido modificados químicamente (o antimir) idóneos en casos en los que la inhibición dirigida de miRNA puede desempeñar un papel crucial en el tratamiento de la patología (Dasgupta & Chatterjee, 2021; Z. Li & Rana, 2014; Vishnoi & Rani, 2017).

2.6.1. Biogénesis de miRNA

El ensamblaje de la maquinaria para la biogénesis de miRNA comienza durante la transcripción del gen, tratándose de un proceso fluido, dinámico e interconectado en el que los componentes se regulan mutuamente (Achkar et al., 2016). Los miRNA de animales pueden ser generados a partir de transcripciones de mayor tamaño denominadas pri-miRNA (miRNA primarios), siguiendo, en el caso de la biogénesis canónica, un proceso de dos pasos con escisión nuclear y citoplásmica (Santovito & Weber, 2022; Treiber et al., 2017). En el núcleo, estos componentes primarios son procesados por un complejo denominado microprocesador, que contiene la endonucleasa RNAsa III Drosha



y la proteína de unión a RNA de doble cadena del gen 8 de la región crítica del síndrome de DiGeorge (DGCR8, también conocida como Pasha en moscas y nematodos). Droscha escinde las secuencias monocatenarias flanqueantes y se genera un precursor de miRNA en forma de horquilla denominado pre-mRNA, que es transportado al citoplasma, generalmente a través de Exportin-5 y RAN-GTP (Treiber et al., 2017; Vishnoi & Rani, 2017).

Una vez en el citoplasma, los pre-mRNA se siguen procesando mediante la acción de Dicer, endonucleasa de RNAsa III que se caracteriza por la presencia de una helicasa, un dominio PAZ, un dominio de unión a ARN de doble cadena (dsRBD) y dos dominios catalíticos y que escinde 22 nucleótidos y separa el bucle y la doble hebra, generando una estructura imperfecta con un fosfato en 5' y un saliente en 3' de 2 nucleótidos en cada extremo (Bartel, 2018; Vishnoi & Rani, 2017). El último paso en la biogénesis y maduración de miRNA consiste en la selección de una de las dos hebras con ayuda de los TRBP (terminal dsRNA binding domains) para cargarla en el complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC), donde interactúa, con ayuda de las proteínas chaperonas HSC70/HSP90, con un miembro de la familia de proteínas Argonaute, mientras que la otra hebra es degradada. La elección de la hebra que va a convertirse en miRNA y cuál es desechada depende generalmente de la orientación con la que estas se unen a Argonaute y de cuál de ellas posee un extremo 5' más adecuado. El miRNA una vez cargado en el complejo silenciador es emparejado con secuencias complementarias en los RNA mensajeros objetivo y acaba por producir su represión postranscripcional o degradación. Dependiendo del grado de complementariedad entre la secuencia y el objetivo, la represión de la expresión génica se puede llevar a cabo con escisión específica del sitio y/o sin escisión, siendo el primer mecanismo característico de plantas, mientras que en animales la forma dominante consiste en la inhibición de la traducción y una mayor degradación del RNAm.

La mayoría de miRNAs canónicos derivan de los intrones o exones de transcritos primarios no codificantes (pri-miRNAs), que pueden contener más de una horquilla y de intrones de pre-mRNA. Las opciones alternativas, como la elección de la hebra cargada en Argonaute ya mencionada o la escisión imprecisa de Droscha o Dicer, pueden generar

múltiples isoformas a partir de un mismo gen de miRNA (isomiR) (Bartel, 2018; Bofill-De Ros et al., 2020).

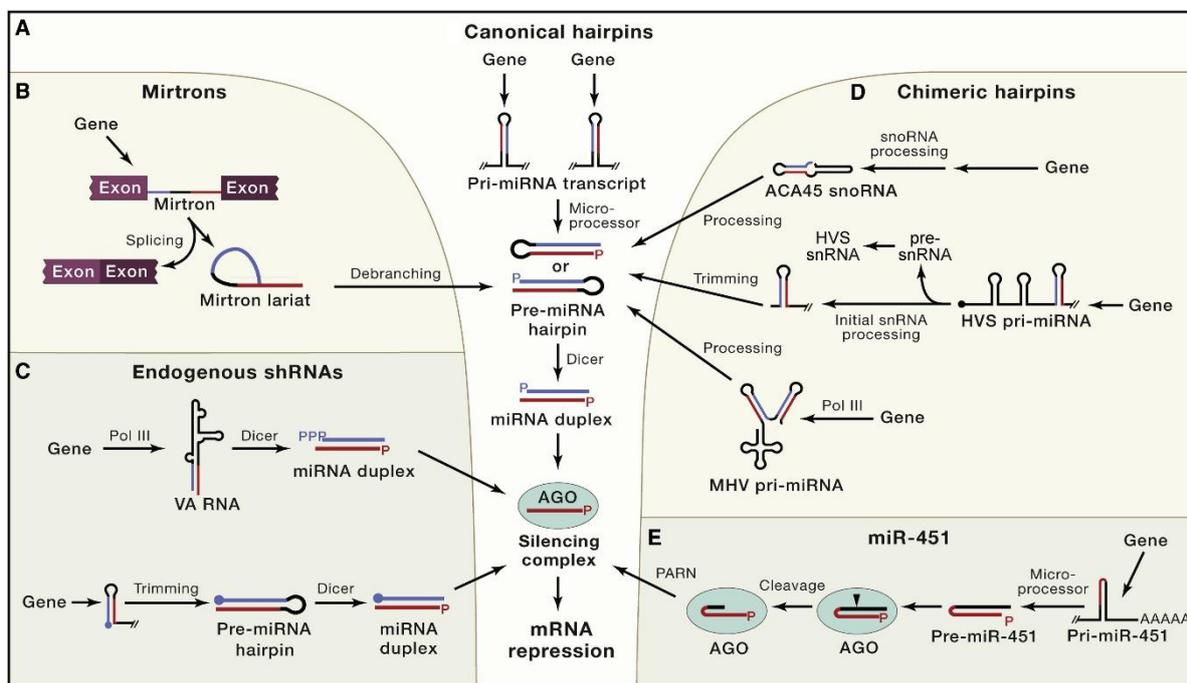


Figura 4. Esquema de biogénesis de RNA por vías canónicas (A) y no canónicas. Extraído de Bartel, 2018.

Asimismo, en los últimos años se han identificado vías alternativas de biogénesis de miRNA que se han denominado no canónicas. Una gran cantidad de miRNA no canónicos están implicados en diferentes enfermedades humanas como el cáncer o activos en células inmunes.

Algunos genes de miRNA producen pri-mRNA que eluden la escisión por Drosha o Dicer y que ingresan a la vía de biogénesis como horquillas pre-miRNA con los extremos definidos por el spliceosoma, denominándose miRtrons. Aunque este tipo de miRNA no han de pasar por el microprocesador, su ruta converge posteriormente en el núcleo con la vía canónica durante la exportación de la horquilla mediada por Exportin-5. Los miRtrons componen una pequeña fracción de miRNA de mamíferos y *Drosophila*.

Otra clase de genes de miRNA no canónicos produce RNA endógenos de horquilla corta (endo-shRNA), también independientes del microprocesador y que se asemejan a los RNA de horquilla corta artificiales utilizados en experimentos de eliminación de genes.



El miRNA no canónico presente en mamíferos con una función más claramente establecida es miR-451, de los más expresados en eritrocitos de organismos vertebrados. A diferencia de los otros miRNA no canónicos, estos requieren de Drosha pero no de Dicer para su biosíntesis. Esto es, después de la escisión provocada por Drosha, la horquilla pre-miR-451 es demasiado corta para que Dicer actúe sobre ella, por lo que ingresa directamente en Argonaute 2 (Ago2) y el centro catalítico de este ayuda en el proceso de maduración de este miRNA (Miyoshi et al., 2010; Santovito & Weber, 2022; Stavast & Erkeland, 2019).

Como conclusión, las células presentan de forma constitutiva una amplia variedad de mecanismos para generar miRNA a partir de distintas fuentes. Hoy en día, a pesar de que el conocimiento acerca de este tipo de estructuras ha aumentado exponencialmente en los últimos años, se siguen identificando funciones inesperadas (Santovito & Weber, 2022; Stavast & Erkeland, 2019).

Asimismo, las vías no canónicas de biogénesis de miRNA evidencian la capacidad y flexibilidad de las células para generar horquillas similares a pre-miRNA que se acoplen a Dicer en la vía canónica o que se unan directamente a Argonaute a partir de un amplio espectro de mecanismos (Abdelfattah et al., 2014; Miyoshi et al., 2010).

2.6.2. miRNA en leche de vaca

Los primeros estudios que demostraron la expresión de miRNA en tejidos bovinos fueron realizados en el año 2007. Desde entonces, se han identificado un total de 1.025 miRNA maduros (versión 22.1 de miRbase), en todos los cromosomas del genoma de *Bos taurus* excepto en el Y. Su genoma está conformado por 29 pares de autosomas y un par de cromosomas sexuales (Coutinho et al., 2007; *miRBase*, 2023; Romao et al., 2014). Estos miRNA se han agrupado en familias en función de la similitud de la secuencia de la región semilla, la secuencia madura o de su secuencia precursora. Muchos miRNA humanos, incluidos algunos de los relacionados con el sistema inmunológico, comparten similitudes funcionales y de secuencia con los bovinos, lo cual indica conservación evolutiva y supuestamente, también conservación de su función (Lawless et al., 2014). Los miRNA en vacas han sido reportados en procesos como la adipogénesis, desarrollo de la glándula mamaria (implicados en la regulación de la síntesis de proteínas de la leche y la formación de la glándula), ovariogénesis y en tejidos como timo, intestino delgado, testículos y

ganglio linfático mesentérico entre otros (Z. Gu et al., 2007; Hossain et al., 2009; Huang et al., 2011; Z. Li et al., 2012).

Debido a que los miRNAs se han considerado durante mucho tiempo moléculas que actúan exclusivamente de forma endógena, la secreción y las posibles funciones de señalización interespecíficas no han sido un foco de investigación durante la última década. En los últimos años se ha demostrado que la leche es el fluido biológico con mayor contenido en miRNA, dependiendo los perfiles de éstos y de isomiR del estado de salud del animal. Los miRNA de la leche poseen una gran resistencia a condiciones ácidas y tratamientos con RNasas, es decir, están altamente estabilizados y podrían soportar el tratamiento industrial (del Pozo-Acebo et al., 2021; Izumi et al., 2012). Esta resistencia deriva de que, de forma natural los miRNA se transportan en su mayoría empaquetados en vesículas extracelulares denominados exosomas, de entre 30 y 120 nanómetros que derivan de todo tipo de células, principalmente de las células epiteliales de las glándulas mamarias, y se pueden encontrar en los espacios extracelulares de los tejidos, así como en todos los fluidos biológicos, como plasma sanguíneo, suero, orina, saliva, leche materna y calostro (Benmoussa et al., 2020; Herwijnen et al., 2018; Myrzabekova et al., 2022). Los contenidos de estos exosomas pueden transferirse al tracto gastrointestinal y contribuir al desarrollo y a la regulación de la expresión génica, además de conferir un efecto protector sobre el sistema inmunitario al transportar macromoléculas hasta las células diana sin desencadenar una respuesta inmune (Wang et al., 2022).

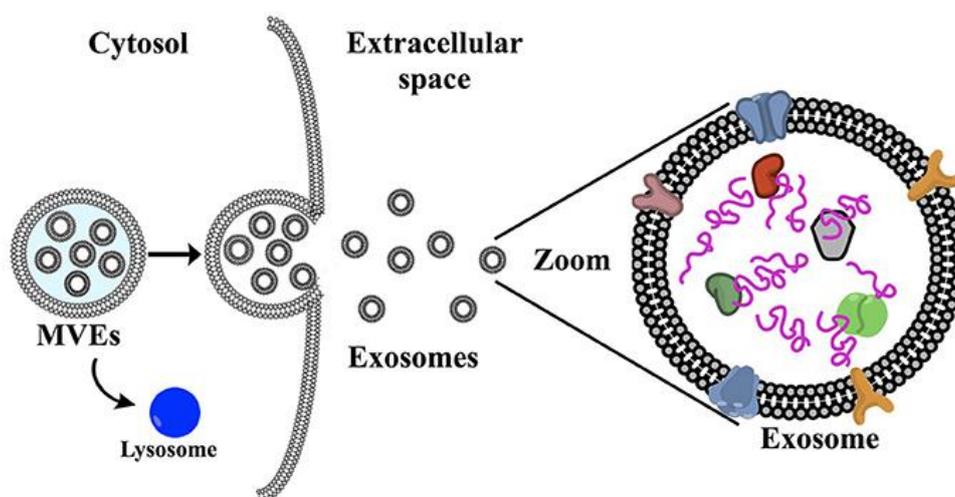


Figura 5. Esquema del proceso de biogénesis de exosomas. Extraído de de la Torre Gomez et al., 2018.



Dado que los exosomas se pueden aislar a partir de estos fluidos corporales, mediante ultracentrifugación (*gold standard*) y cromatografía de exclusión por tamaños, están surgiendo gran cantidad de estudios que permitan determinar el proceso de liberación activa de sus componentes en las células, la posible participación de los miRNA en la comunicación célula-célula y su utilidad como biomarcadores para la detección temprana de enfermedades mediante biopsia líquida no invasiva (del Pozo-Acebo et al., 2021; Myrzabekova et al., 2022).

2.7. Contaminantes de la leche

La leche puede ser utilizada como un indicador del grado de contaminación ambiental del lugar donde es producida. Habitualmente, la calidad del producto se valora exclusivamente en función de su calidad microbiológica y ciertos parámetros químicos. Sin embargo, el contenido de minerales en la leche constituye un indicador directo del estado higiénico de la leche y uno indirecto del grado de contaminación de la zona. Estos minerales se pueden clasificar en 4 categorías:

- Esenciales, necesarios para la dieta del animal, como hierro, zinc, manganeso, yodo, molibdeno, cobalto, selenio y fluoruro.
- Posiblemente esenciales y requeridos en las dietas de algunos animales bajo estricta vigilancia, pero no necesarios para humanos, como cromo, níquel, silicio, estaño y vanadio.
- Sustancias tóxicas, que causan problemas por exceso en el organismo, como el aluminio, el arsénico, el cadmio y el plomo.
- Otros elementos considerados como contaminantes esporádicos en animales (González-Montaña et al., 2019; Meshref et al., 2014).

Los metales pesados son elementos naturales de alto peso atómico y de una densidad de al menos cinco veces la del agua que pueden suponer un peligro tanto para el medio ambiente como para la salud. Estos elementos se encuentran de forma natural en la corteza terrestre desde la formación de la Tierra. Debido, en su mayor parte, a la actividad antropogénica, las cantidades de sustancias metálicas en los medios terrestres y acuáticos han aumentado exponencialmente (Briffa et al., 2020; Mohammadi et al., 2022). Las fuentes de contaminación por metales pesados son, principalmente, la quema de combustibles, la proximidad a carreteras, zonas mineras e industriales y, en especial, las



plantas siderúrgicas, centrales eléctricas de carbón e instalaciones relacionadas con el petróleo, existiendo asimismo fuentes secundarias de contaminación como el uso de pesticidas, insecticidas y fertilizantes. Para que estos elementos se incorporen a la cadena trófica, las plantas asentadas en la zona de pasto han de ser regadas con agua contaminada, permitiendo el paso de los metales tanto a la tierra y la atmósfera como a los animales. Algunos de estos agentes contaminantes como el plomo, el cadmio o el zinc, una vez ubicados en el organismo, pueden afectar a orgánulos y componentes de la célula como mitocondrias, lisosomas, membrana celular e incluso al núcleo, interactuando con las proteínas nucleares y provocando daños en el material genético, lo que conduce a la modificación del ciclo celular, la apoptosis y la carcinogénesis (Briffa et al., 2020).

Asimismo, se ha observado que son capaces de atravesar la barrera mamaria, lo que los convierte en factores de alto riesgo para los consumidores, estando sus límites máximos establecidos indicados en el Codex Alimentarius (González-Montaña et al., 2019; Ismail et al., 2015; Norouzirad et al., 2018).

2.7.1. Cadmio

El cadmio es un metal pesado que se acumula fácilmente en el suelo y el agua. Posee ciertas propiedades, como su larga vida media (superior a 10 años debido a que no puede sufrir degradación microbiana ni química) y sus efectos mutagénicos, carcinogénicos y teratogénicos que lo convierten en un importante contaminante ambiental. Algunas de sus aplicaciones industriales son la fabricación de pesticidas, fertilizantes, baterías de níquel-cadmio o revestimientos resistentes a la corrosión. La presencia de este metal en la leche no posee ninguna función biológica. El cadmio ha sido asociado con la promoción de la apoptosis, el estrés oxidativo y la metilación del DNA, siendo además un potente carcinógeno que afecta a riñones, pulmones, páncreas y próstata, debido a que induce los genes de respuesta temprana e inmediata (IEG), estimulando la proliferación y división celular. Esta carcinogenicidad también es causada por la inducción de la expresión de genes de respuesta al estrés, entre ellos los que codifican la síntesis de metalotioneínas, glutatión y proteínas de choque térmico. Se cree que la toxicidad causada por el cadmio proviene de la desactivación de un mecanismo vital de reparación del DNA: inactiva el sistema de reparación de errores de emparejamiento (MMR, *DNA mismatch repair*) mediante mutaciones, lo cual conduce a un aumento considerable de la inestabilidad del genoma. El cadmio no genera radicales libres por sí mismo, sino de forma indirecta, como



el radical superóxido, óxido nítrico y radical hidroxilo (Briffa et al., 2020; Chen et al., 2021).

Un estudio realizado en el año 2021 sugiere que el eje circ08409/mir-133a/TGFB2 puede desempeñar un papel fundamental en la mediación del efecto del cadmio sobre las células epiteliales mamarias bovinas (BMEC). Este metal puede promover la apoptosis celular y la inflamación debido a que el RNA circular circ08409 es capaz de unirse al miRNA mir-133a y disminuir su efecto inhibitorio sobre la expresión del factor de crecimiento transformante beta 2 (TGFB2), que aumenta la división celular y altera el nivel de expresión de una serie de factores inflamatorios en las BMEC (Chen et al., 2021).

2.7.2. Plomo

El plomo es el metal pesado más utilizado en la industria debido a su maleabilidad y su resistencia a la corrosión. Ha sido utilizado hasta hace poco tiempo como aditivo de combustible y actualmente se utiliza en la producción de baterías de vehículos, municiones, pinturas, revestimientos de cables y tuberías (Botté et al., 2022). Este elemento es difícil de degradar y, además de suponer un alto riesgo ambiental, una vez ingresa al cuerpo humano, es capaz de causar efectos tóxicos agudos y crónicos. La exposición crónica al plomo contribuye al aumento de la presión arterial debido a que los sistemas hormonales y neuronales, que desempeñan papeles críticos en la regulación de la frecuencia cardíaca, la resistencia vascular periférica y el gasto cardíaco, se ven afectados. Esta hipertensión causada por el plomo se asocia con anomalías del sistema adrenérgico que incluyen una activación directa o indirecta del sistema renina-angiotensina-aldosterona a través de la estimulación del sistema nervioso simpático. Otros de sus efectos sobre el organismo incluyen la constricción de los músculos lisos vasculares, funciones respiratorias anormales en las mitocondrias de las células del túbulo proximal, interrupción de la homeostasis del calcio y afectación del sistema hematopoyético (la biosíntesis del grupo hemo se ve alterada en presencia del plomo)(Briffa et al., 2020; Chen et al., 2022).

Según afirma un estudio publicado en 2022, el plomo promueve la inflamación y la apoptosis a través del eje circ05280/miR-146a/IRAK1. De forma análoga a lo que sucede con el cadmio, existe un sitio de unión entre mir-146a y circRNA-05280, por lo que este



último puede liberar la expresión del miRNA en el gen objetivo, IRAK1 (quinasa asociada al receptor de interleucina-1) (Chen et al., 2022).

2.7.3. Arsénico

El envenenamiento por arsénico es un problema altamente común que afecta a millones de personas en todo el mundo. Es un metaloide ubicuo en la corteza terrestre y en las aguas subterráneas, por lo que los procesos de liberación de arsénico son la combustión a altas temperaturas de combustibles fósiles y vegetales, la actividad minera y fenómenos naturales como la actividad volcánica. Este elemento, tóxico y acumulativo, es el único carcinógeno humano con evidencia registrada de riesgo tanto por inhalación como por ingestión y se ha relacionado con distintos tipos de cáncer en humanos, como son los de pulmón, hígado, piel y vejiga (Hong et al., 2014). Asimismo, los estudios epidemiológicos sugieren una fuerte correlación entre la exposición crónica al arsénico y enfermedades no cancerosas como la hiperqueratosis, la aterosclerosis, la diabetes y las enfermedades pulmonares obstructivas crónicas (Mandal, 2017).

Los niveles de arsénico en agua podrían afectar a la salud humana a través del consumo de leche cuando este se incorpora a la cadena alimentaria mediante el agua de riego. Las vacas pueden alimentarse de pasto, heno o agua contaminada por este elemento, aunque la leche producida por estos animales puede mantenerse libre del tóxico si este se encuentra en pequeñas cantidades (González-Montaña et al., 2019; Kuivenhoven & Mason, 2023).

3. METODOLOGÍA UTILIZADA

3.1. Muestreo

Las explotaciones de vacuno seleccionadas para llevar a cabo este estudio fueron explotaciones de pequeño tamaño (menos de 50 cabezas de ganado) cuya producción de forraje se llevase a cabo en el mismo terreno donde los animales son alimentados, es decir, sin pasar necesariamente por controles de calidad. De las dieciséis explotaciones lecheras seleccionadas, diez se encontraban a una distancia menor de 5 kilómetros de zonas con alta actividad industrial y elevada densidad de tráfico de vehículos a motor, y las seis restantes se situaban a más de 5 kilómetros de estas fuentes de contaminación.



En cada una de estas ganaderías, se realizaron tres campañas de muestreo en diferentes épocas y a lo largo de dos años, obteniendo un total de 47 observaciones, debido al cese de la actividad de una de ellas a lo largo del período de muestreo. En cada muestreo se recogieron 500 ml de leche cruda del tanque que contenía ordeños pares, para evitar posibles diferencias en la expresión de marcadores debidas a que la leche sea del ordeño de la mañana o de la tarde. En estas muestras se midieron, entre otros elementos inorgánicos, el cadmio, el plomo y el arsénico mediante ICP-MS (Forcada, 2023), como puede verse en la Tabla 1.

Tabla 1. Ganadería muestreada, distancia a foco de contaminación, época de muestreo, y valores de presencia de contaminantes en leche: cadmio, plomo y arsénico (expresados en $\mu\text{g kg}^{-1}$).

Muestra	Ganadería	Distancia	Estación	Cadmio ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Plomo ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Arsénico ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
624	1	cerca	Verano	0,0339792	1,5186588	0,0014668
626	2	cerca	Verano	0,0034347	1,6185792	0,0012271
628	3	cerca	Verano	0,0550944	2,1431692	0,0013644
658	4	cerca	Verano	0,013088	0,2530042	0,0026402
678	5	cerca	Verano	0,0116986	0,7835839	0,003703
680	6	cerca	Verano	0,0262747	1,8013777	0,0020143
684	7	cerca	Verano	0,0071504	0,6906593	0,0014508
692	1	cerca	Otoño	0,0185753	1,5259252	0,0015207
694	2	cerca	Otoño	0,0288098	1,1421731	0,0015581
696	3	cerca	Otoño	0,0310491	1,4107853	0,0015464
698	8	cerca	Otoño	0,0116337	0,6876126	0,0041711
700	9	cerca	Otoño	0,0098393	2,7011493	0,0016189
708	5	cerca	Otoño	0,0254093	0,6026214	0,0016166
710	10	cerca	Otoño	0,0159574	0,6887536	0,0014275
716	7	cerca	Otoño	0	0,7260139	0,0018425
718	11	cerca	Otoño	0,0212212	1,033659	0,0042379
720	6	cerca	Otoño	0,079383	0,6736823	0,0024836
791	8	cerca	Primavera	0,0267383	0,5801389	0,00185
793	7	cerca	Primavera	0,0033631	0,8247555	0,0014217
795	11	cerca	Primavera	0,027164	0,6442055	0,001404



797	10	cerca	Primavera	0,1154678	2,2451721	0,0073997
798	3	cerca	Primavera	0,0289076	2,2180491	0,0014602
800	2	cerca	Primavera	0,0421677	2,0480106	0,0160146
801	9	cerca	Primavera	0,018905	0,4712893	0,0036701
620	12	lejos	Verano	0,0103135	0,6683033	0,0018602
622	13	lejos	Verano	0	0	0,0016876
660	14	lejos	Verano	0,0325246	0,170363	0,0012635
688	15	lejos	Verano	0,0191094	0,7098397	0,0018324
690	16	lejos	Verano	0,0164887	0,8564217	0,001897
712	4	lejos	Otoño	0,0121608	0,5422522	0,0014916
714	14	lejos	Otoño	0,0328868	1,2270175	0,0015412
722	15	lejos	Otoño	0,0206482	0,2308899	0,0020346
724	13	lejos	Otoño	0	0,5127338	0,001994
726	12	lejos	Otoño	0,0159511	0,7397907	0,0014835
789	14	lejos	Primavera	0,0166671	1,438332	0,0017188
790	13	lejos	Primavera	0,0162214	0,5115489	0,0015008
792	4	lejos	Primavera	0,0190305	0,3469832	0,0013735
794	15	lejos	Primavera	0,0231177	0,5422015	0,0014681
796	16	lejos	Primavera	0,0053242	0,2683904	0,0039135
799	12	lejos	Primavera	0	0,2173879	0,0017611

3.2.Extracción del RNA total de la grasa de la leche

Tanto los datos de las explotaciones seleccionadas como los tubos que contenían las muestras de RNA total ya procesadas y congeladas para su preservación, fueron obtenidos de una tesis doctoral previamente realizada en la Universidad de Oviedo (Forcada, 2023).

La extracción del RNA total se realizó según el protocolo mirVana™ miRNA Isolation Kit (Life Technologies, ThermoFisher Sci., MA, EE. UU.). Previamente, se separó la fracción grasa de la leche del suero y las células somáticas mediante centrifugación durante 20 minutos a 4200 x g y a una temperatura de 4°C. La fracción grasa resultante fue conservada en 4 mL QIAzol a -80°C hasta el momento de su análisis. Posteriormente, se tomaron 2 mL de grasa de leche y se siguieron los pasos del protocolo. Se añadió una décima parte del volumen empleado (200 µL) de *miRNA Homogenate Additive* y, después



de agitarlo para mezclar el contenido se incubó en hielo durante 10 minutos. Posteriormente, se añadieron 2 mL de ácido fenol:cloroformo (5:1), se centrifugó durante 5 minutos a máxima velocidad $10.000 \times g$ a temperatura ambiente con el fin de separar la fase acuosa de la orgánica. El sobrenadante obtenido de esta centrifugación, es decir, la fase acuosa, se trasladó a otro tubo y se añadió un volumen de 2,5 mL (1,25 volúmenes) de etanol 100% a temperatura ambiente y se hizo pasar por las columnas por centrifugación. Después de haber realizado la filtración, las columnas fueron lavadas dos veces con *miRNA Wash Solution*. Por último, la columna se traslada a los tubos, en los que se añaden e 100 μL de *nuclease-free water* precalentada a $95\text{ }^\circ\text{C}$ para eluir el RNA mediante una centrifugación durante 20 a 30 segundos.

3.3.Síntesis de cDNA a partir de RNA total

Los miRNA son moléculas difíciles de amplificar mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa) debido a que el tamaño de un miRNA después de su completa maduración no difiere en gran medida de la longitud de un cebador de PCR estándar. Por lo tanto, es necesario convertir estas moléculas en DNA complementario (cDNA), de mayor estabilidad que el RNA y que puede ser almacenado por un período de hasta dos meses a -20°C protegido de la luz. Para llevar a cabo esta conversión, se ha utilizado el protocolo para síntesis de DNAc *TaqMan Advanced ADNc Synthesis Kit (ThermoFisher Sci., MA, EE. UU.)*, que se compone de cuatro etapas. Durante todas ellas, es necesario mantener el lugar de trabajo en buenas condiciones higiénicas y utilizar guantes en todo momento para evitar la contaminación de las muestras.

Reacción de poliadenilación (poly(A) tailing reaction)

En primer lugar, una vez extraídas las muestras y los reactivos necesarios para llevar a cabo esta reacción, consistente en la adición de sucesivos adenosín monofosfatos que en conjunto forman una cola poly(A) y cuyo propósito es extender el extremo 3' del transcrito maduro, se comienzan a añadir en cada pocillo 2 μL de cada muestra en la placa donde se lleva a cabo el proceso. Para preparar la mezcla de los reactivos o *Poly(A) Reaction Mix*, se introducen 0,5 μL de *Poly(A) Buffer (10X)*, 0,5 μL de ATP, 0,3 de *Poly(A) Enzyme* y 1,7 μL de *RNase free-water*. Estos volúmenes corresponden a cada pocillo en el que se introdujo una muestra, habiendo aumentado las cantidades en un 10% para evitar la falta de reactivos en mitad del proceso debido a errores de los instrumentos



utilizados. A cada pocillo de la placa se le añadieron 3 μL de la *Poly(A) Reaction Mix*, resultando en un volumen total de 5 μL . La placa se cubre de una tapa de sellado de silicona y se agita suavemente durante unos segundos para mezclar ambos componentes de la reacción y eliminar posibles burbujas de aire. Seguidamente, la placa con la mezcla formada se introduce en un termociclador y se incuba según la siguiente configuración y ciclo definido en la guía por el fabricante (Tabla 2).

Tabla 2. Protocolo de temperaturas introducido en el termociclador para la reacción de poliadenilación

Etapa	Temperatura	Tiempo
Polyadenylation	37°C	45 min
Stop reaction	65°C	10 min
Hold	4°C	Hold

Reacción de ligadura del adaptador (*Adaptor Ligation Reaction*)

Una vez se ha añadido a las secuencias iniciales la cola poly(A), el siguiente paso se basa en la adición de un adaptador en el extremo 5' que actúe como sitio de unión para la siguiente etapa del proceso. Para ello, en un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL se prepara un volumen de *Ligation Reaction Mix* suficiente para el número de muestras empleadas. Por cada una de ellas, se añaden 3 μL de *DNA Ligase Buffer (5X)*, 0,6 μL de *Ligation Adaptor (25X)*, 1,5 μL de *RNA Ligase*, 0,4 μL de *RNase-free water* y 4,5 μL de 50% de PEG 8000, un reactivo altamente viscoso y que se debe mantener a temperatura ambiente. Del mismo modo que en la etapa anterior, la mezcla total incluye un 10% de volumen de margen. La *Ligation Reaction Mix* se centrifuga durante unos segundos y se transfieren 10 μL a los pocillos de la placa, resultando en un volumen total en cada uno de ellos de 15 μL . La placa se cubre nuevamente y se introduce en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 configurado con los distintos tiempos y temperaturas (Tabla 3).

Tabla 3. Programa de temperaturas introducido en el termociclador para la reacción de unión del adaptador

Etapa	Temperatura	Tiempo
Ligation	16°C	60 min
Hold	4°C	Hold



Reacción de transcripción reversa (RT)

En esta tercera etapa, los miRNA modificados se someten a una transcripción inversa universal mediante la unión de un cebador denominado *Universal RT Primer* que se une en el extremo 3' a la cola poly(A) añadida en la primera de las etapas, dando como resultado DNA complementario. En un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL se añaden por cada muestra 6 μL de *RT Buffer* (5X), 1,2 μL de *dNTP Mix* (25mM), 1,5 μL de *Universal RT Primer* (20X), 3 μL de *RT Enzyme Mix* (10X) y 3,3 μL de *RNase-free water*. La mezcla resultante, *RT Reaction Mix*, posee un volumen final de 15 μL por reacción. Una vez esta se haya centrifugado brevemente, se transfiere a los pocillos de la placa, que ya contenían 15 μL procedentes de las mezclas de etapas anteriores, dando como resultado un volumen total de 30 μL . La placa se cubre y se agita durante unos segundos para posteriormente volver a introducirla en el termociclador con las siguientes etapas (Tabla 4)

Tabla 4. Programa de temperaturas introducido en el termociclador para la transcripción reversa

Etapa	Temperatura	Tiempo
Reverse transcription	42°C	15 min
Stop reaction	85°C	5 min
Hold	4°C	Hold

Al finalizar esta etapa es posible continuar con el proceso o almacenar las muestras a una temperatura de -20°C hasta por un período de dos meses.

Reacción de amplificación (miR-Amp)

En esta última etapa antes de llevar a cabo la PCR en tiempo real, los primers directos e inversos universales aumentan el número de moléculas de DNA complementario y por lo tanto el análisis cuantitativo. En un tubo Falcon de 14 mL se añaden para cada reacción 25 μL de *miR-Amp Master Mix* (2X), 2,5 μL *miR-Amp Primer Mix* (20X) y 17,5 μL de *RNase-free water*. Una vez añadidos los tres componentes, el tubo se centrifuga durante unos segundos y se transfieren 45 μL de *miR-Amp Reaction Mix* a cada uno de los pocillos de una nueva placa junto con 5 μL del producto resultante de la reacción de la transcriptasa inversa. El volumen total en este momento de 50 μL por tubo. Una vez añadidos los volúmenes correspondientes, la nueva placa se cubre con la tapa de silicona

y se centrifuga nuevamente. Para finalizar, esta se introduce en un termociclador con la configuración indicada en la Tabla 5.

Tabla 5. Programa de temperaturas introducido en el termociclador para la reacción de amplificación

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Enzyme activation	95°C	5 min	1
Denature	95°C	3s	14
Anneal/Extend	60°C	30s	
Stop reaction	99°C	10 min	1
Hold	4°C	Hold	1

3.4.PCR a tiempo real (rtPCR)

A partir de las muestras de cDNA resultantes de la etapa de amplificación anterior, se prepara una dilución 1:10. Para ello, en una nueva placa se sitúan pocillos y a cada uno se le añaden 135 μL de *RNase-free water* y 15 μL a cada una de las muestras de cDNA, incluyendo un control negativo, con 150 μL *RNase-free water*. En un tubo Falcon de 14 ml se prepara la *PCR Reaction Mix*. Para ello, para cada una de las muestras se añaden 10 μL de *TaqMan Fast Advanced Master Mix (2X)*, 1 μL de *TaqMan Advanced miRNA Assay (20X)* y 4 μL de *RNase-free water*. Este tubo Falcon se agita brevemente para homogeneizar la mezcla y de su volumen total se añaden 32 μL a cada pocillo de una nueva placa junto con 12 μL de la dilución 1:10 de cDNA que se había preparado anteriormente. Este volumen se divide en dos pocillos de la placa para constituir las dos réplicas de amplificación. Una vez finalizado el proceso, la placa se cubre con un film adhesivo de sellado que impida la contaminación y el derrame de reactivos y se lleva a cabo la reacción en un termociclador a tiempo real StepOnePlus Real-Time PCR System (*Life Technologies*) configurado con los parámetros que se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Programa de temperaturas introducido en el termociclador a tiempo real StepOnePlus Real-Time PCR System

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Enzyme activation	95°C	20s	1

Denature	95°C	1s	40
Anneal/Extend	60°C	20s	

Una vez finalizados los ciclos, se observa una cinética de amplificación de la PCR con una fase exponencial, una lineal, donde se mantiene constante a lo largo de los ciclos y una fase estacionaria, marcada por el agotamiento de los reactivos y el decaimiento de la actividad enzimática. Estas tres fases se pueden apreciar en la Figura 6.

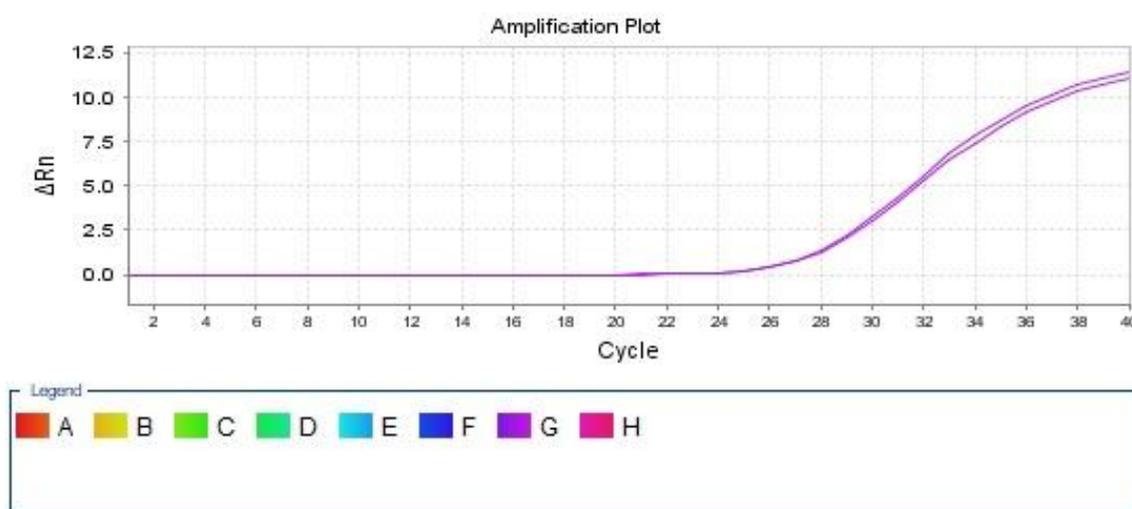


Figura 6. Curva de amplificación de PCR de las dos réplicas de una muestra

3.5. Selección de miRNA utilizados

Para llevar a cabo la selección de miRNA, se realizó una búsqueda entre la bibliografía existente. De este modo, se seleccionaron tres miRNA que poseían papeles relevantes en los procesos de inflamación en las células epiteliales mamarias bovinas, como son el bta-miR-223 y el bta-miR-26a (Jiao et al., 2022; Tzelos et al., 2022) y el bta-miR-146a, que forma parte del eje circRNA-05280/miR-146a/IRAK1 en la glándula mamaria y también se encuentra asociado con la inflamación (Chen et al., 2022). Las secuencias de los miRNAs utilizados están recogidos en la Tabla 7.

**Tabla 7.** Secuencias de miRNAs utilizados

miRNA	Secuencia
bta-miR-26a	UUCAAGUAAUCCAGGAUAGGCU
bta-miR-146a	UGAGAACUGAAUCCAUAAGGUUGU
bta-miR-223	UGUCAGUUUGUCAAAUACCCCA

3.6. miRNA normalizadores

Los resultados de la PCR dependen de la intensidad de la señal fluorescente emitida. A lo largo de los primeros ciclos, los niveles de fluorescencia son mínimos y posteriormente comienzan a aumentar. El parámetro adimensional C_T indica el número de ciclo de la PCR en el cual la señal de fluorescencia alcanza un valor umbral determinado automáticamente por el software utilizado (StepOne Software v2.3, *Life Technologies*) en función de las muestras analizadas. La cantidad de fluorescencia en el punto de corte de cada una de las muestras con el umbral será directamente proporcional a la cantidad inicial. Para poder comparar las muestras, habría que asumir que todas parten de la misma cantidad de miRNA inicial, cosa que sabemos que no es cierta, ya que no todas las muestras de leche tienen la misma cantidad de grasa inicial, existen diferencias en la eficiencia de la extracción RNA total, en la calidad del RNA extraído, y a que este RNA total tiene diferentes componentes: RNA mensajero, ribosomal, de transferencia y miRNA, que hacen imposible disponer todas las muestras con cantidades iguales de miRNA. Debido a esto, se hace necesario el uso de miRNAs de referencia denominados normalizadores, que permiten la comparación de la expresión de cada una de las muestras para cada uno de los miRNA seleccionados.

En base a los datos extraídos de un trabajo previo (Forcada, 2023) en el que se llevó a cabo un análisis geNorm (QBase+), a través del cual se determinó la estabilidad de varios miRNAs y permitió seleccionar a los miRNA bta-miR-99 y bta-miR-27b como normalizadores. Además, este trabajo garantizaba una normalización adecuada de los miRNAs en las en las condiciones del estudio cuando se utiliza la media aritmética de la expresión de estos dos marcadores. Las secuencias de los miRNAs normalizadores se encuentran en la Tabla 8.

**Tabla 8.** Secuencias de miRNAs normalizadores

miRNA normalizador	Secuencia
bta-miR-27b	UUCACAGUGGCCUAAGUUCUGC
bta-miR-99	CAAGCUCGCUUCUAUGGGU

4. RESULTADOS EXPERIMENTALES

4.1. Análisis de datos de expresión

Las PCR en tiempo real de los miRNA seleccionados (miR-146a, miR-223 y miR-26) fueron realizadas por duplicado, por lo que cada una de las muestras posee una réplica, y se permitió una diferencia máxima entre ambos valores de C_T de 0,5. Ambos datos son normalizados con la media aritmética de los datos de expresión de los normalizadores, en este caso miR-27b y miR-99, utilizando un software de análisis de PCR, QBase+ V3.4. Los datos de expresión de los 3 marcadores se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. Media y desviación de la expresión de miRNAs expresados en escala logarítmica.

Muestras	146a	146a SE	223	223 SE	26a	26a SE
620	-2,379E-001	6,403E-002	4,843E-001	7,972E-003	2,234E-001	4,273E-002
622	1,713E-001	6,666E-002	1,643E-001	2,236E-002	5,859E-002	3,456E-002
624	-9,516E-001	6,836E-002	-6,974E-001	6,576E-002	-3,382E-001	5,100E-002
626	6,366E-001	7,358E-002	4,344E-001	6,772E-002	5,273E-001	7,200E-002
628	-1,369E-001	7,473E-002	4,377E-002	1,478E-002	2,377E-001	6,200E-002
658	-1,591E-001	5,563E-002	8,350E-002	3,922E-002	4,872E-001	6,074E-002
660	-7,372E-001	6,360E-002	-5,072E-001	3,982E-002	1,792E-001	3,072E-002
678	-4,411E-001	7,961E-002	-3,337E-001	3,894E-002	-3,807E-001	6,703E-002
680	-1,047E+000	6,098E-002	-6,295E-001	4,662E-002	-1,753E-001	7,997E-002
684	-2,000E-001	7,734E-002	-4,540E-001	2,023E-002	2,073E-001	2,121E-002
688	1,317E-001	6,518E-002	-4,453E-002	2,110E-002	3,168E-001	1,866E-002
690	-1,759E-001	7,410E-002	-5,577E-001	1,168E-002	-5,198E-001	2,417E-002
692	2,470E-001	6,524E-002	3,032E-001	1,962E-002	3,692E-001	2,098E-002
694	-1,352E-002	7,714E-002	9,063E-002	2,581E-002	4,621E-001	4,012E-002
696	2,420E-001	7,294E-002	3,378E-002	4,785E-002	6,515E-001	2,401E-002
698	-3,146E-001	5,969E-002	-2,438E-001	4,328E-002	-3,737E-001	8,120E-002
700	-1,699E-001	7,817E-002	-5,230E-001	4,001E-002	2,771E-001	7,931E-002

708	-3,434E-001	8,153E-002	4,563E-001	3,977E-002	5,569E-001	4,279E-002
710	1,252E-002	8,228E-002	2,398E-001	4,766E-002	-1,236E-001	6,577E-002
712	-1,268E+000	8,284E-002	-1,276E+000	3,640E-002	-6,940E-001	8,161E-002
714	-6,300E-001	1,728E-002	-5,640E-001	6,663E-002	-2,727E-001	5,081E-002
716	-7,216E-001	4,107E-002	-7,502E-001	5,140E-002	-4,910E-001	7,386E-002
718	1,286E-001	7,379E-002	5,541E-001	2,964E-002	9,963E-001	7,988E-002
720	-2,516E-001	1,500E-002	-3,830E-001	1,460E-002	3,838E-001	6,190E-002
722	7,078E-001	7,014E-002	1,101E+000	4,538E-002	1,417E+000	7,843E-002
724	1,211E+000	8,065E-002	1,625E+000	3,075E-002	1,095E+000	5,811E-002
726	1,357E+000	4,047E-002	1,427E+000	6,644E-002	1,783E+000	6,940E-002
789	-4,809E-001	5,453E-002	-4,803E-001	3,744E-002	-1,798E-001	7,025E-002
790	1,180E+000	7,372E-002	1,409E+000	1,330E-002	1,071E+000	6,485E-002
791	9,695E-002	6,159E-002	-1,550E-002	4,720E-002	-2,581E-001	6,987E-002
792	7,438E-001	9,138E-003	9,142E-001	5,294E-002	8,863E-001	7,251E-002
793	-3,952E-001	7,668E-002	-2,999E-001	6,687E-002	6,184E-002	8,471E-002
794	3,172E-001	8,308E-002	1,857E+000	7,916E-002	1,226E+000	8,297E-002
795	-1,229E+000	6,274E-002	-9,267E-001	2,634E-002	-8,980E-001	6,740E-002
796	1,040E+000	8,034E-002	7,400E-001	4,041E-002	7,797E-001	7,681E-002
797	3,885E-001	7,924E-002	9,562E-001	4,162E-002	6,183E-001	6,897E-002
798	3,225E-001	6,697E-002	1,283E-001	1,418E-002	3,374E-001	2,395E-002
799	8,424E-001	8,350E-002	1,062E+000	6,139E-002	9,926E-001	8,367E-002
800	2,533E-001	7,285E-002	4,414E-001	2,181E-002	4,202E-001	7,560E-002
801	1,892E-001	7,758E-002	-1,278E+000	3,479E-002	-6,482E-001	7,641E-002
803	-3,139E-001	7,095E-002	-4,594E-001	3,123E-002	-5,936E-001	7,402E-002

4.2. Análisis en función de la distancia

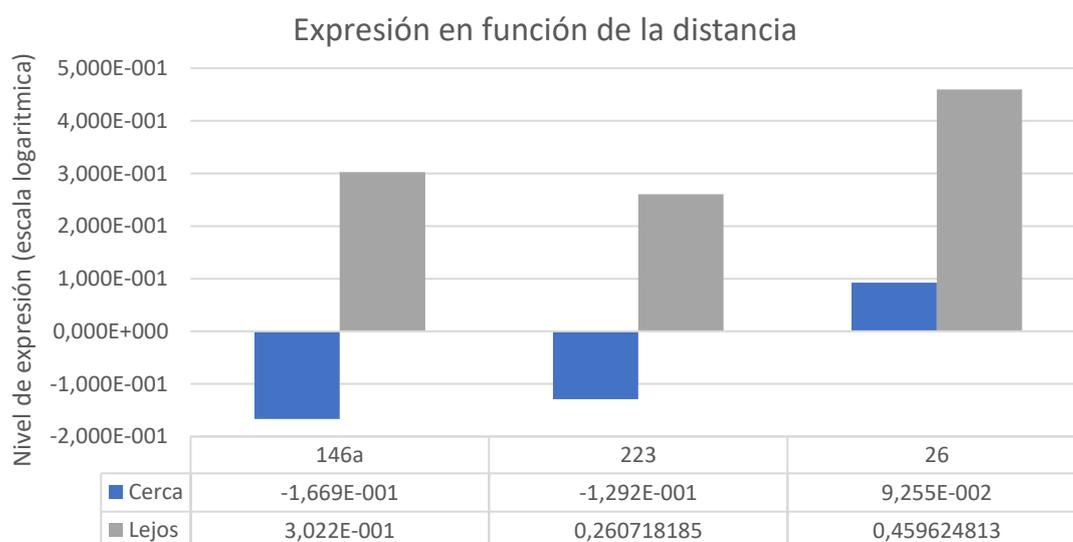


Figura 7. Gráfico que representa la expresión de los miRNAs seleccionados en función de su distancia a las fuentes de contaminación.

A partir de los datos recogidos en la Tabla 9, se ha elaborado una figura en la que se representan gráficamente las diferencias de expresión entre los grupos situados cerca y lejos (ver Figura 7)

Posteriormente, se ha realizado la prueba T de student, con el objetivo de determinar si existen diferencias entre las medias de los grupos de ganaderías de cerca y los de lejos. Para ello, se establece un 95% de confianza, es decir, si el p-valor es menor de 0,05, se rechaza la hipótesis nula y se podrá concluir que no existen diferencias significativas entre las medias de los grupos. Los p-valores de los tres miRNA se pueden observar en la Tabla 10.

Tabla 10. Valores p de la prueba T de student de miRNAs seleccionados

miRNA	p-valor
bta-miR-26a	0,042228
bta-miR-146a	0,04136784
bta-miR-223	0,01864604

Otro de los análisis realizados a partir de los datos de la Tabla 9 ha sido el test de correlación lineal de Pearson, con el objetivo de determinar la intensidad y el sentido de la relación entre dos variables, en este caso, entre los miRNAs, que puede adoptar valores entre -1 (relación lineal negativa) y 1 (relación lineal positiva perfecta).

Tabla 11. Test de correlación lineal de Pearson de miRNAs

Pearson		
146a-223	223-26a	26a-146a
0,82565116	0,88764848	0,79787184

4.3. Análisis de contaminantes

Al igual que con los miRNAs, a partir de los datos de la Tabla 1, se ha realizado la prueba T de student sobre los valores de los contaminantes presentes en la grasa de la leche en los grupos “cerca” y “lejos”.

Tabla 12. Valores p de la prueba T de student de contaminantes en leche

Contaminante	p-valor
Cadmio	0,120692372
Plomo	0,003123302
Arsénico	0,184756508

Al obtener un p-valor menor de 0,05 en la prueba T de student del plomo, se ha llevado a cabo el test de correlación de Pearson, con el propósito de caracterizar la asociación con cada uno de los tres miRNAs relacionados con la inflamación, obteniendo los resultados de la Tabla 13.

Tabla 13. Test de correlación lineal de Pearson de los datos de plomo con los tres miRNA analizados

Pearson (plomo)	
26a	-0,10236425
146a	-0,12747887
223	-0,14802082

4.4. Discusión de resultados

Lo primero que hay que decir, es que los valores encontrados de los tres metales analizados en la leche de tanque de las explotaciones de vacuno de leche se encuentran por debajo del límite máximo permitido por la Unión Europea, tanto en las explotaciones de lejos como de cerca de focos de contaminación (Forcada, 2023).

En función de los p-valores obtenidos a partir de los datos de la Tabla 9, se puede concluir que existen diferencias significativas entre la expresión de los marcadores cuando estos son medidos en grasa de leche de explotaciones cerca y lejos de focos de contaminación. Además, como se observa en la Figura 7, la expresión es mayor cuando las muestras se tomaron en ganaderías situadas a más de cinco kilómetros de focos de contaminación, es decir en ambientes más libres de contaminación ambiental. Además, el test de correlación lineal de Pearson (Tabla 11) indica una relación muy fuerte y positiva entre los tres



miRNAs que se están analizando, ya que, como se podía ver en la gráfica de expresión en función de la distancia (Figura 7), estos presentaban comportamientos muy similares, lo cual puede indicar que los tres están relacionados con la respuesta inmune de la glándula mamaria en la misma vía de activación.

En el caso del bta-miR-146a, como se indica en (Chen et al., 2022), esto podría ser debido al papel de este miRNA en el eje circRNA-05280/miR-146a/IRAK1, ya que, al producirse una sobreexpresión de miR-146a, que se observa en las ganaderías englobadas en el grupo “lejos”, se regula negativamente la expresión de IRAK1, que contribuye a la producción de citocinas proinflamatorias y a la regulación de la vía de transducción de señales NF- κ B, participando en comportamientos biológicos malignos en las células (Yu et al., 2022). Estos resultados coinciden con lo expuesto en otros artículos, en los que se observa que ratones knockout para miR-146a poseen respuestas inflamatorias exageradas (Boldin et al., 2011; S.-X. Gu et al., 2015; Wu et al., 2021).

A falta de estudios realizados en vacas y, en concreto, sobre su papel en la mastitis bovina, el miR-223 ha demostrado constituir un regulador de la respuesta inflamatoria regulando la proliferación de macrófagos proinflamatorios y uniéndose a genes diana específicos para inhibir las citocinas proinflamatorias y las señales inflamatorias en estas células, resultando los ratones deficientes en miR-223 muy sensibles a estímulos desencadenantes de respuestas inmunológicas (Jiao et al., 2022; R. Li et al., 2015; Neudecker et al., 2017).

En cuanto a miR-26a, al igual que los dos miRNAs anteriores, diversos artículos han confirmado sus funciones inmunomoduladoras y de reducción de respuestas inflamatorias en pez cebra (*Danio rerio*) y ratón. Asimismo, una sobreexpresión de mir-26a en ratón suprimió significativamente la expresión de citoquinas proinflamatorias (Pimentel Falcao et al., 2021; Yu et al., 2022; Zhang et al., 2021)

Esta información coincide con los resultados de las PCR cuantitativas llevadas a cabo, a pesar de que no se han realizado hasta el momento suficientes estudios que permitan asegurar con total seguridad qué miRNAs poseen propiedades proinflamatorias o antiinflamatorias y el mecanismo subyacente de las interacciones moleculares derivadas del aumento o disminución de la expresión de miRNAs sigue sin estar claro. La mastitis supone un trastorno asociado a las respuestas inmunitarias e inflamatorias, por lo que el pleno conocimiento de la función de los miRNAs en la homeostasis inmunitaria permitiría



su utilización como biomarcadores en la leche afectada por la mastitis bovina. Esta disminución de niveles de miRNA encontrados en leche de explotaciones cercanas a focos de contaminación, podría ser la consecuencia de una exposición crónica a contaminantes ambientales, que está íntimamente relacionado con la disminución de la respuesta inmune (Q. Li et al., 2018).

En cuanto a los p-valores obtenidos de la realización de la T de student (Tabla 12) con las cantidades de contaminantes registradas en la Tabla 1, únicamente el plomo presentó diferencias significativas ($p < 0,05$), encontrándose los niveles mayores de este contaminante en aquellas ganaderías que se situaban cerca de focos de contaminación. Al realizar el test de correlación de Pearson entre el plomo y los tres miRNAs, se obtuvieron valores que indican una relación lineal débil y negativa, lo que quiere decir que su respuesta no depende concretamente de los niveles de este metal, y además podemos afirmar que no es posible utilizar estos miRNAs como marcadores de contaminación por altos niveles de plomo. Es necesario estudiar otras posibles fuentes de contaminación a parte de estos metales, que puedan ser las responsables directas de la alteración de la expresión de estos miRNA.

Hay que tener en cuenta que este estudio se ha realizado con muestras reales procedentes de explotaciones ganaderas comerciales, que ya de por sí tienen una variabilidad de manejos y de distancias a los focos de contaminación. Sin embargo, este trabajo sí que advierte que los perfiles de miRNA en leche cruda varían dependiendo de la localización de las ganaderías, más o menos cerca de focos de contaminación. Se desconoce además la cantidad y tiempo de exposición de un determinado contaminante a partir de los cuales se produciría una alteración de la expresión de miARN, pudiendo darse el caso de que la ingestión de contaminantes en los forrajes o directamente del ambiente por otras vías, como la respiratoria o cutánea, sea demasiado baja como para provocar una respuesta perceptible en el metabolismo del animal, a diferencia de lo que sucedería en una intoxicación aguda, dado que, como ya hemos dicho, en ningún caso los niveles de contaminantes en leche medidos de la Tabla 1 supera los límites establecidos por la legislación.



5. CONCLUSIONES

Aunque es necesario el estudio de más miRNA en un muestreo más amplio, esta evidencia demuestra que la variación de los perfiles de miRNA en leche puede utilizarse como un biomarcador que informe de manera indirecta sobre la calidad ambiental del entorno de las granjas de donde proviene la leche. Además, indica que las condiciones ambientales se ven reflejadas en el contenido de miRNA de la leche cruda, y por lo tanto el ambiente más o menos libre de contaminación donde se asientan las ganaderías, podría modificar las propiedades funcionales de la leche.

Por lo tanto, la utilización de miRNAs puede servir para medir de manera indirecta el grado de contaminación en leche cruda, pero no de los contaminantes concretos.

Este trabajo ha sido financiado por el Gobierno Regional del Principado de Asturias (proyecto IDI/2021/000102) cofinanciado por la Unión Europea a través del FEDER (Fondo Europeo de Desarrollo Regional), y los proyectos del Ministerio de Ciencia e Innovación (AEI) PID2021-126010OR-I00, y RTA2015-00061-C02-01.



6. BIBLIOGRAFÍA

- Aalaei, K., Rayner, M., & Sjöholm, I. (2019). Chemical methods and techniques to monitor early Maillard reaction in milk products; A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(12), 1829-1839. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1431202>
- Abdelfattah, A. M., Park, C., & Choi, M. Y. (2014). Update on non-canonical microRNAs. *Biomolecular Concepts*, 5(4), 275-287. <https://doi.org/10.1515/bmc-2014-0012>
- Abou el qassim, L., Le Guillou, S., & Royo, L. J. (2022). Variation of miRNA Content in Cow Raw Milk Depending on the Dairy Production System. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(19), Article 19. <https://doi.org/10.3390/ijms231911681>
- Achkar, N. P., Cambiagno, D. A., & Manavella, P. A. (2016). miRNA Biogenesis: A Dynamic Pathway. *Trends in Plant Science*, 21(12), 1034-1044. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.09.003>
- Alais, C. (2003). *Ciencia de la leche*. Reverte.
- Almeida, Lage, J., & Lopes. (2013). *Biomonitorização da deposição atmosférica de elementos químicos na zona industrial de Gijón, Espanha* [MasterThesis]. <https://recil.ensinulusofona.pt/handle/10437/6217>
- Alvarez, A., del Corral, J., Solís, D., & Pérez, J. A. (2008). Does Intensification Improve the Economic Efficiency of Dairy Farms? *Journal of Dairy Science*, 91(9), 3693-3698. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1123>
- Annese, T., Tamma, R., De Giorgis, M., & Ribatti, D. (2020). MicroRNAs Biogenesis, Functions and Role in Tumor Angiogenesis. *Frontiers in Oncology*, 10. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2020.581007>
- Arango Fernández, J. (2001). Agricultura y espacio rural en Asturias. *RAE: Revista Asturiana de Economía, Extra 1*, 69-107.
- Barrio-Pedro, J. C. (2008). *Situación de la ganadería de leche y viabilidad de su producción ecológica en Asturias*. <https://ria.asturias.es/RIA/handle/123456789/157>
- Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell*, 116(2), 281-297. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00045-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00045-5)
- Bartel, D. P. (2018). Metazoan MicroRNAs. *Cell*, 173(1), 20-51. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.006>
- Bavelloni, A., Ramazzotti, G., Poli, A., Piazzzi, M., Focaccia, E., Blalock, W., & Faenza, I. (2017). MiRNA-210: A Current Overview. *Anticancer Research*, 37(12), 6511-6521.
- Benmoussa, A., Laugier, J., Beuparlant, C. J., Lambert, M., Droit, A., & Provost, P. (2020). Complexity of the microRNA transcriptome of cow milk and milk-derived extracellular vesicles isolated via differential ultracentrifugation. *Journal of Dairy Science*, 103(1), 16-29. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16880>



- Boente, C., Matanzas, N., García-González, N., Rodríguez-Valdés, E., & Gallego, J. R. (2017). Trace elements of concern affecting urban agriculture in industrialized areas: A multivariate approach. *Chemosphere*, *183*, 546-556. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.05.129>
- Bofill-De Ros, X., Yang, A., & Gu, S. (2020). IsomiRs: Expanding the miRNA repression toolbox beyond the seed. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, *1863*(4), 194373. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2019.03.005>
- Boldin, M. P., Taganov, K. D., Rao, D. S., Yang, L., Zhao, J. L., Kalwani, M., Garcia-Flores, Y., Luong, M., Devrekanli, A., Xu, J., Sun, G., Tay, J., Linsley, P. S., & Baltimore, D. (2011). MiR-146a is a significant brake on autoimmunity, myeloproliferation, and cancer in mice. *The Journal of Experimental Medicine*, *208*(6), 1189-1201. <https://doi.org/10.1084/jem.20101823>
- Botté, A., Seguin, C., Nahrgang, J., Zaidi, M., Guery, J., & Leignel, V. (2022). Lead in the marine environment: Concentrations and effects on invertebrates. *Ecotoxicology*, *31*(2), 194-207. <https://doi.org/10.1007/s10646-021-02504-4>
- Briffa, J., Sinagra, E., & Blundell, R. (2020). Heavy metal pollution in the environment and their toxicological effects on humans. *Heliyon*, *6*(9), e04691. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04691>
- Brüssow, H. (2013). Nutrition, population growth and disease: A short history of lactose. *Environmental Microbiology*, *15*(8), 2154-2161. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12117>
- Bylund, G. (2003). *Dairy Processing Handbook*. <https://dairyprocessinghandbook.tetrapak.com/>
- Cabiddu, A., Delgadillo-Puga, C., Decandia, M., & Molle, G. (2019). Extensive Ruminant Production Systems and Milk Quality with Emphasis on Unsaturated Fatty Acids, Volatile Compounds, Antioxidant Protection Degree and Phenol Content. *Animals*, *9*(10), Article 10. <https://doi.org/10.3390/ani9100771>
- Chao, E. J. P. (2002). Asturias y el futuro de la producción agroalimentaria. *Ábaco*, *31*, 73-78.
- Chavan, R. S., Chavan, S. R., Khedkar, C. D., & Jana, A. H. (2011). UHT Milk Processing and Effect of Plasmin Activity on Shelf Life: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *10*(5), 251-268. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2011.00157.x>
- Chen, Z., Liang, Y., Lu, Q., Nazar, M., Mao, Y., Aboragah, A., Yang, Z., & Looor, J. J. (2021). Cadmium promotes apoptosis and inflammation via the circ08409/miR-133a/TGFB2 axis in bovine mammary epithelial cells and mouse mammary gland. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *222*, 112477. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112477>
- Chen, Z., Lu, Q., Cao, X., Wang, K., Wang, Y., Wu, Y., & Yang, Z. (2022). Lead exposure promotes the inflammation via the circRNA-05280/miR-146a/IRAK1 axis in



mammary gland. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 247, 114204. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.114204>

Claeys, W. L., Cardoen, S., Daube, G., De Block, J., Dewettinck, K., Dierick, K., De Zutter, L., Huyghebaert, A., Imberechts, H., Thiange, P., Vandenplas, Y., & Herman, L. (2013). Raw or heated cow milk consumption: Review of risks and benefits. *Food Control*, 31(1), 251-262. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.09.035>

Coutinho, L. L., Matukumalli, L. K., Sonstegard, T. S., Van Tassell, C. P., Gasbarre, L. C., Capuco, A. V., & Smith, T. P. L. (2007). Discovery and profiling of bovine microRNAs from immune-related and embryonic tissues. *Physiological Genomics*, 29(1), 35-43. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00081.2006>

Dasgupta, I., & Chatterjee, A. (2021). Recent Advances in miRNA Delivery Systems. *Methods and Protocols*, 4(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/mps4010010>

del Pozo-Acebo, L., López de las Hazas, M.-C., Tomé-Carneiro, J., Gil-Cabrero, P., San-Cristobal, R., Busto, R., García-Ruiz, A., & Dávalos, A. (2021). Bovine Milk-Derived Exosomes as a Drug Delivery Vehicle for miRNA-Based Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/ijms22031105>

Elgersma, A. (2015). Grazing increases the unsaturated fatty acid concentration of milk from grass-fed cows: A review of the contributing factors, challenges and future perspectives. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 117(9), 1345-1369. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201400469>

Faulkner, H., O'Callaghan, T. F., McAuliffe, S., Hennessy, D., Stanton, C., O'Sullivan, M. G., Kerry, J. P., & Kilcawley, K. N. (2018). Effect of different forage types on the volatile and sensory properties of bovine milk. *Journal of Dairy Science*, 101(2), 1034-1047. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13141>

Fink-Gremmels, J. (2012). *Animal Feed Contamination: Effects on Livestock and Food Safety*. Elsevier.

Flores-Calvete, Martínez, & Doltra. (2016). *Estructura y sistemas de alimentación de las explotaciones lecheras de Galicia, Cornisa Cantábrica y Navarra*.

Forcada, S. (2023). *Estrategias de control y monitorización del impacto ambiental en explotaciones de vacuno de leche*. http://www.serida.org/vernoticia.php?id_noticia=1503

Fox, P. F., & Kelly, A. L. (2006). Indigenous enzymes in milk: Overview and historical aspects—Part 2. *International Dairy Journal*, 16(6), 517-532. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.09.017>

García-Martínez, M. J., Ortega, M. F., Bolonio, D., Llamas, J. F., & Canoira, L. (2018). Leaching of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from coal dumps reclaimed with apple trees: A mechanistic insight. *Environmental Geochemistry and Health*, 40(6), 2695-2706. <https://doi.org/10.1007/s10653-018-0133-9>

González-Montaña, J.-R., Senís, E., Alonso, A.-J., Alonso, M.-E., Alonso, M.-P., & Domínguez, J.-C. (2019). Some toxic metals (Al, As, Mo, Hg) from cow's milk raised in



a possibly contaminated area by different sources. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(28), 28909-28918. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06036-7>

Gu, S.-X., Li, X., Hamilton, J. L., Chee, A., Kc, R., Chen, D., An, H. S., Kim, J.-S., Oh, C., Ma, Y.-Z., van Wijnen, A. J., & Im, H.-J. (2015). MicroRNA-146a reduces IL-1 dependent inflammatory responses in the intervertebral disc. *Gene*, 555(2), 80-87. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2014.10.024>

Gu, Z., Eleswarapu, S., & Jiang, H. (2007). Identification and characterization of microRNAs from the bovine adipose tissue and mammary gland. *FEBS Letters*, 581(5), 981-988. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.01.081>

Herwijnen, M. J. C. van, Driedonks, T. A. P., Snoek, B. L., Kroon, A. M. T., Kleinjan, M., Jorritsma, R., Pieterse, C. M. J., Hoen, E. N. M. N.-'t, & Wauben, M. H. M. (2018). Abundantly Present miRNAs in Milk-Derived Extracellular Vesicles Are Conserved Between Mammals. *Frontiers in Nutrition*, 5. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnut.2018.00081>

Hong, Y.-S., Song, K.-H., & Chung, J.-Y. (2014). Health effects of chronic arsenic exposure. *Journal of Preventive Medicine and Public Health = Yebang Uihakhoe Chi*, 47(5), 245-252. <https://doi.org/10.3961/jpmph.14.035>

Hossain, M. M., Ghanem, N., Hoelker, M., Rings, F., Phatsara, C., Tholen, E., Schellander, K., & Tesfaye, D. (2009). Identification and characterization of miRNAs expressed in the bovine ovary. *BMC Genomics*, 10(1), 443. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-443>

Hossain, M. M., Sohel, M. M. H., Schellander, K., & Tesfaye, D. (2012). Characterization and importance of microRNAs in mammalian gonadal functions. *Cell and Tissue Research*, 349(3), 679-690. <https://doi.org/10.1007/s00441-012-1469-6>

Huang, J., Ju, Z., Li, Q., Hou, Q., Wang, C., Li, J., Li, R., Wang, L., Sun, T., Hang, S., Gao, Y., Hou, M., & Zhong, J. (2011). Solexa Sequencing of Novel and Differentially Expressed MicroRNAs in Testicular and Ovarian Tissues in Holstein Cattle. *International Journal of Biological Sciences*, 7(7), 1016-1026.

Hunt, P. R. (2017). The *C. elegans* model in toxicity testing. *Journal of Applied Toxicology*, 37(1), 50-59. <https://doi.org/10.1002/jat.3357>

Ismail, A., Riaz, M., Akhtar, S., Ismail, T., Ahmad, Z., & Hashmi, M. S. (2015). Estimated daily intake and health risk of heavy metals by consumption of milk. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 8(4), 260-265. <https://doi.org/10.1080/19393210.2015.1081989>

Izumi, H., Kosaka, N., Shimizu, T., Sekine, K., Ochiya, T., & Takase, M. (2012). Bovine milk contains microRNA and messenger RNA that are stable under degradative conditions. *Journal of Dairy Science*, 95(9), 4831-4841. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5489>



- Jiao, P., Wang, J., Yang, J., Wang, X., & Luoreng, Z. (2022). Bta-miR-223 Targeting the RHOB Gene in Dairy Cows Attenuates LPS-Induced Inflammatory Responses in Mammary Epithelial Cells. *Cells*, 11(19), 3144. <https://doi.org/10.3390/cells11193144>
- Kaufman, E. J., & Miska, E. A. (2010). The microRNAs of *Caenorhabditis elegans*. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 21(7), 728-737. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2010.07.001>
- Kiełczewska, K., Ambroziak, K., Krzykowska, D., & Aljewicz, M. (2021). The effect of high-pressure homogenisation on the size of milk fat globules and MFGM composition in sweet buttermilk and milk. *International Dairy Journal*, 113, 104898. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2020.104898>
- Kozomara, A., Birgaoanu, M., & Griffiths-Jones, S. (2019). miRBase: From microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D155-D162. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1141>
- Kuivenhoven, M., & Mason, K. (2023). Arsenic Toxicity. *StatPearls*. https://www.statpearls.com/articlelibrary/viewarticle/17832/?utm_source=TrendMD&utm_campaign=StatPearls_TrendMD_1&utm_medium=cpc
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., & Tuschl, T. (2001). Identification of Novel Genes Coding for Small Expressed RNAs. *Science*, 294(5543), 853-858. <https://doi.org/10.1126/science.1064921>
- Lara-Aguilar, S., & Alcaine, S. D. (2019). Lactose oxidase: A novel activator of the lactoperoxidase system in milk for improved shelf life. *Journal of Dairy Science*, 102(3), 1933-1942. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15537>
- Lawless, N., Vegh, P., O'Farrelly, C., & Lynn, D. J. (2014). The Role of microRNAs in Bovine Infection and Immunity. *Frontiers in Immunology*, 5. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2014.00611>
- Leung, M. C. K., Williams, P. L., Benedetto, A., Au, C., Helmcke, K. J., Aschner, M., & Meyer, J. N. (2008). *Caenorhabditis elegans*: An Emerging Model in Biomedical and Environmental Toxicology. *Toxicological Sciences*, 106(1), 5-28. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfn121>
- Li, Q., Yang, C., Du, J., Zhang, B., He, Y., Hu, Q., Li, M., Zhang, Y., Wang, C., & Zhong, J. (2018). Characterization of miRNA profiles in the mammary tissue of dairy cattle in response to heat stress. *BMC Genomics*, 19(1), 975. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-5298-1>
- Li, R., Zhang, C.-L., Liao, X.-X., Chen, D., Wang, W.-Q., Zhu, Y.-H., Geng, X.-H., Ji, D.-J., Mao, Y.-J., Gong, Y.-C., & Yang, Z.-P. (2015). Transcriptome MicroRNA Profiling of Bovine Mammary Glands Infected with *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/ijms16034997>
- Li, S., Ye, A., & Singh, H. (2021). Impacts of heat-induced changes on milk protein digestibility: A review. *International Dairy Journal*, 123, 105160. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105160>



- Li, Z., Liu, H., Jin, X., Lo, L., & Liu, J. (2012). Expression profiles of microRNAs from lactating and non-lactating bovine mammary glands and identification of miRNA related to lactation. *BMC Genomics*, *13*(1), 731. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-731>
- Li, Z., & Rana, T. M. (2014). Therapeutic targeting of microRNAs: Current status and future challenges. *Nature Reviews Drug Discovery*, *13*(8), Article 8. <https://doi.org/10.1038/nrd4359>
- Liu, Y., Boeren, S., Zhang, L., Zhou, P., & Hettinga, K. (2021). Ultrasonication retains more milk fat globule membrane proteins compared to equivalent shear-homogenization. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *70*, 102703. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2021.102703>
- Lopez Iglesias, E., Lainez, M., Capkovicova, A., Óvilo, C., Garcia Azcarate, T., Calvo, J., Ribas, A., Fernández, A., Valdês Paços, B., Vázquez-González, I. V., Crespo, A., González, I., Santiso Blanco, J., Sineiro García, F., Perez-Mesa, J., Elola, I., Collado, V., Navarro, A., Martos, P., & Juárez, M. (2022). *El sector lácteo en España*.
- Lucey, J. A. (2015). Raw Milk Consumption. *Nutrition Today*, *50*(4), 189-193. <https://doi.org/10.1097/NT.000000000000108>
- Mandal, P. (2017). An insight of environmental contamination of arsenic on animal health. *Emerging Contaminants*, *3*(1), 17-22. <https://doi.org/10.1016/j.emcon.2017.01.004>
- Marshall, C. J., Beck, M. R., Garrett, K., Barrell, G. K., Al-Marashdeh, O., & Gregorini, P. (2020). Grazing dairy cows with low milk urea nitrogen breeding values excrete less urinary urea nitrogen. *Science of The Total Environment*, *739*, 139994. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139994>
- Meshref, A. M. S., Moselhy, W. A., & Hassan, N. E.-H. Y. (2014). Heavy metals and trace elements levels in milk and milk products. *Journal of Food Measurement and Characterization*, *8*(4), 381-388. <https://doi.org/10.1007/s11694-014-9203-6>
- Miranda, M., López-Alonso, M., Castillo, C., Hernández, J., & Benedito, J. L. (2005). Effects of moderate pollution on toxic and trace metal levels in calves from a polluted area of northern Spain. *Environment International*, *31*(4), 543-548. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2004.09.025>
- Miranda, M., López-Alonso, M., Castillo, C., Hernández, J., Prieto, F., & Benedito, J. L. (2003). Some toxic elements in liver, kidney and meat from calves slaughtered in Asturias (Northern Spain). *European Food Research and Technology*, *216*(4), 284-289. <https://doi.org/10.1007/s00217-002-0658-z>
- MiRBase*. (2023). <https://www.mirbase.org/summary.shtml?org=bta>
- Miyoshi, K., Miyoshi, T., & Siomi, H. (2010). Many ways to generate microRNA-like small RNAs: Non-canonical pathways for microRNA production. *Molecular Genetics and Genomics*, *284*(2), 95-103. <https://doi.org/10.1007/s00438-010-0556-1>



- Moazami Goodarzi, M., Moradi, M., Tajik, H., Forough, M., Ezati, P., & Kuswandi, B. (2020). Development of an easy-to-use colorimetric pH label with starch and carrot anthocyanins for milk shelf life assessment. *International Journal of Biological Macromolecules*, *153*, 240-247. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.03.014>
- Mohammadi, S., Shafiee, M., Faraji, S. N., Rezaeian, M., & Ghaffarian-Bahraman, A. (2022). Contamination of breast milk with lead, mercury, arsenic, and cadmium in Iran: A systematic review and meta-analysis. *BioMetals*, *35*(4), 711-728. <https://doi.org/10.1007/s10534-022-00395-4>
- Myrzabekova, M., Labeit, S., Niyazova, R., Akimniyazova, A., & Ivashchenko, A. (2022). Identification of Bovine miRNAs with the Potential to Affect Human Gene Expression. *Frontiers in Genetics*, *12*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fgene.2021.705350>
- Neudecker, V., Haneklaus, M., Jensen, O., Khailova, L., Masterson, J. C., Tye, H., Biette, K., Jedlicka, P., Brodsky, K. S., Gerich, M. E., Mack, M., Robertson, A. A. B., Cooper, M. A., Furuta, G. T., Dinarello, C. A., O'Neill, L. A., Eltzschig, H. K., Masters, S. L., & McNamee, E. N. (2017). Myeloid-derived miR-223 regulates intestinal inflammation via repression of the NLRP3 inflammasome. *Journal of Experimental Medicine*, *214*(6), 1737-1752. <https://doi.org/10.1084/jem.20160462>
- Norouzirad, R., González-Montaña, J.-R., Martínez-Pastor, F., Hosseini, H., Shahrouzian, A., Khabazkhoob, M., Ali Malayeri, F., Moallem Bandani, H., Paknejad, M., Foroughi-nia, B., & Fooladi Moghaddam, A. (2018). Lead and cadmium levels in raw bovine milk and dietary risk assessment in areas near petroleum extraction industries. *Science of The Total Environment*, *635*, 308-314. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.138>
- Olsen, P. H., & Ambros, V. (1999). The lin-4 Regulatory RNA Controls Developmental Timing in *Caenorhabditis elegans* by Blocking LIN-14 Protein Synthesis after the Initiation of Translation. *Developmental Biology*, *216*(2), 671-680. <https://doi.org/10.1006/dbio.1999.9523>
- Ordóñez, A., Álvarez, R., & Loredó, J. (2013). Asturian mercury mining district (Spain) and the environment: A review. *Environmental Science and Pollution Research*, *20*(11), 7490-7508. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1663-4>
- Pardini, C. R. (2012). *Notas sobre producción de leche*.
- Pimentel Falcao, M. A., Banderó Walker, C. I., Rodrigo Disner, G., Batista-Filho, J., Silva Soares, A. B., Balan-Lima, L., Lima, C., & Lopes-Ferreira, M. (2021). Knockdown of miR-26a in zebrafish leads to impairment of the anti-inflammatory function of TnF in the control of neutrophilia. *Fish & Shellfish Immunology*, *114*, 301-310. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.04.029>
- Ramos, L., Eljarrat, E., Hernández, L. M., Alonso, L., Rivera, J., & González, M. J. (1997). Levels of PCDDs and PCDFs in farm cow's milk located near potential contaminant sources in Asturias (Spain). Comparison with levels found in control, rural



farms and commercial pasteurized cow's milks. *Chemosphere*, 35(10), 2167-2179. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(97\)00295-6](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(97)00295-6)

Reinhart, B. J., Slack, F. J., Basson, M., Pasquinelli, A. E., Bettinger, J. C., Rougvie, A. E., Horvitz, H. R., & Ruvkun, G. (2000). The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 403(6772), Article 6772. <https://doi.org/10.1038/35002607>

Robles, I., Kelton, D. F., Barkema, H. W., Keefe, G. P., Roy, J. P., von Keyserlingk, M. A. G., & DeVries, T. J. (2020). Bacterial concentrations in bedding and their association with dairy cow hygiene and milk quality. *Animal*, 14(5), 1052-1066. <https://doi.org/10.1017/S1751731119002787>

Romao, J. M., Jin, W., He, M., McAllister, T., & Guan, L. L. (2014). MicroRNAs in bovine adipogenesis: Genomic context, expression and function. *BMC Genomics*, 15(1), 137. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-137>

Rose, A., Chen, Z., & Wei, D. (2023). The economic impacts of Russia–Ukraine War export disruptions of grain commodities. *Applied Economic Perspectives and Policy*, 45(2), 645-665. <https://doi.org/10.1002/aep.13351>

Santovito, D., & Weber, C. (2022). Non-canonical features of microRNAs: Paradigms emerging from cardiovascular disease. *Nature Reviews Cardiology*, 19(9), Article 9. <https://doi.org/10.1038/s41569-022-00680-2>

Sanz-Prada, L., García-Ordiales, E., Roqueñí, N., Grande Gil, J. A., & Loredó, J. (2020). Geochemical distribution of selected heavy metals in the Asturian coastline sediments (North of Spain). *Marine Pollution Bulletin*, 156, 111263. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111263>

Seifu, E., Buys, E. M., & Donkin, E. F. (2005). Significance of the lactoperoxidase system in the dairy industry and its potential applications: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 16(4), 137-154. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2004.11.002>

SERIDA. (2008). *Situación de la ganadería de leche y viabilidad de su producción ecológica en Asturias*. Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario. <http://www.serida.org/publicacionesdetalle.php?id=2205>

Silanikove, N., Leitner, G., & Merin, U. (2015). The Interrelationships between Lactose Intolerance and the Modern Dairy Industry: Global Perspectives in Evolutional and Historical Backgrounds. *Nutrients*, 7(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/nu7095340>

Silva, E., Oliveira, J., Silva, Y., Urbano, S., Sales, D., Moraes, E., Rangel, A., & Anaya, K. (2020). Lactoperoxidase system in the dairy industry: Challenges and opportunities. *Czech Journal of Food Sciences*, 38(6), 337-346. <https://doi.org/10.17221/103/2020-CJFS>

Sozańska, B. (2019). Raw Cow's Milk and Its Protective Effect on Allergies and Asthma. *Nutrients*, 11(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/nu11020469>



- Spitsberg, V. L. (2005). Invited Review: Bovine Milk Fat Globule Membrane as a Potential Nutraceutical. *Journal of Dairy Science*, 88(7), 2289-2294. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72906-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72906-4)
- Stavast, C. J., & Erkeland, S. J. (2019). The Non-Canonical Aspects of MicroRNAs: Many Roads to Gene Regulation. *Cells*, 8(11), Article 11. <https://doi.org/10.3390/cells8111465>
- Tadjine, D., Boudalia, S., Bousbia, A., Khelifa, R., Mebirouk Boudechiche, L., Tadjine, A., & Chemmam, M. (2019). Pasteurization effects on yield and physicochemical parameters of cheese in cow and goat milk. *Food Science and Technology*, 40, 580-587. <https://doi.org/10.1590/fst.13119>
- Tokas, J., & Punia, H. (2019). Milk Fat Globule Membrane (MFGM): An Ingredient of Dairy Products as Nutraceutical. *Trends in Peptide and Protein Sciences*, 4, 1-9 (e3). <https://doi.org/10.22037/tpps.v4i0.26745>
- Treiber, T., Treiber, N., Plessmann, U., Harlander, S., Daiß, J.-L., Eichner, N., Lehmann, G., Schall, K., Urlaub, H., & Meister, G. (2017). A Compendium of RNA-Binding Proteins that Regulate MicroRNA Biogenesis. *Molecular Cell*, 66(2), 270-284.e13. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.03.014>
- Tzelos, T., Ho, W., Charmana, V. I., Lee, S., & Donadeu, F. X. (2022). MiRNAs in milk can be used towards early prediction of mammary gland inflammation in cattle. *Scientific Reports*, 12(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-09214-9>
- van Asselt, A. J., Sweere, A. P. J., Rollema, H. S., & de Jong, P. (2008). Extreme high-temperature treatment of milk with respect to plasmin inactivation. *International Dairy Journal*, 18(5), 531-538. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.11.019>
- Vanderghem, C., Blecker, C., Danthine, S., Deroanne, C., Haubruge, E., Guillonneau, F., De Pauw, E., & Francis, F. (2008). Proteome analysis of the bovine milk fat globule: Enhancement of membrane purification. *International Dairy Journal*, 18(9), 885-893. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.02.003>
- Vella, M. C., & Slack, F. J. (2005). C. elegans microRNAs. En *WormBook: The Online Review of C. elegans Biology [Internet]*. WormBook. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK19796/>
- Veskoukis, A., Kerasioti, E., Priftis, A., Kouka, P., Spanidis, Y., Makri, S., & Kouretas, D. (2019). A battery of translational biomarkers for the assessment of the in vitro and in vivo antioxidant action of plant polyphenolic compounds: The biomarker issue. *Current Opinion in Toxicology*, 13, 99-109. <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2018.10.001>
- Vishnoi, A., & Rani, S. (2017). MiRNA Biogenesis and Regulation of Diseases: An Overview. En S. Rani (Ed.), *MicroRNA Profiling: Methods and Protocols* (pp. 1-10). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6524-3_1
- Wang, Y., Fang, J., Zeng, H.-F., Zhong, J.-F., Li, H.-X., & Chen, K.-L. (2022). Identification and bioinformatics analysis of differentially expressed milk exosomal



microRNAs in milk exosomes of heat-stressed Holstein cows. *Functional & Integrative Genomics*, 22(1), 77-87. <https://doi.org/10.1007/s10142-021-00814-8>

Wróbel, B., Zielewicz, W., & Staniak, M. (2023). Challenges of Pasture Feeding Systems—Opportunities and Constraints. *Agriculture*, 13(5), Article 5. <https://doi.org/10.3390/agriculture13050974>

Wu, H., Wang, Y., Yao, Q., Fan, L., Meng, L., Zheng, N., Li, H., & Wang, J. (2021). Alkaline phosphatase attenuates LPS-induced liver injury by regulating the miR-146a-related inflammatory pathway. *International Immunopharmacology*, 101, 108149. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.108149>

Xing, Q., Ma, Y., Fu, X., Cao, Q., Zhang, Y., & You, C. (2020). Effects of heat treatment, homogenization pressure, and overprocessing on the content of furfural compounds in liquid milk. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(14), 5276-5282. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10578>

Ye, A., Singh, H., Taylor, M. W., & Anema, S. (2002). Characterization of protein components of natural and heat-treated milk fat globule membranes. *International Dairy Journal*, 12(4), 393-402. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(02\)00034-1](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(02)00034-1)

Yu, T., Wang, P., Wu, Y., Zhong, J., Chen, Q., Wang, D., Chen, H., Hu, S., & Wu, Q. (2022). MiR-26a Reduces Inflammatory Responses via Inhibition of PGE2 Production by Targeting COX-2. *Inflammation*, 45(4), 1484-1495. <https://doi.org/10.1007/s10753-022-01631-2>

Yuan, L., Sadiq, F. A., Burmølle, M., Wang, N., & He, G. (2019). Insights into Psychrotrophic Bacteria in Raw Milk: A Review. *Journal of Food Protection*, 82(7), 1148-1159. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-19-032>

Zamora, A., Ferragut, V., Guamis, B., & Trujillo, A. J. (2012). Changes in the surface protein of the fat globules during ultra-high pressure homogenisation and conventional treatments of milk. *Food Hydrocolloids*, 29(1), 135-143. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.02.012>

Zecconi, A., Dell'Orco, F., Vairani, D., Rizzi, N., Cipolla, M., & Zanini, L. (2020). Differential Somatic Cell Count as a Marker for Changes of Milk Composition in Cows with Very Low Somatic Cell Count. *Animals*, 10(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/ani10040604>

Zhang, W., Fu, X., Xie, J., Pan, H., Han, W., & Huang, W. (2021). MiR-26a attenuates colitis and colitis-associated cancer by targeting the multiple intestinal inflammatory pathways. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 24, 264-273. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2021.02.029>