



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCION Y DE LA SALUD**  
**ANIMAL**

**“EFECTO DE LA COMPLEMENTACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS OMEGA 3  
SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE TRIACILGLICÉRIDOS SÉRICOS EN  
PERROS SANOS DE RAZA PEQUEÑA”**

**T E S I S**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS  
P R E S E N T A

**CESAR MIGUEL GALAVIZ GALÁN**

TUTOR: DR. C. CARLOS GUTIÉRREZ OLVERA  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA UNAM

COMITÉ TUTORAL: DR. C. LILIA GUTIÉRREZ OLVERA  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

DRA. MARÍA JOSEFA BERNAD BERNAD  
FACULTAD DE QUÍMICA UNAM

MÉXICO, D.F

noviembre, 2013



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## DEDICATORIA

A Dios por quien se vive y es el origen de todo cuanto me rodea

A mi madre que desde donde está no ha dejado de velar por mí y me ha dado la fuerza suficiente para seguir en el camino del conocimiento.

A mi padre y mi hermana, Miguel y Arianna que nunca han dejado de creer en mí y me dan su amor, comprensión y apoyo.

A Jimena Cristina, esperando ser una inspiración para que ella alcance sus propios sueños.

A mis amigos Gemma, Susana, Fernando, Pepe, Aldo, Carmen, José Luis, Claudio, Jana, Daniel, Lilia, Liliana y Consuelo; que siempre me demuestran su afecto y apoyo.

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Carlos Gutiérrez Olvera por volver a creer en mí, por brindarme su apoyo y confianza.

A la Dra. Lilia Gutiérrez Olvera y la Dra Josefa Bernad por ser parte de mi comité tutor y estar siempre dispuestas a aportarme sus conocimientos

A Tania, Paulina y Karina por el apoyo en los manejos administrativos y económicos que llevaron a realizar y concluir este proyecto.

A Noemí Bernal por ser mi compañera de proyecto, por su amistad y comprensión

A Rocío Torres, Paulina y Karina por ayudar a los muestreos y siempre estar dispuestas a colaborar a pesar de todo.

A Royal Canin México y MVZ Mariana Barrera que nos proporcionaron el alimento para este estudio.

A la MVZ Susana Zárate por ayudarme en la realización del análisis estadístico y por su amistad.

A cada uno de los miembros de mi jurado que enriquecieron con su conocimiento este trabajo.

Al MVZ Juan Horta Ramírez por la asesoría en la fase de laboratorio y por su amistad.

La realización de este trabajo fue posible a la beca otorgada por el Consejo Nacional De Ciencia y Tecnología (CONACYT) y al financiamiento otorgado a través del proyecto PAPIIT IN-218212 “Empleo de probióticos (fructooligosacáridos y ácidos grasos omega 3) en salud de animales de compañía y su repercusión en parámetros sanguíneos”. UNAM 2012 – 2014. Responsable: Dr. Carlos Gutiérrez Olvera.

## CONTENIDO

|  | Páginas |
|--|---------|
| RESUMEN  | II      |
| ABSTRACT   | III     |
| 1. INTRODUCCIÓN  | 1       |
| 1.1. Transporte de los lípidos de la dieta en el organismo.....                                      | 1       |
| 1.2. Papel de los ácidos grasos omega-3 dietarios o complementarios en el transporte de lípidos..... | 10      |
| 1.3. Síntesis de ácidos grasos poliinsaturados no esenciales y los esenciales.....                   | 11      |
| 1.4. Anomalías asociadas al transporte y metabolismo de lípidos en perros.....                       | 15      |
| 1.4.1. Hiperlipidemia del schnawzer miniatura.....   | 17      |
| 2. JUSTIFICACION.....  | 20      |
| 3. OBJETIVOS.....  | 21      |
| 3.1. Objetivos generales.....  | 21      |
| 3.2. Objetivos particulares.....   | 21      |
| 4. HIPÓTESIS.....  | 22      |
| 5. MATERIALES Y MÉTODOS.....   | 23      |
| 5.1. Animales.....   | 23      |
| 5.2. Condición Corporal.....   | 23      |
| 5.3. Sexo.....   | 23      |
| 5.4. Edad.....   | 24      |
| 5.5. Criterios de inclusión.....   | 24      |
| 5.6. Criterios de exclusión.....   | 24      |
| 5.7. Alimentación.....   | 24      |

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 5.8.  | Ubicación.....   | 27 |
| 5.9.  | Fuente complementaria de ácidos grasos omega-3.....  | 27 |
| 5.10. | Metodología de muestreo.....   | 28 |
| 5.11. | Medición de triacilglicéridos, colesterol y bioquímicas sanguíneas completas.....                              | 29 |
| 5.12. | Materiales para la preparación de la muestra para la medición de ácidos grasos por cromatografía de gases..... | 30 |
| 5.13. | Preparación de la muestra.....   | 31 |
| 5.14. | Transesterificación.....   | 32 |
| 5.15. | Análisis de los ácidos grasos por cromatografía de gases.....  | 33 |
| 5.16. | Análisis estadístico.....  | 34 |
| 6.    | RESULTADOS.....  | 35 |
| 7.    | DISCUSIOIN.....  | 54 |
| 8.    | CONCLUSIONES.....  | 58 |
| 9.    | ANEXO 1.....   | 59 |
| 10.   | REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....  | 62 |



## ÍNDICE DE FIGURAS

|   | Páginas |
|---|---------|
| Figura 1. Biosíntesis de ácidos grasos de las series omega-9, omega-6 y omega-3.....                                      | 13      |
| Figura 2. Concentraciones promedio de triacilglicéridos séricos en hembras durante el periodo experimental.....           | 37      |
| Figura 3 Concentraciones promedio de triacilglicéridos séricos en machos durante el periodo experimental                  | 38      |
| Figura 4. Concentraciones promedio de colesterol séricos en hembras durante el periodo experimental                       | 39      |
| Figura 5 Concentraciones promedio de colesterol séricos en machos durante el periodo experimental                         | 40      |
| Figura 6. Cromatograma de los estándares de EPA y DHA   | 55      |
| Figura 7 Cromatogama que muestra los compuestos existentes en la muestra  | 56      |
| Figura 8. Representación gráfica de la normalidad de datos de triacilglicéridos de los individuos hembras de este estudio | 57      |
| Figura 9. Representación gráfica de la normalidad de datos de triacilglicéridos de los individuos machos de este estudio  | 57      |
| Figura 10. Representación gráfica de la normalidad de datos de colesterol de los individuos hembras de este estudio       | 58      |
| Figura 11. Representación gráfica de la normalidad de datos de colesterol de los individuos machos de este estudio        | 58      |

## ÍNDICE DE CUADROS

|  | Páginas |
|--|---------|
| Cuadro 1. Las diferentes lipoproteínas, características fisicoquímicas y sus proporciones lípido-proteína dentro del organismo animal                                  | 2       |
| Cuadro 2. Análisis medio de alimento marca Royal Canin ® adulto raza pequeña   | 25      |
| Cuadro 3. Cuadro de requerimiento energético y consumo de alimento superpremium diario y durante el periodo experimental   | 26      |
| Cuadro 4. Bioquímica sanguínea completa día 0  | 34      |
| Cuadro 5. Bioquímica sanguínea completa día 60   | 34      |
| Cuadro 6. Composición de ácidos grasos (%/mol) de suero sanguíneo de los individuos en el día 0 del periodo experimental   | 43      |
| Cuadro 7. Composición de ácidos grasos (%/mol) de suero sanguíneo de los individuos en el día 0 del periodo experimental   | 44      |
| Cuadro 8. Número de individuos estimados en este estudio y su potencia de prueba   | 45      |
| Cuadro 9. Comportamiento estadístico de los días del periodo experimental y su significancia en individuos hembras de las concentraciones de triacilglicéridos séricos | 59      |
| Cuadro 10. Comportamiento estadístico de los días del periodo experimental y su significancia en individuos machos de las concentraciones de triacilglicéridos séricos | 59      |
| Cuadro 11. Comportamiento estadístico de los días del periodo experimental y su significancia en individuos hembras de las concentraciones de colesterol sérico        | 59      |
| Cuadro 12. Comportamiento estadístico de los días del periodo experimental y su significancia en individuos machos de las concentraciones de colesterol sérico         | 60      |
| Cuadro 13. Valores de las concentraciones séricas de triacilglicéridos de  | 60      |

individuos hembras durante el periodo experimental

Cuadro 14. Valores de las concentraciones séricas de triacilglicéridos de individuos machos durante el periodo experimental 60

Cuadro 15. Valores de las concentraciones séricas de colesterol de individuos hembras durante el periodo experimental 61

Cuadro 16. Valores de las concentraciones séricas de triacilglicéridos de individuos machos durante el periodo experimental 61

## RESUMEN

### EFFECTO DE LA COMPLEMENTACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS OMEGA 3 SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE TRIACILGLICÉRIDOS SÉRICOS EN PERROS SANOS DE RAZA PEQUEÑA

En las últimas décadas se ha popularizado la complementación con ácidos grasos omega 3 en dietas para animales, en estudios científicos actuales se ha demostrado que tienen efectos benéficos sobre la salud. Este estudio tuvo como objetivo determinar las concentraciones de triacilglícidos y colesterol sérico para lo cual se tomaron muestras sanguíneas en los días 0, 15, 30, 45 y 60 de complementación dietaria (60 días) con una fuente de ácidos grasos omega 3 a fin de observar si se modificaron estas concentraciones séricas en 9 perros sanos de raza pequeña, de los cuales 5 fueron hembras y 4 machos cuyo peso promedio fue de  $6.7 \pm 1.94$  kilogramos y una edad promedio de  $4.5 \pm 1.64$  años. Se les administró una dieta superpremium durante el periodo experimental con un periodo previo de adaptación de 15 días. Con el fin de evaluar el estado de salud de los perros se determinó una bioquímica sanguínea en el día 0 del periodo experimental y el día 60 del periodo experimental. La medición de triacilglícidos y colesterol séricos se realizó con un analizador automatizado por el método de bioquímica seca. Los resultados obtenidos se sometieron a análisis multivariado con mediciones repetidas para observar si se modificaron las concentraciones de estos analitos a través del tiempo con respecto al sexo de los animales, lo cual no tuvo diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ). Se determinó la concentración sérica de ácidos grasos omega 3 (ácido eicosapentaenoico (20:5) (EPA) y ácido docosahexaenoico (22:6) (DHA)) por el método de cromatografía de gases los cuales no se encontraron en los cromatogramas de las muestras. Se puede inferir que la complementación, a la dosis usada, no modifica sustancialmente la concentración de triacilglícidos y colesterol séricos, ni son detectables EPA ni DHA en el suero de perros sanos de raza pequeña de este estudio ya que estos son metabolizados o utilizados en las diferentes vías metabólicas.

**Palabras clave:** Perros, triacilglícidos, colesterol, EPA, DHA, complementación dietaria



## ABSTRACT

### EFFECT OF SUPPLEMENTATION WITH OMEGA 3 FATTY ACIDS IN SERUM TRIACYLGLYCEROLS IN HEALTHY SMALL BREED DOGS

The supplementation with omega 3 fatty acids in the animal diets has become popular. In recent scientific investigations, has been demonstrated it has beneficial effects in health, in the last decades. The purpose of the present investigation was determinate triacylglycerides and cholesterol serum levels. Blood samples was taken on days 0, 15, 30, 45 and 60 of dietary supplementation with a source of omega 3 fatty acids in order to observe whether they were modified in 9 small breed healthy dogs (5 female and 4 male), the average weight was  $6.7 \pm 1.94$  kilograms with a average age  $4.5 \pm 1.64$  years old. Were administered a superpremium dog food during experimental period with a prior lapse adjustment of 15 days. In order to evaluate the dog's health status, was made serum biochemistry in 0 and 60 day of experimental period. The serum triacylglycerides and cholesterol measures were made with an automated analyzer by dry biochemical method. The obtained results were subjected to a repeated measures multivariate analysis to observe whether were modified these analytics through the time respect to the animal's gender, no there was statistical differences ( $P < 0.05$ ). The omega 3 fatty acids serum levels were determined (eicosapentaenoic acid EPA (20:5) and docosahexaenoic acid DHA (22:6) by gas-liquid chromatography which no were found in sample's chromatograms. It can be concluded, that complementation at used dose, do not change the serum triacylglycerides and cholesterol levels significantly, neither these are detectable, EPA and DHA, on healthy dogs serum of small breed of this study, since these are metabolized or used on the different metabolic pathways.

**Keywords:** *Healthy dogs, Serical triacylglycerides, seric cholesterol, eicosapentaenoic acid, docosahexaenoic acid, dietary supplementation.*



# **EFFECTO DE LA COMPLEMENTACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS OMEGA 3 SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE TRIACILGLICÉRIDOS SÉRICOS EN PERROS SANOS DE RAZA PEQUEÑA**

## **1. Introducción**

Los lípidos abarcan un amplio espectro de compuestos que cubren los requerimientos nutricionales y funcionales de los seres vivos. En general tienen la propiedad de ser insolubles (hidrofóbicos) en solventes polares como el agua. Algunos lípidos se encuentran en estado sólido a temperatura ambiente los cuales se denominan grasas, por otra parte los que se encuentran en estado líquido son llamados aceites. Cuando se realiza un análisis de nutrientes de alimentos, a la extracción con éter, se obtienen lípidos que representan la grasa cruda de dicho alimento<sup>1, 2, 7-9</sup>.

Los lípidos participan en el metabolismo energético y en varios procesos en los cuales realizan funciones como componentes de la membrana celular, hormonas y vitaminas liposolubles, aislantes térmicos y reguladores biológicos como prostaglandinas etcétera<sup>1, 2, 7-9</sup>.

La ingesta de lípidos beneficia al animal porque suministra energía, ácidos grasos esenciales y un medio que favorece la absorción de vitaminas liposolubles<sup>1, 2, 7-9</sup>.

### **1.1. Transporte de los lípidos de la dieta en el organismo**

Las grasas absorbidas a partir de la alimentación y los lípidos sintetizados por el hígado y el tejido adiposo deben ser transportados a los diversos tejidos y órganos



para su utilización y almacenamiento. Dado que los lípidos son insolubles en el agua, es un problema el transporte en un medio acuoso como el plasma sanguíneo. La solución consiste en asociar lípidos no polares (triacilglicerol y ésteres de colesterol) con lípidos anfipáticos (fosfolípidos y colesterol) y proteínas, para formar lipoproteínas miscibles en agua, las cuales tienen diferente composición físico-química y proporciones lípido-proteína, esta asociación se muestra en el cuadro 1 a continuación<sup>1, 2, 7-9</sup>.

**Cuadro 1. Las diferentes lipoproteínas, características físico-químicas y sus proporciones lípido-proteína dentro del organismo animal**

| Lipoproteína             | Fuente                                 | Diámetro (nm) | Densidad     | Composición |          | Principales Componentes                     | Apolipoproteínas   |
|--------------------------|--|---------------|--------------|-------------|----------|---|--|
|                          |  |               |              | % Proteína  | % Lípido |   |  |
| Quilomicrones            | Intestino                              | 90-100        | < 0.95       | 1 a 2       | 98 a 99  | Triacilglicéridos                           | A-I, A-II, A-IV <sup>1</sup> , B-48, C-I, C-II, C-III, E |
| Quilomicrones remanentes | Quilomicrones                          | 45-150        | < 1.006      | 6 a 8       | 92 a 94  | Triacilglicéridos, Fosfolípidos, Colesterol | B-48, E  |
| VLDL                     | Hígado                                 | 30-90         | 0.95 a 1.006 | 7 a 10      | 90 a 97  | Triacilglicéridos                           | B-100, C-I, C-II, C-III                                  |
| IDL                      | VLDL                                   | 25-35         | 1.006-1.019  | 11          | 89       | Triacilglicéridos, Colesterol               | B-100, E   |
| LDL                      | VLDL                                   | 20-25         | 1.019-1.063  | 21          | 79       | Colesterol                                  |  |
| HDL <sub>1</sub>         | Hígado, Intestino, VLDL, Quilomicrones | 20-25         | 1.019-1.063  | 32          | 68       | Fosfolípidos, Colesterol                    | A-I, A-II, A-IV, C-I, C-II, C-III, D <sup>2</sup> , E    |
| HDL <sub>2</sub>         |  | 10-20         | 1.063-1.125  | 33          | 67       |   |  |
| HDL <sub>3</sub>         |  | 5-20          | 1.125-1.210  | 57          | 43       |   |  |
| HDL pre-B <sup>3</sup>   |  | < 5           | > 1.210      |             |          |   |  |
| Albúmina                 | Tejido adiposo                         |               | > 1.281      | 99          | 1        | Ac. Grasos Libres                           |  |

Tomado de Bioquímica de Harper 14va edición

Por otra parte, los triacilgliceridos (TG) son ésteres del alcohol glicerol y ácidos grasos. En las grasas que se encuentran en la naturaleza, la proporción de moléculas de TG que contienen el mismo residuo de ácido graso en las tres posiciones esterificadas es muy pequeña. Casi todos son acilgliceroles mixtos<sup>7-9</sup>.

Casi todos los ácidos grasos, con excepción importante de algunos de cadena corta, se absorben desde el intestino a la linfa intestinal. Durante la digestión, la mayoría de los triacilgliceridos se escinden en monoglicéridos y ácidos grasos libres (AGL). Después, mientras atraviesan las células epiteliales intestinales vuelven a formar nuevas moléculas de triacilglicéridos, que entran en la linfa formando parte de diminutas gotas dispersas llamadas quilomicrones, cuyo diámetro oscila entre 0.08 y 0.6 micrometros. En la superficie externa de los quilomicrones se adsorbe una pequeña cantidad de la apoproteína B. El resto de las moléculas proteicas se proyecta sobre el agua circundante, con lo que aumenta la estabilidad de los quilomicrones en la linfa y se evita su adherencia a las paredes de los vasos linfáticos <sup>1, 2, 7-9</sup>.

La mayor parte del colesterol y de los fosfolípidos absorbidos en el tubo digestivo forma parte de los quilomicrones. De este modo, los quilomicrones están compuestos principalmente de triacilglicéridos, pero contienen un 9% de fosfolípidos, un 3% de colesterol y un 1% de apoproteína B. Los quilomicrones ascienden luego por el conducto torácico y se vierten en la sangre venosa en la confluencia de las venas yugular y subclavia <sup>1, 2, 7-9</sup>.

Aproximadamente una hora después de haber ingerido alimentos con alto contenido de grasa, la concentración de quilomicrones plasmáticos puede elevarse a razón de 1 a 2% del total. Debido al elevado tamaño de los quilomicrones, el plasma se torna turbio y amarillo. Sin embargo, los quilomicrones tienen una vida media menor a una hora, de manera que el plasma vuelve a aclararse a las pocas horas. Los lípidos de los quilomicrones se depuran de la siguiente manera:

La mayoría de los quilomicrones desaparecen en la sangre circulante a su paso por los capilares del tejido adiposo y en menor cantidad en hígado. Mayormente el tejido adiposo y en menor cantidad el hígado, contienen concentraciones de la enzima lipasa lipoprotéica (LPL). Ésta actúa sobre todo en el endotelio capilar, donde hidroliza los triacilglicéridos de los quilomicrones que entran en contacto con la pared endotelial, liberando ácidos grasos y glicerol <sup>1, 2, 3, 5-11</sup>.

Los ácidos grasos al ser muy miscibles con las membranas plasmáticas de las células difunden de inmediato al interior de los adipocitos. Una vez dentro de estas células, a partir de los ácidos grasos se vuelven a sintetizar triacilglicéridos, donde el glicerol procede del metabolismo de la glucosa. La fosfolipasa también hidroliza los fosfolípidos, liberando ácidos grasos que se almacenan de manera análoga en las células<sup>1, 2, 3, 4</sup>.

Cuando la grasa almacenada en el tejido adiposo se debe utilizar en otro lugar para proporcionar energía, primero debe transportarse al otro tejido en forma de AGL previa hidrólisis de los TG en ácidos grasos y glicerol<sup>1-4, 7-9</sup>.

Al salir de los adipocitos, los ácidos grasos se ionizan con fuerza en el plasma y la parte iónica se combina inmediatamente con moléculas de albúmina. Los ácidos grasos unidos de esta forma se llaman ácidos grasos libres o ácidos grasos no esterificados para distinguirlos de los otros ácidos grasos del plasma que existen en forma de ésteres de glicerol, colesterol y otras sustancias<sup>1-4, 7-9</sup>.

Los AGL aparecen en el plasma a partir de la hidrólisis de los triacilgliceroles por acción de la lipasa lipoprotéica durante su incorporación a los tejidos de los triacilgliceroles plasmáticos. Se encuentran combinados con la albúmina del suero

en concentraciones variables entre 0.1 y 2 pEq/mL del plasma y comprenden a los ácidos grasos de cadena larga que se encuentran en el tejido adiposo, es decir, ácidos palmítico, esteárico, oleico, palmitoléico, linoléico, otros ácidos poliinsaturados y cantidades más pequeñas de otros ácidos grasos de cadena larga <sup>3-14</sup>.

La velocidad de eliminación de los AGL de la sangre es muy rápida. Parte de estos ácidos grasos libres captados se oxidan y suministran alrededor de 25 a 50% de los requerimientos energéticos durante el ayuno. El resto de la incorporación es esterificada. En la inanición, se oxida una cantidad de ácidos grasos considerablemente mayor de la que puede ser atribuida a la oxidación de los ácidos grasos libres <sup>3</sup>.

Por otro lado, la formación de quilomicrones aumenta con la carga de triacilglicerol absorbida. La mayoría de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL, por sus siglas en inglés) plasmáticas son de origen hepático. Estas son el vehículo de transporte del triacilglicerol desde el hígado hasta los tejidos extrahepáticos<sup>3</sup>.

Las VLDL son secretadas por las células del parénquima hepático dentro del espacio de Dissé y luego en los sinusoides hepáticos a través de las ventanas del revestimiento endotelial <sup>3</sup>.

Tanto los quilomicrones, como las VLDL aisladas de la sangre, tienen apolipoproteínas C y E, las lipoproteínas recién secretadas o "nacientes" contienen poca o nada de ella y se tiene evidencia que el complemento de polipéptidos de la apoproteína C y E es tomado por transferencia desde las lipoproteínas de alta densidad (HDL, por sus siglas en inglés) una vez que los quilomicrones y las VLDL han entrado en la circulación <sup>1, 3, 4</sup>.

La depuración sanguínea de los quilomicrones es rápida, pues su tiempo medio de desaparición es del orden de minutos en ratas y es de mayor tiempo en animales superiores, como en el ser humano, en quienes es menor de una hora. Las partículas de elevado peso molecular se catabolizan más rápidamente que las de menor peso molecular. Cuando se administran por vía venosa, quilomicrones con ácidos grasos marcados, casi 80% de la marca se encuentra en el tejido adiposo, corazón y músculo, y aproximadamente 20% en el hígado. Como los experimentos con órgano irrigado han demostrado que el hígado no metaboliza de manera significativa los quilomicrones o las VLDL locales, la marca en el hígado debe ser un resultado secundario de su metabolismo en los tejidos extrahepáticos <sup>1, 2, 4, 5</sup>.

El metabolismo de los lípidos se considera un elemento esencial de los recursos energéticos y de diversas funciones biológicas del ser humano y los animales, y su regulación es muy importante, pues alteraciones en los procesos metabólicos de las grasas se asocian con diversas patologías que de manera aguda o crónica pueden comprometer la calidad de vida, e incluso la supervivencia<sup>6, 12</sup>.

Los avances científicos de los últimos años, sobre el metabolismo de los ácidos grasos que va más allá de su “esencialidad” y que define con relativa precisión la capacidad de estos ácidos grasos para interactuar en rutas de señalización intracelular con un impacto aparentemente indiscutible en la medicina clínica <sup>6, 12</sup>.

Los primeros datos sobre el beneficio de los ácidos grasos omega-3 a la salud se remontan al año 1929, el interés actual por los ácidos grasos omega- 3 de cadena larga [ácido eicosapentaenoico (20:5 omega-3, EPA) y ácido docosahexaenoico

(22:6 omega-3, DHA)] estriba en el descubrimiento de una menor morbilidad y mortalidad por enfermedades cardiovasculares en poblaciones que consumen cantidades significativas de EPA y DHA. A principios de los años 70's se pudo comprobar que, si bien la dieta tradicional de los esquimales en Groenlandia era rica en grasas y proporcionaba varios gramos diarios de EPA y DHA (10 g diarios por cada 3.000 kcal) de la caza de la ballena y otros mamíferos marinos, la incidencia de mortalidad por infarto agudo de miocardio era muy baja (10%-30%) comparada con la de Dinamarca (dieta rica en grasas saturadas y ácidos grasos omega-6, y solo entre 0.10 y 0.15 g de EPA y DHA); a pesar de que las concentraciones de colesterol en sangre no eran tan dispares entre ambas poblaciones. En realidad, esta diferencia de mortalidad no solo se correlaciona exclusivamente con la ingesta total de ácidos grasos omega-3 , sino también con el cociente entre ácidos grasos omega-3 y omega-6, de hecho compiten en las mismas rutas metabólicas con efectos que difieren en intensidad e incluso contrapuestos. La OMS recomienda el consumo mínimo diario de 0.3-0.5 g de EPA y DHA en la población general (proporción 1:5 entre ácidos grasos omega-3 y omega-6, respectivamente), mientras que se aumenta a 1 g diario el consumo de los ácidos grasos omega-3 para personas con antecedentes de enfermedad coronaria. Un hecho relevante es que nuestro metabolismo tiene la capacidad de distinguir perfectamente la posición del primer doble enlace en la molécula de los ácidos grasos insaturados, lo que precisamente diferencia las distintas familias de ácidos grasos entre sí <sup>6</sup>.

Todas estas condiciones anómalas han querido evitarse y se ha procurado obtener los beneficios de los ácidos grasos poliinsaturados omega-3 para los animales de compañía como perros y gatos. A partir de la década de los 90's se ha intensificado la investigación de los beneficios de los AGPI omega-3 en modelos animales, los cuales han evidenciado algunas particularidades, en cuanto a modo de acción y consecuencias en el uso crónico, en especies como ratones, ratas, hámsters, conejos, cerdos, monos, perros y gatos, aunque en términos generales cubren las expectativas de la función esperada de estos ácidos grasos y en este momento es imprescindible mas investigación para dilucidar algunas incógnitas en este tema <sup>6, 12</sup>.

En la actualidad la mayoría de las personas tienden a relacionar a los lípidos que consume diariamente en su dieta (sobre todo triacilglicéridos y colesterol) con el desarrollo de patologías como aterosclerosis y enfermedad arterial coronaria en humanos. Así mismo, se han creado consciencia de la importancia de no exceder el consumo de estos nutrientes. En recientes años, este conocimiento ha llevado a algunos propietarios de animales de compañía a aplicar estos mismos principios nutricionales a sus mascotas. Sin embargo, existen algunas diferencias muy básicas entre estas especies en la forma en la que la grasa de la dieta es asimilada y metabolizada. A diferencia de los humanos, los perros y gatos son capaces de consumir una amplia gama de lípidos en su dieta sin alterar las concentraciones sanguíneas normales de triacilglicéridos y colesterol. Esto es, de manera presumible, debido a que los perros y gatos han evolucionado como carnívoros, facultativos y estrictos respectivamente, predadores con una dieta que

normalmente contiene una alta proporción de lípidos de origen animal. La capacidad de consumir, digerir y asimilar una dieta con tales características ha permanecido en estas especies a través del proceso de domesticación <sup>1,2</sup>.

Los estudios epidemiológicos, de intervención en humanos y en animales experimentales atribuyen a los ácidos grasos omega-3 de cadena larga (ácido eicosapentaenoico, EPA, 20:5 omega-3; y ácido docosahexaenoico, DHA, 22:6 omega-3 ) propiedades benéficas para la salud, pues son activos en la prevención primaria y secundaria de diversas enfermedades. Los ácidos grasos omega-3 pueden tener efectos antiateroscleróticos, antitrombóticos, antiarrítmicos, anticancerígenos, antiinflamatorios y de repercusión en las funciones del sistema nervioso, entre otros. Los mecanismos de acción abarcan desde cambios estructurales en las membranas celulares hasta la regulación en la expresión de genes. La constatación de la asociación entre estas enfermedades y estados carenciales de EPA y DHA, considerando su rápida asimilación metabólica, confiere mayor relevancia al soporte nutricional clínico basado en los ácidos grasos omega-3 <sup>1-6, 12</sup>.

En algunos estudios se ha demostrado que los ácidos grasos omega 3 se incorporan normalmente a los quilomicrones. Harris y Connor (1988) reportaron que en sujetos que consumen una dieta rica en aceite de salmón se abatió la elevación del nivel posprandial de triacilglicéridos plasmáticos comparada con la elevación observada al administrar una comida control de prueba durante la fase de dieta control <sup>5,6</sup>.



Las dietas que contienen aceite de pescado producen, significativamente, menor concentración de triacilglicéridos postprandiales. De modo que la velocidad de remoción de quilomicrones se mejora y/o se retarda la absorción debido a los altos niveles de ácidos grasos omega 3 en tejidos <sup>5,6</sup>.

### **1.2. Papel de los ácidos grasos omega-3 dietarios o complementarios en el transporte de lípidos.**

El consumo regular de cantidades relativamente grandes (500-1500 mg/día) de ácidos grasos omega-3 disminuye considerablemente las concentraciones plasmáticas de triacilglicéridos en sujetos humanos sanos, así como en pacientes hipertrigliceridémicos. Este efecto se puede explicar por varios mecanismos, Bottino, Vandenberg y Reiser sugieren que la configuración única de los triacilglicéridos que contienen ácidos grasos omega-3 puede prevenir la interacción de enzimas lipolíticas con los grupos éster <sup>5-15</sup>.

Los aceites con alto contenido de omega-3 pueden afectar a la formación de partículas de quilomicrones en el enterocito. Aunque esto no se ha investigado específicamente, varios estudios anteriores han examinado los efectos de ácidos grasos omega-3 en la producción hepática de VLDL y han demostrado una disminución en los triacilglicéridos VLDL y producción de apolipoproteína B <sup>5-15</sup>.

Puesto que la resíntesis de triacilglicéridos se lleva a cabo en el enterocito durante la absorción de grasas, es posible que este proceso sea también inhibido por los ácidos grasos omega-3. Tal inhibición llevaría a una tasa reducida de formación de quilomicrones secundaria a una reducción en la síntesis de triacilglicéridos endógenos de los recién absorbidos ácidos grasos libres y monoglicéridos, y se

produciría una menor quilomicronemia postprandial. Al igual que en el hígado, este efecto sólo se hace evidente después del tratamiento crónico (un periodo mayor a 15 días) con aceites ricos en ácidos grasos omega-3, no después de una sola comida.

Una posibilidad es que los ácidos grasos omega-3 en los quilomicrones aceleran su eliminación, sin embargo, Chen y colaboradores encontraron que tanto estudios *in vitro* como *in vivo*, las tasas de eliminación de quilomicrones no mejoran cuando las partículas contenían ácidos grasos omega-3<sup>5-15</sup>.

Por otra parte, se han identificado algunos mecanismos que son afectados por la complementación de ácidos grasos omega-3, tales como algunas funciones del sistema inmune o la coagulación, entre otros<sup>5-15</sup>.

### **1.3. Síntesis de ácidos grasos poliinsaturados no esenciales y los esenciales**

Comparados con los vegetales, los tejidos animales tienen una capacidad limitada para desaturar los ácidos grasos. Por esto requieren ingerir en los alimentos, ácidos grasos poliinsaturados derivados en última instancia de fuentes vegetales. Estos ácidos grasos podrían dar origen a los ácidos grasos eicosanoicos (C<sub>20</sub>), de los que derivan familias de compuestos conocidos como eicosanoides. Estos constituyen las prostaglandinas, las prostaciclina, los tromboxanos, los leucotrienos y las lipoxinas.

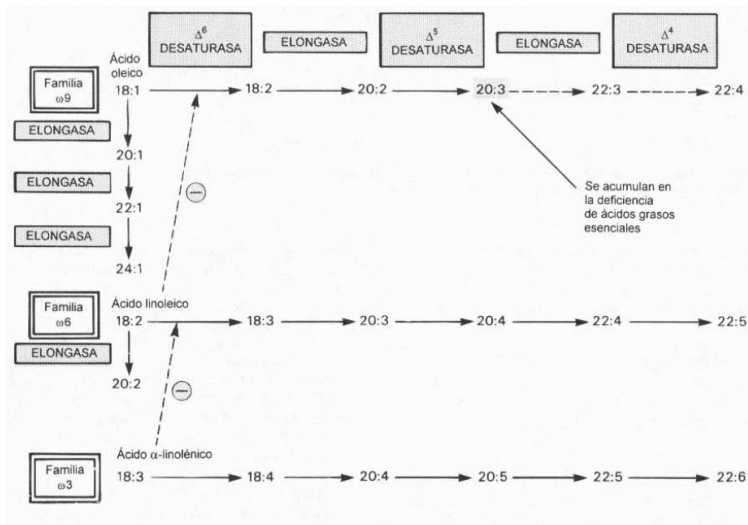
Los mamíferos no pueden sintetizar algunos ácidos grasos poliinsaturados por lo cual son esenciales en la nutrición. Otros ácidos grasos polienoicos de C<sub>20</sub>, C<sub>22</sub> y C<sub>24</sub> pueden detectarse en los tejidos. Estos pueden ser derivados de los ácidos oléico, linoleico y α-linolénico mediante el alargamiento de las cadenas. Es de

notarse que todos los enlaces dobles presentes en los ácidos grasos insaturados naturales en los mamíferos, son de la configuración cis.

Los ácidos palmitoléico y oleico no son esenciales en la alimentación, debido a que los tejidos pueden introducir una doble ligadura en la posición  $\Delta^9$  en el ácido graso saturado correspondiente. Los ácidos linoleico, y  $\alpha$ -linolénico son los únicos ácidos grasos conocidos que son esenciales para la nutrición completa de muchas especies de animales, incluyendo al ser humano, por lo que deben incluirse en la dieta; en consecuencia se conocen como ácidos grasos esenciales en la nutrición. El ácido araquidónico puede formarse a partir del ácido linoleico en la mayoría de los mamíferos, pero no en los felinos, donde debe clasificarse como ácido graso esencial. En la mayoría de los animales, es posible introducir dobles ligaduras en las posiciones  $\Delta^4$ ,  $\Delta^5$ ,  $\Delta^6$  y  $\Delta^9$ , contando desde el grupo terminal carboxilo, pero no más allá de la posición  $\Delta^9$ . Por el contrario, los vegetales pueden introducir dobles ligaduras en las posiciones  $\Delta^{12}$  y  $\Delta^{15}$  y de esta manera pueden sintetizar ácidos grasos esenciales en la nutrición, tal como se ilustra en la figura 1.

Figura 1. Biosíntesis de ácidos grasos de las series omega-9, omega -6 y omega-3

Tomado de: Bioquímica de Harper 14va edición



En cuanto a los ácidos grasos monoinsaturados no esenciales, se considera que varios tejidos incluyendo al hígado, se encargan de su formación a partir de ácidos grasos saturados. La primera doble ligadura introducida en un ácido graso saturado es siempre cercana a la posición  $\Delta^9$ . Un sistema enzimático,  $\Delta^9$ -desaturasa, en el retículo endoplásmico cataliza la conversión de palmitoil-CoA o estearoil-CoA en palmitoleil-CoA y oleil-CoA, respectivamente. El oxígeno, NADPH o el NADH son necesarios para la reacción. Las enzimas parecen ser las de un sistema típico de monooxigenasa que involucran al citocromo  $b_5$ <sup>8</sup>.

En 1928, Evans y Burr notaron que las ratas alimentadas con una dieta purificada libre de lípidos a la cual se habían añadido las vitaminas A y D, manifestaban reducción de la velocidad de crecimiento y deficiencia reproductiva. Trabajos posteriores mostraron que el síndrome de deficiencia se curaba mediante la adición de ácidos linoleico,  $\alpha$ -linolénico y araquidónico a la alimentación. Posteriores características diagnósticas del síndrome incluyen piel con escamas, necrosis de la cola y lesiones en el sistema urinario, aunque el trastorno no es mortal. Una fuente natural de estos ácidos grasos son aceites vegetales y en cantidades pequeñas en las canales de animales<sup>8</sup>.

Las funciones de los ácidos grasos esenciales parecen ser diversas, aunque no bien definidas, además de la formación de prostaglandinas y leucotrienos. Los ácidos grasos esenciales que se hallan en los lípidos estructurales de la célula se relacionan con la integridad estructural de la membrana mitocondrial<sup>8</sup>.

Las membranas celulares contienen ácido araquidónico que constituye entre 5 y 15% de los ácidos grasos de fosfolípidos. El ácido docosahexaenoico (DHA; omega 3,2:6), que se sintetiza a partir de ácido  $\alpha$ -linolénico o se obtiene de manera directa de aceites de pescados, existe en concentraciones elevadas en la retina, la corteza cerebral, los testículos y el esperma. El DHA se requiere en particular durante el desarrollo cerebral y es suministrado a través de la placenta y la leche. Los segmentos exteriores de los bastones de la retina contienen concentraciones muy altas de DHA; la mayoría de los fosfolípidos contiene al menos algunas moléculas de éste ácido graso. Al parecer la gran fluidez resultante se necesita para el funcionamiento de la rodopsina, que consiste en activación por un fotón que produce movimientos laterales y rotatorios dentro de la membrana. En los pacientes con retinitis pigmentosa se encuentran valores sanguíneos bajos de DHA. Los recién nacidos prematuros tienen una baja actividad de  $\Delta^4$  desaturasa, lo cual reduce su capacidad para sintetizar DHA a partir de precursores de ácidos grasos omega 3<sup>8</sup>.

#### **1.4. Anomalías asociadas al transporte y metabolismo de lípidos en perros**

Las hiperlipidemias y la aterosclerosis son condiciones raras en perros y gatos pero cuando ocurren se consideran de origen genético o se desarrollan de manera secundaria a otras enfermedades. Por ejemplo, un defecto hereditario en la actividad de la enzima lipoproteína lipasa en gatos causa concentraciones elevadas de colesterol y triacilglicéridos. La alteración eventualmente lleva al desarrollo de una severa parálisis de nervios periféricos. Se propone que un modo recesivo autosómico de herencia similar a la de una enfermedad análoga en

humanos es responsable de este desorden. También hay evidencia de la existencia de un defecto hereditario en el metabolismo de los lípidos en los Schnawzers Miniatura, Beagles y posiblemente en Spaniels Británicos. Las concentraciones elevadas de colesterol también se han identificado en perros Briard, lo que sugiere la existencia de un desorden hereditario del metabolismo de los lípidos en esta raza <sup>1,2</sup>.

Una segunda causa de hiperlipidemia en animales de compañía es la presencia de ciertos desordenes preexistentes. Las enfermedades que pueden causar hiperlipidemia secundaria incluyen diabetes mellitus, hipotiroidismo, pancreatitis, hiperadrenocorticismo, síndrome nefrótico y enfermedades hepáticas. Ciertos medicamentos tales como los glucocorticoides y los fármacos inmunosupresores también pueden incrementar las concentraciones de lípidos sanguíneos en algunas mascotas<sup>1,2</sup>.

Cuando las concentraciones de triacilglicéridos elevadas ocurren en perros y gatos se pueden producir signos clínicos como: anorexia, letargia, dolor abdominal, convulsiones, vómito, diarrea y desarrollo de humor acuoso ocular concentrado de lípidos. La hipercolesterolemia, por otra parte, puede estar relacionada al desarrollo de lesiones ateroscleróticas, lipemia retinal y opacidad lipídica de la cornea<sup>2</sup>.

Tradicionalmente el tratamiento dietario para la hiperlipidemia en perros y gatos ha sido de dietas bajas en grasa. Ambas hiperlipidemias, primaria y secundaria parecen responder bien a dietas bajas en grasa, dietas bajas en calorías en estas

especies. Sin embargo, es innecesaria la alimentación con dietas bajas de estas características en animales de compañía sanos, con la intención de prevenir hiperlipidemia y concentraciones elevadas de colesterol. Dietas comerciales bajas en grasa se pueden usar para el tratamiento de la obesidad y para mantenimiento del peso en animales de compañía adultos que llevan vidas sedentarias. Sin embargo, las preocupaciones que tienen los humanos con los lípidos dietarios y enfermedades cardíacas no aplican para los animales de compañía, excepto en circunstancias específicas<sup>2</sup>.

La hipertrigliceridemia postprandial es un evento natural que refleja un incremento transitorio en los quilomicrones; en perros esto normalmente se resuelve en el lapso de 6 a 10 horas seguido del consumo de alimento. En perros, la concentración de triacilglicéridos séricos con un valor mayor a 150 mg/dl<sup>-1</sup> en condiciones de ayuno y/o la concentración total de colesterol mayor que 300 mg/dl<sup>-1</sup> es considerada anormalmente elevada<sup>1,2</sup>.

Un número de problemas de salud pueden ser causados por la persistente hiperlipidemia en animales de compañía. La hipertrigliceridemia, especialmente, cuando es severa, está asociada a los signos clínicos ya mencionados anteriormente, acompañados de hepatomegalia y deposición anormal de lípidos en ciertos tejidos. Similar a algunas hipertrigliceridemias en humanos, en perros y gatos las concentraciones elevadas de triacilglicéridos puede incrementar el riesgo de desarrollar pancreatitis aguda. La hipercolesterolemia no es común en perros y gatos pero se ha reportado en Pastores de Shetland, Beagles, Briards, Collies y Schnawzers miniatura <sup>1,2</sup>.



Las deposiciones de lípidos se han reportado en perros con hiperlipidemia y puede ser resultado de colesterol sanguíneo elevado. Algunos estudios revelaron la presencia de una familia de Collies que cursaron con un cuadro de hipercolesterolemia familiar idiopática observando que la mayoría de los perros desarrollaron lipodosis corneal<sup>1,2</sup>.

#### **1.4.1. Hiperlipidemia en Schnawzer miniatura**

La hiperlipidemia del Schnawzer Miniatura es una afección familiar bien documentada. Se ha reportado que muchos perros clínicamente sanos de esta raza se han encontrado con una hiperlipidemia persistente en ayuno al examen clínico rutinario. No existe predilección por sexo y la afección se observa usualmente primero en Schnawzers que son mayores de los 4 años de edad. La hiperlipidemia está asociada con hipertriacilgliceridemia típicamente caracterizada por exceso de hiperquilomicronemia. La concentración de colesterol sérico es casi normal o ligeramente elevada. Una reciente investigación de prevalencia de hipertrigliceridemia en Schnawzer Miniatura encontró que cerca de un tercio (32.8 %) tuvieron concentraciones de triacilglicéridos que fueron mayores que el rango de referencia para perros sanos. Se ha reconocido una actividad incrementada de lipasa y amilasa en Schnawzer Miniatura hipertriacilgliceridémicos que presentan pancreatitis aguda. En estos casos, se cree que la pancreatitis es causada por la hipertrigliceridemia<sup>1-4</sup>.

Los perros afectados son asintomáticos o tiene episodios recurrentes de dolor abdominal o malestar, vómito y/o diarrea. También se han asociado convulsiones

con hipertriacilgliceridemia persistente en esta raza. Los propietarios reportan que los episodios de malestar abdominal duran varios días, seguidos de recuperación espontánea. En muchos casos, los signos clínicos y la historia son similares a las de aquellos perros que cursan con pancreatitis aguda, pero la evidencia de laboratorio y radiográfica a menudo no soporta este diagnóstico. Este síndrome es llamado “pseudopancreatitis” por Xenoulis et al 2011<sup>4</sup>. Se cree que la hiperlipidemia en el Schnawzer Miniatura es hereditaria debido a la alta predisposición racial y debido a que la mayoría de los Schnawzers Miniatura carecen de evidencia de enfermedades que puedan causar hiperlipidemia secundaria<sup>1-4</sup>.

La causa subyacente de la hipertriacilgliceridemia primaria en Schnawzers Miniatura no es conocida pero está caracterizada por excesivas partículas VLDL con o sin recurrente quilomicronemia e hipercolesterolemia media. La actividad de la lipoproteína lipasa (LPL) es menor en Schnawzers Miniatura lipémicos comparada con la actividad de la LPL en Schnawzers Miniatura no lipémicos y en otras razas. Se tiene la teoría que una deficiencia familiar de la enzima LPL o la ausencia de una apoproteína que funciona para activar la LPL puede ser responsable de este padecimiento. Un defecto en la síntesis o actividad de esta enzima previene la liberación de los triacilglicéridos dietarios a los tejidos e impide la utilización de los quilomicrones y de las VLDL intermedias. La ausencia de la apoproteína C-II (apo C-II) podrían tener un efecto similar. La apo C-II es un componente normal de los quilomicrones y de las VLDL y es un cofactor para LPL.

En humanos, los individuos con una deficiencia de apo C-II tienen síntomas clínicos similares a los individuos con deficiencia de LPL <sup>1-4</sup>.

## **2. Justificación**

En las últimas décadas se ha popularizado el consumo de ácidos grasos poliinsaturados omega-3 debido a los beneficios que aportan a la salud, esto se evidencia con las llamadas dietas mediterráneas que son ricas en ácidos grasos poliinsaturados provenientes de aceites de peces marinos. Con el fin de obtener los beneficios de dichos ácidos grasos el ser humano ha abusado del consumo de fuentes complementarias con un pobre conocimiento de los efectos adversos de éstas en el organismo y se tienen bien estudiados en humanos tales efectos, mas no en mascotas y en el afán de proporcionar una mejor salud a sus animales de compañía, como perros y gatos, también se les ha administrado estos complementos a sus dietas. Por lo que en este estudio se quiere investigar si existe un efecto de la complementación prolongada de ácidos grasos omega-3 sobre la concentración de triacilglicéridos séricos de perros sanos de razas pequeñas, ya que no existe suficiente información que sustente si existe un efecto similar en perros igual que en humanos.

### **3. Objetivos**

#### **3.1. Objetivos General**

- Determinar si la complementación con una fuente comercial de ácidos grasos omega-3 EPA y DHA, en la dieta, modifican la concentración de triacilglicéridos y colesterol séricos, así como conocer la concentración de estos ácidos grasos en suero sanguíneo, en perros adultos sanos de raza pequeña.

#### **3.2 Objetivos particulares**

- Determinar las concentraciones séricas de ácidos grasos omega-3 EPA y DHA, antes y durante la administración de la fuente complementaria de ácidos grasos omega-3 en perros sanos adultos de raza pequeña en mantenimiento clínicamente sanos.
- Determinar la concentración sérica de triacilglicéridos y colesterol, antes y durante la administración de la fuente complementaria de ácidos grasos omega-3 EPA y DHA en perros adultos de raza pequeña en mantenimiento clínicamente sanos
- Determinar la concentración de algunos analitos séricos (albumina, fosfatasa alcalina (FA), alanin-amino-transferasa (ALT), amilasa, calcio, creatinina, fósforo, bilirrubina total, proteínas totales, nitrógeno ureico sanguíneo (BUN), globulina) durante la administración de la fuente complementaria de ácidos grasos omega-3 en perros sanos adultos de raza pequeña en mantenimiento clínicamente sanos

#### **4. Hipótesis**

La complementación con ácidos grasos omega-3 en la dieta de perros adultos sanos de raza pequeña, promoverá la modificación de la concentración de triacilglicéridos, colesterol, ácido eicosapentaenóico (EPA) y docosahexaenóico (DHA) séricos.

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1. Animales**

Para este estudio se utilizaron inicialmente 10 perros de raza pequeña (altura a la cruz de no más de 30 cms), las razas de cada uno de los sujetos se muestran en el cuadro 2. Al momento del estudio los perros contaban con un peso promedio de  $6.7 \text{ kg} \pm 1.94$ .

Todos los perros utilizados en este estudio se encontraban clínicamente sanos, con su calendario de medicina preventiva al día, y constantes fisiológicas dentro de rangos normales. Se les realizó una bioquímica sanguínea al inicio del periodo experimental para corroborar el estado de salud, la cual se ilustra en el cuadro 4.

La actividad de dichos animales fue considerada media (debido a que todos ellos tenían acceso a un lugar de esparcimiento y se les peseaba diariamente).

El perro con la identificación "J" tuvo que salir del estudio ya que en el segundo muestreo presentó problemas de salud debido a la complementación con los ácidos grasos omega-3 en su dieta, en lo posterior se presentará la bioquímica sanguínea que corrobora tal condición y se explicara en lo sucesivo.

### **5.2. Condición corporal.**

Todos los animales de este estudio contaban con una condición corporal de 3/5 o 3.5/5 según la escala de cinco puntos lo que significa que tienen una condición corporal ideal de conformidad a lo establecido por Croxton y Stollard (1976).

### **5.3. Sexo**

Los sujetos de experimentación fueron 5 hembras y 5 machos

#### **5.4 Edad**

Los perros tuvieron un intervalo de edad de 1 a 5 años de edad con un promedio de  $4.5 \pm 1.64$  años.

#### **5.5. Criterios de inclusión**

Perros adultos de 1 a 5 años, raza pequeña, color inespecífico, etapa fisiológica de mantenimiento, condición corporal 3-3.5/5, aparentemente sanos.

#### **5.6. Criterios de exclusión**

Perros de 2 meses hasta 1 año y de 6 o más años, perros con obesidad o con algún tipo de patología metabólica, bacteriana, viral, traumática.

#### **5.7. Alimentación**

A todos los animales se les proporcionó la misma dieta durante 8 semanas (60 días) que consistió en alimento superpremium de la marca Royal Canin® para adulto de razas pequeñas. Previo al periodo experimental se dio un periodo de adaptación a la dieta durante 2 semanas. La cantidad proporcionada fue de acuerdo a su requerimiento energético en mantenimiento por peso al día, en un régimen racionado, en un solo periodo de alimentación, calculada de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Necesidad energética (EM/día)} = K \times PV_{\text{kg}}^{0.67}$$

Donde K es el nivel de actividad y corresponde a:

99 inactivos

132 activos

160 muy activos

PV es el peso vivo en kg



La elección del alimento mencionado fue debido a que por ser un alimento superpremium no existe variación de su fórmula ni de ingredientes en su elaboración, además que se cuidó que todo perteneciera al mismo lote.

El fabricante presenta en el empaque la etiqueta del análisis garantizado, mostrado en el cuadro 1 siguiente:

|                                    |                             |
|------------------------------------|-----------------------------|
| <b>Proteínas:</b>                  | 25%                         |
| <b>Materias grasas</b>             | 16%                         |
| <b>Carbohidratos:</b>              | 37%                         |
| <b>Fibra dietética:</b>            | 6.7%                        |
| <b>Fibra cruda</b>                 | 1.5%                        |
| <b>Energía Metabolizable (C)*</b>  | 4,128 Kcal/kg <sup>-1</sup> |
| <b>Energía Metabolizable (M)**</b> | 3,960 Kcal/kg <sup>-1</sup> |
| <b>EPA+DHA</b>                     | 0.3%                        |
| <b>Omega 6:</b>                    | 3.2%                        |
| <b>Omega 3:</b>                    | 0.65%                       |
| <b>Calcio:</b>                     | 0.9%                        |
| <b>Fósforo:</b>                    | 0.7%                        |
| <b>Zinc:</b>                       | 245 mg/kg                   |

\*Según ecuación ATWATER  
 \*\*Energía medida en el Centro de Investigación Royal Canin

Se realizó un análisis químico proximal (AQP) para verificar la veracidad de los datos proporcionados en la etiqueta del fabricante, los cuales corresponden a los reportados en dicho análisis.

En este estudio se administró a los sujetos en fase experimental una cantidad adecuada de alimento de acuerdo a su actividad y densidad calórica del alimento proporcionado.

Una vez obtenidos los datos de cantidad de alimento que debía ser administrado se condensaron en el siguiente cuadro:

**Cuadro 3. Cuadro de requerimiento energético y consumo de alimento superpremium diario y durante el periodo experimental**

| Identificación | Raza                | Sexo | Edad (años) | Peso vivo (kg) | Requerimiento calórico (Kcal/día <sup>-1</sup> ) | Consumo (g/día) | Consumo 60 días (Kg) |
|----------------|---------------------|------|-------------|----------------|--|-----------------|----------------------|
| A              | Cocker Spaniel      | H    | 5           | 7              | 568.06   | 143.45          | 8.61                 |
| B              | Dachshund           | M    | 1.5         | 9              | 685.89   | 173.21          | 10.398               |
| C              | Schnawzer miniatura | M    | 3           | 8.5            | 657.11   | 165.94          | 9.96                 |
| D              | Beagle              | H    | 5           | 7              | 568.06   | 143.45          | 8.61                 |
| E              | Schnawzer miniatura | H    | 5           | 8              | 627.90   | 158.56          | 9.516                |
| F              | Schnawzer miniatura | M    | 5           | 7              | 568.06   | 143.45          | 8.61                 |
| G              | Poodle              | H    | 5           | 4              | 373.35   | 94.28           | 5.658                |
| H              | Chihuahueño         | H    | 3.6         | 3.2            | 315.82   | 79.75           | 4.788                |
| I              | Cocker Sp           | M    | 4           | 7              | 568.06   | 143.45          | 8.61                 |
| J              | Cocker Sp           | M    | 5           | 9              | 685.89   | 173.21          | 10.398               |

## 5.8. Ubicación

Los perros sujetos del estudio fueron residentes de la Ciudad de México, alojamientos tipo jaula, con piso de concreto. Estos alojamientos contaban con un área para protección de la intemperie.

## 5.9. Fuente complementaria de ácidos grasos omega-3

Se administró diariamente, durante ocho semanas, un complemento alimenticio para consumo humano que consistió de una cápsula de gelatina blanda en color ámbar de DHA30® del laboratorio OmegaMex®, cada cápsula contenía 500 mg de aceite de ojo de atún cuyo contenido de DHA fue de 150 mg y de EPA fue 35 mg. El uso de una sola cápsula está condicionado a que esta no puede ser dividida para una administración individual por kilogramo de peso vivo.

### **5.10. Metodología de muestreo**

De cada perro se obtuvo una muestra sanguínea, en ayuno de 8 horas, los días cero, 15, 30, 45 y 60 del estudio, de la siguiente manera:

Se sujetó al perro de manera gentil y se localizó la región del antebrazo, donde está alojada la vena cefálica; se hizo antisepsia con una solución de yodo-alcohol para intentar eliminar la mayor cantidad de microorganismos de esa porción de la piel. Por medio de una liga se rodeó la región del codo del miembro torácico ejerciendo una ligera presión con el fin de localizar la vena cefálica la cual al ser obliterada se hace evidente por debajo de la dermis de la región del antebrazo; localizada la vena se procedió a hacer la punción de la misma con una aguja hipodérmica que se colocó en un dispositivo adaptador tipo barril con tubos al vacío sin anticoagulante. Obteniendo las primeras gotas de sangre se retiró la presión de la liga ejercida en el miembro lo que provocó un influente mayor que llena el tubo rápidamente; una vez que el tubo estuvo lleno, se retiró del adaptador y se hizo ligera presión sobre el lugar de la punción con un algodón húmedo en alcohol, se retiró la aguja, manteniendo por 15 segundos la presión para hacer hemostasis física.

La muestra se transportó a temperatura de refrigeración (4°C), se llevó al laboratorio y se centrifugó a 2500 rpm durante 5 minutos para la obtención del suero sanguíneo, el cual se almacenó en tubos Eppendorf de 3 ml hasta el procesamiento de la muestra.

### **5.11. Medición de triacilglicéridos, colesterol y bioquímicas sanguíneas completas.**

Se realizaron bioquímicas completas para los muestreos de los días cero y 60 del periodo experimental, además de la medición de triacilglicéridos y colesterol para los días cero, 15, 30, 45 y 60 del periodo experimental.

La medición de estos analitos se realizó por el método de bioquímica seca con la ayuda de un analizador automatizado de la marca “VetTest” modelo 8008 de IDEXX Laboratories utilizando las tarjetas del mismo fabricante de los analitos:

- Albúmina sérica
- Fosfatasa Alcalina
- Alanin amino transferasa (ALT)
- Amilasa
- Calcio
- Creatinina
- Glucosa
- Fósforo
- Bilirrubina total
- Proteínas totales (TP)
- Nitrógeno ureico sanguíneo (BUN)
- Globulina
- Triacilglicéridos
- Colesterol

Se utilizó una pipeta Pasteur plástica, un pozo recolector de muestra y una punta de pipeta automatizada, por muestra. Cabe destacar que el resultado de las determinaciones es arrojado en un ticket mostrando los valores obtenidos a partir de la muestra así como los valores de referencia. El analizador automatizado está dotado de un programa de computadora cuya interfaz permite al usuario, mediante un teclado numérico, seleccionar entre las diferentes opciones de especie, edad, tipo de muestra, etc.; cada una de las opciones está representada por un número, el análisis de una bioquímica completa tiene efecto en 7 minutos y un análisis individual en 3 minutos.

#### **5.12. Materiales para la preparación de la muestra para la medición de ácidos grasos por cromatografía de gases**

Para la extracción, purificación y transesterificación de los ácidos grasos presentes en las muestras se utilizaron los siguientes materiales.

- 1 litro de cloroformo ( $\text{CHCl}_3$ ) grado cromatográfico
- 1 litro de metanol ( $\text{MeOH}$ ) grado cromatográfico
- 1 litro de hexano grado cromatográfico
- Tubos de vidrio con capacidad de 5 ml
- 1 litro de agua demineralizada y bidestilada
- 100 viales de reacción (aproximadamente 2 por muestra)
- Pipetas Pasteur de vidrio
- Micropipetas de diferentes volúmenes
- Puntas desechables

- Micropipeta para solventes
- 250 ml de Trifluoruro de boro (BF<sub>3</sub>) de alta pureza
- Gradillas
- Vaso de precipitado con capacidad de 1 litro
- Platina
- Soporte universal
- Ligas
- Agitador vortex

### **5.13. Preparación de la muestra**

De acuerdo con la técnica establecida por Bligh & Dyer (1959) y la técnica de Morrison & Smith (1964) las cuales son una modificación de la técnica de Folch (1921) debido a que son muestras con un porcentaje de humedad mayor al 80% tales pueden ser músculo, cerebro, plasma sanguíneo, suero sanguíneo, etc., se procesaron las muestras como se describe a continuación:

- Se realizó una mezcla de cloroformo:metanol en una proporción de 2:1 en un volumen suficiente para todas las muestras
- En un tubo de vidrio y se vertieron 750 µl de la mezcla CHCl<sub>3</sub>:MeOH
- Se adicionaron 200 µl de la muestra.
- Se colocó en el agitador vortex durante 3 minutos cada muestra
- Se adicionaron 500 µl de CHCl<sub>3</sub> y 200 µl de agua demineralizada, para dar un volumen total de 1,650 µl.
- Se centrifugaron las muestras a 2500 RPM durante 5 minutos a 4 °C
- Se obtuvo la fase acuosa y la fase semi-sólida del sobrenadante

- Se transfirió a un vial de reacción limpio la fase clorofórmica que se encuentra en el fondo del tubo con la ayuda de una pipeta Pasteur
  - En caso de contaminación de la muestra se adicionan 500  $\mu\text{l}$  de  $\text{CHCl}_3$  y se vuelve a centrifugar hasta que la fase líquida quede clara.
- Se realizó el secado de la muestra en atmósfera de gas nitrógeno (grado cromatográfico)

#### **5.14. Trans-esterificación**

- Se adicionó a la muestra desecada 1 ml de  $\text{BF}_3$
- Previamente se tuvo un vaso de precipitado con capacidad de 1 L con agua en ebullición en la platina
- Se sujetaron los viales tapados herméticamente con una liga a una pipeta volumétrica y con la ayuda del soporte universal se sumergieron en el agua en ebullición y se mantuvieron durante 30 minutos
  - Se verificó que el nivel de los viales estuviese siempre por debajo del nivel del agua en ebullición
- Pasados 30 minutos se sacaron los viales y se dejaron enfriar a temperatura ambiente
- Una vez fríos, se destaparon y se les adicionaron 2 ml de hexano grado cromatográfico y 1 ml de agua demineralizada y bidestilada
- Se taparon los viales de reacción y se agitaron vigorosamente durante 15 segundos
- Una vez separadas las fases se extrajo y se transfirió a otro vial la fase superior donde se encontraron los metil ésteres en el hexano

- Una vez obtenida la muestra se llevó a sequedad en una atmósfera de gas nitrógeno y se almacenaron tapados y en refrigeración hasta su lectura en el cromatógrafo de gases.

Una vez que se obtuvieron los lípidos se midieron concentraciones de ácido docosahexaenoico (DHA 22:6) y ácido eicosapentaenoico (EPA 20:5).

### **5.15. Análisis de los ácidos grasos por cromatografía de gases**

Se montó en el laboratorio de Toxicología del Departamento de Nutrición Animal y Bioquímica de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia la técnica para la extracción de ácidos grasos e identificación de estos mediante análisis por Cromatografía de Gas-Líquido.

Los reactivos y solventes utilizados para este análisis de calidad cromatográfica. Se resuspendieron los metil ésteres de ácidos grasos en un volumen conocido de hexano (20 a 40µl de hexano HPLC) y se inyectó 1 µl en el cromatógrafo de gases. Se utilizó un cromatógrafo de gases Clarus 500 de Perkin Elmer controlado por computadora, equipado con detector de ionización de flama (FID) y una columna capilar omegawax de supelco de 30 m de largo, 0.25 mm de diámetro interno y grosor de 0.25 mm. La flama se mantuvo con hidrógeno y aire, y como gas de arrastre se utilizó nitrógeno de alta pureza. Se realizó el análisis de los ácidos grasos con un programa de temperatura cuyas condiciones de trabajo son las siguientes: inicio a 180°C por 5 min, con un aumento de 5°C/min<sup>-1</sup> hasta alcanzar 220°C que se mantuvieron durante 18 minutos, con un tiempo total de trabajo de 35 min. El flujo de nitrógeno para la columna es de 14 ml/min<sup>-1</sup>. Cada ácido graso es reconocido durante la corrida cromatográfica por la identificación



de los tiempos de retención de los metil ésteres estándares. Se integró el área de cada uno de los picos detectados para obtener las proporciones porcentuales.

Se prepararon los estándares en una dilución 20:1 40:1 de EPA y DHA, respectivamente, con hexano para la identificación de los tiempos de retención de estos compuestos en la corrida cromatográfica.

### **5.16. Análisis estadístico**

Se realizó el cálculo para la estimación de la población para este estudio con una prueba de potencia o también llamada de Tang tomando en cuenta un estudio similar. La prueba de potencia estima la probabilidad de que no ocurra el error tipo II o  $\beta-1$ .<sup>111</sup>.

Se realizó la prueba de Shapiro-Wilk para verificar la normalidad de los datos y la prueba de Levene para homogeneidad de varianzas para los análisis de las muestras sanguíneas de triacilglicéridos y colesterol <sup>111</sup>.

Se realizó la prueba de homogeneidad de varianzas también conocida como prueba de homocedasticidad o la Prueba de Levene; donde se plantearon las siguientes hipótesis para los analitos en cuestión:

$$H_0: \sigma^2 = \sigma^2$$

$$H_a: \sigma^2 \neq \sigma^2$$

Se realizó un análisis multivariado de observaciones repetidas en el tiempo para evaluar el efecto que tiene el sexo de los animales en las concentraciones de triacilglicéridos y colesterol con respecto a la complementación con ácidos grasos

omega-3 y los cambios de estas variables respuesta a través del tiempo. Esto se realizó con el programa SPSS Versión 17 <sup>111</sup>.

Se realizó un análisis univariado de las concentraciones de triacilglicéridos y colesterol séricos para la estimación de diferencias entre los días cero, 15, 30, 45 y 60, con respecto al sexo de los animales, con un nivel de significancia  $P < 0.05$  <sup>111</sup>.

## 6. Resultados

### Bioquímicas sanguíneas completas

Una vez realizada la toma de muestras se hicieron los estudios de bioquímica sanguínea en los días cero y 60 del periodo experimental, para buscar anomalías en los analitos correspondientes a la función hepática y renal, así como cualquier otra alteración relacionada con la complementación dada en este estudio.

**Cuadro 4. Bioquímica sanguínea completa día 0**

| Analito                   | A         | B         | C         | D         | E          | F         | G         | H          | I    | Ref                         |
|---------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|-----------|-----------|------------|------|-----------------------------|
| <b>Albumina</b>           | 2.4       | 3.5       | 3.3       | 2.9       | 0          | 3.2       | 3.5       | 0          | 3.5  | 2.4-4 g/dL <sup>-1</sup>    |
| <b>Fosfatasa Alcalina</b> | 30        | 66        | 44        | 35        | 10         | 10        | 59        | 60         | 10   | 23-212 U/L <sup>-1</sup>    |
| <b>ALT</b>                | 31        | 39        | 33        | 64        | 35         | 34        | 64        | <b>15</b>  | 50   | 10-100 U/L <sup>-1</sup>    |
|                           |           |           |           |           |            |           |           | <b>6</b>   |      |                             |
| <b>Amilasa</b>            | 66        | 613       | 680       | 59        | 11         | 85        | <b>46</b> | 36         | 122  | 500/1500                    |
|                           | 0         |           |           | 6         | 5          | 4         | <b>5</b>  | 5          | 7    | U/L <sup>-1</sup>           |
| <b>Ca</b>                 | 9.7       | 10.7      | 10.5      | 11        | <b>2.4</b> | 9.3       | 8.4       | 9.5        | 10.8 | 7.9-12 mg/dL <sup>-1</sup>  |
| <b>Creatinina</b>         | 0.9       | 1.1       | 1.1       | 1.2       | 0.3        | 0.9       | 1.1       | 1.4        | 0.9  | 0.5-1.8 mg/dL <sup>-1</sup> |
| <b>Glucosa</b>            | <b>33</b> | <b>52</b> | <b>67</b> | <b>67</b> | <b>20</b>  | <b>47</b> | <b>61</b> | 13         | 101  | 74-143 mg/dL <sup>-1</sup>  |
|                           |           |           |           |           |            |           |           | <b>3</b>   |      |                             |
| <b>Fosforo</b>            | 4.6       | 4.1       | 6.3       | 5         | <b>1.8</b> | 5         | 4.6       | <b>7.3</b> | 4.6  | 2.5-6.8 mg/dL <sup>-1</sup> |
| <b>Bilirrubina total</b>  | 0.4       | 0.6       | 0.7       | 0.4       | 0.1        | 0.9       | 0.3       | 0.6        | 0.4  | 0-0.9 mg/dL <sup>-1</sup>   |
| <b>Proteínas totales</b>  | 5.9       | 6.5       | 6.6       | 6.3       | <b>1.6</b> | 7         | 7.5       | 5.8        | 7.1  | 5.2-8.2 g/dL <sup>-1</sup>  |
| <b>BUN</b>                | <b>32</b> | 14        | 12        | 16        | <b>4</b>   | <b>38</b> | 20        | 16         | 15   | 7-27 mg/dL <sup>-1</sup>    |
| <b>Globulina</b>          | 3.2       | 3         | 3.3       | 3.3       | 1.5        | 3.8       | 4         | 5.8        | 3.5  | 2.5-4.5 g/dL <sup>-1</sup>  |

**Cuadro 5. Bioquímica sanguínea completa día 60**

| Analito                   | A         | B          | C          | D          | E          | F         | G         | H   | I        | Ref                      |
|---------------------------|-----------|------------|------------|------------|------------|-----------|-----------|-----|----------|--------------------------|
| <b>Albumina</b>           | 3.2       | <b>4.5</b> | <b>5</b>   | 2.8        | <b>4</b>   | <b>6</b>  | 3.9       | 3.7 | <b>6</b> | 2.4-4 g/dL <sup>-1</sup> |
| <b>Fosfatasa Alcalina</b> | <b>17</b> | 35         | 50         | 60         | 60         | <b>10</b> | 58        | 33  | **       | 23-212 U/L <sup>-1</sup> |
| <b>ALT</b>                | 13        | 45         | <b>121</b> | <b>119</b> | <b>139</b> | 22        | <b>18</b> | 68  | <        | 10-100 U/L <sup>-1</sup> |
|                           |           |            |            |            |            |           | <b>2</b>  |     | 10       |                          |

|                          |            |            |            |             |            |            |            |            |            |                            |
|--------------------------|------------|------------|------------|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|----------------------------|
| <b>Amilasa</b>           | 75         | 65         | 611        | 107         | 461        | 993        | 68         | 46         | 778        | 500/1500                   |
|                          | 0          | 5          |            | 1           |            |            | 9          | 2          |            | U/L <sup>-1</sup>          |
| <b>Ca</b>                | 7.9        | 8          | 8          | 11.7        | <b>6.7</b> | <b>7.6</b> | <b>6.9</b> | <b>6.5</b> | 6          | 7.9-12                     |
|                          |            |            |            |             |            |            |            |            |            | mg/dL <sup>-1</sup>        |
| <b>Creatinina</b>        | 0.8        | 0.8        | 1.2        | 1.3         | 1.1        | 0.9        | 1.6        | 0.9        | 0.7        | 0.5-1.8                    |
|                          |            |            |            |             |            |            |            |            |            | mg/dL <sup>-1</sup>        |
| <b>Glucosa</b>           | 89         | <b>25</b>  | <b>66</b>  | 130         | 82         | <b>47</b>  | <b>24</b>  | <b>45</b>  | 85         | 74-143                     |
|                          |            |            |            |             |            |            |            |            |            | mg/dL <sup>-1</sup>        |
| <b>Fosforo</b>           | 4.8        | <b>7.7</b> | <b>14.</b> | <b>17.3</b> | <b>13.</b> | <b>13.</b> | 5.9        | 5.7        | <b>9.9</b> | 2.5-6.8                    |
|                          |            |            | <b>1</b>   |             | <b>9</b>   | <b>6</b>   |            |            |            | mg/dL <sup>-1</sup>        |
| <b>Bilirrubina total</b> | <b>2.1</b> | <b>1.4</b> | <b>0.9</b> | <b>6.2</b>  | <b>1.4</b> | <b>6.4</b> | <b>1.1</b> | <b>1</b>   | <b>11.</b> | 0-0.9 mg/dL <sup>-1</sup>  |
|                          |            |            |            |             |            |            |            |            | <b>4</b>   |                            |
| <b>Proteínas totales</b> | 6.7        | 15         | 7.6        | <b>13.7</b> | 5          | <b>9.7</b> | <b>8.4</b> | 7          | >          | 5.2-8.2 g/dL <sup>-1</sup> |
|                          |            |            |            |             |            |            |            |            | <b>12</b>  |                            |
| <b>BUN</b>               | 21         | 7.7        | 15         | 25          | 16         | <b>33</b>  | 20         | 23         | 16         | 7-27 mg/dL <sup>-1</sup>   |
| <b>Globulina</b>         | 3.5        | 3.2        | <b>6.7</b> | <b>10.8</b> | <b>5</b>   | <b>6</b>   | 4.5        | 3.4        |            | 2.5-4.5 g/dL <sup>-1</sup> |

Se obtuvo el suero de las muestras y se realizó una bioquímica sanguínea para todas las muestras de los días cero y 60 del periodo de experimentación. Los resultados completos de los análisis se encuentran en los cuadros 4 y 5 anteriores, respectivamente.

Se puede observar que en la bioquímica sanguínea del día cero del periodo experimental, no existen alteraciones de importancia clínica a excepción de una marcada hipoglucemia en los resultados de todos los individuos.

En la bioquímica sanguínea del día 60 del periodo experimental se observan alteraciones marcadas en varios analitos de las muestras analizadas.

La primera alteración encontrada fue la concentración sérica de fosfatasa alcalina del individuo "F" la cual se encuentra disminuida con respecto al intervalo de referencia (23-212 U/L<sup>-1</sup>) con un valor de 10 U/L<sup>-1</sup>.

Se puede observar que las concentraciones séricas de la enzima alanin-amino transferasa (ALT) se encuentran por encima de los valores del intervalo de

referencia (10-100 U/L<sup>-1</sup>) en los individuos “c”, “d”, “e” y “g” con 121, 119, 139 y 185 U/L<sup>-1</sup> respectivamente.

Las concentraciones de calcio sérico también se ven afectadas en este análisis en los individuos identificados “e”, “f”, “g”, “h” e “i” estando por debajo de los valores del intervalo de referencia 7.9–12 mg/dl<sup>-1</sup>, cuyos valores son 6.7, 7.6, 6.9, 6.5 Y 6 mg/dl.

Referente a las concentraciones de glucosa sérica también existen alteraciones en los individuos identificados “a”, “b”, “f”, “g” y “h” cuyos valores son 25, 66, 130, 47, 24 y 45 respectivamente, estando por debajo de los valores del intervalo de referencia (74-143 mg/dl<sup>-1</sup>).

Otro analito en el que se puede observar alteración es en el fósforo sérico en los individuos identificados con las letras “a”, “b”, “d”, “e”, “f” e “i”, cuyos valores son 7.7, 14.1, 17.3, 13.9, 13.6, y 9.9, respectivamente estando por encima del valor superior del intervalo de referencia (6.8 mg/dl<sup>-1</sup>).

Otro de los analitos que se alteró de manera importante son las bilirrubinas totales esta vez en todos los animales del estudio estando por encima de los valores del intervalo de referencia (0-0.9 mg/dl<sup>-1</sup>), excepto el individuo identificado con la letra “c” que está en el valor superior, pero aun dentro del rango de referencia.

Las proteínas totales de los individuos identificados con las letras “d”, “f”, “g” e “i” tuvieron valores por encima del intervalo de referencia (5.2–8.2 g/dl<sup>-1</sup>), con 13.7, 9.7, 8.4, y > 12, respectivamente

Todos los individuos analizados tuvieron una concentración de nitrógeno urémico sanguíneo (BUN, por sus siglas en ingles) a excepción del individuo identificado

con la letra “f” el cual está por encima del valor máximo de referencia (7-27 mg/dl<sup>-1</sup>) con 33 mg/dl<sup>-1</sup>.

La globulina también estuvo alterada en la bioquímica sanguínea del día 60 del periodo experimental únicamente en los individuos “h”, “d”, “e” y “f” con 6.7, 10.8, 5, 6 g/dl<sup>-1</sup> que están por encima del valor de referencia que es de 2.5-4.5 g/dl<sup>-1</sup>.

Al realizar las venopunciones, se pudo observar, de manera empírica, que la capacidad de coagulación los animales se vio disminuida a partir del día 30 del periodo experimental, ya que al realizar la hemostasia por compresión en el punto de la punción tardó más tiempo el sangrado conforme se aumentaban los días de la complementación dietaria con los ácidos grasos omega 3.

### **Triacilglicéridos y Colesterol**

Realizados los análisis correspondientes para la obtención de los datos, se muestran las concentraciones promedio de triacilglicéridos séricos en los días cero, 15, 30, 45 y 60 por sexo de cada analito.

En la figura 2 se pueden observar las concentraciones promedio de triacilglicéridos en los individuos hembras del estudio durante el periodo experimental, donde se observa que al día cero y 15 comienzan con una concentración sérica muy similar (115 y 111 mg/dl<sup>-1</sup>) por encima del punto superior del intervalo (100 mg/dl<sup>-1</sup>), en el día 30 tienen un descenso hasta los 60 mg/dl<sup>-1</sup>, dentro del intervalo de referencia, para posteriormente aumentar gradualmente a 81 y 125 mg/dl<sup>-1</sup> en los días 45 y 60 respectivamente.

En la figura 3 se observan del día cero al día 60 del periodo experimental las concentraciones séricas promedio de triacilglicéridos en los individuos machos de este las cuales tienden a incrementar del día cero al día 60 (66.5 y 103 mg/dl<sup>-1</sup>), pero con fluctuaciones el día 15 con 59.5 mg/dl<sup>-1</sup>, el día 30 con 87.75 mg/dl<sup>-1</sup> y el día 45 con 59.75 mg/dl<sup>-1</sup>

Se realizaron los análisis correspondientes para la obtención de los datos sobre las concentraciones de colesterol sérico en los días cero, 15, 30, 45 y 60 se presentan las gráficas de las concentraciones promedio por sexo.

La figura 4 muestra la concentración promedio de colesterol sérico durante el periodo experimental de los individuos hembras de este estudio. En la figura se puede observar que las concentraciones promedio de colesterol sérico, durante todo el periodo experimental, estuvieron dentro del intervalo de referencia (110 a 320 mg/dl<sup>-1</sup>) el día cero la concentración sérica promedio es de 173 mg/dl<sup>-1</sup>, esta sufre una disminución para el día 15 donde se encontró en 142 mg/dl<sup>-1</sup>, posteriormente tendió al aumento en los días 30 y 45 del periodo experimental con 150 y 176 mg/dl<sup>-1</sup>, respectivamente. En el día 60 se observó la concentración de colesterol sérico más baja del periodo experimental con 122 mg/dl<sup>-1</sup>.

Se muestra en la figura 5 las concentraciones séricas promedio de colesterol en los individuos machos de este estudio, las cuales se encuentran dentro del intervalo de referencia (110-320 mg/dl<sup>-1</sup>). Se puede observar que el día cero del periodo experimental la concentración sérica promedio fue de 170.75 mg/dl<sup>-1</sup>,

posteriormente incrementa a 212.5 mg/dl<sup>-1</sup>, para después disminuir a 155.5 mg/dl<sup>-1</sup>; a partir de este momento, comienza una tendencia al aumento en las concentración sérica promedio en los días 45 y 60 del periodo experimental con 169.5 y 211.75 mg/dl<sup>-1</sup>, respectivamente.

### **Ácidos grasos omega-3**

Se realizó una curva estándar para evaluar la respuesta cromatográfica de los estándares. A concentraciones de 25, 50 y 100 µl de EPA/ml de hexano con un coeficiente de correlación de 98% y 50, 100 y 200 µl de DHA/ml de hexano con un coeficiente de correlación de 92%. En la figura 6 del anexo se muestran los picos cromatográficos resultantes de la corrida de los estándares de estos compuestos.

Los tiempos de retención para cada uno de los compuestos fueron:

EPA: 20 minutos 33 segundos y DHA: 31 minutos 51 segundos

Una vez establecidos los tiempos de retención se inyectaron las muestras del día cero y el día 60 del periodo experimental y se obtuvieron los cromatogramas de dichas muestras. Se analizó cada cromatograma de cada muestra en la búsqueda de los compuestos en cuestión sin encontrar ninguno de los analitos problema. En la figura 7, que se muestra en el anexo, se observa un cromatograma en el cual no existe evidencia de la presencia de los compuestos de interés en las muestras.

Sin embargo, durante la corrida cromatográfica, se pudieron identificar algunos otros compuestos de naturaleza lipídica saturados y poliinsaturados de importancia, que se identificaron por su tiempo de retención de conformidad a lo establecido en la literatura. La relación de los compuestos encontrados así como su concentración (%mol) se muestra en los cuadros 6 y 7 a continuación.





**Cuadro 6. Composición de ácidos grasos (%/mol) de suero sanguíneo de los individuos en el día cero del periodo experimental**

| Individuos | Acido Laurico | Acido Mirístico | Acido Palmítico | Acido Palmítico | Acido Oleico | Acido Linoleico | Acido Gamalinoleico | Acido Linoleico | Acido Araquidónico | % de Compuestos no identificados |
|------------|---------------|-----------------|-----------------|-----------------|--------------|-----------------|---------------------|-----------------|--------------------|----------------------------------|
| A          | 4.21          | 7.68            | 17.99           | 12.1            |              |                 | 5.52                |                 | 2.42               | 49.99                            |
| B          | 10.21         | 3.62            |                 | 18.3            |              |                 | 1.57                |                 | 17.51              | 48.78                            |
| C          | 2.50          | 16.43           | 17.90           | 13.2            |              | 0.98            |                     |                 |                    | 41.52                            |
| D          |               | 4.91            | 4.60            | 8.33            | 4.03         | 1.79            |                     |                 |                    | 73.46                            |
| E          | 5.19          | 14.33           | 1.35            | 14.8            |              |                 |                     |                 |                    | 64.32                            |
| F          | 2.01          | 1.68            | 1.10            | 17.8            |              |                 | 3.01                | 0.06            |                    | 74.39                            |
| G          |               |                 | 0.20            | 2.48            |              |                 |                     |                 |                    | 97.25                            |
| H          |               | 0.89            |                 | 15.2            |              |                 | 1.77                | 1.04            |                    | 81.09                            |
| I          | 3.099         | 1.277           |                 | 19.5            |              |                 |                     |                 |                    | 76.12                            |



**Cuadro 7. Composición de ácidos grasos (%/mol) de suero sanguíneo de los individuos en el día 60 del periodo experimental**

| Individuos | Acido Laurico | Acido Mirístico | Acido Palmítico | Acido Palmitoleico | Acido Estéarico | Acido Gamalinoleico | Acido Linolenico | Acido Araquidonic | % de Compuestos no identificados |
|------------|---------------|-----------------|-----------------|--------------------|-----------------|---------------------|------------------|-------------------|----------------------------------|
| <b>A</b>   | 2.10          | 1.07            | 17.11           | 18.34              |                 |                     |                  |                   | 61.37                            |
| <b>B</b>   | 0.85          | 0.63            | 13.41           | 10.27              |                 | 0.89                | 1.33             |                   | 71.99                            |
| <b>C</b>   | 1.06          | 16.82           |                 | 18.28              |                 |                     |                  | 1.19              | 62.64                            |
| <b>D</b>   | 1.25          | 0.74            | 17.75           | 23.07              | 1.68            |                     |                  |                   | 55.51                            |
| <b>E</b>   | 1.78          |                 |                 |                    |                 |                     | 0.60             |                   | 97.62                            |
| <b>F</b>   | 0.65          | 0.36            |                 | 40.06              |                 |                     | 0.66             | 0.75              | 57.52                            |
| <b>G</b>   | 2.09          | 0.19            | 0.45            | 19.53              |                 |                     |                  |                   | 77.74                            |
| <b>H</b>   |               | 16.46           |                 | 18.30              | 1.27            |                     |                  |                   | 63.97                            |
| <b>I</b>   | 2.98          | 2.08            |                 | 29.78              |                 |                     |                  |                   | 65.16                            |

## Análisis Estadístico

En el cuadro 8 se muestra una tabla donde, de acuerdo al cálculo, se observa el número de individuos y la potencia de cada valor de población.

**Cuadro 8. Número de individuos estimados en este estudio y su potencia de prueba**

| Número de individuos | Potencia |
|----------------------|----------|
| 4                    | 0.94     |
| 5                    | 0.98     |
| 6                    | 0.99     |
| 7                    | 0.99     |
| 8                    | 0.99     |
| 9                    | 0.99     |
| 10                   | 0.99     |

Para este estudio el número de individuos de estudio mínimo para obtener una potencia alta es  $n = 6$  donde la potencia es de 0.99. Este estudio contó con 9 individuos con un 0.99 de probabilidad que no ocurra el error tipo II o  $\beta-1$ .

Se realizó la prueba de normalidad de datos para los resultados obtenidos de triacilglicéridos y colesterol con respecto al sexo de los sujetos de experimentación. Se plantearon las siguientes hipótesis:

$H_a = x$  no tiene una distribución Normal

$H_o = x$  tiene una distribución Normal

Donde todos los valores fueron menores a una  $P > 0.05$  por tanto se consideran normales, se ilustran estos datos en las figuras 8 y 9 en el anexo para los individuos hembras (0) y machos (1), respectivamente.

Las varianzas para las concentraciones séricas de triacilglicéridos tuvieron el valor de P de 0.115 que es  $> 0.05$  por tanto no se rechaza la hipótesis nula por tanto existe igualdad en las varianzas.

Las varianzas para los datos correspondientes a la concentración de colesterol sérico tuvieron valores de P de 0.146 que es  $> 0.05$  por tanto no se rechaza la hipótesis nula por tanto existe igualdad en las varianzas.

No existió diferencia estadísticamente significativa en las concentraciones de triacilglicéridos entre hembras y machos cuyos valores de P son  $0.000 < 0.05$ , por lo que no se rechaza la hipótesis nula.

No existió diferencia estadísticamente significativa en las concentraciones de colesterol entre hembras y machos cuyos valores de P son  $0.000 < 0.05$ , por lo que se no rechaza la hipótesis nula.

Se realizó un análisis de varianza univariado para la observación del sexo de los animales para los días cero , 15, 30, 45 y 60 con las concentraciones de triacilgliceridos y colesterol de cada uno de estos días del periodo experimental con un nivel de significancia  $P < 0.05$ ;

En el cuadro 9, en el anexo, se muestran las significancias obtenidas para cada uno de los analitos en los diferentes días del periodo experimental de acuerdo a cada sexo.

Para las concentraciones de triacilglicéridos en hembras no se rechaza la hipótesis nula por tanto no existen diferencias estadísticamente significativas en cada uno de los

muestreos del periodo experimental con una  $P < 0.05$ , como se muestra en el cuadro 9 en el anexo.

Para las concentraciones de triacilglicéridos en machos no se rechaza la hipótesis nula por tanto no existen diferencias estadísticamente significativas en cada uno de los muestreos del periodo experimental con una  $P < 0.05$ , excepto para los días 30 y 45 en los cuales existen diferencias estadísticamente significativas al tener una  $P > 0.05$ , como se muestra en el cuadro 10 en el anexo.

Para las concentraciones de colesterol en hembras no se rechaza la hipótesis nula por tanto no existen diferencias estadísticamente significativas en cada uno de los muestreos del periodo experimental con una  $P < 0.05$ , como se muestra el cuadro 11 en el anexo.

Para las concentraciones de colesterol en machos no se rechaza la hipótesis nula por tanto no existen diferencias estadísticamente significativas en cada uno de los muestreos del periodo experimental con una  $P < 0.05$ , como se muestra en el cuadro 12 en el anexo.

En el día 60 del periodo experimental se tomaron las muestras y se transportaron de manera cuidadosa, y en refrigeración para que no sufrieran deterioro. Se centrifugaron de manera normal y se obtuvo el suero de cada una de las muestras. Se observó hemólisis en cada una de ellas. Al realizar el análisis, se observó que las alteraciones detectadas en los analitos para cada muestra correspondían al artefacto hemólisis, que principalmente se caracteriza por un aumento considerable en la concentración de

bilirrubinas totales, un incremento importante en la concentración de fósforo sérico por encima del valor superior de referencia, mas no es de relevancia diagnóstica.



## 7. Discusión

En estas últimas décadas los propietarios de animales de compañía han adquirido una mayor conciencia sobre la importancia de la nutrición para la salud gracias al reconocimiento creciente de la asociación entre el alimento y algunos procesos patológicos como arteriopatía coronaria, hipertensión, obesidad, diabetes mellitus y cáncer. Es probable que el conocimiento creciente y las actitudes relacionadas con la salud y la nutrición también contribuyeran a la demanda de los propietarios de animales de compañía por lograr una nutrición óptima para estos.

La disciplina de la nutrición veterinaria y su relación con la práctica de la medicina veterinaria se han beneficiado con estos cambios. Algunos de estos cambios son con respecto a la cantidad y calidad de alimento administrado a los animales de compañía.

Se han revisado algunos aspectos de las vías y funciones de los ácidos grasos omega-3 y la interacción de estos con dos de las moléculas lipídicas más importantes en el metabolismo de los lípidos en el organismo: los triacilglicéridos y el colesterol sérico.

Estadísticamente hablando se observó que las concentraciones de triacilglicéridos no tuvieron diferencias tanto a través del tiempo con respecto al sexo de los animales, así como la concentración sérica por día del periodo experimental en los individuos hembras y machos de este estudio, sin embargo, se observa este mismo comportamiento en los días cero y 15 del periodo experimental, no así para los días 30 y 45 del periodo experimental, tal como se muestra en los cuadros 9 y 10. Se infiere que la diferencia en la media de las concentraciones séricas de triacilglicéridos en estos días del periodo experimental, tal como se muestra en la figura 2, están dadas por que

los individuos identificados con las letras “e” y “f” son schnawzer miniatura los cuales tienen variaciones importantes en las concentraciones triacilglicéridos séricos, esto puede deberse a la llamada “Hiperlipidemia del Schnawzer Miniatura” que se caracteriza por una concentración elevada de quilomicrones (hiperquilomicronemia) tal como es mencionado por Xenoulis (2011), Hand y colaboradores (2000) y Case y colaboradores (2001) . Estos quilomicrones se forman dentro de las células intestinales después de la ingesta de alimentos; estos quilomicrones difunden al torrente sanguíneo a través de la membrana basal del enterocito. En perros con este padecimiento genéticamente mantienen baja la actividad de la enzima LPL por lo que se mantienen los quilomicrones en el torrente circulatorio además de una falta de la apolipoproteína C-II en los quilomicrones que activa la LPL de los capilares sanguíneos, lo que permite la retención de los quilomicrones y las VLDL intermedias, que son resultantes del retorno al hígado de los remanentes de las VLDL que se generan después de la incorporación de los remanentes de quilomicrones de la circulación y los AGL y colesterol de origen hepático. Se ha reportado que muchos perros clínicamente normales de esta raza se han encontrado con una hiperlipidemia persistente en ayuno al examen clínico rutinario. No existe predilección por sexo y la afección se observa usualmente primero en Schnawzers que son mayores de los 4 años de edad. La hiperlipidemia está asociada con triacilglicéridos elevados típicamente caracterizada por exceso de quilomicrones. La concentración de colesterol sérico es casi normal o ligeramente elevada. Los análisis séricos realizados en este estudio confirman la signología de este “síndrome” en esta raza que en la última década se ha vuelto tan popular <sup>1-9</sup>.

Existe evidencia a favor y en contra de la hipótesis de la mejora del aclaramiento de los quilomicrones con complementación dietaria de DHA y EPA en humanos. Se sabe que el aceite de pescado reduce la concentración de triacilglicéridos en ayuno al inhibir la producción hepática de triacilglicéridos-VLDL. En estudios de cinética en humanos, el aceite de pescado disminuye la velocidad de producción de VLDL y reduce la producción de apo B-100 de las células HepG2. Puesto que estas disminuyen también la síntesis de triacilglicéridos y la secreción de células CaCo-2, esto no es razonable para hipotetizar que los ácidos grasos omega-3 reducen de manera importante la secreción de triacilglicéridos desde el intestino hacia la sangre. Sin embargo la principal ruta de síntesis de triacilglicéridos en células CaCo-2 hepáticas es la ruta del 3-glicerol-fosfato, no así la ruta del monoacilglicerol que predomina en los enterocitos en una etapa postrandial. El aceite de pescado no disminuye la absorción de triacilglicéridos o la secreción de quilomicrones en ratas o la secreción en conejos *ex vivo*. Sin embargo Willumsen y colaboradores (1993) establece que la complementación con DHA no tiene efectos sobre la concentración sérica de triacilglicéridos debido ya que no aumenta el aclaramiento de quilomicrones, no así en la administración de EPA en la dieta que si mostró un efecto hipotriacilgliceridemiante debido al aumento de la oxidación peroxisomal y mitocondrial de los ácidos grasos, esto se determina al medir los compuestos solubles en ácido con palmitoil-L-carnitina y sustratos de palmitoil-CoA <sup>49</sup>.

Por otro lado, Weintraub y colaboradores (1988) complementaron a seres humanos sanos con una sustitución isocalórica de ácidos grasos poliinsaturados omega 3 y omega 6 para realizar la medición de lipoproteínas en ayuno y postprandiales. Según

este estudio, ambos tipos de AGPI's disminuyeron las concentraciones séricas de colesterol, triacilglicéridos, concentraciones de colesterol el VLDL y LDL; adicionalmente, la dieta constituyente principalmente de AGPI omega 3 disminuyó significativamente las concentraciones séricas totales de colesterol y triacilglicéridos en comparación con la dieta constituyente de AGPI omega 6. Estudios previos, a este referido, se encontraron que la disminución de las concentraciones de colesterol HDL estaba relacionada al a sustitución de los ácidos grasos saturados (SFA, por sus siglas en inglés) por los AGPI omega 3. Esto puede ser explicado por lo establecido por Harris y colaboradores (1990), donde postulan que esto es debido a la disminución del tamaño de las partículas VLDL por la inhibición de la síntesis de triacilglicéridos VLDL. Willumsen y colaboradores (1993) mencionan que la adición de DHA a la dieta de ratas no tiene un efecto hipotriacilgliceridemiante, sin embargo no es así con la adición de EPA ya que demostraron que existe un aumento en la oxidación mitocondrial y peroxisomal de los ácidos grasos, así como el aumento de la enzima diacilglicerol aciltransferasa. <sup>20, 40, 54, 101, 106</sup>

Con respecto a las concentraciones séricas de EPA y DHA que fueron analizadas por cromatografía de gases y cuyo cromatograma de una muestra en el anexo, se observa que las concentraciones son indetectables para el equipo ya que la dosis diaria administrada a los perros fue insuficiente para que esta pudiese ser reflejada por la técnica cromatográfica, Hall y colaboradores (2006) en un estudio realizado con perros establecen que la dosis de DHA en la dieta requerida para alcanzar el máximo de concentración plasmática y detectable es de 175 mg/kg<sup>-1</sup> de peso vivo y 30 mg/kg<sup>-1</sup> de

peso vivo de EPA para alcanzar el mismo efecto, en este estudio se administró 150 mg/día<sup>-1</sup> de DHA y 35 mg/día<sup>-1</sup>. En concordancia a esta posología, las concentraciones, tanto de DHA y de EPA no fueron evidentes en los cromatogramas de las muestras, debido a que la cantidad proporcionada de estos ácidos grasos cumplen su actividad biológica incorporándose a membranas plasmáticas y/o la síntesis de eicosanoides <sup>1, 2, 5,</sup>

<sup>6</sup>.

## 8. Conclusiones

- La complementación dietaria con ácidos grasos omega-3 a dosis de 150 mg/día<sup>-1</sup> de DHA y de 35 mg/día<sup>-1</sup> EPA durante el periodo experimental (día 0 a 60) no disminuye la concentración sérica de los triacilglicéridos tanto en perros como en perras de este estudio.
- La complementación dietaria con ácidos grasos omega-3 a dosis de 150 mg/día<sup>-1</sup> de DHA y de 35 mg/día<sup>-1</sup> EPA durante el periodo experimental (día 0 a 60) no disminuye la concentración sérica de colesterol tanto en perros como en perras de este estudio.
- No es posible detectar los picos cromatográficos de ácido eicosapentaenoico (EPA 20:5) ni ácido docosahexaenoico DHA (22:6) con la dosis de 150 mg/día<sup>-1</sup> de DHA y de 35 mg/día<sup>-1</sup> EPA dietaria administrada a los perros de este estudio

## 9. ANEXO 1

Figura 6. Cromatograma de los estándares de EPA y DHA

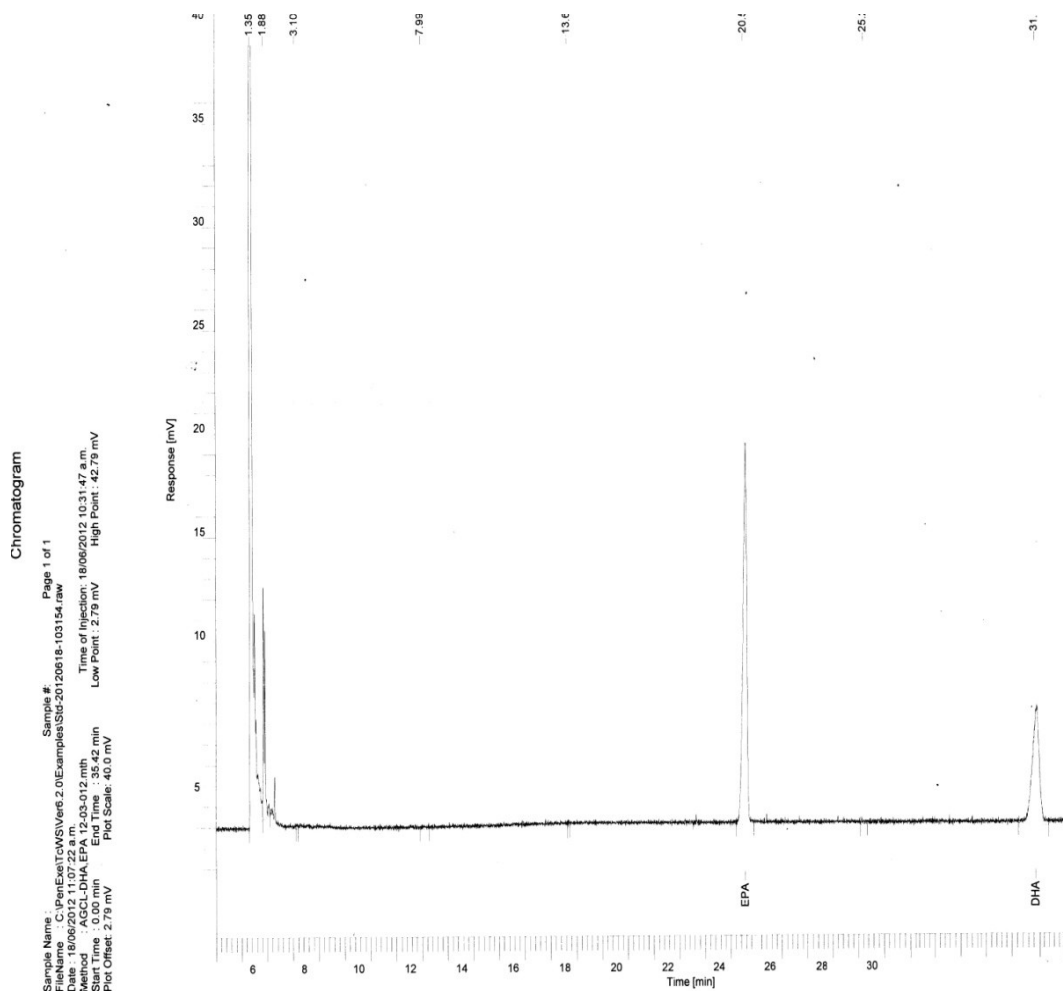
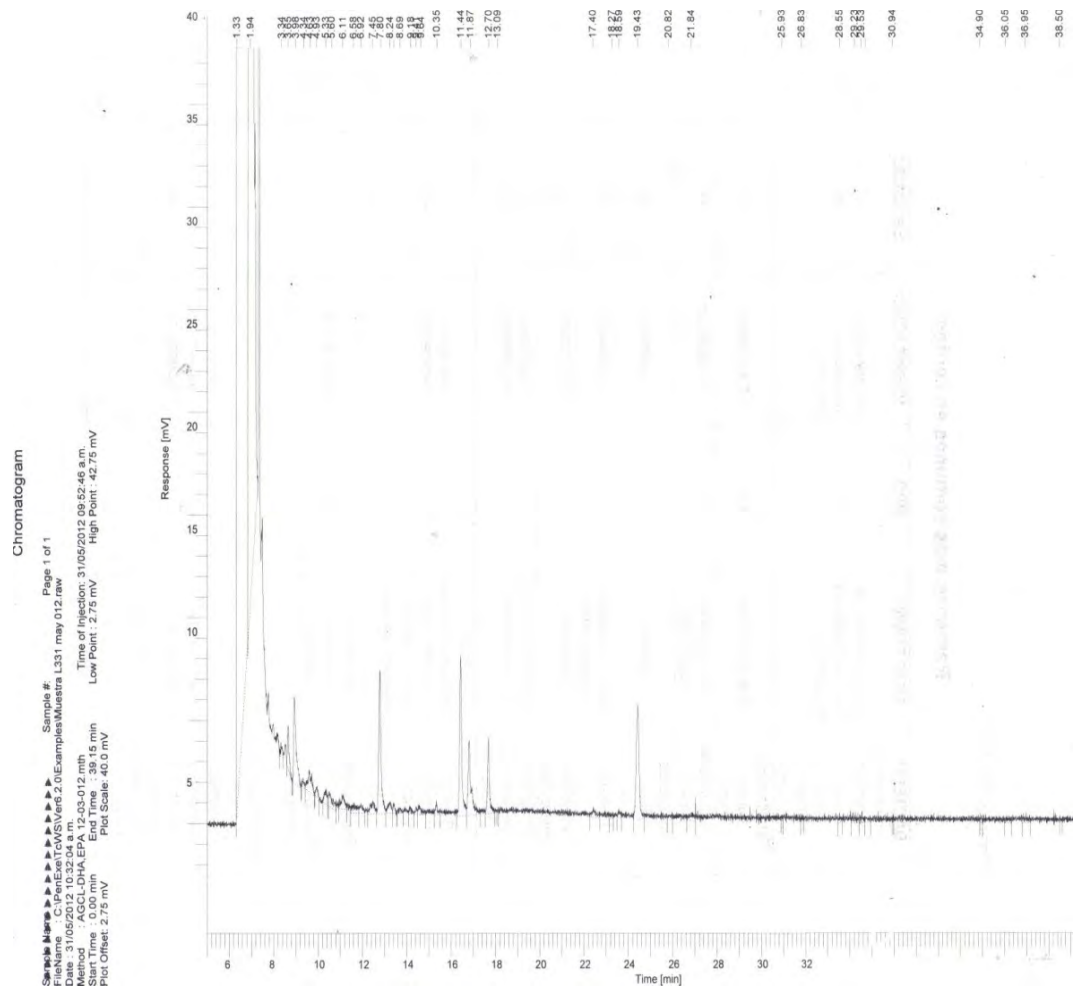
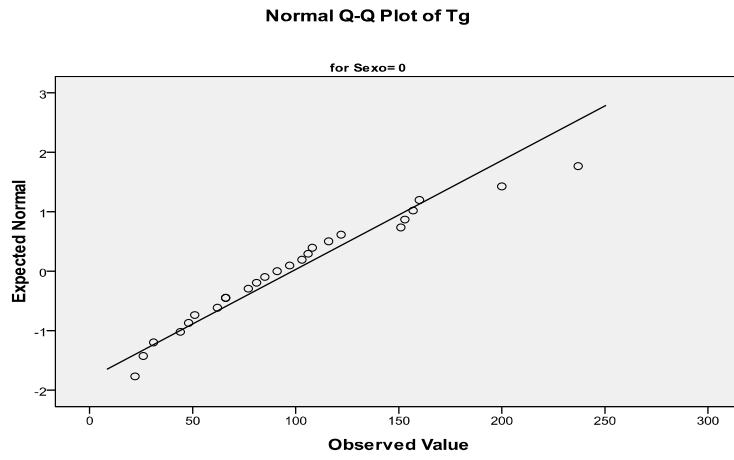


Figura 7. Cromatograma que muestra los compuestos existentes en una muestra

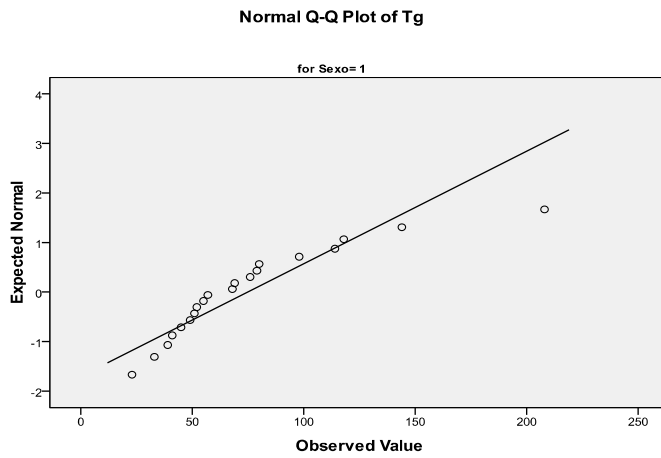




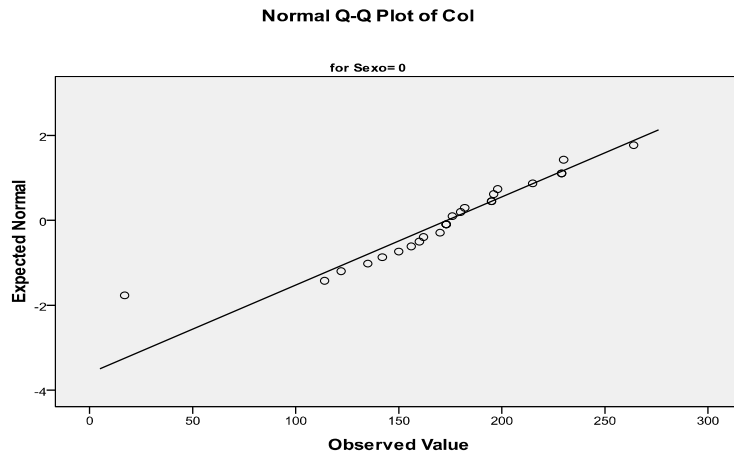
**Figura 8. Representación gráfica de la normalidad de datos de triacilglicéridos de los individuos hembras de este estudio**



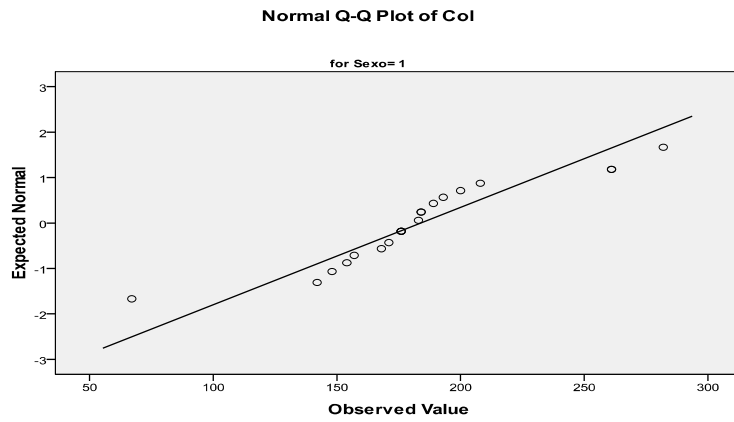
**Figura 9. Representación gráfica de la normalidad de datos de triacilglicéridos de los individuos machos de este estudio**



**Figura 10. Representación gráfica de la normalidad de datos de colesterol de los individuos hembras de este estudio**



**Figura 11. Representación gráfica de la normalidad de datos de colesterol de los individuos machos de este estudio**



**Cuadro 9. Comportamiento estadístico de los días del periodo experimental y su significancia en individuos hembras de las concentraciones de triacilglicéridos séricos**

| <b>Triacilglicéridos Hembras</b>     |                    |   |                      |
|--------------------------------------|--------------------|---|----------------------|
| <b>Días del periodo experimental</b> | <b>Intercept o</b> |   | <b>Significancia</b> |
| <b>0</b>                             | 0.04               | < | 0.05                 |
| <b>15</b>                            | 0.034              | < | 0.05                 |
| <b>30</b>                            | 0.005              | < | 0.05                 |
| <b>45</b>                            | 0.022              | < | 0.05                 |
| <b>60</b>                            | 0.007              | < | 0.05                 |

**Cuadro 10. Comportamiento estadístico de los días del periodo experimental y su significancia en individuos machos de las concentraciones de triacilglicéridos séricos**

| <b>Triacilglicéridos Machos</b>      |                    |   |                      |
|--------------------------------------|--------------------|---|----------------------|
| <b>Días del periodo experimental</b> | <b>Intercept o</b> |   | <b>Significancia</b> |
| <b>0</b>                             | 0.001              | < | 0.05                 |
| <b>15</b>                            | 0.017              | < | 0.05                 |
| <b>30</b>                            | <b>0.117</b>       | > | 0.05                 |
| <b>45</b>                            | <b>0.054</b>       | > | 0.05                 |
| <b>60</b>                            | 0.013              | < | 0.05                 |

**Cuadro 11. Comportamiento estadístico de los días del periodo experimental y su significancia en individuos hembras de las concentraciones de colesterol sérico**

| <b>Colesterol Hembras</b>            |                    |   |                      |
|--------------------------------------|--------------------|---|----------------------|
| <b>Días del periodo experimental</b> | <b>Intercept o</b> |   | <b>Significancia</b> |
| <b>0</b>                             | 0.011              | < | 0.05                 |
| <b>15</b>                            | 0.001              | < | 0.05                 |
| <b>30</b>                            | 0.000              | < | 0.05                 |
| <b>45</b>                            | 0.001              | < | 0.05                 |
| <b>60</b>                            | 0.001              | < | 0.05                 |

**Cuadro 12. Comportamiento estadístico de los días del periodo experimental y su significancia en individuos machos de las concentraciones de colesterol sérico**

| <b>Colesterol Machos</b>             |                    |   |                      |
|--------------------------------------|--------------------|---|----------------------|
| <b>Días del periodo experimental</b> | <b>Intercept o</b> |   | <b>Significancia</b> |
| <b>0</b>                             | 0.000              | < | 0.05                 |
| <b>15</b>                            | 0.03               | < | 0.05                 |
| <b>30</b>                            | 0.016              | < | 0.05                 |
| <b>45</b>                            | 0.000              | < | 0.05                 |
| <b>60</b>                            | 0.005              | < | 0.05                 |

**Cuadro 13. Valores de las concentraciones séricas de triacilglicéridos de individuos hembra durante el periodo experimental**

| <b>Triacilglicéridos (mg/dl)</b>          |          |           |           |           |           |
|---|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| <b>Días</b>                               | <b>0</b> | <b>15</b> | <b>30</b> | <b>45</b> | <b>60</b> |
| <b>A</b>                                  | 116      | 62        | 77        | 85        | 108       |
| <b>D</b>                                  | 48       | 31        | 22        | 26        | 66        |
| <b>E</b>                                  | 151      | 237       | 81        | 97        | 200       |
| <b>G</b>                                  | 103      | 122       | 66        | 153       | 160       |
| <b>H</b>                                  | 157      | 106       | 51        | 44        | 91        |
| <b>Medi</b>                               | 111.     |           |           |           |           |
| <b>a</b>                                  | 115      | 6         | 59.4      | 81        | 125       |
| <b>DE</b>                                 | 43.8     | 78.7      | 23.9      | 49.6      | 54.2      |
|   | 6        | 7         | 2         | 2         | 6         |
| <b>Valor de referencia: (10-100mg/dl)</b> |          |           |           |           |           |

**Cuadro 14. Valores de las concentraciones séricas de triacilglicéridos de individuos macho durante el periodo experimental**

| <b>Triacilglicéridos mg/dl</b> |          |           |           |           |           |
|--------------------------------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| <b>Días</b>                    | <b>0</b> | <b>15</b> | <b>30</b> | <b>45</b> | <b>60</b> |
| <b>B</b>                       | 51       | 41        | 55        | 45        | 52        |
| <b>C</b>                       | 69       | 33        | 39        | 57        | 98        |
| <b>F</b>                       | 79       | 80        | 208       | 23        | 144       |
| <b>I</b>                       | 68       | 76        | 49        | 114       | 118       |
| <b>Medi</b>                    | 66.7     |           | 87.7      | 59.7      |           |
| <b>a</b>                       | 5        | 57.5      | 5         | 5         | 103       |
| <b>DE</b>                      | 11.6     | 23.9      | 80.4      | 38.8      | 38.8      |

|                                    |   |   |   |   |
|------------------------------------|---|---|---|---|
| 2                                  | 5 | 4 | 1 | 7 |
| Valor de referencia: (10-100mg/dl) |   |   |   |   |

**Cuadro 15. Valores de las concentraciones séricas de colesterol de individuos hembra durante el periodo experimental**

| Colesterol mg/dl                    |     |     |     |     |     |
|-------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| Días                                | 0   | 15  | 30  | 45  | 60  |
| A                                   | 173 | 142 | 156 | 176 | 122 |
| D                                   | 173 | 195 | 170 | 114 | 196 |
| E                                   | 170 | 264 | 198 | 215 | 229 |
| G                                   | 162 | 182 | 173 | 150 | 195 |
| H                                   | 180 | 230 | 135 | 160 | 229 |
| Me<br>dia                           | 171 | 202 | 166 | 163 | 194 |
| DE                                  | 6.5 | 46. | 23. | 36. | 43. |
|                                     | 0   | 57  | 18  | 92  | 70  |
| Valores de referencia 110-320 mg/dl |     |     |     |     |     |

**Cuadro 16. Valores de las concentraciones séricas de colesterol de individuos machos durante el periodo experimental**

| Colesterol mg/dl |       |      |      |      |      |
|------------------|-------|------|------|------|------|
| Días             | 0     | 15   | 30   | 45   | 60   |
| B                | 176   | 200  | 154  | 148  | 157  |
| C                | 176   | 184  | 208  | 176  | 211  |
| F                | 189   | 282  | 67   | 183  | 211  |
| I                | 142   | 184  | 193  | 171  | 168  |
| Medi<br>a        |       |      |      |      | 171  |
|                  | 170.7 | 212. | 155. | 169. | 171  |
|                  | 5     | 5    | 5    | 5    | 5    |
| DE               | 20.12 | 46.9 | 63.2 | 15.1 | 15.7 |
|                  |       | 4    | 4    | 5    | 7    |



**Valor de referencia 110-320 mg/dl**

## 10. Referencias Bibliográficas

1. Hand Michael S., Thatcher Craig D., Remillard Rebecca L., Roudebush Philip. Nutrición Clínica de Pequeños Animales, 4ta edición, Mark Morris Institute, Santa Fe de Bogotá, Colombia, 2000.
2. Case L.P., Carey D.P., Hirakawa D.A., Dariltotle L. Nutricion Canina y Felina. Guía para los profesionales de los animales de compañía., Segunda edición, Ediciones Harcourt S.A. Madrid, España 2001
3. Xenoulis P. G., Levinski M. D., Suchodolski J. S., and Steiner J. M. Serum Triglyceride Concentrations in Miniature Schnauzers with and without a History of Probable Pancreatitis. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2011; 25: 20-25.
4. Xenoulis P. G., Investigations into idiopathic hypertriglyceridemia in the Miniature Schnauzer in North America. Tesis Doctoral Texas A&M University, College Station, Texas, USA.
5. Barderas M G, Gallego-Delgado J, Durán M C, Lázaro A, Hernandez-Mérida S, Mas S, Jiménez-Nácher J J, Tuñón J, López Bescós L, Egido J, Vivanco F. Análisis proteómico de monocitos circulantes humanos. Aplicación a pacientes con síndrome coronario agudo. *Investigación Cardiovascular*, 2004; 7: 1-18.
6. Mathews Christopher K., Holde, van K.E., Ahern Kevin G. Bioquímica 3ra edicion Pearson Addison Wesley, Madrid España 2002 RK
7. Murray, DK Granner, PA Mayes, et al editores. Harper Bioquímica Ilustrada, 16 ed, Manual Moderno-McGraw-Hill, México 2004.
8. Guyton Arthur C., Hall John E. Fisiología Médica. Decimo primera adicon. Edit, Elsevier Madrid 2006.

9. Rustan C. A., Hustvedt Bo-E., Drevon C. A. Dietary supplementation of very long-chain omega-3 fatty acids decreases whole body lipid utilization in the rat. *Journal of Lipid Research*, Vol. 34, pp. 1299-1309, 1993.
10. Amenta J. S. A rapid extraction and quantification of total lipids and lipid fractions in blood and feces. *Journal of Clinical Chemistry*, Vol. 16, No. 4, 1970 339-346
11. Lemaitre Rozenn N, King Irena B, Mozaffarian Dariush, Kuller Lewis H, Tracy Russell P, y Siscovick David S. omega-3 polyunsaturated fatty acids, fatal ischemic heart disease, and nonfatal myocardial infarction in older adults: The Cardiovascular Health Study<sup>1-3</sup>. *American Journal of Clinical Nutrition* 2003;77:319–25.
12. Man E.B. And f. Gildea D. A modification of the stoddard and drury titrimetric method for the determination of the fatty acids in blood serum. Blix, G., *Skand. Journal of Biological Chemistry*, 48, 267 (1926)
13. Woodward<sup>1</sup> A.D. , Nielsen<sup>1</sup> B.D. Connor<sup>1</sup> C. I. O', Webel<sup>2</sup> S. K., and. Orth<sup>1</sup> M.D. Dietary Long Chain Polyunsaturated Fatty Acids Increase Plasma Eicosapentaenoic Acid And Docosahexaenoic Acid Concentrations And Trot Stride Length In Horses. Ashes, J. R., B. D. Diebert, S. K. Gulati, A. Z. Cuthbertson, and T. W. Scott. 1992.
14. Folch, M. Jordi, Lees M, and Sloane Stanley G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226: 497-509. 1957



15. Masood A.,\* Stark K. D,<sup>†</sup> and Salem N. Jr.<sup>1\*</sup>. A simplified and efficient method for the analysis of fatty acid methyl esters suitable for large clinical studies. *Journal of Lipid Research*, Volume 46, 2005, p. 2299
16. Torea H. Malasanos, MD, Stacpoole Peter W., PhD, MD. Biological effects of w-3 fatty acids in diabetes mellitus. *Diabetes care*, VOL. 14, NO. 12, Diciembre 1991. P 1160.
17. Gómez Esteban Alberto. *Bioquímica Metabólica*. Lección 14. Síntesis de eicosanoides
18. Abourg Patrick,<sup>1\*</sup> Bougneres Pierre F., \*\* and Rocchiccioli Francis. Capillary gas-liquid chromatographic-mass spectrometric measurement of very long chain (c22 to c24) fatty acids in microliter samples of plasma. *Journal of Lipid Research* Volume 26, 1985 *Notes on Methodology* p. 263
19. Mattson Fred H. and Grundy Scott M. Comparison of effects of dietary saturated, monounsaturated, and polyunsaturated fatty acids on plasma lipids and lipoproteins in man. *Journal of Lipid Research* Volume 26, 1985, p. 194.
20. Herbergt R. and Morrios K. Improved procedure for the extraction of lipids from human erythrocytes *Journal of Lipid Research*, Volume 6 , 1965
21. S. Gordon r. Jr. and Cherkes a. Unesterified fatty acid in human blood plasma. *Journal of Clinical Investigation*. Vol 35 pags 206-212 1956
22. Hallgren B., Stenhagen S., Svanborg a. and Svennerholm I. Gas chromatographic analysis of the fatty acid composition of the plasma lipids in normal and diabetic subjects. *Journal of Clinical Investigation*.1960 September; 39(9): 1424–1434.

23. Ayala Torres A.; Hernández Zarazúa I. L.; Aguilera Barreyro A. Implementación de la técnica de folch para la extracción de grasas en frío. Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Autónoma de Querétaro
24. Lepage G. and C. Roy C. Improved recovery of fatty acid through direct transesterification without prior extraction or purification. *Journal of Lipid Research* Volume 25, 1984
25. Morrison W. and Smith L. Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. *Journal of Lipid Research* Volume 5, 1964.
26. Kew S., Banerjee T., Minihane M.A., Finnegan Y. E., Williams C. M. and Calder P. C. Relation between the fatty acid composition of peripheral blood mononuclear cells and measures of immune cell function in healthy, free-living subjects aged 25–72 y<sup>1-3</sup>. *American Journal of Clinical Nutrition* 2003, Vol. 77, pp. 1278-1286; American Society for Clinical Nutrition USA
27. Goldberg J. R., Katz J. A meta-analysis of the analgesic effects of omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation for inflammatory joint pain. *Pain*. Vol 129 (2007) pags 210-223.
28. Jame J M., Gibson A R., and Cleland G. L. Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammatory mediator production. *American Journal of Clinical Nutrition* 2000;71(suppl):343S–8S. Printed in USA.
29. Levin g., I. Duffin. K., Obukowicz. m., Hummert. Hideji F., Needleman P. and Amiram R.. Differential metabolism of dihomo-c-linolenic acid and arachidonic acid by cyclo-oxygenase-1 and cyclo-oxygenase-2 :implications for cellular

- synthesis of prostaglandin E1 and prostaglandin E2. *Biochemical Journal* (2002) 365, pags. 489-496.
30. Ormerod L.D.,\*t Garsd A.,\*t B. Abelson M.,\*t and R. Kenyon K. Effects of Altering the Eicosanoid Precursor Pool on Neovascularization and Inflammation in the Alkali-burned Rabbit Cornea. *American Journal of Pathology*, Vol. 137, No. 5, November 1990.
  31. Neelley K., DVM and J. Herthel D., DVM. Essential Fatty Acid Supplementation as a Preventative for Carbohydrate Overload-Induced Laminitis. *Proceedings of the Annual Convention of the AAEP* 1997
  32. C Calder P. n\_3 Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases1–3. *American Journal of Clinical Nutrition* 2006; 83(suppl):1505S–19S.
  33. Yacoubian S. and Serhan C. New endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators: implications for rheumatic diseases. *Nature*, October 2007 vol 3 no 10
  34. P. Simopoulos A., MD, FACN. Omega-3 Fatty Acids in Inflammation and Autoimmune Diseases. *Journal of the American College of Nutrition*, Vol. 21, No. 6, 495–505 (2002)
  35. Gil A. Polyunsaturated fatty acids and inflammatory diseases. *Biomed Pharmacother* 56 (2002) pp 388-396.
  36. O'Connor,O., Lawrence L. M., and Hayes S. H.. Dietary fish oil supplementation affects serum fatty acid concentrations in horses. *Journal Of Animal Science* 2007, 85:2183-2189

37. Cave T. W. Jr. Dietary omega-3 (w-3) polyunsaturated fatty acid effects on animal tumorigenesis. *The FASEB Journal* Vol 5 ;May 1991 pp 2160-2166.
38. Kaminski WE, Jendraschak E., Kiefl R and Schacky Von C. Dietary omega 3 fatty lower levels of platelet – derived growth factor mRNA in human mononuclear cells. *Blood* 1993 81: 1871-1879
39. Weintraub S. M., Zechner R., Brown A,t Eisenberg S., and Breslow J. L. Dietary Polyunsaturated Fats of the W-6 and W-3 series reduce postprandial lipoprotein levels. *Journal of Clinical Investigation* Volume 82, December 1988, 1884-1893
40. James M. J., Gibson R. A., and Cleland L. G. Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammatory mediator production. *American Journal of Clinical Nutrition* 2000;71(suppl):343S–8S. Printed in USA.
41. Rustan A. C, Hustvedt E., and A. Drevonl C. Dietary supplementation of very long-chain omega-3 fatty acids decreases whole body lipid utilization in the rat. *Journal of Lipid Research* Volume 34, 1993 1299
42. Hodge J., Sanders K. and J. Sinclairb A. Differential Utilization of Eicosapentaenoic Acid and Docosahexaenoic Acid in Human Plasma 1993 by the American Oil Chemists' Society LIPIDS, Vol. 28, na 6 (1993)
43. M. M. Madden S., F. Garrioch C, and J. Holub B. Direct Diet Quantification Indicates Low Intakes of (n-3) Fatty Acids in Children 4 to 8 Years Old. *The Journal of Nutrition*. March 2009 vol. 139 no. 3 528-532
44. Lepage G. and Roy C. Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. *Journal of Lipid Research* Volume 27, 1986 Notes on Methodology

45. Denomme J., Stark D.,\* and J. Holub B. Directly Quantitated Dietary (n-3) Fatty Acid Intakes of Pregnant Canadian Women Are Lower than Current Dietary Recommendations<sup>1</sup>. *Journal of Nutrition*. February 1, 2005 vol. 135 no. 2 206-211
46. Campos H.,<sup>1</sup>, Perlov D.,\* Khoo C.,\* and M. Sacks F. Distinct patterns of lipoproteins with apoB defined by presence of apoE or apoC-III in hypercholesterolemia and hypertriglyceridemia. *Journal of Lipid Research* Volume 42, 2001.
47. Wu F. C., Ting Y.Y. and Houn-Yung Chen H. Y. Docosahexaenoic Acid Is Superior to Eicosapentaenoic Acid as the Essential Fatty Acid for Growth of Grouper, *Epinephelus*. *Journal of Nutrition*. January 1, 2002 vol. 132 no. 1 72-79
48. Willumsen N. Hexeberg St., Skorve J., Lundquist M. and K. Berge R. Docosahexaenoic acid shows no triglyceridelowering effects but increases the peroxisomal fatty acid oxidation in liver of rats. *Journal of Lipid Research* Volume 34, 1993
49. Grande F. Dog Serum Lipid Responses to Dietary Fats Differing in the Chain Length of the Saturated Fatty Acids<sup>1</sup>. *The Journal of Nutrition*, 76, 62, 260-264
50. Carrero J. J., Martín-Bautista E, Baró L., Fonollá J., Jiménez J., Boza J. J. y López-Huertas E.. Efectos cardiovasculares de los ácidos grasos omega-3 y alternativas para incrementar su ingesta. *Nutrición Hospitalaria*. (2005) 20 (1) 63-69
51. Brenner R. and Peluffo O. Effect of Saturated and Unsaturated Fatty Desaturation in *Vitro* of Palmitic, Stearic, Oleic, Linoleic, and Linolenic Acids.

The Journal Of Biological Chemistry Vol. 241, No. 22, Issue of November 25, pp. 5213-5219, 1966 Printed in U.S.A.

52. McCann M. E., Moore J. N., Carrick J. B. and Barton M. H. Effect of intravenous infusion of omega-3 and omega-6 lipid emulsions on equine monocyte fatty acid composition and inflammatory mediator production in vitro. Vol. 14 No. 2, pp. 22-228, 2000
53. Harris W. S. , Connor W. E., Illingworth D. R., Rothrock D. W, and Foster D. M. Effects of fish oil on VLDL triglyceride kinetics in humans<sup>1</sup>. Journal of Lipid Research Volume 31, 1990
54. Babcock T., MS, Helton W. S., MD, and Espat N. J., MD. Eicosapentaenoic Acid (EPA): An Antiinflammatory  $\omega$ -3 Fat With Potential Clinical Applications. Nutrition 16:1116 –1118, 2000
55. Rustan A. C., Nossen J., Christiansen E. N.,\* and Drevon C. A. Eicosapentaenoic acid reduces hepatic synthesis and secretion of triacylglycerol by decreasing the activity of acyl-coenzyme A: 1,2-diacylglycerol acyltransferase. Journal of Lipid Research Volume 29, 1988
56. Fuhrmann H., Zimmermann A., Gück T., Oechtering G. Erythrocyte and plasma fatty acid patterns in dogs with atopic dermatitis and healthy dogs in the same household. The Canadian Journal of Veterinary Research. 2006;70:191–196
57. García Regueiro J. A. y Díaz I. Nuevas tendencias en el análisis de ácidos grasos. Generalitat de Catalunya 2006

58. Ahlstrom O., Krogdahl A. S., y While S. G.,\* and Skrede A. Fatty Acid Composition in Commercial Dog Foods. *Journal of Nutrition* 134: 2145S–2147S, 2004.
59. Doğru P. B. Fatty acid composition of red blood cell membrane phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine in rat, rabbit, human and dog. *Journal of Faculty Pharmacy of Ankara*, 31 (3) 169-182, 2002
60. FC Glatz J., EMF Soffers A., and B Katan M. Fatty acid composition of serum cholesteryl esters and erythrocyte membranes as indicators of linoleic acid intake in man<sup>13</sup>. *American Journal of Clinical Nutrition* 1989; 49:269-76. Printed in USA.
61. Kris-Etherton P. M., Harris W. S. and Appel L. J. Fish Consumption, Fish Oil, Omega-3 Fatty Acids, and Cardiovascular Disease. *Journal of the American Heart Association. Circulation*. 2002; 106: 2747-2757
62. Harris W. S. Fish oils and plasma lipid and lipoprotein metabolism in humans: a critical review. *Journal of Lipid Research* Volume 30, 1989
63. Boehm G., Borte M., Böhles H. J., Müller H., Kohn G. and Moro G. Docosahexaenoic and arachidonic acid content of serum and red blood cell membrane phospholipids of preterm infants fed breast milk, standard formula or formula supplemented with omega-3 and n-6 long-chain polyunsaturated fatty acids. *European Journal Pediatrics* (1996) 155:410-416.
64. Hallgren B. O., Stenhagen S., Svanborg A. and Svennerholm L. Gas chromatographic analysis of the fatty acid composition of the plasma lipids in normal and diabetic subjects. *Journal of Clinical Investigation*. 1960 September; 39(9): 1424–1434.

65. Christensen J. H., Stubkjoer Christensen M., Dyerberg J, and Schmidt E. B. Heart rate variability and fatty acid content of blood cell membranes: a dose-response study with n23 fatty acids 1–3. *American Journal of Clinical Nutrition* 1999; 70:331–7. Printed in USA. American Society for Clinical Nutrition
66. Beisel W. R. History of Nutritional Immunology: Introduction and Overview1. *Journal of Nutrition*. 1992 Mar; 122 (3 Suppl):591-6 1992
67. De Grauw J. C., Van de Lest C. HA., and Van Weeren P. R. Inflammatory mediators and cartilage biomarkers in synovial fluid after a single inflammatory insult: a longitudinal experimental study. *Arthritis Research & Therapy* Vol 11 No 2.
68. Garg M. L., Thomson A. B. R., and Clandinin M. T. Interactions of saturated, n-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids to modulate arachidonic acid metabolism. *Journal of Lipid Research* Volume 31, 1990
69. Harris W. S., PhD; Zucker M. L., MD; and Dujovne C. A., MD. omega-3 Fatty acids in hypertriglyceridemic patients: triglycerides vs methyl esters. *American Journal of Clinical Nutrition* 1988;48:992-7. Printed in USA.
70. Bloc'h J. L., Leray V., Chetiveaux M., Freuchet B., Magot T., Krempf M., Nguyen P. and Ouguerram K. Nicotinic acid decreases apoB100-containing lipoprotein levels by reducing hepatic VLDL secretion through a possible DGAT2 inhibition in obese dogs. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. August 2010 vol. 334 no. 2 583-589
71. Dougherty R. M., BA, Gail C., MD, Ferro-Luzzi A., MD, and Jacono J. Lipid and phospholipid fatty acid composition of plasma, red blood cells, and platelets and how they are affected by dietary lipids: a study of normal subjects from



- Italy, Finland, and the USA<sup>1,2</sup>. American Journal of Clinical Nutrition 1987;45:443-55. Printed in USA.
72. Xenoulis P. G., Steiner J. M. Lipid metabolism and hyperlipidemia in dogs. The Veterinary Journal 183 (2010) 12–21
  73. von Schacky C., Fischer S., and Weber P. C. Long-term Effects of Dietary Marine w-3 Fatty Acids upon Plasma and Cellular Lipids, Platelet Function, and Eicosanoid Formation in Humans. Journal of Clinical Investigation. Volume 76, October 1985, 1626-1631
  74. García M F. J. Los ácidos grasos omega-3 de cadena larga en la nutrición clínica. Nutrición Clínica en Medicina Noviembre 2007 Vol. I - Número 3 pp. 203-218
  75. Von Schacky C. and Weber P. C. Metabolism and Effects on Platelet Function of the Purified Eicosapentaenoic and Docosahexaenoic Acids in Humans. Journal of Clinical Investigation. Volume 76, December 1985, 2446-2450
  76. Luo J., Rizkalla S. W., Vidal H., Oppert J. M., Colas C., Boussa A. G., Guerre-Millo M., Chapuis A. S., Chevalier A., Durand G. and Slama G. Moderate Intake of omega-3 Fatty Acids for 2 Months Has No Detrimental Effect on Glucose Metabolism and Could Ameliorate the Lipid Profile in Type 2 Diabetic Men. Diabetes Care, Volume 21, Number 5, May 1998
  77. Zapata G. F. Modulación del sistema inmune por el ácido docosahexaenoico: efecto sobre la célula dendrítica. Tesis para optar por el grado de Doctor en Química, Universidad de Barcelona.

78. Harris W. S. omega-3 Long-chain polyunsaturated fatty acids reduce risk of coronary heart disease death: extending the evidence to the elderly<sup>1,2</sup>. American Journal of Clinical Nutrition 2003 ;77:279–80. Printed in USA
79. Calder P. C. omega-3 Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases<sup>1–3</sup>. American Journal of Clinical Nutrition 2006 ; 83(suppl):1505S–19S. Printed in USA
80. Klempner M. S., Mikkelsen R. B., Corfman D. H., and Schwartz J. A. Neutrophil Plasma Membranes I. High-Yield Purification of Human Neutrophil Plasma Membrane Vesicles by Nitrogen Cavitation and Differential Centrifugation. The Journal of Cell Biology - Volume 86 July 1980 21-28
81. Moreno J. J., Carbonell T., Sanchez T., Miret S. and Mitjavila M. T. Olive Oil Decreases both Oxidative Stress and the Production of Arachidonic Acid Metabolites by the Prostaglandin G/H Synthase Pathway in Rat Macrophages<sup>1,2</sup>. Journal of Nutrition. August 1, 2001 vol. 131 no. 8 2145-2149
82. Park Y. and Harris W. S. Omega-3 fatty acid supplementation accelerates chylomicron triglyceride clearance. Journal of Lipid Research Volume 44, 2003
83. Simopoulos A. P. Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development<sup>1</sup>. American Journal of Clinical Nutrition 1991:54:438-63. Printed in USA.
84. Simopoulos A. P. Omega-3 Fatty Acids in Inflammation and Autoimmune Diseases. Journal of the American College of Nutrition, Vol. 21, No. 6, 495–505 (2002)

85. Pace-Asciak C. R. One-step rapid extractive methylation of plasma nonesterified fatty acids for gas chromatographic analysis. *Journal of Lipid Research* Volume 30, 1989.
86. Gutiérrez-Tolentino R., Vega y León S., Díaz-González G., Delgadillo-Gutiérrez H. J., Urbán-Carrillo G., Ramírez-Ayala A., González-Cabrera C. e Méndez-Ramírez I. Detection of foreign fat in milk fat by gas-chromatography and multivariable statistic. *Agrociencia* 41: 733-742. 2007.
87. Slots T., Butler G., Leifert C., Kristensen T., Skibsted L. H., and Nielsen J. H. Potentials to differentiate milk composition by different feeding strategies. *Journal of Dairy Science*. 92:2057–2066
88. Castro, Gonzalez M. I, Anayte Ojeda, Jose L. Silencio, Lorena Cassis, Hector Ledesma, and Gil F. Perez. "Perfil Lipidico De 25 Pescados Marinos Mexicanos Con Especial Enfasis En Sus Acidos Grasos omega-3 Como Componentes Nutraceuticos." *Archivos Latinoamericanos De Nutrición*. 54.3 (2004): 328-336. Print.
89. Brown A. J., Pang E., and CK Roberts D. Persistent changes in the fatty acid composition of erythrocyte membranes after moderate intake of omega-3 polyunsaturated fatty acids: study design implications. *American Journal of Clinical Nutrition* 1991;54:668-73. Printed in USA.
90. Stulnig T. M., Huber J., Leitinger N., Imre E. N., Angelisova P., Nowotny P., and Waldhausl. Polyunsaturated Eicosapentaenoic Acid Displaces Proteins from Membrane Rafts by Altering Raft Lipid Composition. *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 276, No. 40, Issue of October 5, pp. 37335–37340, 2001 Printed in U.S.A.

91. Laurit I., Bloundeau N., Heurteaux C., Widmann C., Romey G. and Lazdunski M. Polyunsaturated fatty acids are potent neuroprotectors. The EMABO Journal Vol. 19 No. 8 pp. 1784-1793, 2000.
92. Ntambi J. M. and Bené H. Polyunsaturated Fatty Acid Regulation of Gene Expression. Volume 16, 2001 Received May 16, 2000; Accepted November 1, 2000
93. Christie W. W. Preparation of ester derivatives of fatty acids for chromatographic analysis. Advances in Lipid Methodology – Two, pp. 69-111 [1993]
94. Morrison W. R. and Smith L. M. Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. Journal of Lipid Research Volume5, 1964
95. Johnson M. C. Hyperlipidemia Disorders in Dogs. Compendium MAY 2005
96. Slover H. T. and Lanza E. Quantitative Analysis of Food Fatty Acids by Capillary Gas Chromatography. Journal of the American Oil Chemists' Society Volume 56, Number 12 (1979), 933-943
97. Harris W. S., O'Connor W. E., Alam N., and Illingworth D. R. Reduction of postprandial triglyceridemia in humans by dietary omega-3 fatty acids. Journal of Lipid Research Volume 29, 1988
98. Kew S., Banerjee T., Minihane A. M., Finnegan Y. E., Williams C. M., and Calder P. C. Relation between the fatty acid composition of peripheral blood mononuclear cells and measures of immune cell function in healthy, free-living subjects aged 25–72. American Journal of Clinical Nutrition 2003; 77:1278–86.  
Printed in USA.

99. Respondek F., Swanson K. S., Belsito K. S., Vester B. M, Wagner A., Istasse L. and Diez M. Short-Chain Fructooligosaccharides Influence Insulin Sensitivity and Gene Expression of Fat Tissue in Obese Dogs. *The Journal of Nutrition*. September 2008 vol. 138 no. 9 1712-1718
100. Nestel P. J., Connor W. E., Reardon M. F., Connor S., Wong S., and Boston R. Suppression by Diets Rich in Fish Oil of Very Low Density Lipoprotein Production in Man. *Journal of Clinical Investigation*. Volume 74, July 1984, 82-89.
101. Hall J. A., Picton R. A., Skinner M. M., Dennis E. Jewell D. E., and Wander R. C. The (n-3) Fatty Acid Dose, Independent of the (n-6) to (n-3) Fatty Acid Ratio, Affects the Plasma Fatty Acid Profile of Normal Dogs. *Journal of Nutrition* September 2006 vol. 136 no. 9 2338-2344.
102. Bourre J. M., Francois M., Yooyoa A., Dumont O., Lepiciotti M., Pascal G. and Durand G. The Effects of Dietary  $\alpha$ -Linolenic Acid on the Composition of Nerve Membranes, Enzymatic Activity, Amplitude of Electrophysiological Parameters, Resistance to Poisons and Performance of Learning Tasks in Rats. *The Journal of Nutrition* 1989, vol. 119, n 12, pp. 1880-1892
103. Lee K. W. and Lip G. Y. H. The role of omega-3 fatty acids in the secondary prevention of cardiovascular disease. *QJM: An International Journal of Medicine* Volume 96, Issue 7 Pp. 465-480
104. Simopoulos A. P. The importance of the ratio of omega-6/ omega-3 essential fatty acids *Biomedicine & Pharmacotherapy* Volume 56, Issue 8, October 2002, Pages 365–379

105. Sanders T., Sullivan D.R., Reeve J. and Thompson G. R. Triglyceride-Lowering Effect of Marine Polyunsaturates in Patients with Hypertriglyceridemia. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*.1985; 5: 459-465.
106. Calder P. C., Bond J. A., Harvey D. J., Gordon S. and Newsholme E. A. Uptake and incorporation of saturated and unsaturated fatty acids into macrophage lipids and their effect upon macrophage adhesion and phagocytosis. *Biochemical Journal*. (1990) 269, 807-814 (Printed in Great Britain)
107. Hendriks W. H., Wu Y. B., Shields R. G., Newcomb M., Rutherford K. J., Belay T. and Wilson J. Vitamin E Requirement of Adult Cats Increases Slightly with High Dietary Intake of Polyunsaturated Fatty Acids. *Journal of Nutrition*. 132: 1613S–1615S, 2002.
108. Harris W. S. omega-3 Fatty acids and serum lipoproteins: animal studies. *American Journal of Clinical Nutrition* May 1997 vol. 65 no. 5 1611S-1616S.
109. Meyer D. J., Harvey J, W. *Veterinary Laboratory Medicine. Interpretation and Diagnosis*. 3ra edicion 2004, EUA. ISBN 0-7216-8926-4
110. Kuehl,R., *Diseño de experimentos* 2a. Ed., Thomson Editores, S.A. de C.V.,2000, ISBN 970-686-048-7.