

UNIVERSIDAD DE GRANADA  
FACULTAD DE CIENCIAS



*Suplementación de la dieta con aceite de pescado rico  
en ácidos grasos poliinsaturados n-3. Estrategias a  
practicar para potenciar su consumo.*

José Ramón Fernández Navarro  
Granada, 2007





## MEMORIA DE TESIS DOCTORAL

Presentada por el Licenciado en Ciencias Biológicas José Ramón Fernández Navarro para optar al grado de Doctor por la Universidad de Granada.

Dirigida por la doctora:

M<sup>a</sup> Remedios Sanz Sampelayo

Unidad de Nutrición Animal  
Estación Experimental del Zaidín  
Consejo Superior de Investigaciones Científicas  
GRANADA





## *Agradecimientos*

Esta investigación se ha desarrollado en el Departamento de Nutrición Animal de la Estación Experimental del Zaidín del Consejo Superior de Investigaciones Científicas. En 2001 el Consejo me abrió las puertas de la Ciencia y me proporcionó todos los medios necesarios para desarrollar este trabajo.

La presente memoria ha sido el resultado de la participación en diferentes proyectos de investigación adjudicados en convocatoria pública y culminados con éxito gracias al buen hacer del grupo del Plan Andaluz de Investigación “Nutrición de Pequeños Rumiantes” y a la financiación concedida por las siguientes instituciones:

**- Ministerio de Ciencia y Tecnología**

EFEECTO INMUNOMODULADOR DE LOS PUFA SOBRE UNA INFECCIÓN POR NEMATODOS.

**- Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria (INIA).  
Ministerio de Educación y Ciencia.**

PAPEL DE LOS ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS DE LA DIETA EN LA EFICIENCIA REPRODUCTIVA DEL GANADO CABRIO. UTILIZACIÓN NUTRITIVA Y ESTATUS ENERGÉTICO DE LOS ANIMALES.

**- Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía**

OBTENCIÓN DE CANALES CAPRINAS DE CALIDAD, DESARROLLO Y COMPOSICIÓN DE SUS DEPÓSITOS ADIPOSOS EN RAZÓN DE LA NATURALEZA DE LA GRASA INCLUIDA EN EL LACTORREEMPLAZANTE.

**- Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía**

EFEECTO DE UNA DIETA SUPLEMENTADA CON UNA GRASA PROTEGIDA RICA EN ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS (PUFAS), SOBRE DETERMINADOS ASPECTOS PRODUCTIVOS DE LA CABRA DE RAZA GRANADINA.



Esta memoria es el resultado de una mezcla de grandes dosis de Entusiasmo, Trabajo y Ciencia. Ha sido un verdadero lujo trabajar en lo que quería durante los primeros años de mi vida profesional, años en los que la asimilación de conocimientos ha sido vertiginosa y la ilusión infinita. No obstante, lo más importante han sido las personas sin las que este trabajo no hubiese sido posible y a las que quiero expresar mi más sincera gratitud:

A la Dra. M<sup>a</sup> Remedios Sanz Sampelayo por haberme dirigido la Tesis, por su dedicación y por darme la oportunidad de formarme como investigador.

Al Dr. Julio Boza por ser un referente en lo profesional y lo personal, y por demostrarme que la sabiduría no está reñida con la cercanía. A Paqui, por su maestría en el laboratorio, por sus canciones y porque la tesis no hubiese sido lo mismo sin ella. A las Dras. Victoria Gómez, Matilde Rodríguez y Rosario Hermoso por introducirme en el mundo de la inmunología. Al Dr Luis Pérez por su ayuda con la cromatografía.

A mis compañeros y amigos: a Eva porque su ayuda ha sido incondicional y su amistad ha ido creciendo exponencialmente, a Gloria por estar siempre dispuesta a todo, por ser única y hacerme pasar muy buenos ratos “a pesar de sus intentos de asesinato”, a David por su inconmensurable aportación como científico y amigo, porque puedo agradecerle mucho que no tiene que ver con esta Tesis.

A Liki por su entusiasmo y por compartir durante el último año de Tesis muchas, muchas, muchas cosas. A Sonia por su alegría, su meticulosidad y por ser el complemento que necesitaba en el laboratorio.

A mis compañeros, David, Cristina, Roberto, Ignacio, Abdelmajid, Marta R., Marta M. y Rosa por todos sus consejos y apoyo en la primera etapa de la Tesis y por compartir tantos momentazos en la sala de becarios. A Gonzalo, Alberto, Eliza, Bea por mantener ese espíritu predoctoral tan importante. A Luis del Boz, Mari Carmen, Víctor, Luisa, Ana, Ginesa, Angustias por su ayuda en el laboratorio.

A Luis Lara por sus charlas y su ayuda con la estadística. A Juan por solucionarme más de mil problemas y por ser una persona sorprendente. A Paco por ser un maestro en el manejo de todo tipo de animales y por conseguir que invite la casa, ya ves.

A los doctores del piso de arriba: Edu, Pepe, Luis, Pilar, Alfonso, Isabel, Rosa, Ignacio y Manolo por sus consejos, por estar siempre y por hacerme sentir como en casa cada vez que he vuelto al Departamento.

A la Asociación Española de Criadores de la Cabra Malagueña, especialmente a Alfonso y a Juanma. A Juan Francisco Díaz Pedraza y a sus cabras. A la Granja Experimental de la Diputación de Granada.

A la Agencia de Innovación y Desarrollo de Andalucía por colocarme entre la investigación académica y el desarrollo empresarial y darme la oportunidad de trabajar en un proyecto apasionante.

A mis bichólogos favoritos: a Mercedes por ser tan grande y tan importante, a Sandra por contagiarme su pasión por la vida, a Sonia, Micaela, John, Aida, Enrique, Mari Carmen, Alex y Belén.

A la peña Q, a la peña M, a la peña Sabanilla, a Fran, Carlota, Rafa, Ingrid y Peque por ser como de toda la vida y para que dure toda una vida.

A Marcos por ser un lujo como amigo y como biólogo, por tantas cosas...

Al piso colegas y a mis colegas, Manolillo, Ru, Daddy, Ernest, Micho, Ficus, Richi, Fede y Joldy, porque aunque sospecho que aún no se han enterado bien de que va esta Tesis, me han acompañado durante todas las etapas de mi vida y del Doctorado. A Virtu, Isa, Nora, María José y Eva por aguantarlos. A Migue por ser como un hermano. A Patricia porque no se debe olvidar el pasado y por ser mi mejor amiga.

A Alvaro, Elena y Elenita por ser parte de mi familia, por habitar en lo más profundo de mi pasado, presente y futuro.

A Jennifer por haber sido un apoyo fundamental en la fase final de esta tesis, por ser un apoyo imprescindible en todo lo demás, por compartirlo todo, por lo que nos queda por compartir. Por ser responsable de que me levante y me acueste feliz todos los días.

A mi hermana por su apoyo y comprensión incondicional y porque cada vez la siento más cerca. A mis padres porque no conformándose con darme sus genes, me lo han dado todo, por estar siempre a mi lado y ser el mejor ejemplo que uno puede tener. Soy lo que soy gracias a ellos.

A mi hermano porque es el futuro y lo es todo para mí.

Una línea, si es línea,  
puede ser el comienzo  
de más líneas que, unidas,  
digan su descontento.

Una línea es tal línea  
cuando algo tiene dentro.  
Línea que no está llena  
es un vacío hueco.

Una línea no es línea  
si no suma un entero.  
A lo sumo será  
línea de medios pelos.

Pero si línea, es línea  
de número concreto  
que, sumado a otros números,  
forma un bloque de acero.

Dos líneas, si son líneas  
que marchan paralelas,  
serán líneas unidas  
si multiplican fuerza...

... Tres líneas, si son líneas,  
pueden ser un equipo  
capaz; pueden, si quieren,  
cambiar del mundo el ritmo.

Cuatro líneas, si se unen,  
codo a codo, conscientes,  
son líneas que se apoyan  
de manera honda y fuerte...

... si no desmaya  
su vocación de gente,  
serán la raíz cuadrada  
del porvenir que viene.

**Gabino-Alejandro Carriedo**



Antes que hombres de Ciencia, deberíamos ser hombres.  
**Albert Einstein**



*A Pablo, mi hermano.  
Por ser el único capaz de  
ver el bosque en su conjunto*

*A mis padres y a mi hermana.*



|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>  | <b>1</b>  |
| <b>2. OBJETIVOS .....</b>  | <b>9</b>  |
| <b>3. ANTECEDENTES .....</b>   | <b>13</b> |
| 3.1 Lípidos alimentarios .....   | 15        |
| 3.1.1 Nomenclatura de los ácidos grasos .....  | 16        |
| 3.1.2 Metabolismo lipídico.....  | 19        |
| 3.1.3 Ácidos grasos esenciales .....   | 23        |
| 3.1.4. Biosíntesis de los eicosanoides .....   | 25        |
| 3.2 Efectos beneficiosos de los PUFA n-3 sobre la salud humana....   | 29        |
| 3.2.1. Enfermedad cardiovascular .....   | 30        |
| 3.2.2. Función de los PUFA en la gestación y la lactancia. ....  | 36        |
| 3.2.3. Sistema inmune .....  | 42        |
| 3.2.4. Efectos anticancerígenos .....  | 45        |
| 3.2.5. Requerimientos e ingesta recomendada de PUFA n-3 ....   | 47        |
| 3.3 Suplementación lipídica en la dieta del rumiante .....   | 49        |
| 3.3.1. Control de la ingesta del rumiante.....   | 49        |
| 3.3.2. Metabolismo de los ácidos grasos en el rumen y la<br>glándula mamaria .....                                 | 53        |
| 3.3.3. Métodos de protección de la grasa frente al<br>metabolismo ruminal.....                                     | 58        |
| 3.3.4. Efecto de la suplementación de la dieta con grasa<br>sobre la producción y la composición de la leche. .... | 60        |
| 3.4. Utilización metabólica de los PUFA n-3 por el rumiante.....   | 63        |

|  |            |
|--|------------|
| 3.4.1. Digestibilidad.....   | 63         |
| 3.4.2. Termogénesis inducida por la dieta .....  | 71         |
| 3.5. Papel de los PUFA sobre la eficiencia reproductiva del ganado cabrío .....  | 73         |
| 3.5.1. Suplementación de la dieta con grasa y actividad reproductora del rumiante.....   | 73         |
| 3.5.2. Causas que determinan el efecto de la grasa sobre la capacidad reproductora.....  | 74         |
| 3.5.3. Nutrición de la hembra gestante.....  | 89         |
| 3.6 Composición y calidad de la leche de cabra .....   | 92         |
| 3.6.1 Composición de la leche. Aspectos comparativos entre las leches de cabra, vaca y oveja.....                                | 92         |
| 3.6.2. Composición y características de la proteína.....   | 94         |
| 3.6.3. Composición de la grasa. Perfil en ácidos grasos .....  | 97         |
| 3.6.4. Aspectos saludables de la leche de cabra.....   | 100        |
| 3.7. Efecto de los PUFA en el crecimiento del neonato.....   | 105        |
| 3.8. Composición y calidad de la canal de los cabritos.....  | 108        |
| 3.8.1. Composición en ácidos grasos de la canal al nacimiento.....   | 108        |
| 3.8.2. Composición y calidad en ácidos grasos de la canal de los neonatos.....   | 111        |
| <b>4. DESARROLLO EXPERIMENTAL .....</b>  | <b>115</b> |
| <b>5. PUBLICACIONES .....</b>  | <b>129</b> |
| 5.1. Polyunsaturated fatty acids and parasitism: effect of a diet supplemented with fish oil on the course of rat trichinellosis | 133        |

|  |            |
|--|------------|
| 5.2. Thermogénesis associated to the intake of a diet non-supplemented or supplemented with n-3 polyunsaturated fatty acid-rich fat, determined in rats receiving the same quantity of metabolizable energy..... | 147        |
| 5.3. Effect of rumen-protected supplements of fish oil on intake, digestibility and nitrogen balance of growing goats.....   | 157        |
| 5.4. Effect of providing a polyunsaturated fatty acid-rich protected fat to lactating goats on growth and body composition of suckling goat kids.....  | 167        |
| 5.5. Efecto de la utilización de un concentrado suplementado con una grasa rica en ácidos grasos poliinsaturados n-3 sobre la capacidad reproductora de la cabra de raza malagueña. ....                         | 175        |
| 5.6. Composición al nacimiento de cabritos cuyas madres fueron alimentadas con un concentrado suplementado con una grasa protegida rica en ácidos grasos poliinsaturados n-3. ....                               | 183        |
| <b>6. DISCUSIÓN GENERAL.....</b>   | <b>191</b> |
| 6.1 Aceite de pescado rico en PUFA n-3 y parasitosis.....  | 194        |
| 6.2 Aceite de pescado rico en PUFA n-3 y termogénesis .....  | 196        |
| 6.3 Aceite de pescado rico en PUFA n-3, ingesta y digestibilidad..   | 200        |
| 6.4 Aceite de pescado rico en PUFA n-3 y reproducción.....   | 209        |
| 6.5 Aceite de pescado rico en PUFA n-3, composición tisular y crecimiento .....  | 214        |
| 6.6. Aceite de pescado rico en PUFA n-3 y calidad de la leche.....   | 219        |
| 6.7 Aceite de pescado rico en PUFA n-3 y calidad de la canal.....  | 222        |
| <b>7. CONCLUSIONES.....</b>  | <b>225</b> |
| <b>Bibliografía.....</b>   | <b>229</b> |



## *Abreviaturas*

|             |                                       |
|-------------|---------------------------------------|
| <b>AA</b>   | Ácido araquidónico                    |
| <b>AE</b>   | Ácido esteárico                       |
| <b>AG</b>   | Ácidos grasos.                        |
| <b>AGE</b>  | Ácidos grasos esenciales              |
| <b>AGMI</b> | Ácidos grasos monoinsaturados (MUFA)  |
| <b>AGNE</b> | Ácidos grasos no esterificados (NEFA) |
| <b>AGS</b>  | Ácidos grasos saturados (SFA)         |
| <b>BHA</b>  | Hidroxianisol butilado                |
| <b>BHB</b>  | $\beta$ -hidroxibutirato              |
| <b>BHT</b>  | Hidroxitolueno butilado               |
| <b>CLA</b>  | Ácido linoleico conjugado             |
| <b>DHA</b>  | Ácido docosahexaenoico                |
| <b>DPA</b>  | Ácido docosapentaenoico               |
| <b>ECV</b>  | Enfermedades cardiovasculares         |
| <b>EPA</b>  | Ácido eicosapentaenoico               |
| <b>FAD</b>  | Fibra ácido detergente (ADF)          |
| <b>FFA</b>  | Ácidos grasos libres                  |
| <b>FND</b>  | Fibra neutro detergente (NFD)         |
| <b>FSH</b>  | Hormona folículo estimulante          |
| <b>HDL</b>  | Lipoproteínas de alta densidad        |
| <b>HETE</b> | Ácidos hidroxieicosatetraenoicos      |

|               |   |
|---------------|---|
| <b>IFI</b>    | Inmunofluorescencia indirecta                 |
| <b>IFN</b>    | Interferón                                    |
| <b>IGF-1</b>  | Factor de crecimiento dependiente de insulina |
| <b>IL</b>     | Interleuquina                                 |
| <b>LA</b>     | Ácido linoleico                               |
| <b>LCPUFA</b> | Ácidos grasos poliinsaturados de larga cadena |
| <b>LDL</b>    | Lipoproteínas de baja densidad                |
| <b>LH</b>     | Hormona luteinizante                          |
| <b>LNA</b>    | Ácido $\alpha$ -linolénico                    |
| <b>LT</b>     | Leucotrienos                                  |
| <b>MCT</b>    | Triglicéridos de media cadena                 |
| <b>MO</b>     | Materia orgánica (OM)                         |
| <b>MS</b>     | Materia seca (DM)                             |
| <b>n-3</b>    | Omega 3                                       |
| <b>NAD</b>    | Dinucleótido de nicotinamida y adenina        |
| <b>NEFA</b>   | Ácidos grasos no esterificados (AGNE)         |
| <b>NNP</b>    | Nitrógeno no proteico                         |
| <b>OMS</b>    | Organización Mundial de la Salud              |
| <b>PFO</b>    | Aceite de pescado protegido                   |
| <b>PG</b>     | Prostaglandina                                |
| <b>PGFM</b>   | 15-ceto-13,14-dihidroprostaglandina           |
| <b>PUFA</b>   | Ácidos grasos poliinsaturados (AGP)           |
| <b>TX</b>     | Tromboxanos                                   |

# 1. Introducción

---



Las virtudes que se atribuyen a determinados alimentos han sido objeto de estudio desde hace miles de años hasta la actualidad. Basta recordar la frase propuesta por Hipócrates, “que la alimentación sea tu única medicina y que la medicina sea tu alimentación” para contrastar que la preocupación por la dieta no es tan reciente como parece.

Desde entonces el mundo ha cambiado mucho para el homínido en lo referente a hábitos y modo de vida. Eduardo Punset, en su libro “El viaje a la felicidad”, acierta al reivindicar que la revolución científica ha desatado el cambio más importante de toda la historia de la evolución en forma de prolongación de la esperanza de vida en los países “desarrollados”, que ha generado más de cuarenta años redundantes en términos evolutivos. Hace poco más de un siglo la esperanza de vida en Europa era de treinta años (como la de Sierra Leona en la actualidad), lo justo para culminar con éxito la máxima evolutiva de reproducirse. Por primera vez en la historia, el ser humano tiene un futuro que va más allá de la reproducción, esta parcial independencia del autoritarismo genético que nos gobierna ha desencadenado innumerables esfuerzos encaminados y dirigidos a alargar la esperanza de vida y a mejorar la calidad de la misma.

Los nuevos conocimientos científicos y tecnológicos, junto con la transformación de los hábitos de consumo alimentario y la drástica modificación del papel que, en la dieta cotidiana, representa cada alimento, hacen que la calidad de cualquier alimento destinado al consumo humano dependa de sus beneficios potenciales para la salud, más allá de sus efectos nutricionales (Es, 1991).

Dentro de este marco, los lípidos constituyen uno de los principios inmediatos más importantes de la nutrición por su extraordinaria capacidad para satisfacer las demandas energéticas de nuestro organismo, por su función como componentes estructurales y moduladores de las membranas celulares, por su contribución como precursores de metabolitos biológicamente activos y su importancia como sustancias de reserva (Linscheer y Vergoesen, 1994). En la actualidad, la grasa de la dieta es motivo de preocupación por la mayor parte de la población en los países

“desarrollados”, tanto por la cantidad ingerida y el aporte calórico de la misma, como por su calidad e implicación en la salud (Mataix, 2002). El avance en el conocimiento de las propiedades y mecanismos de actuación de los ácidos grasos, nos permite diseñar dietas con proporciones saludables de lípidos, considerándose de vital importancia mantener un equilibrio óptimo entre las diferentes familias de ácidos grasos (saturados, monoinsaturados y poliinsaturados) y dentro de los poliinsaturados entre los ácidos grasos n-6 y n-3, equilibrios que suelen estar gravemente descompensados debido a los hábitos alimenticios actuales (FAO/OMS 1997 y 2003; Simolopoulos, 2002).

Las autoridades sanitarias recomiendan aumentar el consumo de PUFA n-3, en especial los de cadena larga (EPA y DHA), cuya fuente principal es el pescado (Schmidt y col., 2001; FAO/OMS, 2003). En esta línea, una forma eficaz de aumentar la ingesta es la fortificación o adición de ácidos grasos n-3 a alimentos de uso cotidiano (Trautwein, 2001). Se ha demostrado que la leche es el vehículo más eficaz para absorber las grasas, puesto que los lípidos de la leche se encuentran en forma de micelas y su absorción, en comparación con otros alimentos, es muy elevada (Carrero y col., 2005). Asimismo, desde el punto de vista de una alimentación humana saludable, es importante destacar las peculiaridades que tiene la leche de cabra (estructura física y perfil químico de su grasa, características de sus fracciones proteicas y de sus carbohidratos, propiedades digestivas, mínimas reacciones alérgicas, etc.) que aconsejan su empleo, al menos en personas con intolerancias a la leche de vaca o con patologías que precisen alimentos de fácil digestión y utilización de sus nutrientes (Boza y Sanz Sampelayo, 1997; Alférez y col., 2001; Haenlein, 2004).

En este sentido, numerosas líneas de investigación dentro de la comunidad científica gravitan sobre la necesidad de obtener una mejora en la calidad de la leche (Offer y col., 1999; Chilliard y col., 2001), modificando su perfil en ácidos grasos para hacerla más saludable, y así satisfacer a una fracción creciente de consumidores que demanda alimentos que puedan contribuir a paliar el déficit en ácidos grasos n-3 que sufre parte de la población (Simolopoulos, 2002, FAO/OMS, 2003).

Nuestro grupo, ya en el año 2000, había conseguido un eficaz método de protección de la grasa frente al rumen que permite modificar el perfil en ácidos grasos de la leche mediante la suplementación de la dieta con aceite de pescado azul en forma de sales cálcicas (Sanz Sampelayo y col., 2000, 2002, 2004). En concreto, la línea de investigación pretendía incrementar la cantidad en ácidos grasos n-3 de la leche para obtener un alimento funcional que mejorase los que existían en el mercado. La diferencia con otros productos similares radica en que las leches comercializadas, enriquecidas con ácidos grasos poliinsaturados n-3, se obtienen por adición de los ácidos grasos a la leche, mientras que nuestro método adiciona los lípidos (protegidos frente al metabolismo ruminal) al pienso del animal, de manera que la leche enriquecida es sintetizada por el rumiante de forma natural. La técnica de protección de la grasa en forma de sales cálcicas está, a su vez, protegida por la patente de invención nº 2 136 536: “Producto y procedimiento de obtención de una grasa protegida para incluir en las dietas de los rumiantes” (Boza y col., 1999).

A la hora de suplementar una dieta con grasa, hay que tener en cuenta que los sistemas reguladores del animal están íntimamente conexos, así el desarrollo corporal, metabolismo de proteínas, grasas e hidratos de carbono, recambio energético, mineral y electrolítico, equilibrio hídrico, la reproducción, el sistema inmune y la secreción láctea, no pueden funcionar con independencia. En este sentido, además de los contrastados efectos beneficiosos de los PUFA n-3 frente a las enfermedades cardiovasculares (Kris-Etherton y col., 2002), numerosos estudios los relacionan con el sistema inmune (Calder y col., 2002), con la función reproductiva (Burke y col., 1997), la obtención de energía (Schingoethe, 1996), el crecimiento (Koletzko y Braun, 1991; Uauy y col., 2000) y el desarrollo de determinados órganos y tejidos (San Giovanni y col., 2000; Kitajka y col., 2002). Por ello, se planteó la necesidad de realizar una investigación global sobre los efectos de la ingesta de cierta cantidad de PUFA sobre el metabolismo y la fisiología de los animales cuya dieta se iba a suplementar, resultados que en algunos casos podrían ser extrapolables

entre especies, proporcionando información sobre posibles efectos de los PUFA n-3 en el consumidor humano.

Por lo tanto, el reto de este estudio consistía en suplementar la dieta de la cabra granadina y malagueña con una cantidad óptima de PUFA n-3, protegidos frente al metabolismo ruminal y posteriores procesos oxidativos, que cumpliera el doble objetivo de, por una parte, producir una leche con una cantidad de PUFA n-3 suficiente para tener un potencial efecto beneficioso sobre el consumidor humano y una canal equivalentemente enriquecida de los cabritos gestados y alimentados por las madres que tomaron el suplemento lipídico; y por otra parte, resultaba imprescindible contrastar el efecto global de la ingesta de la grasa protegida sobre la fisiología del animal para generar nuevos conocimientos sobre los efectos de la suplementación y asegurarnos que su ingesta fuese, al menos, no perjudicial para los animales objeto de estudio.

Para que los dos nuevos productos logrados sean útiles, el proceso de obtención de estos alimentos enriquecidos en PUFA n-3 debe ser rentable para el ganadero y asequible para el consumidor final, por lo que en este trabajo también se han estudiado aspectos claves en la economía de los ganaderos. Para ello, se ha determinado la digestibilidad individual de cada ácido graso de la dieta y su utilización metabólica, hemos contrastado el efecto de la grasa protegida sobre los índices de fertilidad y prolificidad de las cabras cuya dieta fue suplementada, y se ha estudiado su posible efecto sobre algunos parámetros inmunológicos. También, se ha comprobado el efecto de la leche enriquecida en ácidos grasos n-3 sobre la fisiología de los cabritos gestados y amamantados por las madres que fueron alimentadas con el pienso suplementado, prestando especial atención a la tasa de mortalidad, tasa de crecimiento, desarrollo tisular pre y postnatal y a la calidad de la canal.

Nuestra intención ha sido generar nuevos conocimientos desde el mayor rigor científico que, además de publicarse “en las mejores revistas internacionales”, pudiesen ser aplicados a una realidad muy concreta y así repercutir en beneficio de la sociedad.

Parte de los resultados de la presente Tesis Doctoral han sido objeto de publicaciones que se presentan en esta memoria directamente en el formato requerido por las diferentes revistas. Los trabajos que permiten presentar esta memoria de Tesis Doctoral en la modalidad de “reagrupamiento de trabajos de investigación publicados” son los siguientes:

- Polyunsaturated fatty acids and parasitism: effect of a diet supplemented with fish oil on the course of rat trichinellosis.  
**Veterinary Parasitology, 2003.**
- Effect of rumen-protected supplements of fish oil on intake, digestibility and nitrogen balance of growing goats.  
**Animal Science, 2004.**
- Thermogenesis associated to the intake of a diet non-supplemented or supplemented with n-3 polyunsaturated fatty acid-rich fat, determined in rats receiving the same quantity of metabolizable energy. **Annals of Nutrition & Metabolism, 2006.**
- Effect of providing a polyunsaturated fatty acid-rich protected fat to lactating goats on growth and body composition of suckling goat kids. **Animal Science, 2006.**
- Efecto de la utilización de un concentrado suplementado con una grasa rica en ácidos grasos poliinsaturados n-3 sobre la capacidad reproductora de la cabra de raza malagueña.  
IX Jornadas Internacionales de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia, 2005.
- Composición al nacimiento de cabritos cuyas madres fueron alimentadas con un concentrado suplementado con una grasa protegida rica en ácidos grasos poliinsaturados n-3.  
IX Jornadas Internacionales de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia, 2005.

Otras publicaciones realizadas durante el periodo en el que se desarrolló la presente Tesis Doctoral son las siguientes:

- Alternatives for Improving Physical, Chemical, and Sensory Characteristics of Goat Cheeses: The Use of Arid-Land Forages in the Diet. *Journal of Dairy Science*, 2006.
- Digestive utilization of the fat and individual fatty acids of a protected fat rich in PUFAs in goats. *Options Méditerranéennes*, 2005.
- Kid goat adipose deposits fatty acid composition in response to maternal intake of a protected fat rich in PUFAs during gestation and/or lactation. *Options Méditerranéennes*, 2005.
- Calidad de la leche de los pequeños rumiantes. *Anales de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental*, 2003.
- Calidad de la carne: vías a utilizar en su posible mejora. *Anales de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental*, 2002.

Además, parte de los resultados obtenidos se han divulgado en los siguientes congresos:

- International Congress of Meat Science and Technology. Roma, 2002.
- First Joint Seminar of the FAO-CIHEAM. Sheep and Goat Nutrition and Mountain and Mediterranean Pastures Sub-Networks. Granada, 2003.
- IX European Multicolloquium of Parasitology. Symposium on Trichinella and Trichinellosis. Valencia, 2004.
- 27<sup>th</sup> World Congress of Internal Medicine. Granada, 2004.
- IX Jornadas Internacionales de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia, 2005.

## 2. Objetivos

---



El objetivo del presente estudio consiste en determinar los efectos de los ácidos grasos poliinsaturados n-3 sobre diferentes aspectos de la fisiología animal, así como su utilización a nivel metabólico, para verificar una posible intervención en la cadena alimentaria y obtener leche y carne de forma natural, con una cantidad de ácidos grasos poliinsaturados n-3 suficiente para tener un efecto saludable en el consumidor humano.

### **Objetivos específicos**

- Estudio del efecto del aceite de pescado rico en PUFA n-3 sobre algunos parámetros del sistema inmune en enfermedades parasitarias.
- Utilización metabólica de los PUFA n-3 como fuente de energía. Estudio de la termogénesis inducida por una dieta suplementada con aceite de pescado.
- Efecto de la suplementación lipídica sobre la ingesta y la digestibilidad aparente de la dieta.
- Efecto del suplemento sobre la función reproductiva. Rentabilidad ganadera a partir de los índices de fertilidad y prolificidad.
- Efecto de los PUFA n-3 sobre la composición tisular de los cabritos al nacimiento y sobre el crecimiento de los neonatos.
- Obtención de una leche de carácter funcional para el consumidor humano enriquecida de forma natural en PUFA n-3.
- Obtención de una canal de carácter funcional para el consumidor humano de los cabritos gestados y amamantados por las madres que se alimentaron con la dieta suplementada con aceite de pescado.



### 3. Antecedentes

---



### **3.1 Lípidos alimentarios.**

Los lípidos son un grupo heterogéneo de compuestos vinculados más por sus propiedades físicas que por las químicas. Tienen la propiedad común de ser relativamente insolubles en agua y solubles en solventes no polares (Murray y col., 2001).

Las grasas alimentarias incluyen todos los lípidos de los tejidos vegetales y animales que se ingieren con los alimentos. Las grasas o aceites más frecuentes son una mezcla de triacilglicéridos o triglicéridos con cantidades menores de otros lípidos (FAO/OMS, 1997). En los alimentos y en el cuerpo humano hay tres clases de lípidos: los triglicéridos, los fosfolípidos, los glucolípidos y los ésteres de colesterol. Desde un punto de vista alimentario, los componentes lipídicos cualitativamente y cuantitativamente más importantes y característicos son los triglicéridos o triacilglicerol. Estos compuestos son ésteres de glicerol con ácidos grasos que tienen un gran contenido energético y forman parte de todos los aceites y grasas que se conocen. El tipo de ácidos grasos y la posición en la cual se esterifican con el glicerol determinan las características de los triglicéridos. (Murray y col., 2001)

Los fosfolípidos y los glucolípidos son lípidos complejos esenciales con funciones estructurales y fisiológicas, puesto que forman parte de las membranas celulares y modulan su actividad. Los fosfolípidos están compuestos por una molécula de glicerol, dos ácidos grasos, un grupo fosfato y un grupo hidrófilo, mientras los glucolípidos contienen azúcares (Murray y col., 2001).

Los ésteres de colesterol también son componentes estructurales de las membranas. Están formados por colesterol y un ácido graso. El colesterol tiene un extraordinario interés biológico, puesto que, además de formar parte de las membranas, es precursor de esteroides hormonales, ácidos biliares y vitamina D (Mataix, 2002).

### 3.1.1 Nomenclatura de los ácidos grasos

Por lo general, los ácidos grasos de interés biológico son los ácidos carboxílicos de número par de átomos de carbono. Se pueden clasificar en cuatro grupos de acuerdo con la longitud de su cadena:

- Ácidos grasos de cadena corta (4-6 átomos de carbono)
- Ácidos grasos de cadena media (8-12 átomos de carbono)
- Ácidos grasos de cadena larga (14-18 átomos de carbono)
- Ácidos grasos de cadena muy larga (20 o más átomos de carbono)

Por otra parte, los ácidos grasos pueden ser saturados, tener un doble enlace (monoinsaturados o monoenoicos) o más dobles enlaces (poliinsaturados o polienoicos). El punto de fusión de los ácidos grasos con un número par de carbonos se incrementa con la longitud de la cadena y disminuye de acuerdo con la insaturación. Los lípidos de membrana deben estar líquidos a todas las temperaturas ambientales, por lo que son más insaturados que los lípidos de almacenamiento. El grado de insaturación de las membranas celulares modula las propiedades de las mismas (Murray y col., 2001, Mataix, 2002).

Los ácidos grasos naturales presentan un tipo de isomería geométrica, la disposición espacial de los hidrógenos en los enlaces simples es *trans*, mientras que los dobles enlaces adoptan casi siempre una conformación de tipo *cis*, lo que origina un ángulo de aproximadamente 120° en dicha posición y, por tanto, un acomodamiento de la molécula. Al aumentar el número de dobles enlaces, se origina una importante curvatura en la molécula del ácido graso con relevantes repercusiones en la conformación de los triglicéridos y fosfolípidos que contienen a estos ácidos grasos (Mataix, 2002).

Aunque no son mayoritarios, también hay ácidos grasos con dobles enlaces en posición *trans*. Éstos proceden de modo natural de la grasa de la leche y de la carne de los rumiantes formados por la microbiota de estos

animales. También se pueden originar por transformación química de los ácidos naturales en determinados procesos tecnológicos (Mataix, 2002). Los AG con doble enlaces saturados *trans* son rectos, por lo que sus propiedades biológicas cambian, relacionándolos varios estudios con la hipercolesterolemia (Mensink y Katan, 1990; FAO/OMS, 1997; Jude y col., 1994).

La nomenclatura sistemática de uso más frecuente se basa en la designación de los ácidos grasos de acuerdo con el hidrocarburo que posee el mismo número y disposición de átomos de carbono, sustituyendo la -o final en el nombre del hidrocarburo por la terminación -oico. Por tanto los AG saturados terminan en -anoico, y los AG insaturados en -enoico. Los átomos de carbono se numeran a partir del carbono del carboxilo (carbono nº 1 o  $\alpha$ -carbono), así hasta el carbono de la terminal metilo que se conoce como el átomo de carbono omega (n- carbono o  $\omega$ -carbono). Además del nombre sistemático, los AG naturales más frecuentes suelen tener un nombre común (Murray y col., 2001).

Sin embargo, atendiendo a razones fisiológicas, resulta mucho más útil y simple indicar exclusivamente el número de átomos de carbono, el número de dobles enlaces y la posición del primero de ellos contando a partir del carbono terminal no carboxílico, añadiendo  $\omega$  o **n**. Como ejemplo, el ácido linolenico se denomina como 18:3  $\omega$ -3 o 18:3 n-3 o C18:3  $\omega$ -3 o C18:3 n-3. Se indica así que hay un doble enlace en el carbono 3 contando a partir del metilo terminal y otros dos dobles enlaces situados a partir de éste de manera no conjugada, quedando siempre un metileno entre ellos, por tanto, el siguiente enlace se encuentra en posición omega 6 y el último en omega 9 (Mataix, 2002).

En la tabla 1 se detalla el nombre común, el nombre químico sistemático y la abreviatura de los ácidos grasos más frecuentes en alimentos de consumo habitual. Los dobles enlaces están en configuración *cis*.

### 3. Antecedentes

**Tabla 1. Nomenclatura de los ácidos grasos alimentarios más frecuentes.**

| Nombre común                 | Nombre sistemático               | Abrev. | Familia |
|------------------------------|----------------------------------|--------|---------|
| Butírico                     | butanoico                        | 4:0    |         |
| Caproico                     | hexanoico                        | 6:0    |         |
| Caprílico                    | Octanoico                        | 8:0    |         |
| Cáprico                      | decanoico                        | 10:0   |         |
| Láurico                      | dodecanoico                      | 12:0   |         |
| Mirístico                    | tetradecanoico                   | 14:0   |         |
| Palmítico                    | hexadecanoico                    | 16:0   |         |
| Estearico                    | octadecanoico                    | 18:0   |         |
| Araquídico                   | eicosanoico                      | 20:0   |         |
| Behénico                     | docosanoico                      | 22:0   |         |
| Lignocérico                  | tetracosanoico                   | 24:0   |         |
| Palmitoleico                 | 9-hexadecenoico                  | 16:1   | n-7     |
| Oleico                       | 9-octadecenoico                  | 18:1   | n-9     |
| Gadoleico                    | 11-eicosaenoico                  | 20:1   | n-9     |
| Cetoleico                    | 11-docasaenoico                  | 22:1   | n-11    |
| Erúxico                      | 13-docasaenoico                  | 22:1   | n-9     |
| Nervónico                    | 15-tetracosanoico                | 24:1   | n-9     |
| Linoleico                    | 9,12-octadecadienoico            | 18:2   | n-6     |
| $\alpha$ -linolénico         | 9,12,15-octadecatrienoico        | 18:3   | n-3     |
| $\gamma$ -linolénico         | 6,9,12-octadecatrienoico         | 18:3   | n-6     |
| Dihomo- $\gamma$ -linolénico | 8,11,14-eicosatrienoico          | 20:3   | n-6     |
|                              | 5,8,11-eicosatrienoico           | 20:3   | n-9     |
| Araquidónico                 | 5,8,11,14-eicosatetraenoico      | 20:4   | n-6     |
| EPA                          | 5,8,11,14,17-eicosapentaenoico   | 20:5   | n-3     |
| Adrénico                     | 7,10,13,16-docosatetraenoico     | 22:4   | n-6     |
|                              | 7,10,13,16,19-docosapentaenoico  | 22:5   | n-3     |
| DPA                          | 4,7,10,13,16-docosapentaenoico   | 22:5   | n-6     |
| DHA                          | 4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico | 22:6   | n-3     |

Consulta FAO/OMS de expertos sobre grasas y aceites en la nutrición humana. Roma, 1997.

### 3.1.2 Metabolismo lipídico

El metabolismo de los ácidos grasos se considera el eje de los recursos energéticos en el ser humano. La principal fuente de energía, normalmente es de naturaleza lipídica, puesto que éstos, aportan aproximadamente 9 Kcal /gramo, frente a las 4 Kcal / gramo con que contribuyen los hidratos de carbono (Lehninger, 1993). Debido a esta condición, su regulación es de gran importancia, pues alteraciones en los procesos metabólicos de las grasas se asocian con diversas patologías que pueden derivar, entre otras, en enfermedades cardiovasculares, del sistema inmune y nervioso, y cáncer (Ruxton y col., 2004).

La digestión de los lípidos comienza en la boca, donde como respuesta a la masticación y a los estímulos nerviosos se segrega la lipasa lingual, que hidroliza algunos enlaces ésteres de los ácidos grasos de cadena corta y media (preferentemente de los que se encuentran unidos a los carbonos 1 y 3) de los triglicéridos. Éstos pasan al estómago donde interviene la lipasa gástrica. La emulsión formada en el estómago pasa por el píloro al duodeno, donde se liberan sales biliares, se favorece una microemulsión y actúa la lipasa pancreática que cataliza la transformación de todos los triglicéridos en ácidos grasos libres y 2-monoglicéridos. Además, el jugo pancreático contiene las enzimas: fosfolipasa A2, colesterol esterasa y colipasa, que hidrolizan fosfolípidos y ésteres del colesterol (García-Muriana, 2002).

Todos los productos de la digestión de los triglicéridos participan en la formación de micelas mixtas, que atraviesan la membrana de los enterocitos de la mucosa intestinal, con la ayuda activa de la propia lipasa pancreática y proteínas específicas de la superficie celular. En el citoplasma del enterocito tiene lugar la reconversión secuencial de los ácidos grasos y 2-monoglicéridos en triglicéridos. Estos triglicéridos, junto con otros lípidos resintetizados (fosfolípidos y ésteres de colesterol), migran en forma de vesículas desde la región apical hacia la basal del enterocito (en su tránsito se incorpora una proteína específica,

### *3. Antecedentes*

---

apolipoproteína B-48), hasta formar los quilomicrones. Mediante un proceso de exocitosis, los quilomicrones se segregan a los capilares linfáticos del plexo mesentérico, de donde pasan a los vasos linfáticos y finalmente al torrente circulatorio. Las lipoproteínas los transportan por el organismo hasta los diferentes tejidos, donde son utilizados como fuente de energía, como componentes estructurales de las membranas, como precursores de metabolitos biológicamente activos o son almacenados como reserva (Linscheer y Vergroesen, 1994; Lehninger, 1993; Devlin, 1997).

En el torrente sanguíneo los quilomicrones interaccionan con dos enzimas que probablemente actúen de manera coordinada: la lipoproteína lipasa, con actividad hidrolítica sobre los triglicéridos, y la lipasa endotelial, con actividad hidrolítica sobre los fosfolípidos; se produce la lipólisis de los triglicéridos, y los ácidos grasos, que se liberan en las proximidades de las células del endotelio, se incorporan a su metabolismo. Aquellos triglicéridos que no se utilizan inmediatamente después del periodo postprandial se almacenan en forma de gotas de grasa en el interior de las células del tejido adiposo. Durante el periodo interdigestivo, los ácidos grasos del tejido adiposo “se movilizan”, se produce la hidrólisis de los triglicéridos catalizada por una lipasa presente en el citoplasma de los adipocitos, y unidos a la albúmina son transportados en sangre hasta que son captados y convenientemente metabolizados por las células del organismo. El hígado, músculo esquelético, corazón y corteza renal son los principales aceptores de estos ácidos grasos, donde producen energía por oxidación. En el hígado los ácidos grasos también pueden participar en la formación de las lipoproteínas de muy baja densidad, regulándose el suministro de ácidos grasos a los tejidos extrahepáticos (Linscheer y Vergroesen, 1994; Lehninger, 1993; Devlin, 1997).

#### **Oxidación de los ácidos grasos**

Los ácidos grasos procedentes de la hidrólisis de los triglicéridos se acumulan en el citoplasma celular, mientras las enzimas de la oxidación de

dichos ácidos grasos se encuentran en la matriz mitocondrial. El problema se resuelve mediante la “activación” de los ácidos grasos y su transporte activo hasta el interior de la mitocondria. En primer lugar, el ácido graso se transforma en acil-CoA por distintas isoenzimas de la acil-CoA sintetasa. A continuación, se produce una transesterificación del grupo acilo de este sustrato a la carnitina por la carnitina acil transferasa I, de manera que el producto formado, acil-carnitina, difunde unido al transportador acil-carnitina/carnitina por la membrana mitocondrial hacia el interior de la mitocondria; donde tiene lugar la liberación del ácido graso, de nuevo en forma de de acil-CoA, por la carnitina acil transferasa II (Lehninger, 1993; García Muriana, 2002).

En el interior de la mitocondria, la oxidación de los ácidos grasos se produce en tres fases. La primera fase se denomina  $\beta$ -oxidación, y consiste en la eliminación oxidativa de unidades sucesivas de dos átomos de carbono en forma de acetil-CoA a partir del extremo carboxilo de la cadena de ácido graso. En la segunda fase de la oxidación, los residuos acetilo del acetil-CoA se oxidan a  $\text{CO}_2$  por la vía del ciclo del ácido cítrico. Las dos primeras fases de la oxidación de los ácidos grasos reducen los transportadores electrónicos a NADH y  $\text{FADH}_2$ , que en la tercera fase donarán sus electrones a la cadena transportadora mitocondrial donde se forma ATP. De este modo, la energía liberada por la oxidación de los ácidos grasos se conserva en moléculas de ATP (Lehninger, 1993).

Los peroxisomas también contienen enzimas capaces de oxidar los ácidos grasos hasta acetil-CoA. La única diferencia significativa radica en la producción de  $\text{FADH}_2$ , que interacciona directamente con una molécula de oxígeno para producir  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Esta molécula es muy reactiva, tiene propiedades oxidativas y se metaboliza rápidamente por la catalasa en  $\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{O}_2$ . Por lo tanto, en los peroxisomas, la energía no se conserva en forma de ATP sino que se disipa en forma de calor. La oxidación peroxisomal es fundamentalmente de ácidos grasos de corta y media cadena. Un nivel elevado de grasa en la dieta produce un aumento de la síntesis de enzimas de la  $\beta$ -oxidación peroxisómica en el hígado de mamíferos. El acetato producido por la oxidación de los ácidos grasos se exporta al exterior de

### 3. Antecedentes

---

los peroxisomas. Presumiblemente, parte de este acetato entra en las mitocondrias donde es oxidado (García Muriana, 2002; Lehninger, 1993).

Las moléculas de Acetil-CoA procedentes de la oxidación de los ácidos grasos en el hígado también pueden transformarse en los denominados “cuerpos cetónicos”: acetoacetato,  $\beta$ -hidroxibutirato y acetona (éste último es volátil y se exhala). En los tejidos extrahepáticos, el  $\beta$ -hidroxibutirato puede oxidarse a acetoacetato que se activa en forma de acetoacetil-CoA y se rompe en dos moléculas de Acetil-CoA que entran en el ciclo del ácido cítrico, constituyendo una fuente adicional de energía procedente del hígado para las células extrahepáticas (García Muriana, 2002).

#### **Biosíntesis de los ácidos grasos**

Los ácidos grasos se sintetizan en el citoplasma de las células, de manera que así se mantienen separados los procesos biosintéticos de los degradativos. La acetil-CoA carboxilasa (enzima limitante) transforma el acetil-CoA en malonil-CoA que es el sustrato de la ácido graso sintasa; este complejo multienzimático detiene su producción cuando el ácido graso formado es de 16 átomos de carbono. El ácido palmítico sintetizado podrá participar en diversas rutas metabólicas de elongación y desaturación (Lehninger, 1993; Devlin, 1997).

La elongación del ácido palmítico tiene lugar en el retículo endoplasmático y en las mitocondrias. Las enzimas que participan, ácido graso elongasas, difieren en términos de especificidad por el sustrato. En el retículo endoplasmático, el proceso consiste en adición de dos átomos de carbono de una molécula de malonil-CoA al extremo carboxilo final del ácido graso “activado” como palmitoil-CoA. Pueden aumentar de tamaño tanto ácidos grasos saturados como insaturados, pero las elongasas prefieren como sustrato a los ácidos grasos insaturados. En las mitocondrias, para la elongación se utiliza el acetil-CoA como donador de átomos de carbono; es cuantitativamente menos importante que la elongación del retículo endoplasmático, y suele funcionar solo cuando el

potencial reductor de la mitocondria es alto (Lehninger, 1993; Devlin 1997).

La desaturación se cataliza por las acil-CoA desaturasas en el retículo endoplasmático liso, y consiste en una reacción en la que el ácido graso correspondiente como acil-CoA y el NADPH se oxidan por una molécula de oxígeno; además participan el citocromo b5 y la citocromo b5 reductasa. El ácido palmítico y el ácido esteárico son los precursores de los ácidos grasos monoinsaturados mayoritarios en nuestras células: el ácido palmitoleico y el ácido oleico. La desaturasa que cataliza este proceso se conoce como  $\Delta^9$ -desaturasa (García Muriana, 2002; Lehninger, 1993; Murray y col., 2001).

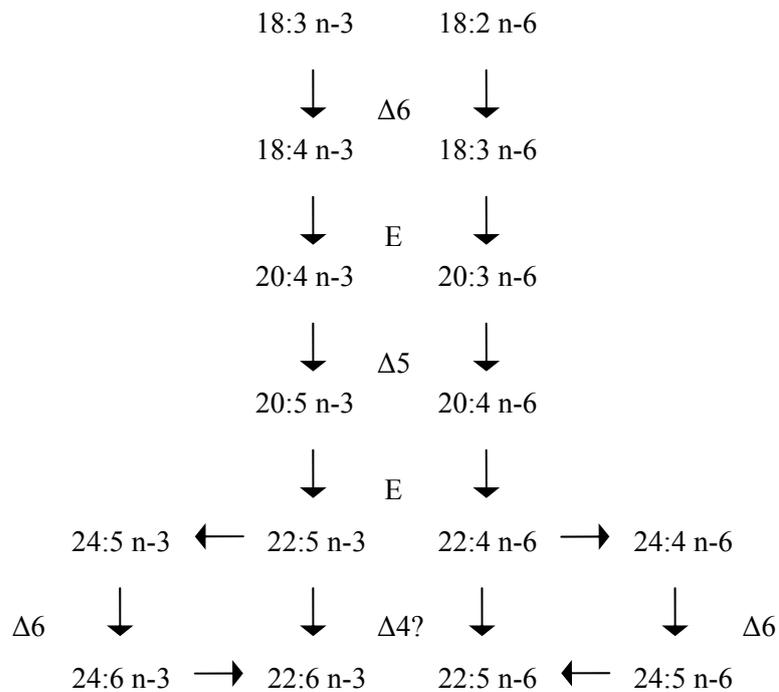
### 3.1.3 Ácidos grasos esenciales

Las células de los mamíferos no tienen las desaturasas capaces de introducir un doble enlace en los átomos de carbono 12 ( $\Delta^{12}$ - desaturasa) y 15 ( $\Delta^{15}$ - desaturasa) de los ácidos grasos; por lo tanto, no pueden sintetizar el ácido linoleico ni el ácido  $\alpha$ -linolénico, respectivamente. Estos ácidos grasos se consideran “esenciales” porque tienen que ser incorporados a nuestro metabolismo mediante la ingesta de alimentos que los contienen (Burr y Burr, 1929; Lehninger, 1993; Uauy y col., 1992; García Muriana, 2002). La carencia de ácidos grasos esenciales en la alimentación de los mamíferos conduce a trastornos en el crecimiento, cambios en la piel, alteraciones inmunológicas, neurológicas, serios cambios conductuales y cardiopatías (Innis, 1991).

Los ácidos grasos esenciales se utilizan para la síntesis de otros ácidos grasos poliinsaturados de larga cadena, de esta forma, el ácido linoleico (biológicamente inactivo) es el precursor de los ácidos grasos de la serie n-6; se transforma en ácido  $\gamma$ -linolenico mediante la enzima delta-6-desaturasa, éste último se elonga para formar el ácido dihomo- $\gamma$ -linolénico, que puede sufrir otra desaturación y convertirse en el ácido araquidónico gracias a la delta-5-desaturasa (Brenner, 1987; Linscheer y Vergroesen,

1994; Tolonen, 1995). El ácido  $\alpha$ -linolénico es el precursor de los ácidos grasos de la serie n-3, a partir de él se forman, entre otros, el ácido eicosapentaenoico y el ácido docosahexaenoico. En mujeres embarazadas se transforma un 9% de LNA en DHA (Burdge y Wootton, 2002), siendo este porcentaje superior al de los hombres, puesto que las mujeres utilizan preferentemente carbohidratos como fuente de energía (Jones y col., 1998), por lo que éstas, podrían tener una mayor disponibilidad de LNA para formar EPA y DHA (Burdge y Wootton, 2002).

**Figura 1. Desaturación y elongación de los ácidos grasos esenciales.**




---

$\Delta x$ :  $\Delta x$ -desaturasa; E: elongación.

Las enzimas desaturasas tienen preferencia por los ácidos grasos de la serie n-3 frente a los de la serie n-6, y en último lugar por los de la serie n-9. Las reacciones limitantes en la biosíntesis de los LCPUFA son aquellas en las que intervienen las  $\Delta$ -6 y  $\Delta$ -5 desaturasas (Linscheer y Vergroesen, 1994). La actividad  $\Delta$ -6 desaturasa es inhibida por altos niveles de sus productos o precursores y, por lo tanto, está influenciada por la ingesta en la dieta de dichos ácidos grasos y por gran número de hormonas (Brenner, 1977; Kinsella y col., 1990). Una alta ingesta de carbohidratos, también disminuye la actividad de la  $\Delta$ -6 desaturasa, mientras que las proteínas la activan. El glucagón, la adrenalina y la tiroxina actúan como depresoras de la actividad  $\Delta$ -6 desaturasa (Brenner, 1977). Asimismo, una deficiencia de minerales como zinc, selenio y magnesio reducen la actividad de la  $\Delta$ -5 y  $\Delta$ -6 desaturasa, mientras la insulina puede actuar como activador (Brenner, 1977).

El DHA y el EPA son considerados ácidos grasos esenciales en etapas tempranas del desarrollo de los mamíferos (periodos prenatal y postnatal temprano), puesto que, en estas etapas la síntesis de estos ácidos grasos a partir de sus precursores no es suficiente para cubrir los elevados requerimientos de este periodo de desarrollo (Smith, 2002). Los mamíferos recién nacidos necesitan ingerir DHA, bien de la madre o añadido a la fórmula láctea (Makrides y col., 1996; Hamosh y Salem, 1998; Cunnane y col., 1999b).

#### **3.1.4. Biosíntesis de los eicosanoides**

Los eicosanoides son ácidos carboxílicos de 20 átomos de carbono. Hay cuatro tipos: prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos e hidroxiácidos, los dos primeros presentan una estructura cíclica y los dos últimos lineal (Barber y Ponz, 1998).

Los eicosanoides derivan de los ácidos grasos de veinte carbonos, que se encuentran esterificados en la posición 2 de los fosfolípidos. La estructura de los fosfolípidos deriva del ácido fosfatídico (fosfoglicéridos),

### 3. Antecedentes

---

o bien de una ceramida esterificada con un grupo fosfato (esfigolípidos). Los ácidos grasos poliinsaturados de larga cadena n-6 y n-3 se almacenan preferentemente en los fosfoglicéridos. La síntesis de estos fosfolípidos comparte los mismos precursores que la síntesis de triglicéridos. Estos procesos de síntesis tienen lugar en la superficie del retículo endoplasmático liso (García Muriana, 2002).

Cuando nuestras células reciben estímulos específicos, se activan enzimas que hidrolizan los fosfolípidos de las membranas. Una de estas enzimas es la fosfolipasa A<sub>2</sub> (existen diferentes isoenzimas) que específicamente rompe el enlace éster en posición dos del fosfoglicérido y libera, sobre todo, ácido araquidónico. El AA es el ácido graso más importante como precursor de eicosanoides, éste se transforma en el retículo endoplasmático liso y en la membrana nuclear mediante reacciones de oxidación (Barber y Ponz, 1998; Wainwright, 2002). En estas reacciones participan las ciclooxigenasas (COX-1 y COX-2) que originan prostaglandinas, tromboxanos y prostaciclina (prostanoides de la serie 2) y las lipooxigenasas que originan leucotrienos, lipoxinas y (HETE) (prostanoides de la serie 4). Los eicosanoides también pueden derivar del ácido graso dihomo- $\gamma$ -linolénico (prostanoides de la serie 1) y del ácido eicosapentaenoico (prostanoides de la serie 3) (Barber y Ponz, 1998; Wainwright, 2002). La mayoría de los prostanoides de las series 2 y 4 tienen una existencia efímera, de minutos e incluso de segundos. Las prostaglandinas, tromboxanos y prostaciclina se relacionan con funciones secretoras, digestivas, reproductivas y circulatorias, entre otras, mientras que los leucotrienos y lipoxinas intervienen en respuestas alérgicas, inflamatorias e inmunes, y en la quimiotaxis (García Muriana, 2002).

Su regulación depende de los precursores y competidores que se incorporan en nuestro metabolismo mediante la dieta. Un ingesta excesiva del ácido  $\alpha$ -linolénico, inhibe la conversión del ácido linoleico en ácido  $\gamma$ -linolénico (por inhibición competitiva de la  $\Delta^6$ -desaturasa), de manera que disminuye la cantidad de prostanoides de la serie 2 (Brenner, 1977; Kinsella y col., 1990). Los ácidos grasos eicosapentaenoico y docosahexaenoico también desplazan al ácido araquidónico de los

compartimentos intracelulares, reduciendo su metabolismo y disponibilidad para las ciclooxigenasas y lipooxigenasas. Además el metabolismo de los ácidos grasos de la familia n-3 puede afectar los mecanismos de transducción intracelular y la expresión de genes asociados al metabolismo de los ácidos grasos de la familia n-6, puesto que el eicosapentaenoico, al competir con el araquidónico por las ciclooxigenasas y lipooxigenasas, puede descompensar la cantidad de prostanoídes a favor de los de las series 3 y 5, menos activos que los de las series 2 y 4. Por estos motivos es muy importante el balance entre la ingesta de ácidos grasos n-6 y n-3 (Simolopoulos 2002<sup>a</sup>). Por su parte, los prostanoídes de la serie 1 aumentan la concentración intracelular de AMP-cíclico, el cual inhibe la fosfolipasa A<sub>2</sub>, limitando la liberación del ácido araquidónico. (García Muriana, 2002).

Las prostaglandinas tienen un anillo de ciclopentano. Se detectan en casi todos los tejidos y líquidos orgánicos y con una producción que aumenta en respuesta a diversos estímulos, provocan un amplio espectro de efectos biológicos (Tolonen, 1995; Barber y Ponz, 1998).

Las prostaglandinas E ejercen diversas funciones útiles, destacando las siguientes: disminuye la tendencia de las plaquetas a la agregación, y por lo tanto disminuye el riesgo de formación de trombos; dilata los vasos sanguíneos contraídos; dilata las vías respiratorias, y por lo tanto previene la formación del moco, las infecciones y los ataques de asma; disminuye la producción de colesterol; refuerza los efectos de la insulina y mejora la actividad del sistema inmunitario, principalmente por su influencia en los linfocitos T (Tolonen, 1995). Las prostaglandinas I<sub>2</sub> también ejercen una función vasodilatadora, sin embargo, sobre la agregación plaquetaria actúan, al contrario que las PGE, como proagregante. Las prostaglandinas A también están relacionadas con la presión sanguínea, puesto que intervienen como vasodilatadoras. Las prostaglandinas F participan, junto a las PGE, en el control de la fisiología reproductiva (Tolonen, 1995; Barber y Ponz, 1998).

### 3. Antecedentes

---

Sumando a los numerosos estudios sobre el efecto de las PG en humanos, Petit y colaboradores afirman que generalmente las éstas son de gran importancia para los terneros. En dos publicaciones afirman que las PG de la serie 2 incrementan la agregación plaquetaria y la formación de coágulos sanguíneos, también elevan la retención de sales en los riñones, la retención de agua y la presión sanguínea. Las PG de la serie 1 mejoran el sistema inmune (células T), previenen la agregación plaquetaria y contribuyen a disminuir el exceso de Na y agua en los riñones, reducen la respuesta inflamatoria y contribuyen a disminuir la producción de colesterol. Las PG de la serie 3 tienen muy poca capacidad de agregación plaquetaria e inhiben la síntesis de PG de la serie 2 (Petit y col., 2001 y 2002).

Los TX tienen un anillo de seis átomos que contiene una función éter. Son producidos por las plaquetas y actúan en la formación de coágulos sanguíneos y en la reducción del flujo sanguíneo hacia el coágulo. El TXA<sub>2</sub> actúa como vasoconstrictor y como proagregante plaquetario (Lehninger, 1993).

Los LT son lineales con tres doble enlaces conjugados, y se encuentran en leucocitos, mastocitos, cerebro, pulmón, corazón y bazo. LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> y LT<sub>4</sub> son los implicados en la reacción lenta de anafilaxia: inducen la contracción del músculo liso a nivel bronquial, traqueal e intestinal y aumentan la permeabilidad capilar (edema). HETE y LTB<sub>4</sub> median reacciones alérgicas (hipersensibilidad) y regulan quimiotaxis de neutrófilos, eosinófilos y degranulación de polimorfonucleares (Barber y Ponz, 1998).

### **3.2 Efectos beneficiosos de los PUFA n-3 sobre la salud humana.**

En las últimas décadas, se ha demostrado que los factores genéticos determinan la susceptibilidad de un individuo a enfermarse, y que los factores ambientales determinan que un sujeto de los genéticamente predispuestos lo haga. En este sentido, la nutrición es un factor determinante muy importante (Lusis, 2000). Los estudios en los cambios evolutivos de la dieta indican que los cambios más importantes que han tenido lugar en nuestra dieta han ocurrido especialmente en el tipo y cantidad de ácidos grasos esenciales y de antioxidantes en los alimentos (Mata y col., 2002). Los cambios ocurridos en los últimos 100 años son potentes promotores de diferentes disfunciones y de algunas de las enfermedades crónicas más relevantes en la actualidad, como la aterosclerosis, la diabetes mellitus, la hipertensión arterial, la enfermedad inflamatoria, la obesidad y determinados cánceres (Bartsch y col., 1999; James y col., 2000; Hu y col., 2002; Kris-Etherton y col., 2002; Ruxton y col., 2004.).

Parece evidente que en la actualidad, en los países industrializados, existe un cambio absoluto y relativo en el aporte de ácidos grasos n-6 y n-3 en los alimentos, que junto al cambio en los hábitos dietarios hace que la relación n-6/n-3 sea de 15-20:1, cuando debería ser inferior a 10:1 (FAO/OMS, 1997; Simolopoulos, 2002; Mata y col., 2002).

Respecto a los ácidos grasos n-3, se empezaron a considerar de gran interés en la década de los 70, siendo Bang y colaboradores en 1980 los que establecieron una nueva dimensión de la relación entre la grasa de la dieta y la mortalidad por enfermedad coronaria, al descubrir que la mortalidad por infarto de miocardio en los esquimales de Groenlandia, ajustada por edad, era significativamente menor que la de los daneses, a pesar del alto contenido en grasa y colesterol y bajo en carbohidratos de su dieta.

### **3.2.1. Enfermedad cardiovascular**

La cardiopatía isquémica es la complicación clínica principal de la aterosclerosis, proceso inflamatorio que se desarrolla por la interacción entre el colesterol transportado en las lipoproteínas de baja densidad, los monocitos-macrófagos, las plaquetas y las células de la pared arterial (Mata y col., 1996; Bulliyya, 2002; Dewailly y col., 2003). La aterosclerosis puede ser provocada por múltiples factores genéticos y ambientales (Pasten y Grenett, 2006). Entre estos, los hábitos dietéticos, la actividad física y el consumo de tabaco tienen un papel fundamental en el desarrollo de cardiopatías isquémicas (Pasten y Grenett, 2006).

La Sociedad Europea de Cardiología pronostica una epidemia de enfermedades cardiovasculares en un plazo de entre 15 y 20 años, si no se consigue que la prevención gane la batalla (Michal Tendera, Inauguración del Congreso Mundial de Cardiología, septiembre de 2006). Según Tendera (presidente de la Sociedad Española de Cardiología), 17 millones de personas mueren cada año en el mundo debido a estas enfermedades, de los que cuatro millones y medio son europeos. Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de mortalidad en los países occidentales y una parte importante de Asia y se conoce que la dieta puede influir en algunos de los factores de riesgo descritos para estas enfermedades (Lusis 2000; The European Heart Network, 2002; Ruxton y col., 2004; Carrero y col., 2005).

#### **Estudios epidemiológicos**

Desde 1985 se han realizado diversos estudios epidemiológicos. El estudio “The ceben Countries” (20 años de duración), el estudio “The Western Electric” y el estudio “US Physicians Health”, determinaron que un consumo discreto de pescado se asocia a una clara reducción en el riesgo de mortalidad de causa cardiovascular en diversas poblaciones no mediterráneas (Kromhout y col., 1985; Daviglius y col, 1997; Albert y col., 1998). Sin embargo, el consumo de pescado no protege contra la

### *3.2 Efectos beneficiosos de los PUFA n-3 sobre la salud humana*

---

enfermedad coronaria en aquellas poblaciones en que el consumo de grasas saturadas es elevado (Kromhout, 1989). Otro estudio sobre la prevención de Aterosclerosis Coronaria Mediante la intervención con ácidos grasos n-3 de origen marino (también conocido como SCIMO), demostró una reducción en el desarrollo de la aterosclerosis al administrar dosis de 1,65 g de AGPI n-3 al día (Von Schacky y col., 2001).

Una revisión en 1999 de distintos estudios cohorte prospectivos, con más de 115.000 sujetos, ha mostrado que en aquellas poblaciones con bajo riesgo de desarrollar enfermedad coronaria, el consumo de pescado no tuvo un efecto protector. Sin embargo, en aquellas poblaciones de alto riesgo, el consumo de 40-60 g de pescado al día se asoció con una reducción del riesgo del 40 al 60% (Marckmann y Grombaek, 1999).

Por otra parte, tres estudios de intervención han mostrado que el consumo de pescado o de aceite de pescado tiene efectos protectores importantes frente a las ECV. El "Diet and Reinfarction Trial" (DART) demostró que dosis relativamente bajas de PUFA n-3 (2,3 g/semana), equivalentes a 2-3 porciones de pescado azul a la semana, reducían el riesgo de sufrir un episodio coronario secundario y producían un descenso del 30% en la mortalidad a causa de ECV (Burr y col., 1989). En el estudio "GISSI-Prevenzione", el consumo de un suplemento nutricional de AGPI (1 g/día) disminuyó en un 17% el riesgo de mortalidad por ECV, en relación con el grupo control que no consumió el suplemento (Hopper y col., 1999). Además el estudio "Lyon Heart" demostró que una dieta de tipo mediterránea, que aportaba ácido oleico, antioxidantes naturales, cantidades reducidas de ácidos grasos saturados y aproximadamente 2 g/día de LNA, redujo la aparición de episodios coronarios en un 70% y la mortalidad en un 80% (Kris- Etherton y col., 2001).

Otros estudios no epidemiológicos han demostrado que dosis bajas de aceites de pescado (1 g/día de PUFA n-3) pueden disminuir la concentración de triglicéridos del plasma en ayunas y también en el estado postprandial (Zampelas y col., 1994; Harris, 1997), a partir de cuyos

valores se ha sugerido se puede predecir el riesgo de sufrir infarto de miocardio (Von Schacky, 2000; Trautwein, 2001).

### **Posibles mecanismos de acción**

Se han propuesto varios mecanismos mediante los cuales los PUFA n-3 podrían ejercer su efecto protector frente a las enfermedades cardiovasculares. Entre ellos se ha descrito la capacidad que tienen para influir en la coagulación sanguínea y la trombosis, la presión sanguínea, y la inflamación (Carrero y col., 2005).

La formación del trombo está influenciada por las plaquetas y los mecanismos de coagulación y fibrinólisis (Mata y col., 2002, Ruxton, 2004). Los ácidos grasos EPA y DHA reemplazan parcialmente a los ácidos grasos n-6, especialmente al AA en las membranas de varios tipos celulares como son las plaquetas, eritrocitos, células blancas y hepáticas (Sanders y Roshanai, 1983). De esta forma, la síntesis de TXA2 se reduce y se produce TXA3, que tiene menos capacidad proagregante, reduciendo, por tanto, la agregación plaquetaria y la trombosis (Connor, 2000). Por otra parte, la producción de eicosanoides proinflamatorios como la PGE2 y LTB4 derivados del AA disminuye, mientras aumentan los derivados de los PUFA n-3 como la PGE3 y el LTB5 con escasa actividad inflamatoria (Kinsella y col., 1990; Wainwright, 2002). Un aumento de EPA Y DHA en la composición de la membrana de los eritrocitos también tiene efecto sobre su deformabilidad beneficiosos para la salud (Murray y col., 2001).

El consumo de PUFA n-3 tiene un efecto hipolipemiante por su efecto reductor sobre los triglicéridos del plasma (The British Nutrition Foundation, 1997). Los triglicéridos elevados son un factor de riesgo independiente de las ECV. La intensidad de la lipemia postprandial está relacionada con el tipo de grasa ingerida (Harris, 1997). Algunos estudios indican que la ingesta de DHA y EPA reduce el aumento postprandial de triglicéridos, produciendo un efecto beneficioso para la salud (Zampelas y col., 1994; Layne y col., 1996; Adler y col., 1997). Otros estudios también

### *3.2 Efectos beneficiosos de los PUFA n-3 sobre la salud humana*

---

han demostrado que el consumo de aceite de pescado, puede disminuir los niveles de triglicéridos en sujetos sanos e hiperlipémicos (Cobiac y col., 1991; William y col., 1992; Visioli y col., 2000).

La oxidación de las LDL juega un importante papel en el inicio y desarrollo de la aterosclerosis (Witztum y Steinberg, 1991). El cambio en la composición de los principales ácidos grasos de la dieta afecta a la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad. Las LDL enriquecidas con ácidos grasos monoinsaturados derivados del aceite de oliva son más resistentes a la oxidación que las LDL enriquecidas con ácidos grasos saturados y PUFA n-6 (Mata y col., 1996; Mata y Alonso, 2001). También se ha observado, que las LDL aisladas de sujetos sanos después de una dieta enriquecida en ácido oleico producen menos quimiotaxis y reducen la adhesión de los monocitos cuando se compararon a las LDL de una dieta enriquecida en ácido linoleico (Tsimikas y col., 1999).

Investigaciones recientes concluyen que se puede modular la concentración de LDL y HDL mediante la ingesta de pescado (Bulliyya, 2002; Dewailly y col., 2003). En 2002 Bulliyya comparó los análisis de 500 individuos de India consumidores de pescado con los de 500 sujetos que casi nunca ingerían pescado. El grupo que consumía pescado ostentaba niveles ligeramente superiores de HDL y concentraciones significativamente menores de LDL. Similares resultados obtuvo Dewaly en 2003 con sujetos pertenecientes a tres grupos étnicos en Quebec.

El endotelio también juega un importante papel en la regulación del tono vascular a través de la liberación de sustancias vasodilatadoras y vasoconstrictoras (Booyse y col., 1999; Handin y Loscalzo, 1988; Bodary y col., 2002). Además, las células endoteliales secretan numerosos metabolitos implicados en la coagulación, fibrinólisis y en la adhesión y migración transendotelial de los leucocitos circulantes dentro de la pared vascular (Bodary y col., 2002; Mata y col., 2002). Una correcta función del endotelio previene el inicio y desarrollo de la lesión aterosclerótica y del fenómeno trombótico que desencadena el episodio coronario agudo (Handin y Loscalzo, 1988; Mata y col., 2002). En las etapas iniciales del

desarrollo de la placa del ateroma, se produce un depósito de lípidos y su posterior oxidación en la pared vascular, con lesión del endotelio, reclutamiento de células inflamatorias (especialmente monocitos) y acumulación de células musculares lisas (Mata y col., 2002).

### **Hipertensión arterial**

La hipertensión arterial es otro importante factor de riesgo en el desarrollo de la enfermedad cardiovascular (Carrero y col., 2005). Entre otros efectos, la hipertensión provoca la activación del endotelio (Brown y Hu, 2001), lo que a su vez origina la producción endotelial de moléculas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1 y la infiltración de células sanguíneas a la pared vascular, contribuyendo al engrosamiento de la arteria y al desarrollo de la aterosclerosis (Report of the British Nutrition Foundation's Task Force, 1992). Sin embargo, un estudio que incluye poblaciones de diferentes partes del mundo sugiere que el riesgo cardiovascular es heterogéneo entre poblaciones con similar presión arterial (Van Dem Hoogen y col., 2000).

Diferentes estudios sugieren que la dieta puede tener un papel determinante en la prevalencia de la hipertensión arterial (Brown y col., 2001). La ingesta elevada de sal y el consumo reducido de calcio, potasio, magnesio, fibra vegetal y vitaminas A y C se ha relacionado con cifras elevadas de presión arterial (Brown y col., 2001). En general, la dieta rica en grasa saturada favorece la elevación de la presión arterial (Mata y col., 2002), mientras que las grasas insaturadas tienen un efecto contrario o nulo (Morris y col., 1993; Appel y col., 1993; Harris, 1996). El aumento en el consumo de ácidos grasos n-3 puede producir una reducción en la presión arterial sistólica y diastólica, tanto en sujetos normo como hipertensos (Appel y col., 1993), sin afectar el metabolismo hidrocarbonado y las concentraciones de insulina (Lahoz y col., 1999). También se ha demostrado, que el consumo de dosis altas de n-3 (3-4 g/día) previene el aumento de la tensión arterial y de la resistencia vascular observada en pacientes transplantados de corazón (Holm y col., 2001).

En un estudio realizado sobre varones con sobrepeso y con una leve hiperlipemia, el consumo de 4 g/día de ácido docosahexaenoico purificado produjo un descenso significativo de la tensión arterial. Sin embargo, el ácido eicosapentaenoico no produjo ningún efecto significativo respecto al placebo (Mori y col., 1999).

En dos estudios, tanto en hombres como en mujeres, se observó el efecto beneficioso en la reducción de la presión arterial de la sustitución isocalórica de una dieta rica en grasa saturada por grasa monoinsaturada y poliinsaturada n-3 (Lahoz y col., 1999; Espino y col., 1996). En estos estudios no hubo variación en el consumo de sodio, potasio y calcio, ni en la excreción urinaria de sodio.

### **Diabetes Mellitus tipo II.**

El desarrollo de la diabetes mellitus tipo 2 y resistencia a la insulina se asocia con el exceso de peso y la obesidad (Swindurn y col., 1991) y con una ingesta calórica excesiva, especialmente de grasa saturada y baja en carbohidratos (Marshall y col., 1991). Numerosos estudios han demostrado que la sustitución, en una dieta rica en grasa, de la grasa saturada por hidratos de carbono, produjo una mejora en la secreción de insulina y una reducción en las concentraciones plasmáticas de colesterol-LDL (O'Dea, 1988; Cruickshank y col., 1991). Sin embargo, este tipo de dieta tiene efectos negativos en los pacientes diabéticos, porque suelen aumentar las concentraciones plasmáticas de triglicéridos y disminuir las de colesterol-HDL. También puede deteriorar el metabolismo de la glucosa y aumentar la lipemia postprandial. Por tanto, los potenciales efectos negativos de una dieta baja en grasa y rica en carbohidratos, ha despertado el interés por el efecto de las dietas ricas en grasas insaturadas sobre el metabolismo de la glucosa (Mata y col., 2002).

### **3.2.2. Función de los PUFA durante la gestación y la lactancia.**

Los ácidos grasos esenciales y sus derivados poliinsaturados de larga cadena desempeñan un papel crucial en el desarrollo fetal y en el resultado de la preñez (Dutta-Roy, 1997; Kurlak y Stephenson, 1999; Uauy y col., 2000; Smith, 2002). Durante la gestación, es necesario adquirir ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga para el desarrollo de la placenta y del feto. Además, existen pruebas evidentes de que la nutrición y la salud maternas durante el período de la concepción tienen una importancia crucial sobre el desarrollo del feto (Connor y col., 2000; Gibson y Makrides, 2001), de forma que al nacimiento existe una relación significativa entre el estatus de LCPUFA de la madre y el recién nacido (Connor y col., 1996; Velzing-Aarts y col., 2001).

Los acontecimientos que preceden a la concepción influyen en el proceso fisiológico de acumulación de grasa y en la naturaleza de la grasa almacenada. Ésta es la grasa que se tiene a disposición durante el período de la formación y la división celular en el desarrollo embrionario y de la placenta durante el primer trimestre de gestación (FAO, 1993).

A partir del momento de la concepción también se acumulan cantidades importantes de grasa para mantener el crecimiento fetal, reservas que son utilizadas fundamentalmente durante el tercer trimestre de la gestación (Kurlak y Stephenson, 1999; Montgomery y col., 2003), así como para satisfacer las necesidades iniciales de la lactancia (Gibson y Makrides, 2001). Las carencias específicas de ácidos grasos n-3 durante la gestación y el primer año de vida influyen en la integridad neurológica (Budowski y col., 1987; Crawford y col., 1989; Uauy, 2000; Wainwright, 2002) y afectan selectivamente al aprendizaje y a la capacidad visiva (Wheeler y col., 1975; Lamptey y Walker, 1976; Yamamoto y col., 1987; Bourre y col., 1989; Carrié y col., 2000). Los estudios realizados con primates no humanos confirman que la carencia de n-3 disminuye el desarrollo de la función retinal y de la agudeza visual (Neuringer y col., 1988).

### *3.2 Efectos beneficiosos de los PUFA n-3 sobre la salud humana*

---

Estudios recientes en niños, han concluido que los ácidos grasos n-3 son esenciales y que es necesario incluir DHA en los alimentos para lactantes (Birch y col., 1992a y 1993; Carlson y col., 1993a; Uauy y col., 1990; Uauy, 1992). Aunque no existen estudios similares con AA, los datos experimentales sugieren que los niveles bajos de AA se asocian a un crecimiento prenatal lento (Crawford y col., 1989; Leaf y col., 1992) y postnatal tardío en los niños prematuros (Carlson et al., 1996). Por tanto, el ácido araquidónico debe considerarse un nutriente esencial durante las primeras etapas del desarrollo debido a que se encuentra en la leche humana (Koletzko y col. 1992) junto con el ácido docosahexaenoico. Así, la Sociedad Europea de Pediatría, Gastroenterología y Nutrición en 1991, La Fundación Británica de Nutrición en 1992 y el comité de expertos sobre Grasas y Aceites en Nutrición Humana de la WHO/FAO en 1997 han recomendado añadir a las fórmulas lácteas para niños prematuros LNA, DHA y AA. En 1994 la Sociedad Internacional de Ácidos Grasos y Lípidos comparte dichas recomendaciones.

Como se ha indicado anteriormente, la importancia de los ácidos grasos poliinsaturados de larga cadena para el feto y el neonato está ampliamente contrastada y cada vez se hace más evidente el papel que desempeñan en la regulación de la función celular. Algunos de los estudios que intentan aclarar la función de los PUFA durante la etapa prenatal y postnatal temprana son los siguientes:

- La disponibilidad del ácido araquidónico como precursor de eicosanoides, leucotrienos, prostaglandinas y tromboxanos (Barber y Ponz, 1998; Kurlak y Stephenson, 1999).
- El papel del ácido araquidónico como segundo mensajero (Kurlak y Stephenson, 1999; Wainwright, 2002).
- El rol estructural del DHA y AA como componentes de los fosfolípidos en las membranas celulares, con especial énfasis en el DHA como principal componente de las membranas de las células

### 3. Antecedentes

---

neuronales y de la retina (Bourre y col., 1989; Treen y col, 1992; Uauy y col., 2000; Carrié y col., 2000).

- La insaturación de la cadena de carbono puede afectar a la fluidez de la membrana celular. La fluidez de la membrana modula la función de receptores y transportadores, al mismo tiempo que interacciona con factores de transcripción en el interior de la célula (Clanidin, 1994; Wainwright, 2002). Los más conocidos son los “receptores activados por proliferadores peroxisomales” (PPAR) que son sensibles a la presencia de ácidos grasos libres en el citoplasma. Los PPAR parece que controlan la expresión de la acil-CoA sintasa y de proteínas relacionadas con la unión y el transporte de los ácidos grasos (Kurlak y Stephenson, 1999; García Muriana 2002; Uauy y col., 2000).

#### **Periodo prenatal**

Durante la gestación, la madre adapta su metabolismo a las necesidades de feto. En este periodo, la concentración de fosfolípidos plasmáticos aumenta en más de un 50%, como consecuencia de la hiperlipidemia asociada a este estado. Además, las cantidades absolutas de AA y DHA se incrementan en un 23% y un 52%, respectivamente (Gil, 2002). Este aumento de DHA, según Gil, parece deberse a la movilización de depósitos maternos, más que a un aumento de la síntesis o cambios en los hábitos dietéticos. Además, bajas concentraciones en plasma de AA y DHA están relacionadas con un peso inferior de la placenta, y éste hecho también se ha relacionado con una gestación más corta y menores perímetros cefálicos en los recién nacidos (Gil, 2002).

Durante los primeros dos tercios de la gestación, la mayor parte del incremento de peso de la madre corresponde a la acumulación de depósitos de grasa, depósitos que serán liberados en el último tercio de la misma (Boza, 1998; Uauy y col., 2000; Herrera, 2002). En este último tercio de la gestación, la actividad lipolítica del tejido adiposo es potenciada, y sus productos, ácidos grasos libres y glicerol, son fundamentalmente dirigidos

### *3.2 Efectos beneficiosos de los PUFA n-3 sobre la salud humana*

---

al hígado materno, donde los FFA son convertidos en cuerpos cetónicos y el glicerol en glucosa, ambos productos atraviesan fácilmente la placenta para participar en el metabolismo fetal (Dutta-Roy, 1997; Herrera, 2002).

Durante el último trimestre de gestación, el feto capta 50-60 mg/d de LCPUFA n-3, aproximadamente un 4-5% de la energía requerida. Para que exista un equilibrio adecuado, la madre gestante debería ingerir alrededor de 100 mg/d de estos ácidos grasos (Gil, 2002; Uauy y col., 2000). Una ingesta materna excesiva de LCPUFA n-3 puede tener efectos inhibitorios sobre las  $\Delta$ -5 y  $\Delta$ -6 desaturasas, hecho que puede causar un descenso del nivel de AA, de la misma manera que una elevada concentración de LCPUFA n-6 en el plasma materno hace que disminuya la concentración de LCPUFA n-3 (Cho y col., 1999; Uauy y col., 2000; Herrera, 2002). La razón entre los ácidos grasos n-6 y n-3 presentes en la dieta debe mantener un rango entre 5:1 y 10:1, y la razón entre el DHA y el AA debe ser de 1:1 a 1:2 para que no exista competencia por las desaturasas (Uauy y col., 2000). Así, la suplementación de la dieta de mujeres gestantes con 2.7 g/d de aceite de pescado desde la semana treinta de la gestación hasta el parto, se traduce en un aumento significativo de los ácidos grasos n-3 en los fosfolípidos del cordón umbilical y en una disminución concomitante de los ácidos grasos n-6 (Gil, 2002).

#### **Periodo postnatal**

Los recién nacidos alimentados con la leche materna tienen niveles más elevados del DHA y AA, en comparación con los alimentados con la mayoría de las fórmulas lactorreemplazantes comercializadas (Sanders y Naismith, 1979; Makrides y col., 1996; Innis y col., 1996; Morage y col., 1998). En bebés recién nacidos, la cantidad de ácidos grasos liberados en plasma aumenta seis veces durante las cinco primeras horas de vida (Leskanich y Noble, 1999).

Durante la lactación la madre pierde 70-80 mg/día de DHA en la leche, además de las cantidades utilizadas para satisfacer las demandas endógenas. Entre los primeros días y la 5ª semana se observa un descenso

### *3. Antecedentes*

---

del 30% de los niveles de DHA de los fosfolípidos plasmáticos. Este descenso se mantiene durante las primeras doce semanas e incluso hasta los 6 meses (Gil, 2002).

La leche humana contiene una cantidad variable de AA y DHA preformados que oscila de 0,4-0,7% para el AA y de 0,2-0,4% para el DHA, sobre el total de los AG. Su contenido es muy constante en diversas poblaciones de diferente origen étnico y con hábitos alimentarios muy diferentes. La elevada concentración de LCPUFA en el calostro de madres de niños pretérmino sugiere que las células mamarias son capaces de elongar y desaturar LA y LNA después del parto, siendo independiente de la duración del embarazo (Greiner y col., 1997).

La cantidad de DHA es mayor en la leche de las madres con un consumo alto de pescado y en aquellas mujeres que reciben una suplementación con aceite de pescado en la dieta. Sin embargo, a pesar de la concentración elevada de EPA en el aceite de pescado, el ácido graso mayoritario de la serie n-3 en la leche es el DHA, sugiriendo que existe un mecanismo regulador para suministrar una cantidad relativamente constante de este AG al recién nacido. Además se ha podido comprobar que el DHA de la leche y de los eritrocitos de los recién nacidos alimentados al pecho está positivamente correlacionado con el DHA de la dieta materna (Gil, 2002).

#### **Importancia de los PUFA en el desarrollo del cerebro.**

Los lípidos constituyen entre un 50-60% del peso seco del cerebro de un adulto, y aproximadamente un 35% están en forma de LCPUFA, principalmente como AA y DHA (Crawford, 1993). La vida intrauterina constituye un periodo vulnerable en el desarrollo del cerebro, puesto que el feto depende totalmente del suministro materno de nutrientes específicos para su crecimiento (Dutta-Roy, 1997). El AA y el DHA se obtienen por biosíntesis a partir de sus respectivos ácidos grasos esenciales obtenidos de la dieta (LNA y LA), o bien, directamente de la dieta (Wainwright, 2002). La cantidad de PUFA se incrementa conforme avanza la gestación,

### 3.2 Efectos beneficiosos de los PUFA n-3 sobre la salud humana

aumentando de forma exponencial durante el desarrollo prenatal y, tan solo de forma lineal durante el postnatal. La mayor parte de éstos, son derivados de larga cadena de las series n-3 y n-6, siendo la cantidad de ácidos grasos n-6 dos veces superior que la de n-3 (Clandinin y col., 1980a; Martínez, 1995). El cerebro fetal obtiene aproximadamente 21g de DHA por semana durante el último trimestre de la gestación (Clandinin y col., 1981).

En el cerebro, la incorporación de AA y DHA en las membranas se produce mayoritariamente a partir de la reutilización de PUFA preformados, siendo ésta diez veces mayor que la síntesis a partir de sus precursores. Además, en estudios con ratas se ha demostrado que únicamente el 15% del AA y del DHA son oxidados en las primeras 24 horas, mientras que sus precursores sufren un 60% de oxidación. Por otra parte, el LNA, que puede traspasar la barrera hematoencefálica, es usado para la síntesis de colesterol más que para la síntesis del DHA (Gil y col., 2002). La importancia del LNA y LA no sólo radica en su función precursora de LCPUFA, quizás sea igual de importante el hecho de ser precursores de los cuerpos cetónicos necesarios para la síntesis lipídica cerebral *in situ* (Cunnane y col., 1999a).

La importancia relativa del mecanismo de captación de LCPUFA del plasma y el de síntesis *in situ* a partir de sus precursores, es un problema fundamental que necesita ser resuelto para establecer los requerimientos de LCPUFA de las series n-6 y n-3 del sistema nervioso central en desarrollo. Varios estudios han mostrado que el cerebro maduro y en desarrollo puede desaturar y elongar ácidos grasos esenciales en animales en experimentación (Clandinin y col., 1980; Uauy y col., 2000). Las células endoteliales del sistema vascular del cerebro también pueden desaturar y elongar LA y LNA hasta AA y EPA, pero no completan la síntesis hasta DHA. Por otro lado los astrocitos pueden sintetizar AA y DHA, que tras ser liberados, pueden incorporarse a las neuronas del cerebro y del cerebelo (Gil, 2002). Además, no hay una relación lineal entre la cantidad de DHA del cerebro y la de los fosfolípidos de los eritrocitos (Wainwright, 2002).

La deficiencia de ácidos grasos n-3 y n-6 en la dieta conlleva anomalías físicas y funcionales en el cerebro, puesto que en el cerebro en crecimiento cada hora se originan miles de nuevas sinapsis. Además, ambas series de ácidos grasos tienen que estar balanceadas, de manera que altos niveles del DHA con bajos niveles de ácidos grasos n-6 también producen un retardo en el crecimiento cerebral (Ward y col., 1998). A pesar de la abundancia del DHA en las membranas sinaptosomales, el AA es preferentemente liberado de los fosfolípidos de membrana por la fosfolipasa A<sub>2</sub>. Esto ocurre porque el AA es más importante como ácido graso libre, con un papel destacado en la transducción de señales de las células neuroendocrinas, estando implicado en la liberación de la hormona del crecimiento y la prolactina (Kurlac y Stephenson, 1999; Roudbaraki y col., 1996). Cuando sólo hay deficiencia de ácidos grasos n-3 no afecta al crecimiento del cerebro, no obstante, éste sufre cambios característicos en la composición en ácidos grasos, disminuyendo la cantidad del DHA y aumentando la del ácido docosapentaenoico (Wainwright, 2002).

También hay evidencias de que existe relación entre el contenido en ácidos grasos esenciales de la dieta y el sistema neurotransmisor del cerebro de la rata. Cuando hay una deficiencia crónica en la dieta de LNA se producen anomalías severas en la función cerebral. En el sistema mesocortical parece existir una disminución en la liberación de dopamina, y una reducción de los receptores de dopamina D2. Por el contrario en el sistema mesolímbico se incrementa la liberación basal de dopamina y los receptores D2 (Chalón y col., 2001; Zimmer y col., 2000).

#### **3.2.3. Sistema inmune**

El interés sobre la participación de los lípidos en la respuesta inmunitaria empezó cuando se reconoció su efecto modulador del sistema del retículo endotelial (Di Luzio, 1972). Además, se ha demostrado que las grasas influyen en la gravedad de las enfermedades autoinmunitarias, así como en la duración de la aceptación de homo-injertos (Mertin y Hunt, 1976; Ring y col., 1974; Kremer, 1996; Lawrence y Sorrel, 1993). Desde

### 3.2 Efectos beneficiosos de los PUFA n-3 sobre la salud humana

1975 se conoce que la adición de ácidos grasos a los cultivos *in vitro* de linfocitos modifican su respuesta mitogénica (Mertin y Hughs, 1975).

Para la elaboración de una respuesta inmunitaria satisfactoria, es esencial la cooperación entre las distintas células del sistema inmunitario, en la que intervienen diferentes lípidos intermediarios (FAO/OMS, 1997). Los lípidos de la alimentación pueden afectar al sistema inmunitario influyendo en la disponibilidad del sustrato de la ciclooxigenasa y de la lipooxigenasa. Estos productos, a su vez, actúan como intermediarios lipídicos en el control del sistema inmunitario (Rola-Plaszczyński, 1985; Goodwin y col., 1974). Por otra parte, las células del sistema inmunitario dependen en gran medida de la función de la membrana celular para realizar operaciones tales como secreción de citoquinas y anticuerpos, recepción de antígenos, transformación de linfocitos y lisis por contacto. La importancia de los lípidos en el mantenimiento de la integridad de la membrana indica que pueden ser nutrientes críticos en la regulación de la función inmunitaria (Stubbs y Smith, 1984).

Los metabolitos del ácido araquidónico también intervienen en el control del sistema inmunitario. Los metabolitos del AA, las PG, el HETE y los LT son producidos por las células mononucleares de la sangre periférica humana y por los esplenocitos de ratón en respuesta a los estímulos de los mitógenos o de los antígenos. *In vitro*, la PGE<sub>2</sub> inhibe la proliferación de las células T (Goodwin y col., 1974; Rola-Plaszczyński y Lemaire, 1985;), la producción de citoquinas (Gordon y col., 1976), la generación de células citotóxicas (Plaut, 1979) y la actividad de las células asesinas naturales (Roder y Klein, 1979).

Se ha demostrado que, además de la PGE<sub>2</sub>, los productos de la lipooxigenasa (LT y HETE) inhiben la proliferación de los linfocitos en los esplenocitos del ratón y en los linfocitos periféricos humanos (Goodman y Weigle, 1980).

La PGE<sub>2</sub> controla distintos aspectos de la respuesta inflamatoria e inmunológica celular (FAO/OMS, 1997). La producción de PGE<sub>2</sub>

### 3. Antecedentes

---

disminuye tras consumir PUFA n-3. Algunos estudios en el ser humano han demostrado de manera coherente, como se comentó anteriormente, que la producción de citoquinas proinflamatorias disminuye cuando se ingieren por vía oral una suplementación de PUFA n-3 de origen marino (Meydani y col., 1993; Kremer y col., 1987; Meydani y col., 1991; Endres y col., 1989). La disminución de la producción de citoquinas proinflamatorias y de eicosanoides contribuye al efecto beneficioso del aceite de pescado en la reducción de la patogénesis de las enfermedades inflamatorias y ateroscleróticas.

Las propiedades inmunomoduladoras de los PUFA están suficientemente contrastadas en la bibliografía (Calder y col., 1991, 1992, 2002). Los cambios de los lípidos de la dieta influyen en la composición en PUFA de las membranas de las células, pudiendo modificar el fenotipo inmune desarrollado tras una infección (Muturi y col., 2005). Sin embargo, hay relativamente pocos estudios específicos sobre el efecto de la suplementación con aceite de pescado sobre la inmunidad celular. En este sentido, se ha observado que la suplementación con aceite de pescado *in vivo* reduce la proliferación de las células T y B, una medida de la inmunidad mediada por células (Meydani y col., 1991; Kramer y col., 1991).

También se ha descrito que la suplementación de la dieta con PUFA procedentes de aceite de pescado reduce la resistencia natural de los ratones frente a la infección con *Salmonella typhimurium* (Chang y col., 1992). Frente a *Listeria monocytogenes* y *Klebsiella pneumoniae*, la suplementación de la dieta con aceite de pescado también presenta efectos negativos (Fritsche y col., 1997; 2000; Bjornsson y col., 1997).

En pollos infectados con *Eimeria tenella*, se observa una reducción de la infección parasitaria, disminuyendo las lesiones cecales, al tiempo que se mantiene la ganancia de peso de los animales (Allen y col., 1996).

Moussa y col. (2000) estudiaron el efecto de los PUFA de la dieta sobre la composición en ácidos de la membrana de los linfocitos y la

proliferación y activación de los mismos. Observaron que un incremento de los niveles de LA en los linfocitos del bazo se correlacionaban negativamente con la expresión de la cadena  $\alpha$  de los receptores de la IL2 y con la proliferación de estos linfocitos. Sin embargo encontraron una correlación positiva entre la expresión de la cadena  $\alpha$  de los receptores de la IL2 y la proliferación de los linfocitos del bazo con los niveles de ácido oleico. Concluyendo que el efecto inmunosupresor descrito en la literatura de los PUFA, en función de la composición de los fosfolípidos de membrana, sobre la activación de los linfocitos puede ser intervenido con la suplementación de la dieta con ácido oleico.

Muturi y col. (2005) estudiaron el efecto de suplementar la dieta de terneros con aceite de pescado rico en PUFA n-3 sobre la composición tisular en ácidos grasos y sobre la infección abomasal e intestinal de los nematodos *Ostertagia ostertagi* y *Cooperia oncophora*. Estos autores concluyeron que el número de gusanos inmaduros fue significativamente más alto en el grupo que ingirió la dieta suplementada con aceite de pescado. El número de mastocitos y de eosinófilos de la mucosa se incrementó por la infección, siendo inferior su cantidad en el tejido intestinal para el grupo cuya dieta contenía aceite de pescado frente al control. Por lo tanto, los autores sugieren que una reducción de la relación n-6/n-3 en la dieta se puede utilizar como una estrategia para potenciar la respuesta inmune frente a la infección por nematodos parásitos en terneros.

#### **3.2.4. Efectos anticancerígenos**

En 1953 se desarrollaron los primeros estudios que demostraron que los ratones y las ratas que se alimentaban con dietas ricas en grasas eran mucho más propensos al cáncer de piel y de mama (Tannenbaum y Silverstone, 1953). Los estudios epidemiológicos constituyen el principal instrumento experimental para identificar la relación causal entre la ingesta de un nutriente y el cáncer. Los primeros datos epidemiológicos, demostraron que la incidencia de determinados tipos de cáncer era mucho más frecuente en los países con una alimentación rica en grasas que en

### 3. Antecedentes

---

aquéllos con una alimentación de bajo contenido en grasa (Carroll y Khor, 1975). En la actualidad, mediante este método, ha sido posible establecer una correlación entre la ingesta excesiva de grasas saturadas y de alcohol, y la disminución en la ingesta de fibras dietéticas y antioxidantes con el aumento de la incidencia de cáncer en poblaciones que se caracterizan por éstos hábitos alimenticios (National Research Council, 1982 y 1989; Hunter y col., 1993; García Muriana, 2002).

Los estudios experimentales demuestran que en el caso de los tumores de mama, se requieren grasas poliinsaturadas n-6. La producción de los tumores aumenta con la adición de ácido linoleico hasta un umbral del 4-5% de las calorías totales. Cuando se alcanza este umbral, aumentar las grasas totales ocasiona mayores aumentos de la incidencia y del volumen al parecer independientemente del tipo de grasa añadido (IP, 1987). El cáncer de colon también parece requerir la presencia del ácido linoleico, aunque este requisito parece ser menor que en el caso del cáncer mamario (Bull y col., 1989).

Los aceites de pescado, que contienen principalmente ácidos grasos poliinsaturados n-3, no parecen favorecer el cáncer mamario cuando se suministran en grandes cantidades, aunque en pequeñas cantidades podrían tener un efecto estimulante (Carroll, 1989; Cave, 1991a, b). Los estudios realizados con mezclas de ácidos grasos n-3 y n-6 indican que el efecto estimulante de los ácidos grasos n-6 se puede neutralizar mediante una relación elevada de ácidos grasos n-3 respecto a los n-6, tanto en el caso del cáncer mamario como en el de colon (Cave, 1991a; Reddy, 1992).

Estudios *in vitro* han demostrado que los PUFA n-3 tienen la capacidad de reducir el crecimiento de distintas células cancerígenas humanas. Este efecto es dependiente de la concentración de los ácidos grasos n-3 y se relaciona con una disminución de la proliferación y un aumento de la apoptosis (Finstad y col., 1998).

### **3.2.5. Requerimiento nutricional e ingesta recomendada de PUFA n-3**

El Comité de Food and Nutrition Board- National Research Council de Estados Unidos define ingesta recomendable como: “Niveles de ingestas de nutrientes esenciales que sobre las bases de conocimientos científicos, se juzgan adecuados para mantener los requisitos nutricionales de prácticamente todas las personas sanas”.

Las estimaciones realizadas sobre la ingesta de ácidos grasos n-3 se basan principalmente en los datos sobre consumo de alimentos y análisis químicos de las dietas. El consumo aproximado de LNA en los países europeos oscila entre 0,6 y 2,5 g/día (Hepburn y col., 1986; Hulshof y col., 1999; Sanders, 2000). El consumo estimado de EPA y DHA es del orden de 0,1 a 0,5 g/día en Europa (Sanders, 2000), de 0,1 a 0,2 en Estados Unidos y de 2g/día en Japón (Kris-Etherton y col., 2000).

La Sociedad Española de Nutrición Comunitaria en el año 2001 estableció en sus guías alimentarias para la población española una serie de objetivos nutricionales. En lo que respecta a la grasa, recomiendan un aporte que oscila entre el 30 y el 35% de la energía total, dependiendo de la calidad de la misma. Los ácidos grasos saturados no deberán superar en ningún caso el 10% del valor calórico total de la dieta habitual, siendo aconsejable situar estos niveles en aportes no superiores al 7-8%. El ácido graso que debe ser mayoritario en la alimentación habitual debe ser el AGMI oleico con una participación de 15 a 20% del valor calórico total. Los ácidos grasos poliinsaturados deben limitarse a una cantidad que no sobrepase el 5% de la energía total. De esta cantidad el 4% deben ser de la serie omega 6 y el 1% restante omega 3. A pesar de la dificultad de establecer cantidades de PUFA n-3, recomienda el consumo de 2g como LNA y 200 mg como DHA al día (Mataix, 2001b; Ruxton y col., 2004). La FAO y la OMS en su informe del año 2003 sobre dieta, nutrición y prevención de enfermedades crónicas recomiendan ingestas muy similares, siendo la recomendación para los PUFA n-3 de 1 a 2% de la energía total.

### *3. Antecedentes*

---

La relación recomendada por la FAO y la OMS (2003) entre la serie omega 6 y omega 3 es de 4:1, en sintonía con la propuesta por diversos autores que oscila entre 5:1 y 10:1 (Budowsky y col., 1987, Mata y col., 2002; Simopoulos, 2002a).

La sociedad internacional para el Estudio de Ácidos Grasos y Lípidos sugiere la cantidad de 0,65g/día de DHA y 1g/día de LNA (Simopoulos y col., 1999). Por otra parte, la Sociedad Americana del Corazón recomienda el consumo de un gramo de diario de EPA + DHA procedentes de aceite de pescado o suplementos para pacientes con enfermedad coronaria (Kris-Etherton y col., 2003).

Uauy y Castillo (2003) revisaron las recomendaciones sobre los requerimientos lipídicos a partir de los estudios publicados por la FAO y la OMS en 1997 sobre grasas y aceites en nutrición humana, la Sociedad Canadiense de Pediatría y Salud en 1993 y la Academia Americana de Pediatría en 1992 concluyendo que durante los 6 primeros meses de vida, la grasa de la dieta debe contribuir al 40-60% del total de los requerimientos energéticos, que debe de reducirse hasta un 30-35% a los 3 años de edad. La dieta en las primeras etapas de desarrollo debe aportar, al menos, 3-4.5% de la energía total de LA y 0.5% de LNA (Uauy y Castillo, 2003). Para mujeres en edad fértil se recomienda obtener al menos el 20% de su necesidad energética en forma de grasas (FAO/OMS, 1997).

Las personas activas que se encuentran en equilibrio energético pueden recabar de las grasas alimentarias hasta el 35% de su aporte energético total, si su aporte de ácidos grasos esenciales es suficiente, y si el nivel de ácidos grasos saturados no supera el 10% de la energía que consumen. El consumo de PUFA n-6 nunca debe ser superior al 10% del total de la energía, ni el consumo de PUFA n-3 superior al 15% de la energía total. También se aconseja una restricción de consumo de colesterol de 300 mg/día (FAO/OMS, 1997; Uauy y Castillo, 2003).

### **3.3 Suplementación lipídica en la dieta del rumiante**

Las dietas de los rumiantes suelen contener entre un 2 y un 5% de grasa, aproximadamente la mitad de ésta son ácidos grasos. Desde hace tiempo, la tendencia ha sido incrementar la concentración energética de la dieta suplementándola con grasa que se incorporaba a la dieta en forma de semillas ricas en lípidos, o directamente como grasa vegetal o animal (Baldi y col., 1992; Jenkins y Palmquist, 1984). Ésta puede ser procesada o protegida para facilitar su incorporación en los concentrados, prevenir el efecto negativo que pudiese tener sobre la digestión de la fibra en el rumen, evitar posibles perjuicios sobre la microbiota ruminal y evadir, al menos en parte, su hidrogenación en el rumen (Jenkins y Palmquist, 1984).

Cuando se modifica la dieta, el contenido en grasa y proteína de la leche suelen responder de manera opuesta (Emery, 1978), siendo mayor la posibilidad de modificar la cantidad y composición de la grasa, que la de la proteína y/o caseína (Sutton y Morant, 1989; Caja y Schmidely, 2005). La modificación de la producción y composición (contenido en grasa y proteína) de la leche a través de la dieta, implica considerar el estado de la lactación en el que se encuentra el rumiante (Morand-Ferh y col., 1991; Kalscheur y col., 1999), así como el nivel de ingesta (Hadjipanayiotou y Morand-Fehr, 1991; Abijaudé y col., 2000).

#### **3.3.1. Control de la ingesta del rumiante**

Puesto que la ingesta ejerce una gran influencia en la producción y composición de la leche (Hadjipanayiotou y Morand-Fehr, 1991), es importante el estudio de aquellos factores que la determinan. En los rumiantes, la ingesta está mayoritariamente regulada por factores desencadenados por la presencia del alimento en el rumen. La distensión del rumen y los aspectos químicos y bioquímicos derivados de la digestión

### *3. Antecedentes*

---

ruminal posibilitan a los rumiantes el control de la ingesta de alimento (Forbes, 1995; Faverdin, 1999; Lu y col., 2005).

Los nutrientes requeridos para una adecuada actividad microbiana generalmente promueven la ingesta de alimento, mientras que los nutrientes que alteran la funcionalidad del rumen (lípidos) la reducen (Faverdin, 1999). Morand-Ferh (2005) en una revisión, expone que en cabras, el déficit de nitrógeno fermentable en la dieta disminuye la ingesta, mientras que el aporte de suplementos nitrogenados, la aumenta. Con respecto al efecto de los lípidos, la infusión al duodeno generalmente reduce la ingesta, pero cuando los lípidos son ingeridos o infundidos en el rumen, la disminución es incluso mayor (Faverdin, 1999). Este efecto negativo se ha comprobado en cabras y parece ser proporcional a la cantidad de ácidos grasos poliinsaturados que presenten los lípidos (Giger-Reverdin y col., 2004). El contenido en fibra del alimento es clave en la ingesta voluntaria, de modo que un incremento de la cantidad de fibra de la dieta reduce la ingesta de materia seca en cabras (Kawas y col., 1991; Santini y col., 1991; Lu y col., 2005). Además, puede disminuir la digestibilidad de algunos componentes de la dieta, excepto de la fibra, cuya digestibilidad aumenta normalmente (Kawas y col., 1991; Lu y col., 2005).

A largo plazo, los rumiantes parecen capaces de seleccionar el alimento tanto para optimizar el funcionamiento del rumen, como para satisfacer el equilibrio nutricional que requiere el organismo (Faverdin, 1999), lo que podría explicar la buena correlación entre el nivel de ingesta y la digestibilidad. La selección del alimento por los rumiantes parece que se basa, principalmente, en su contenido en proteína bruta, mostrando, generalmente, preferencia por dietas ricas en nitrógeno degradable, de alta calidad (Faverdin, 1999).

El nivel de ingesta energética puede variarse modificando tanto el tipo de forraje, su forma física o el contenido en fibra, así como la relación forraje:concentrado en la dieta (Morand-Fehr y col., 2000).

### *3.3 Suplementación lipídica en la dieta del rumiante*

---

Morand-Fehr y col. (2000), en una revisión al respecto, exponen que un incremento en el nivel de ingesta energética en cabras en lactación aumenta la producción de leche y disminuye su porcentaje en grasa. En cuanto a este último aspecto, Morand-Ferh y col. (1991) añaden que la proporción de los ácidos grasos C4-C16 se mantiene constante. Muchos estudios reflejan un ligero aumento en el contenido de la proteína y caseínas de la leche de diferentes rumiantes, debido al incremento de la ingesta energética (Rémond, 1985; Morand-Ferh y col., 1991; De Peters y Cant, 1992; Caja y Bocquier, 2000). Por otro lado, una ingesta reducida al principio de la lactación, podría disminuir la producción de leche, aumentando su contenido en grasa y, en menor medida, el de proteína (Morand-Ferh y col., 1991). Este último efecto parece deberse, principalmente, a la disminución en la producción (Rémond, 1985). Sin embargo, el aumento en el contenido de grasa en leche podría deberse a la movilización masiva de las grasas del tejido adiposo, principalmente de los ácidos grasos C18, de modo que se reduce significativamente la síntesis de novo de ácidos grasos de cadena corta (Morand-Ferh y col., 1991; Chilliard y col., 2003).

Abijaudé y col., (2000) estudiaron el efecto de la variación en la relación forraje:concentrado y en la fuente de almidón en la dieta (cebada o maíz), sobre la producción y composición de la leche en cabras. Estos autores, observaron que el contenido de grasa de la leche disminuyó significativamente, con dietas ricas en concentrado frente a dietas ricas en forraje, mientras que el contenido en proteína quedó ligeramente afectado. Estas observaciones están de acuerdo con los resultados obtenidos anteriormente en diferentes rumiantes (Morand-Ferh y col., 1991; Calderón y col., 1984; Caja y Bocquier, 2000). Morand-Ferh (2005), expone que las cabras son extremadamente sensibles a dietas pobres en fibra y ricas en concentrado. El pH ruminal desciende cuando la proporción de concentrado en la dieta excede el 60% de la materia seca, pudiendo provocar síntomas de acidosis como la caída de la ingesta o diarrea. Calderón y col. (1984), sugieren que el caprino es menos sensible que el vacuno a una dieta deficiente en fibra disminuyendo, en menor medida, el contenido en grasa de la leche.

### 3. Antecedentes

---

En los estudios de Abijaudé y col. (2000), se deduce que la relación forraje:concentrado tiene menos influencia sobre la ingesta de materia seca y producción de leche que la fuente de almidón en la dieta. El almidón rápidamente degradado en el rumen procedente de la cebada, aumentó la ingesta, la producción de leche y también la acidificación ruminal en cabras en lactación. Murphy y O'Mara (1993), en una revisión, exponen que el almidón rápidamente degradable produce la disminución del pH ruminal, reduciendo el número de bacterias celulolíticas y, por tanto, la degradación de la fibra. El aumento del almidón en la dieta de vacas en lactación debería incrementar la relación propionato:acetato, resultando en mayor cantidad de proteína en leche y menor de grasa.

Con respecto al perfil de ácidos grasos de la leche de cabra, en relación al nivel de forraje en la dieta, LeDoux y col. (2002) concluyen que la leche de las cabras alimentadas con dietas ricas en forraje presentan valores mas bajos de C10:0, C12:0, y C18:2 y mayor proporción de los ácidos grasos C18:1 y C18:3 en la leche de aquellas cabras cuya dieta incluía un menor nivel de forraje. Observaron que el incremento de la fracción de forraje en la dieta así como niveles altos de alfalfa (en comparación con alfalfa deshidratada), producen la disminución del contenido en ácidos grasos C18:1 *trans*, considerados perjudiciales para la salud (FAO/OMS, 2003). Elgersma y col. (2006) exponen que la leche producida por vacas alimentadas con forraje verde, especialmente aquellas sometidas a pastoreo, presentó mayor proporción de grasos insaturados, con valores elevados de poliinsaturados y CLA (en particular C18:2, *cis*-9, *trans*-11) que la leche producida por los animales que consumieron ensilados.

Respecto a los cambios en la forma física de la fibra de la dieta, Murphy (1995) indica que estos pueden producir alteraciones en la composición de la leche. Cuando la dieta está en forma de gránulos, el contenido de grasa en la leche puede disminuir y el de proteína aumentar debido a que el tiempo de fermentación del alimento en el rumen se reduce (Rook, 1976). Morand-Fehr y col. (2000), observan una caída en el porcentaje de grasa de la leche al sustituir heno de alfalfa, en forma de fibra larga, por granulado. Sanz Sampelayo y col. (1998b), concluyen que la composición

y producción de leche en cabras parece ser más sensible a la ingesta energética que a las características físicas de la dieta consumida. Sin embargo, observaron que cuando el forraje se suministraba en forma de gránulos, la utilización del nitrógeno y de la energía para producción de leche fue mejor. Por otro lado, el tamaño de partícula de la fibra de la dieta afecta al tiempo de masticación ejerciendo un efecto indirecto sobre la producción de grasa de la leche debido a la disminución de la relación acetato-propionato (Fredeen, 1996). Sutton y Morant (1989) concluyeron que el contenido de grasa de la leche se reduce con un tamaño de partícula del forraje inferior a 10 cm.

### **3.3.2. Metabolismo de los ácidos grasos en el rumen y la glándula mamaria**

La ingesta energética puede incrementarse aumentando el aporte de grasa en la dieta (Schingoethe, 1996). Esta estrategia, puede producir diferentes efectos que dependen de la cantidad y calidad de la grasa suplementada. Para el estudio de dichos efectos, es esencial conocer la digestión ruminal, así como el metabolismo de los ácidos grasos en la glándula mamaria.

La digestión de la grasa implica su hidrólisis e hidrogenación en el rumen, de modo que los ácidos grasos absorbidos en el intestino son más saturados que los presentes en la dieta (Doreau y Chilliard, 1997). La hidrólisis de los lípidos de la dieta en el rumen se produce por la acción de lipasas, galactosidasas y fosfolipasas, producidas por bacterias, principalmente, y protozoos (Harfoot y Hazlewood, 1988) que dan lugar a ácidos grasos libres. Se ha observado que ciertos factores disminuyen la lipólisis, como los antibióticos (Van Nevel y Demeyer, 1995) y valores bajos de pH (Van Nevel y Demeyer, 1996). Este último factor podría explicar la reducción de la lipólisis con dietas ricas en almidón (Gerson y col., 1985). Además, tanto la velocidad como el grado de lipólisis pueden verse influidos por la fuente de grasa, puesto que tienden a ser más altos

cuando las grasas se suministran puras que cuando se encuentran protegidas (jabones cálcicos) o integradas en una estructura celular, como las semillas oleaginosas enteras (Doreau y Ferlay, 1994). Tras la lipólisis, tiene lugar la hidrogenación, siendo el primer paso la isomerización. Las hidrogenasas permiten la reducción de los ácidos grasos mediante diferentes vías, siendo el producto final, en el caso de los ácidos grasos poliinsaturados de 18 átomos de carbono, el ácido esteárico (Harfoot y Hazlewood, 1988).

#### **Biohidrogenación ruminal de los ácidos grasos insaturados**

El fenómeno de la biohidrogenación está muy contrastado en la literatura científica, citado por Reiser en 1951 y verificado posteriormente por Shorland y col. (1955), al demostrar que la composición de la dieta en ácido linolénico era superior a la existente en el rumen de las ovejas, al contrario de lo que ocurría con la cantidad de ácido esteárico.

Los ácidos grasos ingeridos con los lípidos de la dieta son susceptibles de ser hidrolizados en el rumen por las enzimas lipolíticas, siendo la esterificación o no de estos ácidos grasos la etapa que limita la velocidad del proceso (Palquist y Jenkins, 1980). En 1970, Dawson y Kemp describieron como parte de los ácidos grasos insaturados de 18 átomos de carbono ingeridos con la dieta, se transforman en ácido esteárico en el rumen. Una mínima parte de los ácidos grasos ingeridos se absorbe en el rumen, el resto pasa al abomaso. La mayoría de los ácidos grasos pasan al tracto digestivo de forma no esterificada, probablemente en forma de jabones cálcicos o magnésicos insolubles asociados a partículas materiales. Los efluentes del rumen contienen cierta cantidad de ácidos transmonoinsaturados de 18 átomos de carbono que son productos intermediarios de la biohidrogenación, no presentes en la dieta ingerida por el animal. Este patrón composicional de ácidos grasos que llega al abomaso cambia cuando llegan al duodeno superior debido a los fosfolípidos biliares insaturados allí presentes.

### 3.3 Suplementación lipídica en la dieta del rumiante

---

La suplementación de la dieta con 50-100g diarios de aceite de pescado sin proteger tiene un efecto negativo sobre el contenido en grasa de la leche (Doreau y col., 1999). La cantidad de EPA y DHA suplementada apenas aparece en leche según Chilliard y col. (2000), explicando esta circunstancia como resultado de una posible hidrogenación en el rumen, siendo ésta muy elevada pero menor que la que sufren los ácidos grasos de 18 carbonos poliinsaturados.

En una revisión realizada por Chilliard en el año 2001, sobre varios estudios en los que se suplementaban las dietas de rumiantes con aceite de pescado sin proteger, se observa un descenso de la proporción de los ácidos palmítico o esteárico y del oleico. En todos los ensayos aumentaba considerablemente la cantidad del ácido C18:1 *trans* y del contenido de CLA, sobre todo del isómero 9 *cis*, 11 *trans* (Chilliard y col., 1997; Chouinard y col., 1998; Offer y col., 1999; Keady y col., 2000).

El examen de los isómeros conjugados *cis-trans* de la grasa de rumiantes, predijo que la conjugación de los ácidos grasos poliinsaturados debería preceder a su hidrogenación. A partir de LA marcado radiactivamente incubado con contenido ruminal de oveja, se obtuvo el sistema de dienos conjugados *cis-trans-cis* 9,11,15 octadecenotrienoico. La alteración del sistema de dobles enlaces se debe a la presencia de una isomerasa, la cual requiere para su actuación que el sustrato tenga un doble enlace en la posición 9 y un grupo carboxilo libre. La enzima responsable fue identificada como una  $cis-\Delta^{12}$   $trans-\Delta^{11}$  isomerasa (Palquist y Jenkins, 1980). Una vez que actúa esta enzima se produce la hidrogenación de la posición  $-\Delta^9$  mediante una adición específica de 2 hidrógenos (Dawson y Kemp, 1970). La siguiente etapa es la hidrogenación de la posición  $-\Delta^{11}$ , responsable de la velocidad de la reacción. El hecho de que la isomerasa implicada en este proceso necesite de un grupo carboxilo libre para actuar es la base de la protección de las grasas en forma de jabones cálcicos, ya que al estar saponificado el grupo ácido con un ión calcio no puede ser sustrato de la isomerasa y no se daría el proceso de hidrogenación del ácido graso.

### 3. Antecedentes

---

A partir de la isomerización estos conjugados pueden seguir distintas vías de hidrogenación pero la principal es la que comprende 2 sistemas hidrogenantes, produciéndose primero el paso a trans –cis octadeca- 11,15-dienoico y el paso a trans-octadeca-11-enoico. La ruta de hidrogenación del ácido linoleico es muy similar a la aquí descrita para el linolénico (Palquist y Jenkins en 1980).

La hidrogenación del ácido oleico o hasta ácido esteárico es mucho más rápida que la de sus isómeros (ácidos vaccínico y elaídico) hasta C18:0 debido a que el proceso es una adición *cis* estereoespecífica. El donador de estos hidrógenos puede ser debido a una activación del H<sub>2</sub> gas por una hidrogenasa implicando en el proceso al NAD o a una ferredoxina. (Dawson y Kemp, 1970).

El proceso de biohidrogenación lo pueden llevar a cabo multitud de bacterias normalmente presentes en el rumen, especialmente ciertas cepas de *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Bacteroides rumenicola*, *Ruminococcus albus* y *Ruminococcus flavefaciens*, también interviene el espiroqueto *Borrelia spp*, y en general los protozoos de la familia de los oligótricos (Dawson y Kemp, 1970 y Maczulak y col., 1981).

Cuantitativamente en el rumen se produce la mayor parte de la biohidrogenación del tracto digestivo de los rumiantes. Grummer en 1991 cifra esta hidrogenación en unos porcentajes que oscilan entre el 60 y el 90% de los ácidos grasos que ingresan en el rumen, mientras que Palmquist y Jenkins en 1980 los situaron entre un 68 y un 90%.

La transferencia media entre varios estudios de los ácidos grasos poliinsaturados procedentes de aceite de pescado sin proteger a leche es de 2.6% para el EPA y de 4.1% para el DHA y de 35% para el DPA (Offer y col., 1999; Chilliard t col., 2000; Givens y col., 2000; Jones y col., 2000; Keady y col., 2000). Sin embargo, cuando se infunde en el abomaso o en el duodeno, la transferencia de estos ácidos grasos es mucho mayor: 18-33% para el EPA y de 16-25% para el DHA (Hagemeister y col., 1991, Chilliard y col., 2000). Estos porcentajes de transferencia no son demasiado altos,

pudiendo ser la causa el hecho de que estos ácidos grasos están concentrados en los ésteres de colesterol y en los fosfolípidos (Offer y col., 1999).

Dawson y Kemp (1970), deducen que uno de los principales papeles biológicos de estos procesos es actuar como mecanismo detoxificante, en el caso que nos ocupa previniendo la toxicidad derivada de la ingesta de los ácidos grasos insaturados, ya que estos pueden inhibir el crecimiento microbiano. Esta toxicidad se explica por su gran actividad superficial y el consiguiente cambio en la permeabilidad de las membranas que esto conlleva. Además el proceso de biohidrogenación parece ser favorable energéticamente hacia el animal, puesto que en el proceso existe una competición por el hidrógeno y disminuye la formación de metano. La otra función biológica de la biohidrogenación es proteger a los tejidos de los efectos de una elevada ingestión de estos ácidos grasos cuyos productos de oxidación son unos tóxicos celulares muy poderosos. Dicha ingestión, acoplada con una baja ingesta de vitamina E puede favorecer ciertas miopatías en el animal.

#### **Síntesis de ácidos grasos en la glándula mamaria**

Aproximadamente el 40% de los ácidos grasos de la leche de rumiantes se sintetiza en la propia glándula mamaria, utilizando como precursores acetato y  $\beta$ - hidroxibutirato, procedentes de la fermentación de los hidratos de carbono en el rumen (Chilliard y col., 2000). Esta vía es el origen de los ácidos grasos de cadena corta y media (4 a 14 átomos de carbono) y de, aproximadamente, la mitad del ácido palmítico. El resto del ácido palmítico y de los ácidos grasos de cadena larga (principalmente C18:0 y C18:1) procede de lípidos circulantes en sangre (Chilliard y col., 2000) que tienen su origen en la grasa de la dieta y de los microorganismos ruminales, así como de la grasa movilizada de las reservas corporales. Además, en la glándula mamaria existe actividad delta-9 desaturasa, a través de la cual, aproximadamente el 40% de los ácidos esteárico (C18:0) y vaccénico (C18:1, *trans*-11), procedentes de la biohidrogenación ruminal, se convierten en ácido oleico (C18:1, *cis*-9) y CLA (C18:2, *cis*-9, *trans*-11),

respectivamente (Chilliard y col., 2000). Esta última es la vía cuantitativamente más importante (93%; Piperota y col., 2002) para la formación del CLA (C18:2, *cis*-9, *trans*-11) presente tanto en leche como en carne y, por ello, este isómero es el más abundante en dichos alimentos.

#### **3.3.3. Métodos de protección de la grasa frente al metabolismo ruminal**

Con el fin de cambiar la composición de la grasa de la leche o de la carne para hacerla más saludable, se han llegado a diseñar grasas protegidas ricas en determinados PUFA, los que en mayor o menor cantidad llegan a pasar a leche o depositarse a nivel de la canal (Ashes y col., 1992; Franklin y col., 1999; Sanz Sampelayo y col., 2002). La inclusión de manera adecuada de PUFA en la dieta del rumiante puede también acometerse con objeto de conseguir sobre su fisiología, efectos sumamente interesantes, puestos de manifiesto en diferentes especies sobre la fertilidad (Burke y col., 1997) y la modulación del sistema inmune (Rodríguez Osorio y col., 2001). Una protección eficaz debe ser capaz de resistir los efectos mecánicos de la masticación y la rumia (Gagliostro y Chilliard, 1992).

El aporte de lípidos protegidos contra la degradación ruminal en la alimentación de rumiantes es una alternativa muy utilizada en los sistemas productivos en todo el mundo. El uso de lípidos no protegidos contra su degradación en el rumen puede modificar la intensidad y la orientación de las fermentaciones ruminales, disminuyendo la digestión de los constituyentes de la pared celular del forraje y la producción de ácido acético, principal precursor de los ácidos grasos sintetizados en la glándula mamaria, al mismo tiempo que provocar un incremento en la producción de ácido propiónico (Chilliard y col., 2001 y 2003).

Gracias a su alto contenido energético, el aporte de grasas protegidas permite reducir la cantidad de carbohidratos rápidamente fermentables,

### *3.3 Suplementación lipídica en la dieta del rumiante*

---

tales como el almidón y las pectinas, en el concentrado con el que se suplementa al animal. Las fermentaciones en el rumen son dirigidas hacia una disminución de la producción y absorción de propionato y una menor producción de glucosa e insulina en el organismo. Estas circunstancias serían propicias para el aumento en la síntesis de grasa butirosa, único proceso productivo que representa un gasto específico de ácidos grasos, con respecto a suplementos ricos en almidón (Gagliostro y Chilliard, 1992).

Existen diversas técnicas industriales de protección de los lípidos frente al metabolismo ruminal. Las más empleadas y citadas en la bibliografía son las siguientes:

- Adsorción de grasas sobre un soporte inerte, descrita por Jenkins y Palmquist en 1984. La grasa se funde y mezcla con un soporte inerte (por ejemplo vermiculita y/o ventonita).
- Cristalización en frío de ácidos grasos o “fat prills”, descrita por Schauff y Clark en 1989. Los ácidos grasos se licuan y se pulverizan bajo presión sobre una atmósfera enfriada.
- Encapsulación de partículas lipídicas en una matriz proteica tratada con formaldehído. Este método ha sido ampliamente usado por distintos autores (Scott y col., 1971; Wren y col., 1976; Banks y col., 1990; Gagliostro y Chilliard, 1992), y se puede aplicar a grasas saturadas, insaturadas y a semillas vegetales enteras. La técnica consiste en recubrir a la grasa con una envoltura proteica y entrecruzar ésta mediante tratamiento con formaldehído.
- Aporte de ácidos grasos bajo la forma de sales de calcio. Es el método de protección de grasas más extendido y ampliamente usado en rumiantes a nivel mundial (Sukhija y Palmquist, 1990; Chilliard y col., 2001).

### **3.3.4. Efecto de la suplementación de la dieta con grasa sobre la producción y la composición de la leche.**

La composición lipídica de la leche de cabra y del queso refleja la composición de la grasa de la dieta (Gulati y col., 1997; Alonso y col., 2000), a pesar de la hidrogenación e isomerización de los ácidos grasos de la dieta en el rumen. Los resultados observados en vacas (Chilliard y col., 2001), cabras (Chilliard y col., 2003; Sanz Sampelayo y col., 2005) y ovejas (Caja y Bocquier, 2000) muestran que la respuesta a la suplementación de la dieta con grasa, difiere considerablemente, dependiendo de la especie:

- a) la producción de leche se incrementa en vacas en mitad de la lactación, pero no en cabras ni en ovejas;
- b) la secreción de grasa y el contenido de la misma en leche, aumenta marcadamente en ovejas y cabras, pero no en vacas, en las que puede no haber cambios o producirse un descenso;
- c) el contenido en proteína de la leche disminuye en vacas y en ovejas, pero no en cabras. Esto se debe a que la secreción de proteína en la leche disminuye en ovejas, pero no cambia en vacas y cabras (DePeters y Cant, 1992). Estos autores exponen que ciertos estudios sobre la influencia del aporte de grasa a la dieta en vacas en lactación, demuestran que la producción de proteína de la leche podría permanecer inalterada o incluso incrementar. Sin embargo, puesto que la producción de leche aumenta en mayor medida que la secreción de proteína, se produce una disminución en la concentración de proteína, debido a un efecto de dilución (DePeters y Cant., 1992; Schingoethe, 1996).

La grasa de la dieta tiene una influencia mayor sobre la síntesis de componentes no nitrogenados de la leche (lactosa y grasa) que sobre la de proteína. La disminución del contenido proteico de la leche podría deberse a una síntesis más eficiente de la lactosa (Schingoethe, 1996). Puesto que la

### 3.3 Suplementación lipídica en la dieta del rumiante

---

lactosa es un constituyente osmótico de gran importancia en la leche y su concentración es esencialmente constante, a medida que la síntesis de lactosa aumenta, la producción de leche también lo hace. Otra posible causa sería el efecto negativo de los lípidos de la dieta sobre la proteína de la leche (Murphy y O'Mara, 1993), debido a un efecto indirecto sobre el flujo de proteína microbiana, de modo que éste disminuye. Además, como se comentó anteriormente, algunos suplementos lipídicos, particularmente los ácidos grasos poliinsaturados, ejercen un efecto antimicrobiano que da lugar a una reducción de la digestibilidad de la fibra y, por tanto, de la relación acetato/propionato en el rumen (Fredeen, 1996).

El aumento de la concentración de los ácidos grasos deseados en los productos derivados de los rumiantes, puede conseguirse de varias formas: a) a través del aumento de la concentración de sus precursores en la dieta; b) por la reducción del grado de biohidrogenación en el rumen; c) mediante la mejora de la actividad de la enzima  $\Delta 9$  desaturasa de la glándula mamaria, que convierte el ácido vaccénico en ruménico (Elgersma y col., 2006). La manipulación, mediante la alimentación, del perfil lipídico de la grasa de la leche para mejorar su calidad nutricional y tecnológica, ha recibido una atención especial durante los últimos años (Caja y Schmidely, 2005). Chilliard y col. (2003) concluyen que a pesar de las diferencias en las respuestas cuantitativas (producción de leche y contenido en grasa), los cambios en la composición de ácidos grasos de la leche, como consecuencia de la suplementación lipídica, son similares en vacas y en cabras.

El principal interés se centra en la disminución de los ácidos grasos saturados, C12:0, C14:0 y C16:0, por su acción aterogénica, y en el incremento de los poliinsaturados n-3. Recientemente, la investigación se ha centrado en la reducción en la leche de los ácidos grasos monoinsaturados *trans* y en el incremento de los isómeros del ácido linoleico conjugado (especialmente el ácido ruménico, *cis*-9, *trans*-11, C18:2), debido a su acción inhibidora del crecimiento tumoral. La suplementación de la dieta con aceites poliinsaturados (aceites vegetales y de pescado) y, en general, todos los ácidos grasos de cadena larga, conduce

### 3. Antecedentes

---

a una disminución de la síntesis de novo y de la concentración total de grasa en la leche (Chilliard y col., 2000). Este efecto es tanto mayor cuanto mayor es la longitud de la cadena del ácido, su grado de insaturación y su proporción de dobles enlaces en configuración *trans* (Chilliard, 2001). La información disponible, en cuanto a suplementos de grasa, se centra principalmente en el uso de jabones cálcicos de ácidos grasos de cadena larga.

Caja y Schmidely (2005), exponen que la inclusión de aceites protegidos y semillas oleaginosas en el alimento, incrementa el contenido de ácidos grasos mono y poliinsaturados en la grasa de la leche, en proporción a su contenido en la dieta. Los aceites no protegidos, incrementan los ácidos esteárico y linoleico y reducen los ácidos grasos saturados en la leche, como resultado de la biohidrogenación ruminal y la desaturación parcial de estos ácidos grasos en la glándula mamaria. El contenido en CLA es mayor en leche de cabra y oveja que en la de vaca, mostrando sus valores más altos en condiciones de pastoreo, que disminuyen cuando el concentrado se incluye en la dieta.

Sanz Sampelayo y col. (2000) suplementaron la dieta de cabras en lactación con aceite de pescado protegido de la degradación ruminal en forma de jabones cálcicos, y obtuvieron mayor producción de leche, grasa y proteína (aún cuando la concentración de estos últimos no resultó alterada), frente a los animales alimentados sin este suplemento. Además, la leche obtenida se caracterizó por una mayor concentración de ácidos grasos poliinsaturados y menor de ácido esteárico, manteniéndose la de los ácidos grasos de cadena media. Posteriormente, Sanz Sampelayo y col. (2004) observaron, además, que los efectos persistían después de la retirada del suplemento, sobre la producción de leche, grasa y proteína, pero no sobre la composición en ácidos grasos de la misma. Teniendo en cuenta que el balance energético es el factor más importante en la determinación del contenido en proteína y grasa de la leche, diversos autores (Giger y col., 1987; Sauvant y col., 1987; Sanz Sampelayo y col., 1998b) han asociado el efecto anteriormente descrito a la similitud en las ingestas de energía metabolizable.

### **3.4. Utilización metabólica de los PUFA n-3 por el rumiante**

Al suplementar la dieta de los rumiantes con grasa protegida, debe tenerse en cuenta que los resultados a obtener vendrán determinados por la utilización nutritiva que de los distintos componentes de la dieta y, en especial, de los diferentes ácidos grasos tenga lugar, lo que dependerá de la naturaleza de la grasa, del grado y método de protección y del animal en cuestión. En este sentido, la mayor parte de los ensayos realizados con el fin de investigar la utilización nutritiva de una grasa protegida en el rumiante, se han llevado a cabo bien en ovejas, corderos, terneros y vacas (Shell y col., 1978; Clapperton y Steele, 1983; Fallon y col., 1986; Enjalbert y col., 1994), resultando prácticamente nulos los datos referentes a la especie caprina.

#### **3.4.1. Digestibilidad**

##### **Digestibilidad de la materia seca, materia orgánica, grasa y energía.**

La ingesta de materia seca y de materia orgánica depende en gran medida de la cantidad de la grasa suplementada, de la calidad de la misma y del grado de protección a que esté sometida. En un ensayo realizado en ovejas cuya dieta se suplementó con aceite de atún sin proteger, la ingesta de materia seca fue sustancialmente inferior a la ingesta de la dieta suplementada con el mismo aceite protegido con caseína tratada con formaldehído, y la ingesta de esta última no diferente a la resultante de tomar la ración control (Kitessa y col., 2001). También ha sido descrita una reducción en la ingesta al incorporar ácidos grasos procedentes de aceite de pescado en la dieta (Cant y col., 1996). En otro trabajo publicado más recientemente, Loo y colaboradores (2005) compararon la ingesta de vacas cuya dieta fue suplementada con aceite de pescado, aceites de linaza y girasol, siendo significativamente inferior la ingesta de la

### *3. Antecedentes*

---

suplementación del aceite de pescado comparado con las dietas suplementadas con aceites de linaza y girasol.

Respecto a la protección de la grasa suplementada, está pródigamente aceptado que las sales cálcicas utilizadas para este motivo no afectan a la digestibilidad de la materia orgánica, puesto que son inertes en el rumen y atóxicas para los microorganismos ruminales (Elmeddah y col., 1991). Una de las explicaciones más utilizadas para explicar la ausencia de efectos negativos de las sales cálcicas está relacionada con los efectos específicos de los iones cálcicos (Ferlay y Doreau, 1993), aunque este postulado implica la disociación de las sales en el rumen, y por tanto, supondría una protección incompleta y la posible hidrogenación de parte de los ácidos grasos protegidos.

En cabras en lactación y con el fin de conseguir una composición de la grasa láctea más saludable, Sanz Sampelayo y col., administraron en el año 2002 una grasa protegida rica en PUFA a distintos niveles, determinando que la digestibilidad de la materia seca, materia orgánica y energía iba decreciendo levemente al aumentar el nivel de grasa de la dieta. En este estudio la digestibilidad de las fracciones fibrosas fue estadísticamente no diferente. Resultados similares fueron obtenidos para ovejas por Enjalbert y col. (1994). En corderos en crecimiento, Shell y colaboradores (1978) suplementaron la dieta con aceite de semilla de algodón protegido por caseína tratada con formaldehído, obteniendo una digestibilidad de la materia seca, proteína, energía y fibra ácido detergente no afectada por la suplementación.

Al estudiar la digestibilidad en los rumiantes hay que tener en cuenta que el flujo de ácidos grasos que pasa al duodeno suele ser superior al que entra en el rumen (Doreau y Ferlay, 1994), aseveración que se puede defender teniendo en cuenta la síntesis de lípidos bacterianos (las bacterias contienen entre 10 y 15% de lípidos en sustancia seca) (Viavini, 1970) y la imperiosa necesidad de condiciones aeróbicas que requiere el catabolismo de los ácidos grasos, además, no hay que olvidar que su absorción ruminal normalmente es muy lenta (Noble, 1981).

### 3.4. Utilización metabólica de los PUFA n-3 por el rumiante

---

Sin embargo, también se encuentran trabajos en la bibliografía que muestran balances negativos entre el flujo de ácidos grasos que entra al rumen y pasa al duodeno (Leegay-Carmier, 1989; Ferlay y col., 1993), en particular para dietas con un porcentaje lipídico alto. Esta posibilidad también fue relatada por Goosen en 1975 al describir como la absorción de ácidos grasos en el rumen era directamente proporcional a la cantidad de ácidos grasos presentes. Ha sido demostrado *in vitro* que los ácidos grasos pueden ser catabolizados hasta cuerpos cetónicos en el epitelio ruminal (Jackson y col., 1964; Cook y col., 1967) o junto a células ruminales aisladas (Jesse y col., 1992).

Doreau y Ferlay en 1994 después de comparar 91 publicaciones que estudian el efecto producido en la razón entre el flujo de ácidos grasos entrantes y salientes del rumen concluyen que la protección de la grasa de la dieta por los métodos convencionales no ha demostrado tener ninguna consecuencia sobre dicho ratio. Otro estudio reciente tampoco pudo demostrar dicha relación para el balance ruminal en ovejas alimentadas con una dieta suplementada con aceite de atún protegido con caseína tratada con formaldehído, siendo este no diferente del de otro grupo de ovejas alimentadas con el mismo aceite sin proteger (Kitessa y col., 2001).

La contribución de los microorganismos al flujo de ácidos grasos que pasa del rumen al duodeno fue determinada por Ferlay y col. en 1993, estimando que es de un 40% para las dietas con una cantidad de grasa inferior al 5%, mientras que cuando se supera este porcentaje de lípidos dietarios la contribución microbiana baja hasta un 30% por los motivos anteriormente comentados. Estos valores pueden ser una sobreestimación, puesto que parte de los ácidos grasos de la dieta pueden ser adsorbidos por las bacterias o incorporados por las mismas (Bauchart y col., 1990)

En la pared ruminal se absorben los ácidos grasos de cadena corta (hasta doce átomos de carbono), el resto pasa al abomaso junto a las sales cálcicas, disociándose estas últimas completamente con la bajada de pH (Sukhija y Palmquist, 1990). Los ácidos grasos pasan al duodeno en una fase insoluble que contiene, además, partículas procedentes del pienso,

### 3. Antecedentes

---

células microbianas y células endoteliales descamadas (Doreau y Felay, 1994). Para su solubilización se forman miscelas con sales biliares y lisolecitinas. Estas miscelas se absorben mayoritariamente en el yeyuno, excepto las sales biliares que lo hacen en el íleon (Chilliard y col., 1992). Aproximadamente el 90% de los lípidos de la dieta llegan al duodeno no esterificados, su reesterificación se produce en las células epiteliales del intestino delgado, a continuación los triglicéridos y los fosfolípidos son incorporados en quilomicrones y lipoproteínas que son transportados en su mayoría por el sistema linfático. De estos ácidos grasos que pasan al duodeno, aproximadamente el 90% lo hacen como ácidos grasos saturados no esterificados cuando no se protegen. (Chilliard y col., 1992).

En cuanto al grado de protección, no hay ningún estudio que encuentre diferencias entre la digestibilidad a nivel del intestino delgado de los lípidos que se administraron protegidos frente a los que no lo están. Esto se confirma con dos publicaciones que estudiaron la digestibilidad lipídica infundiendo triglicéridos en el abomaso y el duodeno (Chilliard y col., 1991; Drackley y col., 1992). Sin embargo, el hecho de suplementar los ácidos grasos en forma de triglicéridos en el duodeno puede maquillar estos resultados (Machmüller y col., 2000).

#### **Digestibilidad de los ácidos grasos individuales.**

Durante muchos años se ha pensado que la digestibilidad de los ácidos grasos aumentaba con incrementos en la cantidad de grasa de la dieta (Sharma y col., 1978). Esta creencia pudo deberse a una infravalorada estimación de la digestibilidad por no tener en cuenta la diferencia entre el flujo de ácidos grasos que pasan al rumen y los que salen al duodeno, sobre todo en dietas con poca cantidad de grasa. Doreau y Ferlay en 1994 compararon 73 dietas diferentes de 13 experimentos, no encontrando en esta revisión resultados que permitan aseverar una relación entre la cantidad de ingesta de ácidos grasos y la digestibilidad de cada uno de ellos. En todo caso, destacan que ésta puede aumentar en casos en los que la dieta tenga una cantidad muy reducida de ácidos grasos. El rango de digestibilidad de los ensayos comparados oscila entre 55 y 92%,

### 3.4. Utilización metabólica de los PUFA n-3 por el rumiante

---

obteniéndose los porcentajes más altos para las dietas con parte de la grasa protegida.

En el año 2005 Loor y col. estudiaron en vacas en lactación la efectividad de suplementar dietas con una alta fracción de concentrado combinadas con aceite de pescado, aceite de linaza o aceite de girasol y comprobaron como se modifica el flujo duodenal de isómeros *cis* y *trans* de los ácidos grasos con 18 carbonos y 1, 2 o 3 dobles enlaces (isómeros de C18:1, C18:3 y C18:2 conjugado y no conjugado). Los flujos totales de ácidos grasos de los animales que ingirieron en su dieta aceite de pescado fueron significativamente inferiores al de las dietas con aceites de linaza y girasol. El balance ruminal (flujo duodenal – ingesta) de la totalidad de los ácidos grasos para la dieta con aceite de pescado fue igual a -17 g/d.

En 1992, Weisbjerg y col. estudiaron la digestibilidad de los ácidos grasos con cadenas entre 12 y 22 átomos de Carbono de 17 dietas diferentes. La digestibilidad de los ácidos palmítico y esteárico es superior a los demás ácidos grasos saturados. Esta afirmación fue corroborada por otros trabajos, resultando la media de comparar 15 publicaciones al respecto con 64 dietas diferentes, igual a 77.1% y 76.3% para el palmítico y el esteárico respectivamente (Doreau y Felay, 1994).

Normalmente, es aceptado que la digestibilidad en el intestino delgado se incrementa con el grado de insaturación (Machmüller y col., 2000). Esta opinión se basa en resultados obtenidos para monogástricos, que indican que los ácidos grasos saturados forman miscelas con más dificultad que los insaturados, lo cual dificulta su captación por las células endoteliales, y por tanto retrasa su reesterificación (Ockner y col. 1972; Freeman, 1984).

Cuando se suplementa la dieta con aceite de pescado la transferencia de los ácidos grasos poliinsaturados hasta la leche es muy baja. Para el ácido eicosapentaenoico (EPA) es de un 2.6%, mientras que para el ácido docosahexaenoico (DHA) apenas supera el 4% (Chilliard y col., 2001). Uno de los motivos es la biohidrogenación de estos ácidos grasos en el rumen, que parece ser mayor para el EPA, puesto que la relación DHA /

### 3. Antecedentes

---

EPA es mayor en el duodeno que en la dieta (Doreau y Chilliard, 1997; Chilliard y Doreau, 1997). Sin embargo, cuando el aceite de pescado se administra en el duodeno, la eficiencia con que se transfieren a la leche es mucho mayor: 18-33% para el EPA y 16-25% para el DHA (Chilliard y col., 2000). El bajo porcentaje que pasa a leche puede ser debido a que estos ácidos grasos administrados al duodeno se encuentran formando parte de triglicéridos (Storry y col., 1969) y de ésteres de colesterol y fosfolípidos (Offer y col., 1999) que son utilizados muy poco por las glándulas mamarias.

Generalmente, se acepta que el flujo de ácidos grasos que deja el intestino delgado es muy parecido al flujo fecal de ácidos grasos. Sin embargo, cuando la dieta contiene un alto porcentaje de concentrado, la fermentación y síntesis microbiana puede ser importante. La síntesis microbiana del intestino grueso conlleva síntesis de ácidos grasos. El mecanismo de absorción en el intestino grueso es similar al del rumen (Stevens y col., 1980), los ácidos grasos de larga cadena no pueden ser absorbidos. Hay experimentos que describen un aumento entre el flujo de ácidos grasos del extremo terminal de íleon y la heces que varía entre un 10 y un 25% (Outen y col., 1975; Bock y col., 1991; Ferlay y col., 1992).

La excreción de los ácidos esteárico, mirístico y eicosanoico excede su ingesta en un ensayo con seis dietas diferentes presumiblemente debido a la síntesis microbiana de dicho ácido y/o por la hidrogenación de ácidos grasos insaturados de la dieta (Machmüller y col., 2000). En la bibliografía es común encontrar un alto porcentaje de ácidos grasos saturados en las heces de los rumiantes y coeficientes de digestibilidad negativos para los ácidos grasos saturados (Andrews y Lewis, 1970; Machmüller y col., 2000), esta composición puede tener, en opinión de Shell y colaboradores (1978), tres orígenes distintos: proceder de la hidrogenación de la grasa de la dieta en el rumen o en el intestino grueso (Stevens y col., 1980), de la excreción endógena (Bock y col., 1991; Ferlay y col., 1992) o de la absorción selectiva de los ácidos grasos mono y poliinsaturados (Machmüller y col., 2000). También pueden tener un origen bacteriano (Drackley y col., 1985).

### 3.4. Utilización metabólica de los PUFA n-3 por el rumiante

---

La digestibilidad aparente de EPA y DHA es superior al 95% para dietas suplementadas con aceite de pescado protegido o sin proteger frente al metabolismo ruminal (Kitessa y col., 2001) y en ambos casos se incrementa la proporción del ácido C18:1 *trans* en un 60%.

#### **Digestibilidad de la fibra**

Las bacterias del rumen protegen al animal frente a la acción depresiva de los lípidos sobre la degradación de la fibra (Jenkins y Palmquist, 1984; Palmquist, 1984; Sklan, 1989; Gagliostro y Chilliard, 1992). Sklan argumentó en 1989 que las dietas con más de un 5% de grasa producen un descenso de la actividad celulolítica de las bacterias del rumen causada por la alta concentración de ácidos grasos libres. La protección de los suplementos grasos de la dieta puede evitar este efecto.

Hay varios artículos que relacionan la suplementación con diferentes tipos de grasas y la digestibilidad de la fibra. No obstante, existe una gran controversia al respecto exponiéndose resultados muy diversos en diferentes publicaciones. Un grupo de autores sostiene que el suplemento de la dieta con grasa reduce significativamente la digestibilidad aparente de la fibra neutro detergente y de la fibra ácido detergente. Machmüller y col. en el año 2000 encuentran este efecto negativo para la FND y la FAD en ovejas en crecimiento que tomaron una dieta suplementada con semillas de girasol, mientras Park y col. sostienen la misma afirmación para la FAD en un artículo publicado en 1982. Otros dos estudios hallan un fuerte efecto negativo sobre la digestibilidad de la fibra cuando la dieta es suplementada con aceite de linaza (Ikwuegbu y Sutton, 1982)

Maczulak y colaboradores (1981) estudiaron el efecto de los ácidos grasos de cadena larga sobre el crecimiento de bacterias del rumen. Estos autores afirmaron que la presencia de ácido oleico inhibe fuertemente el crecimiento de las especies celulolíticas estudiadas, *Butyrivibrio fibrisolvens* y *Ruminococcus flavefaciens*. El mecanismo de acción se ha asociado a la adsorción del ácido oleico sobre la superficie celular

### *3. Antecedentes*

---

bacteriana, impidiendo el trasvase o ingreso de nutrientes en la célula. Esta adsorción se ha demostrado reversible en el caso de ciertos ácidos grasos de cadena larga. Otra hipótesis apuntada por estos autores, argumenta que la enzima celulasa, que se encuentra enlazada en la superficie celular, puede ver disminuida su actividad por la adsorción superficial de estos ácidos grasos

Por otra parte, otros investigadores defienden que la digestibilidad ruminal de la FND y FAD se incrementa cuando la dieta es suplementada con aceite de linaza rico en ácido linolénico (Ueda y col., 2003). Este efecto positivo sobre la digestibilidad de la fibra también ha sido observado en dietas suplementadas con aceite de pescado (Doreau y Chilliard, 1997).

Un tercer grupo de publicaciones científicas argumenta que la suplementación con aceite de colza en un 10% de materia seca no tiene efecto sobre la digestión ruminal de la fibra (Doreau y col., 1991). Tampoco se encontraron diferencias significativas en la digestibilidad de la fracciones fibrosas en cabras cuya dieta se suplementó con distintos niveles de sales cálcicas de aceite de pescado ricas en ácidos grasos poliinsaturados (Sanz Sampelayo, 2002).

Harvatine y Allen (2006), realizaron un ensayo con vacas en lactación comparando una dieta control con otras dos en las que sustituyeron un 2.5% de la grasa de la dieta por un suplemento compuesto por ácidos grasos libres saturados y otro suplemento compuesto por jabones cálcicos de ácidos grasos parcialmente insaturados de larga cadena. El resultado fue una reducción en la digestibilidad ruminal de la FND en los animales que tomaron la dieta suplementada con los ácidos grasos saturados y ningún efecto sobre la digestibilidad de la fibra en los animales cuya dieta se suplementó con grasa protegida parcialmente insaturada. La reducción en la digestibilidad de la FND fue compensada con por la digestión postruminal, resultando no diferente la digestibilidad total de la misma. Machmüller y col., tampoco encontraron en el año 2000 diferencias en las

digestibilidad de la fibra en animales cuya dieta se suplementó con grasa protegida.

### **3.4.2. Termogénesis inducida por la dieta**

Con el fin de conocer el efecto que la composición en ácidos grasos de la grasa de una dieta puede llegar a tener sobre la utilización de la energía, se han llevado a cabo distintos tipos de estudios referentes al empleo de dietas altas en grasa con diferente composición en ácidos grasos (Mercer y Trayhurn, 1987; Shimomura y col., 1990; Pan y Storlien, 1993; Su y Jones, 1993; Takahashi e Ide, 2000; Frenoux y col., 2001; Gaiva y col., 2001), obteniéndose resultados contradictorios en razón del distinto modelo experimental utilizado y procedimiento empleado.

Los procesos de termogénesis juegan un papel fundamental en la relación del balance energético. Actualmente, la termogénesis facultativa inducida por el tipo de dieta es objeto de un profundo debate. En este sentido, distintos resultados experimentales consideran que la pérdida de calor que tiene lugar bajo consumo de una dieta alta en carbohidratos frente a otra alta en grasa, resulta mayor (Schwartz y col., 1985; Halas y col., 2003). El hecho de que la grasa de la dieta se deposite en el tejido adiposo con una eficiencia mayor cuando la energía procede de los lípidos, es comentado por estos autores como una de las posibles causas de la mencionada diferencia en la termogénesis. Ésta es una de las razones por las que las dietas altas en grasa, aparecen directamente relacionadas con el desarrollo de la obesidad (Boden y Chen, 1995). Por lo tanto, las dietas altas en grasa pueden reducir la pérdida energética como consecuencia de su menor efecto térmico, comparado con el de los carbohidratos y proteínas (Astrup y col., 2002).

Otros estudios señalan que la pérdida de calor podía resultar más alta bajo ingesta de una dieta alta en grasa rica en PUFA (Müller y Kirchgessner, 1998; Clarke, 2000; Takahashi e Ide, 2000; West y col., 2000; Terpstra y col., 2002; Mitchell y Pursel, 2003). Un tercer grupo de publicaciones no encuentran resultados significativamente diferentes en la

### *3. Antecedentes*

---

pérdida de calor entre diferentes tipos de dietas (Gaiva y col., 2001; Bouthegourd y col., 2002).

Müller y Kirchgessner (1998), explicaron la mayor termogénesis originada por los PUFA, indicando que estos ácidos grasos son oxidados preferentemente para obtención de energía. De acuerdo con esto, Clarke (2000), postula la hipótesis de que los PUFA podrían oxidarse a nivel del peroxisoma celular en vez de en la mitocondria. De esta manera, cada acetyl-CoA rendiría dos ATP en vez de tres. En opinión de este autor, los enzimas implicados en la oxidación de los ácidos grasos en el peroxisoma, tanto del hígado como del músculo, se incrementan de dos a tres veces cuando la dieta lleva aceite de pescado rico en PUFA con 20 y 22 átomos de carbono.

La mayor tasa de oxidación de una grasa constituida por PUFA, es un aspecto bien conocido (Su y Jones, 1993; Zhao y col., 2001; Jorgensen y col., 2003). Los PUFA, sobre todo de la serie n-3, originan energía a una tasa superior que la que generan los AGS, energía que se utiliza en distintos procesos metabólicos, entre ellos la síntesis proteica (Fickova y col., 1998; Clarke, 2000; Takahashi e Ide, 2000). Relacionado con el particular metabolismo de los PUFA, se ha descrito que un aumento en la cantidad de grasa de la dieta durante el crecimiento, produce una utilización de la proteína de la dieta más eficiente, obteniéndose tasas mayores de retención de la misma (Sanz Sampelayo y col., 1997). El interés del proceso de síntesis proteica y el costo energético del mismo, indican la importancia que tiene la cantidad y la naturaleza de la grasa de la dieta.

### **3.5. Papel de los PUFA sobre la eficiencia reproductiva del ganado cabrío**

Una causa importante de la infertilidad son las situaciones carenciales en uno o más nutrientes asociados con la reproducción (Salisbury y Vandemark, 1964).

#### **3.5.1. Suplementación de la dieta con grasa y actividad reproductora del rumiante.**

Varios estudios ponen de manifiesto la posibilidad de mejorar la función reproductiva en la hembra mediante la alimentación, haciendo especial hincapié en la suplementación de las dietas con grasa para que mejore el estatus energético, actúe como precursora de algunas hormonas reproductivas e intervenga en los circuitos reguladores de la fisiología reproductiva del animal. La suplementación de dietas con aceite de pescado o sales cálcicas de aceite de pescado a vacas y ovejas en lactación suele mejorar las tasas de concepción (Lucy y col., 1991; Thomas y col., 1997; García-Bojalil y col., 1998; Kuran y col., 1999; O'Callaghan and Bolland, 1999; Mattos y col., 2002) e incrementar las posibilidades de supervivencia del embrión (Staples y col., 1998; Petit y col., 2002).

Staples y colaboradores (1998) estudian, para la vaca, los efectos que la suplementación de la dieta con distintos tipos de grasa puede tener sobre la reproducción. Estos autores comentan que la información disponible procede de estudios en los que los objetivos eran, más bien, de naturaleza nutritiva y no meramente reproductiva. En estos casos se analiza esencialmente, la ingesta de materia seca, la digestibilidad de los nutrientes, la producción y composición de la leche, etc. Como resultado de esto, distintos aspectos de manejo quedan sin controlar; éstos pueden afectar a otras variables dependientes que desde un punto de vista reproductivo llegan igualmente a analizarse. En este sentido Barton y Carroll (1992), indican los criterios y controles que son necesarios llevar a

cabo cuando se realizan ensayos tanto desde un punto de vista nutritivo como reproductivo, comentando que se pueden necesitar una gran cantidad de animales con el fin de poder obtener resultados significativos, lo que obligaría a realizar este tipo de estudios en granjas comerciales, donde el control necesario podría ser, muchas veces, difícil de llevar a cabo.

En la revisión de Staples y colaboradores (1998) de cada 100 casos analizados, 17 mostraban un efecto positivo, en el sentido de aumentar la tasa de concepción. Las grasas utilizadas en los diferentes ensayos encontrados en la bibliografía son de lo más heterogéneo: sales cálcicas de diferentes tipos de ácidos grasos de cadena larga, harina de pescado, sebo, etc. Frente a esto, tres estudios obtuvieron unos efectos fuertemente negativos sobre la eficiencia de la reproducción, haciendo disminuir la tasa de concepción. En las conclusiones de esta revisión se indica cómo la inclusión de algún tipo de grasa dentro de la ración, a un nivel del 2-3% de la materia seca, durante los 30 días previos a la cubrición, da lugar a una significativa mayor tasa de concepción y preñez en, al menos, la mitad de los estudios revisados.

#### **3.5.2. Causas que determinan el efecto de la grasa sobre la capacidad reproductora.**

Los mecanismos por los que la grasa de una dieta puede llegar a mejorar la capacidad reproductora del animal no son aún bien conocidos, habiéndose postulado al respecto, distintas hipótesis. En primera instancia pueden suponer una mejora en el estatus energético, lo que determina que después del parto, el animal entre antes en celo, esto repercutiría de manera positiva sobre la fertilidad. En segundo lugar se señala el aumento en la formación de hormonas esteroideas, lo que igualmente, daría lugar a una mayor capacidad reproductora. En tercer lugar, la suplementación sería capaz de modular la concentración de insulina, con lo que se influiría sobre el desarrollo de los folículos ováricos. En cuarto lugar habría que señalar el efecto que la grasa ejercería sobre la estimulación o inhibición de la producción de prostaglandinas (Stapples y col., 1998).

### **Suplementación de la dieta con grasa y estatus energético**

Uno de los objetivos que se persiguen cuando la dieta del rumiante se suplementa con una grasa, consiste en mejorar el balance energético negativo que en estos animales se establece después del parto, efecto debido por una parte, a la caída que la ingesta voluntaria experimenta y, por otra, al incremento que los requerimientos energéticos alcanzan al comienzo de la lactación. Sin embargo, puede que la ingesta energética no sufra cambio alguno en el caso de consumo de dietas suplementadas con grasa, debido a la caída, que algunas veces sufre la ingesta de materia seca con este tipo de dietas (Jerred y col., 1990; Andrew y col., 1991; Harrison y col., 1995; Romo y col., 1996). Un aumento en la secreción endógena de colecistoquinina puede ser la responsable de la caída en la ingesta (Choi y col., 1996). Frankin y colaboradores (1999) indican que esa menor ingesta puede deberse a una menor palatabilidad de la dieta, a su mayor densidad energética o al consumo de determinados ácidos grasos, aunque éste es un aspecto aún no conocido del todo. En este sentido, la mayoría de los estudios llevados a cabo con grasas protegidas frente al metabolismo ruminal, concluyen que al utilizar este tipo de suplementación de manera temprana después del parto, se mantiene el estatus energético del animal, posiblemente como consecuencia de la no caída en la ingesta (Staples y col., 1998). Otras veces lo que se llega a obtener es una mejora en dicho estatus energético (Palmquist y col., 1994; Harrison y col., 1995) o por el contrario, un empeoramiento del mismo en virtud de la caída experimentada, en estos casos, en la ingesta (Spicer y col., 1993),

Los aportes insuficientes de energía son causa de trastornos en la reproducción de la hembra pudiendo causar infantilismo ovárico, retrasos de la madurez sexual, celos irregulares, baja fertilidad y hasta el cese de la actividad ovárica (Boza, 1998; O'Callaghan and Boland, 1999). Sin embargo, desde el punto de vista energético, un aporte insuficiente en la fase final de la gestación, puede determinar pérdidas importantes en la madre con escasas consecuencias en el peso de la cría al nacimiento (Boza, 1998). No obstante, para el ganado bovino, los requerimientos energéticos para el crecimiento folicular y la ovulación son muy bajos (menos de 3 MJ

### *3. Antecedentes*

---

de energía metabolizable por día) comparados con los de mantenimiento y producción (60-250 MJ de energía metabolizable por día) (O'Callaghan and Boland, 1999). Estos autores sostienen que el estatus energético es el factor nutricional que más influye sobre la reproducción, pero siempre y cuando exista un déficit severo y prolongado de energía, de manera que para que se produzca un descenso en la tasa de ovulación y en la frecuencia del pulso de hormona luteinizante es necesaria una restricción de varios meses (O'Callaghan and Boland, 1999).

Spicer y col. en 1997, suplementaron la dieta con sebo al 3% de la materia seca, obteniendo una mayor fertilidad a pesar de constatarse un balance energético más negativo que el de los animales controles. En otro caso, la tasa de fertilidad disminuía del 67 al 33% al ser administrada una dieta que contenía harina de pescado en vez de harina de soja, siendo semejante en estos casos el balance energético (Carroll y col., 1994). Si el estatus energético se estima por medio de los valores de peso vivo o condición corporal, igualmente se ha determinado que una mejora de la fertilidad puede tener lugar sin que se acompañe de un mayor peso vivo o condición corporal (Armstrong y col., 1990; Carroll y col., 1994) o, incluso, bajo una caída de los mismos (Burkey col., 1997; Sklan y col., 1991). La necesidad de llevar a cabo los estudios precisos en una granja donde los animales se encuentren bajo condiciones normales de explotación, determina que en la mayoría de los casos, el estatus energético de los animales no pueda ser establecido, con lo que dicho aspecto es difícil de tener en cuenta para el correspondiente análisis de resultados (Staples y col., 1998).

Lucy y colaboradores (1991) concluyen que la función reproductora de la vaca queda, después del parto, limitada por la cantidad de energía consumida. Un balance energético negativo, el que normalmente tiene lugar al comienzo de la lactación, origina una caída en la formación de hormona luteinizante, retrasando la aparición del celo, aspectos que se mejoran cuando el animal alcanza un balance energético positivo o menos negativo. Del mismo modo, comentan cómo un balance energético negativo, da lugar a unos folículos ováricos que crecen más lentamente que

### 3.5. Papel de los PUFA sobre la eficiencia reproductiva del ganado cabrío

los de unos animales que se encontraban bajo un balance energético positivo, indicando los autores que la situación de balance energético negativo que se instaura en el rumiante después del parto, puede mejorarse mediante la suplementación de la dieta con una grasa. La administración de este tipo de dietas puede llegar por tanto, a estimular la función ovárica. Con el fin de verificar esta hipótesis, se alimentaron vacas con una dieta control y otra similar pero suplementada energéticamente por medio de una grasa en forma de jabones cálcicos de ácidos grasos de cadena larga (Lucy y col., 1991, Lucy y col., 1992). Durante los primeros 25 días siguientes al parto, las vacas suplementadas con la grasa, tuvieron menos folículos ováricos de pequeño tamaño y más de mayor tamaño. Los autores concluyen indicando que bien la suplementación energética o más concretamente la ingesta de la grasa, estimulaba el desarrollo folicular.

Para aclarar este aspecto se llevaron a cabo otra serie de ensayos en los que se utilizaron tres dietas; una control, otra que contenía sales cálcicas de ácidos grasos de cadena larga, la que presentaba un contenido energético equivalente a la control, y una tercera suplementada con la misma grasa que la segunda en forma de sales cálcicas. A las cuatro semanas del consumo de estas dietas, los folículos preovulatorios, resultaban mayores para el caso de los animales que habían consumido las dietas suplementadas con la grasa rica en ácidos grasos de larga cadena. Además, se deducía que el efecto más alto correspondía al consumo de la dieta suplementada con la grasa pero con una menor densidad energética. Los autores concluyen indicando que la grasa en forma de sales cálcicas y no la adición de energía por otra vía, era la causante de los efectos observados, comentando igualmente, cómo el mecanismo por el que lo indicado se conseguía no quedaba claro, pudiendo en principio, ser debido al mayor nivel sanguíneo que de colesterol se detectaba en el animal con respecto a los que ingirieron la dieta control (Lucy y col., 1992, 1993).

#### **Metabolitos sanguíneos indicadores del estatus energético**

Desde hace tiempo y por distintos motivos, se pretende llegar a identificar a nivel sanguíneo, la concentración de determinados metabolitos

### 3. Antecedentes

---

que pudieran servir de indicadores del estatus energético del animal. En este sentido, se ha indicado que podrían servir al respecto los niveles en sangre de diferentes compuestos, que pueden mostrar en función de su naturaleza una relación estrecha con el metabolismo energético (Boza, 1998).

Grummer y Carroll (1991), detectan junto a unos mayores niveles de ácidos grasos libres, una ausencia de subida de  $\beta$ -hidroxibutirato, lo que en principio parece indicar que hay una menor oxidación de los ácidos grasos hasta  $\text{CO}_2$ . Los autores comentan cómo el establecimiento de un ahorro en la utilización de la glucosa podría ser, al menos parcialmente, el causante de este resultado. Al administrar una dieta suplementada con grasa, los ácidos grasos resultan ser una fuente de energía para los tejidos, así como para la síntesis de triglicéridos en la mama. Cuando la grasa está constituida por ácidos grasos de largas cadenas, se reduce la síntesis de novo de ácidos grasos en la mama. Esta síntesis de ácidos grasos resulta dependiente de la formación de NADPH, compuesto que en su mayor parte se origina a partir de la oxidación de la glucosa. Por lo tanto, en opinión de Grummer y Carroll (1991), en los casos en que se administra una dieta suplementada con grasa, puede llegar a ahorrarse una cierta cantidad de glucosa, lo que determina que estas dietas resulten anticetogénicas, si bien por otra parte, los niveles de glucosa en sangre pueden no resultar incrementados.

En 1998, Sinclair y colaboradores suministraron una cantidad fija de alimento durante toda la preñez, puesto que es la práctica común en muchas ganaderías, a pesar de que los rendimientos de energía metabolizable van aumentando durante la gestación (Bruce y col., 1984), concluyendo que conforme avanza la preñez la concentración de glucosa en plasma iba bajando, mientras que las concentraciones de ácidos grasos no esterificados y de  $\beta$ -hidroxibutirato en plasma aumentan reflejando un balance energético negativo. Después del parto la concentración de glucosa en plasma seguía siendo baja, mientras que la de AGNE y BHB era aún más elevada, estos niveles pudieron deberse a que los nutrientes que antes eran para el feto se destinaban después del parto a las glándulas mamarias u

### 3.5. Papel de los PUFA sobre la eficiencia reproductiva del ganado cabrío

otros tejidos maternos. Hasta la cuarta semana posterior al parto no se estabilizaron los niveles de glucosa, AGNE y BHB (Sinclair y col., 1998).

#### **Suplementación con grasa y nivel de prostaglandinas.**

Todas las prostaglandinas derivan del ácido linoleico, o de sus productos metabólicos como el araquidónico, y de otros ácidos grasos poliinsaturados de largas cadenas, de lo que se deduce la importancia que los ácidos grasos poliinsaturados pueden tener en la reproducción como precursores o inhibidores de la formación de las prostaglandinas que intervienen en la luteolisis y desempeñan una función reguladora en el ciclo reproductivo de la hembra. Las prostaglandinas derivadas del ácido araquidónico son prostaglandinas de la serie 2, entre las que se incluyen las  $PGF_{2\alpha}$  y las  $PGE_2$  de particular importancia si nos encontramos al final del ciclo estral o en la gestación (Abayasekara y Wathes, 1999). Otro ácido graso responsable de la biosíntesis de prostaglandinas es el eicosapentaenoico, que produce prostaglandinas de la serie 3; éstas son consideradas menos activas que las procedentes del araquidónico (Fly y Johnston, 1990).

Las prostaglandinas  $F_{2\alpha}$  tienen una importante función consistente en reestablecer el ciclo estral si el animal no ha sido fecundado (Petit y col., 2002). También son utilizadas para la sincronización del estro del rebaño con las ventajas económicas y de manejo que de ello se derivan (Xu and Burton, 2000; LeBlanc y Leslie, 2003; Tenhagen y col., 2004). Sin embargo, cuando se produce la fecundación la liberación de prostaglandinas  $F_{2\alpha}$  por el útero debe ser inhibida para preservar el cuerpo lúteo en el ovario y prevenir una posible muerte embrionaria temprana (Staples y col., 1998; Mattos y col., 2002).

En relación con lo comentado anteriormente, Staples y colaboradores (1998) indican que son sustancias que juegan un amplio papel en la fisiología y metabolismo del mamífero. La mayor parte de los órganos de estos animales, sintetizan prostaglandinas. Estas sustancias resultan ser reguladoras locales, lo que hace que se sinteticen en la proximidad de las

### 3. Antecedentes

---

células en las que actúan. En el tracto reproductivo, los tejidos del útero resultan ser las principales fuentes de prostaglandinas, especialmente al comienzo del post-parto, momento en el que los niveles de prostaglandinas de la serie dos, experimentan una gran subida, la que parece quedar asociada con la regresión del cuerpo lúteo y del útero. Durante las dos semanas siguientes, la concentración de prostaglandinas vuelve de una manera gradual, a sus valores basales. Después, el útero libera prostaglandinas de la serie dos de manera regular durante las semanas siguientes hasta comience un nuevo celo y siempre que el animal no quede gestante. En el momento en que comience la gestación, la liberación de estas prostaglandinas desde el útero, queda inhibida con objeto de mantener la gestación. Como las prostaglandinas de la serie dos ejercen un efecto sobre la regresión o desaparición del cuerpo lúteo, las concentraciones de progesterona en plasma se relacionan inversamente con las de prostaglandinas de la serie dos durante este proceso. Staples y colaboradores (1998) terminan indicando cómo las prostaglandinas ejercen una función importante en el restablecimiento del ciclo estral, hasta que el animal quede otra vez gestante. A partir de este momento, su formación debe caer, previniéndose de esa manera, una posible muerte embrionaria.

Como se ha comentado anteriormente, los ácidos grasos poliinsaturados de larga cadena pueden servir como precursores para la biosíntesis de prostaglandinas y como inhibidores de las mismas, por lo tanto depende del tipo y de la cantidad proporcional de ácidos grasos y del momento reproductivo del animal el que ejerzan una función u otra (Staples y col., 1998; Petit y col., 2002).

Varios estudios informan sobre los efectos inhibidores del ácido linoleico sobre la producción de prostaglandinas de la serie 2 (Thatcher y col., 1994), la suplementación con ácido linoleico ha reducido la cantidad de ácido araquidónico en terneros prerrumiantes (Jenkins, 1988). El ácido linoleico actúa como un inhibidor de la síntesis de prostaglandinas cuando es producido por el endometrio después de la fecundación para preservar la integridad del embrión (Danet-Desnoyers y col., 1993; Thatcher y col., 1994). El mecanismo de inhibición puede deberse a la competencia como

### 3.5. Papel de los PUFA sobre la eficiencia reproductiva del ganado cabrío

sustrato con el araquidónico por la unión a la cicloxigenasa, enzima responsable de la biosíntesis de las prostaglandinas (Smith y col., 1991; Burke y col., 1997).

Otros estudios mantienen que una inyección intravenosa de una solución rica en aceite de soja (50% de ácido linoleico) en vacas y en ovejas en los días centrales del ciclo estral incrementa la concentración de prostaglandinas en plasma, medida por la concentración del metabolito 15-ceto-13,14-dihidroprostaglandina  $F_{2\alpha}$  (Lucy y col., 1990; Grummer y Carroll, 1991; Burke y col., 1996). No fue determinado si estos resultados se debían a una conversión del ácido linoleico en prostaglandinas  $F_{2\alpha}$  o a un efecto indirecto de los ácidos grasos sobre la secreción de estas prostaglandinas. En el mismo trabajo Burke y colaboradores (1996) compararon en ovejas la suplementación de aceite de soja con otra de aceite de oliva, resultando un incremento superior de las prostaglandinas con este último y alcanzando antes el final del ciclo estral las ovejas a las que se les habían inyectado la solución rica en ácido oleico. De lo que se podría deducir que la suplementación con una pequeña cantidad de precursor de prostaglandinas (como la que se encuentra en el aceite de oliva) induce a la biosíntesis de las prostaglandinas  $F_{2\alpha}$ , y por lo tanto puede provocar un adelanto en la regresión del cuerpo lúteo acortando el ciclo estral, mientras que a partir de cierto nivel de precursor pueden comenzar los efectos inhibidores antes mencionados.

Al abordar el tema Grummer y Carroll (1991) opinan que parece más probable que los efectos de la suplementación pudieran deberse al efecto indirecto de los ácidos grasos sobre la secreción de prostaglandinas, ya que el incremento aparecía dentro de las 24 horas de administración de la grasa, conociéndose cómo en otras especies, se ha necesitado de varios días para que la suplementación con ácido linoleico diera lugar a un aumento en los niveles plasmáticos de prostaglandinas. Igualmente se ha deducido que al suplementar a vacas en el post-parto, con sales cálcicas de ácidos grasos de cadena larga, tenía lugar un mayor desarrollo folicular, a pesar de que los niveles plasmáticos de determinados metabolitos de las prostaglandinas de la serie dos, no mostraban cambio alguno, lo que en principio, podría

deberse a la baja concentración de ácido linoleico existente en la grasa utilizada. Este resultado hace indicar a Grummer y Carroll (1991) que quizás, el mayor desarrollo folicular detectado se debería simplemente, al incremento que en el balance energético del animal puede establecerse cuando una dieta se suplementa con grasa

El ácido linolénico puede competir con el ácido linoleico por la  $\Delta$ -6-desaturasa, esto junto a la existencia de una afinidad favorable hacia la biosíntesis del ácido eicosapentaenoico frente a la biosíntesis del ácido araquidónico (Gurr y col., 1991), hace pensar que el ácido linolénico puede reducir la síntesis de prostaglandinas  $F_{2\alpha}$  (Barnouin and Chassagne, 1991; Cunnane, 1995; Rooke y col., 2003).

El consumo de una gran cantidad de EPA también puede inhibir la producción de  $PGF_{2\alpha}$ , porque su elevada concentración hace que disminuya el ácido araquidónico en las membranas celulares, asimismo inhibe la fosfolipasa A2, responsable de la liberación del ácido araquidónico de los fosfolípidos. Además de lo comentado, puede competir con el AA por la cicloxigenasa. Lo mismo puede ocurrir con el ácido eicosatrienoico y el ácido docosahexaenoico (Spicer y col., 1993; Rooke y col., 2003).

Por lo tanto los PUFA pueden lograr inhibir la secreción de PG, entre otros, a través de los siguientes mecanismos:

- Reduciendo la síntesis de AA al competir por las desaturasas ( $\Delta$ 5 y  $\Delta$ 6) necesarias para su formación (Brenner, 1977; Kinsella y col., 1990).
- Alterando el perfil en las membranas de los fosfolípidos a favor de los PUFA n-3 (Spicer y col., 1993).
- Inhibiendo la actividad de las ciclooxigenasas responsables de la síntesis de las PG (Smith y col., 1991; Burke y col., 1997; Staples y col., 1998).

### 3.5. Papel de los PUFA sobre la eficiencia reproductiva del ganado cabrío

- Inhibiendo la expresión de genes involucrados en la síntesis de PG de la serie 2 (Mattos y col., 2000).

En un estudio reciente Petit y colaboradores (2002) comparan el efecto de grasas ricas en ácidos grasos poliinsaturados de la serie n-3, procedentes de diferentes fuentes, sobre la producción y composición de la leche, el desarrollo folicular y la secreción de prostaglandinas. Cuando suplementan la dieta con aceite de linaza (rico en ácido linolénico), ya sea tratado con formaldehído o mediante infusión duodenal, la concentración de PGFM en plasma disminuye. Sin embargo, cuando la grasa es una mezcla de aceite de linaza tratado con formaldehído y aceite de pescado al 50%, la concentración del metabolito es mayor. Concluyen que al incrementar la razón n-3/n-6 disminuye la síntesis de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , excepto en el caso de que los ácidos grasos poliinsaturados n-3 sean de cadenas muy largas como el EPA y el DHA (Petit y col., 2002).

Otros estudios muestran una reducción de PGFM en plasma en respuesta a una suplementación con harina de aceite de pescado, haciendo hincapié en el efecto inhibitorio de los ácidos grasos EPA y DHA sobre la secreción uterina de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (Mattos y col., 2001 y 2002; Thatcher y col. 2001). Como consecuencia, los tratamientos que reducen la síntesis de prostaglandinas de la serie dos, pueden dar lugar a una menor mortalidad embrionaria (Mattos y col., 2000; Petit y col., 2002). En opinión de Petit y colaboradores (2002), la suplementación de una dieta con grasa puede dar lugar a una reducción en la síntesis de prostaglandinas totales, al afectar la actividad de la prostaglandina-sintetasa.

#### **Suplementación con grasa y nivel de hormonas esteroideas**

Igualmente se ha asociado una mejora en la fertilidad con la existencia de altos niveles de progesterona antes de la fase luteal (Folman y col., 1973; Carstairs y col., 1980; Fonseca y col., 1983; Grummer y Carroll, 1991; Kuran y col., 1999). El colesterol es un precursor de la síntesis de progesterona por las células luteales del ovario (Staples, 1998; Kuran y col., 1999) y es generalmente aceptado que tanto la concentración de

### *3. Antecedentes*

---

colesterol como de progesterona en plasma aumentan bajo regímenes de suplementación con grasa. (Grummer y Carroll, 1991; Oldick y col., 1997; Kuran y col., 1999; Fahey y col., 2002; Petit y col., 2002). Incremento que, según Grummer y Carroll, parece ser independiente del grado de saturación de los ácidos grasos procedentes de la suplementación lipídica. De acuerdo con esto, un incremento en la concentración de progesterona en el plasma, ha sido asociado a un aumento en la tasa de concepción y fertilidad en el rumiante. Por estos motivos la mayor producción de colesterol que tiene lugar cuando se introduce una grasa en la dieta del rumiante, se indica como posible causa de la obtención de una mayor tasa de fertilidad (Staples y col., 1998). Sin embargo, otros trabajos publicados no encuentran relación entre la concentración de colesterol en sangre, la concentración de progesterona y una mejora en la fertilidad (Ferguson y col., 1990; Spicer y col., 1990).

La secreción de progesterona es la función principal del cuerpo lúteo. Ésta prepara al útero para la implantación del embrión, disminuye la frecuencia de las contracciones uterinas, mantiene el estado de preñez y estimula los cambios secretores en la mucosa que reviste las trompas, resultando importante para la nutrición del huevo que está empezando a dividirse y no queda implantado aún en el útero (Petit y col., 2001 y 2002). Entre el 25 y el 55% de los embriones de mamíferos mueren al principio de la gestación, la tasa de concepción en rumiantes es superior cuando hay un aumento en la cantidad de progesterona (Staples y col., 1997).

La concentración de progesterona en el fluido folicular se obtiene también más alta en los casos de suplementación grasa, lo que sugiere que la función del cuerpo lúteo puede mejorarse por medio de la inclusión de una grasa en la dieta (Staples y col., 1998). Lo indicado implica que un aumento en la concentración de colesterol circulante como consecuencia de la utilización de grasa en la dieta, debe determinar un incremento en la síntesis de progesterona en las células foliculares y del cuerpo lúteo. En este sentido, Carroll y colaboradores (1992), informan de que la síntesis máxima *in vitro* de progesterona por las células del cuerpo lúteo, se llevaba a cabo a una concentración de lipoproteínas de alta densidad, mucho más

### 3.5. Papel de los PUFA sobre la eficiencia reproductiva del ganado cabrío

baja que la que se detectaba en el plasma. Los autores concluyen indicando que al parecer, las lipoproteínas-colesterol, no parecen ser un factor limitante en la síntesis de progesterona. Por lo tanto, la síntesis in vitro de esta hormona por las células luteinizantes, puede resultar similar en animales suplementados o no, con una grasa (Carroll y col., 1992a y b). De la misma manera, Hawkins y colaboradores (1995), sugieren que el incremento que la concentración de progesterona experimentada en el plasma de vacas alimentadas con dietas suplementadas con una grasa, puede no ser debido a una mayor síntesis de la hormona, sino a una menor tasa de toma de la misma desde la circulación.

El contenido en grasa de las células luteales también aumenta con la suplementación de grasa. En vacas alimentadas con una suplementación de sales cálcicas ricas en ácidos grasos poliinsaturados de larga cadena, un corte de cuerpo lúteo examinado por microscopía electrónica revela que los lípidos ocupan un porcentaje superior del área de la célula luteal, a los cien días del parto, frente al porcentaje que ocupaban los lípidos en las células de vacas cuya alimentación no había sido suplementada (Hawkins y col., 1995). En este trabajo la suplementación con las sales cálcicas también aumentaban los niveles séricos de colesterol, de HDL y de progesterona. Burke y colaboradores en 1997, encontraron que la suplementación con aceite de pescado incrementaba la tasa de gestación en vacas y alteraban la regresión del cuerpo lúteo, apareciendo una mayor concentración en plasma de progesterona. Petit y col. (2002), también observaron una tendencia al encontrar una mayor cantidad de progesterona en la leche de vacas cuya alimentación había sido suplementada con semilla de linaza tratada con formaldehído.

#### **Otros mecanismos de acción**

La insulina es un potente estimulador de la función de las células foliculares ováricas (Staples y col., 1998). A parte de sus funciones metabólicas conocidas, la insulina y el factor de crecimiento dependiente de insulina pueden estimular la producción de progesterona y la mitosis en

### 3. Antecedentes

---

células de la granulosa ováricas tanto *in vivo* (Lucy, 2000) como *in vitro* (Langhout y col., 1991; Webb y col., 1999).

En 1993, Spicer y colaboradores adicionaron insulina e IGF-I a células de la granulosa procedentes de folículos pequeños (1 a 5 mm) y grandes (>8 mm) de los ovarios de vacas previamente sacrificadas, obteniendo una mayor proliferación celular y una superior producción de progesterona con respecto a células a las que no se había adicionado insulina ni IGF-I. Ambos factores por separado también incrementaron la producción de progesterona (Spicer y col., 1993). También hay que tener en cuenta que las células de la granulosa tienden a producir menos IGF-I cuando son cultivadas con insulina (Spicer y col., 1993), y que una restricción en la ingesta hace que disminuya la concentración de IGF-I en plasma (Kobayashi y col., 2002), por lo que modular la concentración de insulina a través de la dieta puede permitir un incremento de IGF-I que afecte positivamente al desarrollo de los folículos (Staples y col., 1998).

No obstante son necesarios más estudios *in vivo* para aclarar el efecto de la concentración plasmática de insulina sobre el desarrollo folicular. Es bien conocido, desde hace muchos años, que una baja concentración sanguínea de insulina potencia la lipólisis en el tejido adiposo, evidencia revisada por Grummer y Carroll para vacuno y caprino sugiriendo que la hidrólisis de triglicéridos en el tejido adiposo aumentaba cuando la dieta era suplementada con grasa, resultando una concentración superior de ácidos grasos no esterificados en plasma en los animales cuya dieta había sido suplementada con grasa frente a los del grupo control (Grummer y Carroll, 1991; Petit y col., 2002). Estos ácidos grasos libres pueden interferir en la concentración de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  como se comentó anteriormente.

De acuerdo con lo descrito con anterioridad, muestras del tejido adiposo procedentes tanto de ovejas como terneros, llegaban a liberar, *in vitro*, mayores cantidades de ácidos grasos, en los casos en los que una grasa protegida se incluía en la dieta (Yang y col., 1978). Igualmente, la actividad lipolítica del tejido adiposo de vacas en lactación, que habían sido duodenalmente infundidas con un aceite, resultaba más alta, efecto

### 3.5. Papel de los PUFA sobre la eficiencia reproductiva del ganado cabrío

que puede dar lugar a una pérdida bien en el peso o en la condición corporal (Gagliostro y Chilliard, 1991). Por lo tanto, se deduce que la grasa de la dieta reduce la lipogénesis en el tejido adiposo. Un aumento en la lipólisis da lugar a una mayor concentración en plasma, de ácidos grasos no esterificados. Grummer y Carroll (1991) deducen igualmente, que la concentración plasmática de 3-hidroxiacetil-CoA, normalmente no cambia en los casos de utilización de dietas con grasa, comentando que los niveles plasmáticos de cetonas, normalmente aumentan cuando se elevan los de ácidos grasos no esterificados, por lo tanto, el efecto anticetogénico deducido en estos casos, podría dar lugar a un ahorro en la utilización de la glucosa.

También se conoce que al administrar en la dieta del animal en lactación, ácidos grasos de cadena larga, la síntesis de novo de ácidos grasos en la glándula mamaria disminuye (Grummer, 1991). En consecuencia, como la síntesis de ácidos grasos depende de la formación de NADPH, la mitad del cual es originado por la oxidación de glucosa, al suplementar la dieta con una grasa, se origina un ahorro en la utilización de este sustrato. Este ahorro de glucosa no parece reflejarse en sus niveles sanguíneos, los que generalmente, no cambian cuando se suplementa la dieta del rumiante con una grasa (Grummer y Carroll, 1991).

No obstante, los resultados obtenidos a partir de distintos ensayos, ponen en evidencia la falta de consistencia respecto de lo que sucede en este sentido. La concentración plasmática de glucosa no se afectaba en vacas en lactación alimentadas con una alta cantidad de aceite de maíz o sebo, o abomasalmente infundidas con ácidos grasos libres, bien saturados o insaturados (Christensen y col., 1994a y b). Por el contrario, los niveles de este metabolito disminuyeron en vacas duodenalmente infundidas con aceite de colza (Chilliard y Otton, 1995). A las siete semanas del parto, la concentración plasmática de glucosa disminuía en vacas alimentadas con sales cálcicas de ácidos grasos, lo que no sucedía a las 13 semanas (Simas y col., 1995). Al incluir sebo al 2%, en una dieta desde el primer día hasta el 120 después del parto, se obtenían en las muestras obtenidas cada dos

### 3. Antecedentes

---

semanas, unas concentraciones crecientes de glucosa en sangre (Bateman y col., 1996).

En este sentido, Staples y colaboradores (1998) indican que las posibles diferencias en las concentraciones de glucosa en sangre, no parecen servir para deducir posibles diferencias en el flujo sanguíneo o tasa de toma desde la sangre. Grummer y Carroll (1991) indican que el aumento que en la producción de leche tiene normalmente lugar en los casos en que se administra una dieta adicionada de grasa, reflejaría un mayor requerimiento en lactosa, la que podría ser originada a partir de la glucosa no utilizada en la síntesis de novo de ácidos grasos. Estos autores terminan comentando que si la toma de glucosa por los tejidos se reduce a causa del efecto ejercido por la grasa, el que los niveles plasmáticos de glucosa se mantengan estables, podría indicar que en estos casos, tiene lugar una disminución de la gluconeogénesis hepática, hecho por el que respecto de la aparición de determinados desordenes metabólicos, se considera beneficioso la suplementación de la dieta del animal en lactación con grasa.

En 1998, Staples y colaboradores proponen un posible mecanismo de acción mediante el cual la suplementación con ácidos grasos poliinsaturados de largas cadenas (bien en forma de sales cálcicas o mediante su inclusión directa a nivel abomasal o intestinal) potencia la función reproductiva. El cuerpo lúteo está regulado por, al menos, tres tejidos: la glándula pituitaria anterior, el útero y el embrión. La hipófisis secreta LH para estimular la diferenciación de las células de la granulosa a células luteales, el útero produce  $\text{PGF}_{2\alpha}$  para retrotraer el cuerpo lúteo, y el embrión produce señales al tejido endometrial para que produzca un inhibidor de la prostaglandina sintetasas para modificar la secreción de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  por el útero. El mecanismo por el cual la suplementación con grasa podría estimular la liberación de LH aún no se conoce bien, aunque Staples propone que pudiera deberse a un ahorro de glucosa en la glándula mamaria, de forma que hubiese una mayor disponibilidad de la misma, y ésta actuara sobre el sistema hipotálamo-hipófisis que secretaría mas LH. Grummer y Carroll en 1991 observaron que posiblemente la suplementación de grasa se traducía en un ahorro de glucosa más que en

### 3.5. Papel de los PUFA sobre la eficiencia reproductiva del ganado cabrío

una mejora en el balance energético; no obstante, hacen falta más estudios sobre el tema. O'Callaghan y Boland en una revisión de 1999 relacionan un descenso de LH con una nutrición inadecuada en ovejas; sin embargo, no se encuentran cambios significativos en la secreción de LH cuando se restringe el nivel de energía de la dieta (Abecia y col., 1995).

A nivel del útero los ácidos grasos poliinsaturados, sobre todo el linoleico y el eicosapentaenoico, pueden inhibir la secreción de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  de la forma antes comentada. Si esto ocurre, la síntesis de progesterona no es inhibida, y solo depende de la disponibilidad de colesterol, que con la suplementación de grasa dejaría de ser un posible factor limitante. Al mismo tiempo la secreción de estradiol es suprimida por la suplementación con grasa, esto hace que el cuerpo lúteo sea menos sensible a las  $\text{PGF}_{2\alpha}$  que aún puedan estar presentes. En estas condiciones la vida del cuerpo lúteo se mantiene para asegurar la supervivencia del embrión (Staples y col., 1998). Asimismo, la suplementación con ácidos grasos poliinsaturados hace que el cuerpo lúteo permanezca más tiempo en el ovario (Oldick y col., 1997), exista un mayor número de folículos y éstos tengan un diámetro mayor (Lucy y col., 1989 y 1991; O'Callaghan and Boland, 1999; Petit y col., 2002).

#### **3.5.3. Nutrición de la hembra gestante**

Al inicio de la gestación, la alimentación de la hembra tiene la mayor incidencia sobre la mortalidad embrionaria, casi un 40% del total de las pérdidas embrionarias suceden entre los días 8 y 17 de gestación (Mattos y col., 2002), especialmente en los casos de gestación múltiple, dependiendo dicha incidencia, entre otros factores, de la alimentación y de la condición corporal de la madre en el momento de la cubrición, aunque normalmente solo situaciones de malnutrición severas suelen ejercer efecto sobre dicha mortalidad, esto también se puede dar en ovejas o cabras muy jóvenes en crecimiento (Boza, 1998). Por tanto, la condición corporal del animal está estrechamente relacionada con la función reproductiva e influye también en el modelo de la dinámica folicular a través de cambios en el entorno

### 3. Antecedentes

---

endocrino; ovejas con una condición corporal superior mantienen una alta concentración de la hormona foliculo estimulante durante la fase folicular, lo que permite a este grupo mantener una tasa de ovulación más alta que la de otro grupo que presentaba una condición corporal inferior (Viñoles y col., 2002). Burke y colaboradores también relacionan una mala condición corporal con una baja tasa de fertilidad en vacas que han sido alimentadas con harina de pescado (Burke y col., 1997).

Las modificaciones que se producen en el útero después de la fertilización guardan una relación primaria con la nutrición, pero es la existencia de un feto en crecimiento el que añade progresivamente unos mayores requerimientos a la madre, por esto, la gestación estimula la ingesta voluntaria de alimentos, aumenta la absorción de nutrientes y la eficacia de su utilización (se deposita el 80% de la proteína y los minerales absorbidos), provoca una reducción del tono muscular y de la actividad física de la madre y origina un mayor crecimiento de los tejidos maternos; estos efectos maternos específicos se conocen como “el anabolismo de la gestación”, que parece estar regulado inicialmente por la progesterona, seguida por la prolactina secretada por la placenta, resultando probable que el consumo de energía sea el factor limitante (Boza, 1998).

En las cabras el peso medio de las crías al parto suele ser, en la raza granadina, del 12 al 14% del peso de la madre. Además la cabra gestante experimenta un crecimiento del útero y de las glándulas mamarias, que sumado al de las envolturas fetales, nos llevaría a un 10% más del peso del animal, lo que nos da idea de la importancia que tiene un aporte alimentario suficiente, para no tener que movilizar en demasía sus depósitos, dejando estas reservas para el comienzo de la lactación, momento más crítico por coincidir esas mayores necesidades con la anorexia postparto (Boza, 1998). Los principales períodos en los que debe cuidarse la alimentación de la hembra gestante son:

- Primer mes de gestación, ya que la alimentación ejerce su efecto principal sobre la supervivencia de los embriones (Boza, 1998; Mattos, 2002), esto no sería importante si, como se indicó

### 3.5. Papel de los PUFA sobre la eficiencia reproductiva del ganado cabrío

anteriormente, la condición corporal al comienzo de la gestación fuese adecuada.

- Durante el segundo y tercer mes, la alimentación de la cabra va a influir en el crecimiento de la placenta, aspecto de considerable interés, ya que el tamaño de la placenta determina el flujo sanguíneo a los fetos y la transferencia de nutrientes, así como su actividad hormonal (Boza, 1998).
- Los últimos 45 días o último tercio de la gestación, es donde la alimentación de la cabra tiene la mayor importancia, puesto que afecta al metabolismo, crecimiento y desarrollo de los fetos en el periodo de máxima velocidad de crecimiento (Boza, 1998).

El déficit de proteína interviene en menor medida, y según su cuantía provoca retraso de la pubertad en la hembra, a veces suprime los signos evidentes de celo, aunque tiene poca incidencia en la regularidad del ciclo ovárico (Boza, 1998). También se ha destacado que la deficiencia proteica retrasa el desarrollo testicular en el caprino y afecta a la producción espermática (Smith, 1986).

Son las deficiencias en minerales y vitaminas las de mayores consecuencias sobre la reproducción (si no hay un déficit severo de energía), principalmente las de fósforo, fósforo-proteína, calcio, hierro, cobalto, o las vitaminas A, D y E, provocando trastornos que van desde el cese del ciclo estral, a la muerte embrionaria y aborto. El feto tiene prioridad por los nutrientes, por lo que cuando los aportes de alimentos son insuficientes, la madre apela a sus reservas corporales para satisfacer las necesidades del mismo, caso del Fe, y especialmente del Ca y P, pudiendo ser transferidos al feto desde el esqueleto de la madre, llegando a desencadenar hasta una hipocalcemia en ésta (Boza, 1998). Por el contrario hay otros nutrientes como la proteína y la vitamina A, cuyo déficit es más acusado en el feto que en la madre (Robinson, 1977).

### **3.6 Composición y calidad de la leche de cabra**

La leche de cabra y sus productos derivados son de gran importancia en la nutrición humana. Haenlein (2004) resume los aspectos que actualmente centran el interés por la leche de cabra, en los siguientes: 1) la leche y el queso de cabra han sido de gran relevancia en la alimentación de las zonas rurales y desfavorecidas, siendo la fuente principal de proteína para su población; 2) las exigencias gastronómicas de los consumidores hacen que aumente la demanda de productos derivados de la cabra, especialmente queso y yogurt, por lo que se requiere un mayor conocimiento de la materia prima, en relación a los productos finales; 3) la mejora que el empleo de leche de cabra y derivados lácteos, parece producir en individuos que padecen alergias y otros desordenes gastrointestinales, derivados del consumo de leche de vacuno. En este sentido, la composición de la leche de cabra determina características beneficiosas especiales y propiedades demostradas para la nutrición y salud humana, junto con su valor nutritivo como alimento (Haenlein, 2004).

#### **3.6.1 Composición de la leche. Aspectos comparativos entre las leches de cabra, vaca y oveja**

La leche de cabra y oveja presenta un color blanco, comparado con la de vaca que es amarillento, dada la presencia de carotenos en esta última (Saini y Gill, 1991). La leche de cabra es de naturaleza alcalina, al contrario que la de vaca que es ligeramente ácida, siendo muy útil para individuos con problemas de acidez. Dicha alcalinidad se debe a su mayor contenido proteico y a la presencia de diferentes fosfatos (Saini y Gill, 1991).

La leche de oveja presenta mayor contenido de grasa, proteína, cenizas y sólidos totales que la de cabra (Hadjipanayiotou, 1995; Jandal, 1996; Sanz Sampelayo y col., 2003; Jung Hoon Lee, 2006), siendo los valores de esta última superiores a los de la leche de vaca (Hadjipanayiotou, 1995).

### *3.6 Composición y calidad de la leche de cabra*

---

En cuanto al nitrógeno no proteico, Hadjipanayiotou (1995) observó que la leche que presenta mayor cantidad (en gramos por kilogramo de leche producida) es la de cabra (2,91 g/kg), seguida de la de oveja (2,7 g/kg) y vaca (2,18 g/kg). Sin embargo, el NNP como porcentaje de la proteína bruta, fue similar en la leche de cabra y vaca (7,13 y 7,43% respectivamente) mientras que la de oveja presentó el valor más bajo (4,66%). Por otro lado, Morand-Fehr y col., (1982) obtienen un porcentaje de NNP mayor en la leche de cabra (8-9%) que en la de vaca (5%). Estas diferencias, entre la leche de vaca, oveja y cabra influyen en el proceso de su transformación en queso y en las características de este.

Con respecto a la composición aminoacídica, la leche de cabra presenta valores superiores a los de la de vaca, en relación a seis de los diez aminoácidos esenciales: treonina, isoleucina, lisina, cisteína, tirosina y valina (Posati y Orr, 1976).

La leche de cabra es deficiente en vitamina B12 y ácido fólico, comparada con la leche de vaca. La distribución de otras vitaminas y de Ca, Mg, Na, K, y P es similar en la leche de vaca y cabra (Chandan y col., 1992). Jandal (1996), en una revisión, señala que la leche de cabra tiene un contenido mineral ligeramente superior a la de vaca, pero inferior al de la de oveja. Sin embargo, la leche de cabra presenta valores superiores de calcio (194 mg/100g) y fósforo (270mg/100g) (Posati y Orr, 1976) a los de la de oveja (160 y 145 mg/100g para calcio y fósforo, respectivamente) (Saini y Gill, 1991).

El carbohidrato mayoritario de la leche de cabra es la lactosa, cuyo porcentaje (4,08-4,45) es similar al de la leche de vaca (4,66-4,78%) (Chandan y col., 1992; Jandal, 1996) pero ligeramente superior al de oveja (3,7%) (Jandal, 1996).

### 3.6.2. Composición y características de la proteína

Las proteínas de la leche de cabra son similares a las más importantes de la leche de vaca, en cuanto a su clasificación general:  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\kappa$ -caseínas,  $\beta$ -lactoglobulina,  $\alpha$ -lactoalbúmina. Sin embargo, son diferentes en cuanto a polimorfismos genéticos y su frecuencia en la población de cabras. Las caseínas representan la fracción proteica mayoritaria de la leche de cabra y se definen como un grupo heterogéneo de fosfoproteínas, que precipitan a partir de la leche descremada a pH 4,6 y a 20°C (Thompson y col., 1965).

El complejo caseínico tiene cuatro componentes principales, que son cadenas polipeptídicas, denominadas  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\beta$ -, y  $\kappa$ -caseínas (esta última, en ocasiones, también glicosilada). En cuanto al polimorfismo genético, la  $\beta$ -caseína presentaría 4 alelos, y tanto la  $\alpha_{s2}$  como la  $\kappa$ -caseína, presentarían dos variantes. La  $\alpha_{s1}$ -caseína se distingue por un fuerte polimorfismo estructural, asociado a una variabilidad alélica cuantitativa. A principios de los años 80, se identificaron siete variantes genéticas de la  $\alpha_{s1}$ -caseína (Boulanger y col., 1984). Posteriormente, se observó que las variantes genéticas podrían agruparse en categorías según el nivel de síntesis de la  $\alpha_{s1}$ -caseína en la leche de cabra (Grosclaude y col., 1987). Grosclaude y col., (1987) concluyeron que las variantes A, B y C se acompañan de una producción alta de  $\alpha_{s1}$ -caseína (aproximadamente 3,6g/l); el alelo E, asociado a un nivel medio, (aproximadamente 1,6 g/l); los alelos D y F, asociados a un nivel bajo de síntesis (aproximadamente 0,6 g/l) y el alelo O, que confiere el fenotipo nulo. Estos autores sugieren que cada variante individual tiene una función aditiva en la síntesis de  $\alpha_{s1}$ -caseína. La combinación F/F tendría una producción significativamente menor de  $\alpha_{s1}$ -caseína que la E/F, y ambas producirían significativamente menos cantidad que las combinaciones A/F y A/E (Grosclaude y col., 1987).

A finales de los años 90, se identificaron nuevas variantes genéticas adicionales de la  $\alpha_{s1}$ -caseína (Martín y Addeo, 1996) como la G, que al igual que las D y F, está asociada con una baja producción de  $\alpha_{s1}$ -caseína. Además, se observó que la variante B, presentaba tres formas diferentes:

### 3.6 Composición y calidad de la leche de cabra

---

B1, B2 y B3, asociadas con una síntesis relativamente elevada de la  $\alpha_{s1}$ -caseína. En razas caprinas italianas se han descrito cuatro nuevas variantes: C<sup>1</sup>, A<sup>1</sup>, X y W (Chianese y col., 1995) y en razas africanas se ha identificado la variante H (Pépin, 1995). Estas diferencias en los tipos genéticos, se deben a sustituciones o deleciones de aminoácidos en las cadenas de proteínas (Trujillo y col., 1997).

Con respecto a la fracción caseína, la leche de cabra es rica en  $\beta$ -caseína y pobre en  $\alpha_{s1}$ -caseína, mientras que en la leche de vaca, la  $\alpha_{s1}$ -caseína es mayoritaria (Chandan y col., 1992; Trujillo y col., 1997). La leche de cabra contiene niveles relativamente mayores de  $\alpha_{s2}$ -caseína, en comparación con la de vaca, aunque la suma de las fracciones,  $\alpha_{s1}$ - más  $\alpha_{s2}$ -caseína, en la leche de cabra es menor que la fracción de  $\alpha_{s1}$ -caseína de la de vaca (Chandan y col., 1992). La proporción de las distintas fracciones caseínicas ( $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\beta$ , y  $\kappa$ ), particularmente el contenido en  $\alpha_{s1}$ , afecta a las propiedades de coagulación de la leche y a la producción de queso (Ambrosoli y col., 1988; Remeuf y col., 1993; Vassal y col., 1994), así como a sus características (Grosclaude y col., 1994).

Las caseínas se organizan en la leche en forma de micelas, asociadas a un complejo mineral, compuesto de fosfato cálcico. Las micelas de caseína caprina presentan un grado de dispersión y un diámetro medio mayores, una mineralización más elevada, un nivel de hidratación inferior y son menos estables a los tratamientos térmicos, con respecto a las micelas de la leche de bovino (Trujillo y col., 1997). Estos parámetros pueden variar de forma más o menos acusada dependiendo de la variante de la  $\alpha_{s1}$ -caseína presente (Remeuf, 1993; Pierre y col., 1995).

Las principales proteínas séricas de la leche caprina son  $\alpha$ -lactalbúmina y  $\beta$ -lactoglobulina; la fracción minoritaria está constituida por seroalbúmina, proteasas, peptonas e inmunoglobulinas (Jennes, 1979).

En cuanto a la composición de la leche de cabra en función del genotipo, Clark y Sherbon (2000) observaron que la leche de cabras, con al menos un tipo de la variante genética de alta producción de  $\alpha_{s1}$  caseína (A,

### 3. Antecedentes

---

B1, B2, B3 o C), contenía un mayor porcentaje de sólidos totales, sólidos no grasos, proteína y  $\alpha_{s1}$  caseína que aquellas que presentaban sólo variantes de baja producción de  $\alpha_{s1}$ -caseína (D, F o G) o eran homocigóticas para la variante nula. Estos autores no encontraron diferencias significativas en cuanto a la coagulación de la leche procedente de cabras con diferentes variantes genéticas para la  $\alpha_{s1}$ -caseína. Sin embargo, observaron tendencias notables en este sentido: la leche que contenía al menos una variante de tipo alto tendía a presentar mejores propiedades de coagulación que la leche procedente de cabras homocigotas para el alelo O. Recientemente, De la Torre (2006) obtiene que tanto el rendimiento quesero como la firmeza de la cuajada resultaron mayores con el empleo de leche procedente de cabras de alta capacidad de síntesis de  $\alpha_{s1}$ -caseína frente a animales de baja capacidad.

Quiles y col., (1994) estudiaron la evolución, durante la lactación, del contenido en proteína total, caseínas ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\kappa$ ) y proteínas del suero ( $\beta$ -lactoglobulina,  $\alpha$ -lactoalbúmina) en la leche de 44 cabras de raza murciano-Granadina y obtuvieron unos valores medios de 40,9, 32,1 y 8,7 g/l, respectivamente. Dentro de estos grupos las cantidades obtenidas para  $\alpha$ -,  $\beta$ -, y  $\kappa$ - caseínas, así como para  $\beta$ -lactoglobulina,  $\alpha$ -lactoalbúmina y proteínas minoritarias del suero (seroalbúmina, inmunoglobulinas y las proteosas y peptonas) fueron de 8,5, 21, 2,5, 5,8, 1,5 y 1,4 g/l, respectivamente. Observaron que todas las proteínas y fracciones aumentaron significativamente durante la lactación, excepto las proteínas minoritarias del suero, que disminuyeron. Díaz y col., (1999) observaron que el contenido en proteínas y caseínas totales de la leche de cabras de raza murciano-Granadina, variaba a lo largo de la lactación en una magnitud que dependía de la estación de la paridera, observándose una mayor variación en la paridera de primavera. Dicha variación fue mucho menor para el caso de las fracciones de  $\alpha$  y  $\kappa$  caseínas.

### 3.6.3. Composición de la grasa. Perfil en ácidos grasos

El porcentaje de grasa es el factor determinante de la cremosidad y del sabor de la leche de cabra y sus productos derivados (Morand-Fehr y col., 2000). La cantidad es superior en la leche de cabra (4,81) que en la de vaca (3,38), existiendo diferencias en cuanto a la estructura física y perfil en ácidos grasos (Boza y Sanz Sampelayo, 1997). El tamaño medio de la micela o glóbulo graso de la leche de cabra es de 3,5  $\mu\text{m}$ , presentando un alto porcentaje de glóbulos con un tamaño de 1,5 a 3  $\mu\text{m}$ , considerablemente inferiores a los que presenta la leche de vaca (4,5  $\mu\text{m}$ ) (Stark, 1988; Chandan y col., 1992; Boza y Sanz Sampelayo, 1997).

Una de las principales peculiaridades de la leche de cabra es su composición en ácidos grasos, que es diferente a la que presenta la leche de vaca (Haenlein, 2004) y la de oveja (Jung Hoon Lee y col., 2006). La leche de cabra es rica en triglicéridos de cadena media, formados por ácidos grasos cuya cadena carbonada presenta de 6 a 10 átomos de carbono. La mayor proporción corresponde a los ácidos caproico (C6:0), caprílico (C8:0), cáprico (C10:0), que pueden constituir del 15 al 18% en la leche de cabra, frente al 5-9% que presenta la de vaca (Boza y Sanz Sampelayo, 1997), esta proporción confiere a la leche de cabra su sabor característico. La leche de cabra también tiene mayor cantidad de AGMI y PUFA en comparación con la leche de vaca y oveja (Haenlein, 2004; Jung Hoon Lee y col., 2006). Además, presenta valores muchos más altos de los ácidos butírico (C4:0), caproico (C6:0), caprílico (C8:0), cáprico (C10:0), laurico (C12:0), mirístico (C14:0) y palmítico (C16:0), que las de vaca y oveja. Sin embargo, la leche de vaca presenta valores más elevados de los ácidos esteárico (C18:0) y oleico (C18:1), mientras que la de oveja contiene mayores niveles de ácidos grasos saturados de cadena larga, particularmente esteárico (18:0) y eicosanoico (20:0) (Haenlein, 2004).

Alonso y col. (1999) estudiaron la composición en ácidos grasos de la leche de cinco rebaños de cabras en la región de Murcia. Observaron que los cinco ácidos grasos de mayor importancia, en términos cuantitativos

### 3. Antecedentes

---

(C16:0, C18:1, C10:0, C14:0 y C18:0) constituían más del 75% del total de los ácidos grasos de la leche, mientras que los valores medios de ácidos caprílico y cáprico fueron de 2,7 y 9,9%, respectivamente. Poveda y Cabezas (2006) obtienen resultados similares en quesos producidos a partir de leche de cabras de la región de La Mancha, concluyendo que estos cinco ácidos grasos mayoritarios constituían, aproximadamente, el 85% del total de ácidos grasos. Además, señalan que el ácido butírico era el principal ácido graso de cadena corta (5,6% del total de ácidos grasos), siendo el cáprico el ácido graso de cadena media mayoritario (8,9% del total de ácidos grasos).

Con respecto a los ácidos grasos ramificados, Alonso y col., (1999) identificaron 36 en la leche de cabra. Los más importantes, en términos cuantitativos, fueron las formas *iso*- y *anteiso*- del C15 y *anteiso*-C17 e *iso*-C16. Estos ácidos grasos también son predominantes en la leche de vaca. Kim Ha y Lindsay (1993) determinaron la fracción de ácidos grasos volátiles en quesos y cuantificaron 5 ácidos grasos ramificados de menos de 10 átomos de carbono, no identificados anteriormente (Massart-Leen y col., 1981). Estos autores hicieron énfasis en la existencia de ácidos grasos ramificados monometilo, además de las formas *iso* y *anteiso*, principalmente sustituciones de grupos metil sobre ácidos grasos C4 y C6, presentes en la leche caprina pero no en la bovina. Identificaron y cuantificaron 25 ácidos grasos ramificados con un grupo metil, 2 ácidos grasos con grupo dimetil y 4 con grupo etil. Los ácidos 4 etilcanoato (227 µg/g) y 4 metilcanoato (391 µg/g) confieren el sabor característico a la leche y derivados lácteos de cabra y oveja. Aproximadamente del 5 al 15% de la cantidad total de C18:1 está en configuración *trans*, tanto en cabra (Alonso y col., 1999) como en vaca (Selner y Schultz, 1980) siendo el principal isómero el *trans*-vaccénico (35-40%) para ambas (Bicherstaffe y col., 1972; Alonso y col., 1999). Con respecto al contenido en *trans*- C18:1 de la grasa de la leche de cabra, Alonso y col., (1999) obtuvieron un valor medio de 2,12%, menor que el estimado para la leche de vaca (3,8 %) por otros autores (Prencht y Molkentin, 1996). Sin embargo, la proporción de los distintos isómeros del *trans*-C18:1 y el contenido de *trans*-C16:1 fue comparable en ambas especies (Alonso y col., 1999).

### 3.6 Composición y calidad de la leche de cabra

---

Jung Hoon Lee y col., (2006) observaron que la leche de cabra presenta niveles más bajos de ciertos ácidos grasos monoinsaturados (C13:1n-9, C14:1n-5, C16:1 *trans*, C16:1n-7 y C18:1n-9) en comparación con la de oveja. En este estudio no se observaron diferencias significativas en cuanto a la cantidad de ácido C18:1 *trans* entre las leches de cabra y oveja. Sin embargo, otros autores demuestran que el nivel de los ácidos C18:1 *trans* es significativamente superior en la leche de oveja que en la de cabra (Griinari y Bauman, 1999). El nivel de ácido vaccénico (C18:1 11-*trans*) en leche de oveja fue ligeramente superior al de la de cabra; no obstante, el contenido en ácidos grasos C18:1 *trans*, varía en función de la alimentación, periodo de lactación o raza. Con respecto a los ácidos grasos poliinsaturados, no se observaron diferencias en cuanto a C18:2 *cis*-9, *trans*-11, linolenico (C18:3n-3) y docosapentaenoico (C22:5n-3). Sin embargo, los niveles de ácido linoleico (C18:2n-6), C18:2 *trans*-10, *cis*-12 y  $\gamma$ -linolenico (C18:3n-6) en leche de cabra fueron significativamente más bajos que en leche de oveja. Actualmente, uno de los aspectos más estudiado con respecto a la leche y carne del rumiante, es la cantidad en ácido linoleico conjugado (CLA), dadas las propiedades saludables que se le atribuyen. El término ácido linoleico conjugado, incluye una serie de isómeros, principalmente *cis*-9, *trans*-11 y *trans*-10, *cis*-12, del ácido linoleico, que es el *cis*-9, *cis*-12 octadecaenoico. Se considera que el ácido C18:2 *cis*-9, *trans*-11, es el mayoritario en la leche de rumiantes, denominándose también ácido ruménico. Griinari y Bauman (1999) concluyen que la leche de oveja presenta el mayor contenido de CLA y ácido vacénico, en comparación con la leche de cabra y vaca. El valor medio de ácido ruménico (*cis*-9, *trans*-11) en cabras está en torno a 0,4-0,9% del total de ácidos grasos (Alonso y col., 1999; Gulati y col., 2000; Chilliard y col., 2002).

### 3.6.4. Aspectos saludables de la leche de cabra

#### Ácidos grasos

La leche de cabra presenta mayor digestibilidad que la de vaca, debido a ciertos aspectos relativos a la grasa: tamaño de los glóbulos de grasa y presencia de ácidos grasos de cadena corta y media. El menor tamaño de los glóbulos grasos de la leche de cabra proporciona una emulsión fina y más uniforme, que confiere mayor digestibilidad frente a la leche de vaca (Stark, 1988; Chandan y col., 1992; Jandal, 1996; Boza y Sanz Sampelayo, 1997). Por otro lado, esta característica hace que, desde el punto de vista tecnológico, la grasa sea más susceptible a la lipólisis y al desarrollo de aromas típicos, asociados con la presencia de ácidos grasos volátiles (Chandan y col., 1992). Además, la leche de cabra es rica en ácidos grasos de cadena corta y media (C4:0-C14:0), siendo su digestión más rápida puesto que las lipasas actúan más fácilmente sobre las uniones éster de estos ácidos grasos que sobre las que presentan los ácidos grasos de cadena larga (Jennes, 1980; Chandan y col., 1992). Los ácidos cáprico, caprílico y caproico, presentan gran interés desde el punto de vista terapéutico, debido a su utilidad en determinadas enfermedades metabólicas, síndromes de malabsorción, hiperlipoproteinemia, malnutrición infantil, epilepsia, esteatorrea, fibrosis quística, etc. (García Unciti, 1996; Boza y Sanz Sampelayo, 1997; Sanz Sampelayo y col., 2003; Haenlein, 2004). Estos ácidos grasos, dado su especial metabolismo, proporcionan energía en niños en crecimiento y tienen efectos hipocolesterolémicos en tejidos, a través de la inhibición de la formación de depósitos de colesterol (Park 1994; Haenlein, 2004).

Los ácidos grasos de la leche y sus productos derivados, que presentan un potencial anticarcinogénico o antiaterogénico, son el butírico, oleico, ácidos grasos poliinsaturados (especialmente los n-3) y el CLA (Chilliard y col., 2000). Aquellos ácidos grasos de la dieta que presentan un efecto potencial negativo sobre la salud humana, asociados con el incremento de la frecuencia de padecer aterosclerosis, enfermedades coronarias y cáncer,

### 3.6 Composición y calidad de la leche de cabra

---

son los ácidos saturados, laurico (C12:0), mirístico (C14:0) y palmítico (C16:0), considerados hipercolesterolémicos (responsables de elevar la concentración de LDL-colesterol) (Murphy, 2001; Givens y Shingfield, 2004) y los ácidos grasos monoinsaturados *trans*, o una parte de ellos (Chilliard y col., 2000).

El ácido butírico (C4:0) inhibe el crecimiento celular e induce a la diferenciación en un amplio espectro de líneas celulares cancerosas, incluyendo las del cáncer de mama y colon (Parodi, 1999; Murphy, 2001).

Los ácidos grasos monoinsaturados, tienen efectos positivos sobre las lipoproteínas plasmáticas humanas. El ácido oleico (C18:1) disminuye la cantidad de LDL colesterol sin afectar al HDL colesterol, resultando beneficioso puesto que existe una relación inversa entre HDL colesterol y la aparición de aterosclerosis (Murphy, 2001). Los ácidos grasos monoinsaturados, C18 *trans*, que aumentan el riesgo de enfermedades cardiovasculares, están presentes en menor proporción en la grasa de la leche de cabra que en la de vaca (Alonso y col., 1999).

Los ácidos grasos poliinsaturados, cuyo consumo reduce el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, como se comentó extensamente en el segundo capítulo de esta revisión, no se sintetizan en cantidades apreciables en los tejidos de los rumiantes y, por tanto, su concentración en leche es, esencialmente, un reflejo de la cantidad de estos que abandona el rumen (Givens y Shingfield, 2004). Por ello, una estrategia para el aumento de la cantidad de éstos en la leche de los rumiantes es la manipulación de su alimentación (Sanz Sampelayo y col., 2000; 2002), por ejemplo mediante el empleo de aceites ricos en ácido linoleico (C18:2 n-6) y linolénico (C18:3 n-3), y aceite de pescado como fuente de EPA y de DHA.

El CLA se ha asociado con importantes actividades biológicas, incluyendo la anticarcinogénica y aterogénica, la reducción de los efectos catabólicos de la estimulación inmune, la mejora del crecimiento, la disminución de la grasa corporal y la regulación de la glucosa en sangre

(Murphy, 2001). La leche, sus derivados son la mayor fuente de CLA en la dieta humana, y el isómero *cis*-9, *trans*-11, el más abundante en los alimentos derivados de los rumiantes, habiéndose desarrollado una serie de estrategias nutricionales para maximizar su contenido en la leche (Chilliard y col., 2000).

#### **Proteína**

Los efectos cuantitativos, ligados al polimorfismo genético de la  $\alpha_{s1}$ -caseína, además de repercutir en la calidad tecnológica de la leche de cabra, particularmente en su comportamiento frente a la coagulación, lo hacen en la calidad saludable de la misma (Sanz Sampelayo y col., 2003). En este sentido, la leche de cabras que presenten alta síntesis de  $\alpha_{s1}$ -caseína, tendría la mejor calidad tecnológica, existiendo actualmente programas de selección genética hacia este tipo de animales (Clark y Sherbon, 2000; Raynal-Ljutovac y col., 2005). También se ha observado que las cabras que contengan los alelos asociados con un nivel nulo o bajo de síntesis de la  $\alpha_{s1}$ -caseína, presentarían mayor nivel de lipólisis que aquellas de variantes genéticas de alta producción (Raynal-Ljutovac y col., 2005). Con respecto a la calidad nutritiva, la leche procedente de cabras caracterizadas por una síntesis baja o nula de  $\alpha_{s1}$ -caseína, tendría un tiempo de coagulación menor, por lo que formaría una cuajada más suave y de menor firmeza; esta sería más fácil de hidrolizar por las enzimas proteolíticas digestivas dando lugar a un mayor aprovechamiento digestivo de distintos nutrientes (Jennes, 1980; Chandan y col., 1992; Park, 1994; Sanz Sampelayo y col., 2003).

La alergia alimentaria más frecuente, especialmente en niños, es la debida al consumo de leche de vaca (Podleski, 1992). De acuerdo con Taylor (1986), la alergenicidad de la leche de vaca implica la respuesta de la IgE, siendo las caseínas y la  $\beta$ -lactoglobulina las más alergenas. La  $\beta$ -lactoglobulina es la proteína del suero mayoritaria en la leche de vaca, que no se encuentra en la leche humana, y es la principal responsable de la alergia a la leche de vaca (Park, 1994). Los síntomas normalmente se desarrollan entre la segunda y cuarta semanas de edad, y casi siempre

### *3.6 Composición y calidad de la leche de cabra*

---

dentro de los primeros seis meses de vida (Robertson y col., 1982). La sintomatología clínica que desarrollan los pacientes alérgicos a la proteína de la leche de vaca incluye: rinitis, diarrea, vómitos, asma, anafilaxis, urticaria, eczemas, catarro crónico, migrañas, colitis y dolores epigástricos. La leche de cabra se recomienda como alternativa a la de vaca en pacientes alérgicos (Rosenblum y Rosenblum, 1952; Walker, 1965; Van der Horst, 1976; Taitz y Armitage, 1984), a pesar de que algunas proteínas de la leche de cabra presentan inmunoreactividad cruzada con las de la leche de vaca (Park, 1994).

Existen muchas evidencias del carácter hipoalergénico de la leche de cabra en niños con alergia a la leche de vaca (Podleski, 1992). Sanz Sampelayo y col., (2003) y Haenlein (2004) señalan que el tratamiento con leche de cabra tuvo efectos positivos en el 40% de los niños alérgicos a la de vaca. Haenlein (2004) expone que en un estudio, 49 de los 55 niños que fueron tratados resultaron beneficiados del tratamiento con leche de cabra, haciendo también referencia en su revisión a una serie de estudios clínicos (Reinert y Frabe, 1997; Fabre, 1997; Grzesiak, 1997) en los que se observó que el 93% de los niños que presentaban alergia a la leche de vaca, respondían positivamente al consumo de leche de cabra. Se concluyó que ésta presenta un gran interés para la nutrición infantil, dada su baja alergenidad y mejor digestibilidad en comparación con la de la leche de vaca. Sin embargo, la información sobre la alergenidad de la leche de cabra frente a la de vaca es escasa (Podleski, 1992; Sanz Sampelayo y col., 2003), por lo que se requieren estudios basados en datos inmunológicos y mecanismos biológicos que apoyen las observaciones clínicas.

La mayoría de los humanos, sufren una pérdida gradual de la enzima intestinal lactasa desde de la infancia, y por tanto de su capacidad para digerir lactosa, el principal azúcar de la leche (Podleski, 1992); por tanto, los valores bajos de lactasa se asocian con la intolerancia a la leche (Boza y Sanz Sampelayo, 1997). Como resultado de la ingestión de leche de vaca, los individuos que presentan intolerancia a la lactosa desarrollan distensión abdominal, dolores y diarreas. Esta sintomatología a menudo, se confunde con los síntomas comunes asociados a la alergia a la leche de vaca. En

### *3. Antecedentes*

---

cuanto a la mayor tolerancia a la lactosa de la leche de cabra parece ser debida a su mayor digestibilidad frente a la de vaca; las tasas más adecuadas de liberación de nutrientes desde el estómago al intestino, optimizan la utilización digestiva de la lactosa (Boza y Sanz Sampelayo, 1997).

Destacan otras características de la leche de cabra, como su capacidad tampón, debido a las caseínas y fosfatos, de modo que puede ser empleada para el tratamiento de úlceras (Park, 1992). Por otro lado, la leche de cabra presenta mayor disponibilidad del hierro en ratas con anemia, que la leche de vaca (Park y col., 1986). En estudios con ratas que presentaban resección intestinal, simulando la condición patológica del síndrome de malabsorción, se encontró que la leche de cabra mejoraba la absorción intestinal de hierro y cobre (Barrionuevo y col., 2002), así como de la proteína y magnesio (López-Aliaga y col., 2003) y del calcio y fósforo (Campos y col., 2003).

### **3.7. Efecto de los PUFA en el crecimiento del neonato**

El estatus nutricional en ácidos grasos esenciales de la madre durante la gestación puede estar relacionado con el crecimiento del feto; varios autores encuentran una relación positiva entre el estatus en AA y el peso al nacimiento (Al y col., 1990, 1995; Koletzko y Braun, 1991; Carlson, 1996; Woltil y col., 1998). Además, hay que resaltar el efecto de las PG derivadas del AA como inductoras del comienzo del parto, como se deduce del pobre estatus en AA que presentan bebés prematuros en comparación con otros nacidos a término (Koletzko y Braun, 1991; Carlson, 1996; Uauy y col., 2000). Otra hipótesis que relaciona el estatus en AA con el crecimiento consiste en el posible incremento del flujo sanguíneo, contribuyendo así al desarrollo fetal (Gil, 2002).

Carlson y col. (1992), asociaron un crecimiento lento en niños prematuros con el aceite de pescado, causado por una disminución en el nivel de AA. Un año más tarde, los mismos autores publicaron otro estudio en el que desaparece esta circunstancia al utilizar aceite de pescado con bajo contenido en EPA, con una relación EPA/DHA de 1:10. En este estudio concluyen que no se comprometía el peso y que además se encontraban diferencias significativas positivas, para los prematuros que tomaron aceite de pescado, en el “índice de desarrollo mental de Bayley” a los 12 meses (Carlson y col., 1993b).

Cuando las madres toman una dieta rica en LCPUFA se retarda el momento del parto, reduciendo el riesgo de partos prematuros de un 33% a un 21% (Olsen y col., 1992, 2000), también se incrementa el peso al nacimiento, aunque posiblemente ocurra como consecuencia de prolongar el periodo de gestación (Olsen y col., 1994).

Carlson (1996), relaciona la razón n-6/n-3 con el crecimiento y el estatus de AA en bebés prematuros, concluyendo que fórmulas infantiles

### *3. Antecedentes*

---

suplementadas con aceite de pescado que contiene un 0.3% de EPA y un 0.2% de DHA tienen el efecto de disminuir el estatus del AA en bebés prematuros, mientras que, con la misma cantidad de aceite de pescado, al reducir la cantidad de EPA a 0.06%, y manteniendo la de DHA en un 0.2% observó que la concentración de AA en la fosfatidilcolina plasmática no disminuía en comparación con el grupo control. Por último, alimentó bebés prematuros con una fórmula enriquecida en AA (0.43%) y DHA (0.1%) resultando una mejora del estatus del AA (Carlson, 1996). Asimismo, puede existir una relación inversa entre la concentración de LNA y el peso al nacimiento en bebés prematuros (Koletzko y Braun, 1991).

Hoffman y Uauy en 1992, concluyeron que en niños prematuros la suplementación con aceite de pescado no tiene ningún efecto negativo sobre el crecimiento. Otro estudio posterior con fórmulas enriquecidas con PUFA de aceite de pescado con un bajo contenido de EPA en bebés prematuros, mejora el estatus de DHA y de los ácidos grasos de la serie n-3 en general, a expensas del estatus de los ácidos grasos de la serie n-6, en particular del AA (Lapillonne y col., 2000).

La mayoría de los estudios en bebés nacidos a término, no encuentran relación significativa entre el estatus de LCPUFA y el crecimiento de los mismos (Innis y col., 1997; Jorgensen y col., 1998; Makrides y col., 1999; Auestad y col., 2001). Solo Jensen y col., encontraron diferencias a los 120 días del nacimiento entre el peso corporal de bebés alimentados con una fórmula rica en LNA (3.2%) y otra con un 0.4% de LNA, siendo menor el peso de los niños alimentados con la fórmula suplementada (Jensen y col., 1997).

Martín y colaboradores (1999), suplementaron la dieta de cabras con sales cálcicas de ácidos grasos para ver el efecto del incremento energético de la dieta sobre el crecimiento de los cabritos alimentados por sus madres. El suplemento causó un incremento del contenido en grasa de la leche de las madres suplementadas. En este ensayo, 22 cabritos fueron alimentados por sus madres hasta su sacrificio a los 45 días, no distinguiéndose cambios significativos en el peso vivo entre el grupo control y el grupo cuyas

### *3.7 Efecto de los PUFA en el crecimiento del neonato*

---

madres recibieron suplementación. Sin embargo, los autores encontraron diferencias significativas en la composición de la canal de los cabritos (Martín y col., 1999).

Yeom y col. han estudiado la posible influencia del LA y LNA sobre el crecimiento de cabritos recién nacidos, alimentando a los mismos con lactoreemplazantes que contenían diferentes niveles de dichos ácidos grasos. Estos autores, concluyeron que la cantidad de LA y LNA en el lactoreemplazante no influye en el crecimiento de los cabritos durante las cinco primeras semanas de vida, resultado que explican con la hipótesis de que los cabritos poseían reservas suficientes de PUFA n-3 capaces de suplir una deficiencia de los mismos en la dieta. Sin embargo, la suplementación se reflejaba en la composición en ácidos grasos de los glóbulos rojos, el tejido adiposo (donde el LA se incorporó más eficientemente que el LNA) y el hígado. Apareciendo, además, una mayor cantidad de EPA y DHA en el hígado (Yeom y col., 2002, 2003 y 2004).

En este sentido, hay que tener en cuenta que los LCPUFA de la dieta, si no van acompañados de una cantidad adecuada de antioxidantes, pueden también potenciar la peroxidación y reducir así la capacidad antioxidante de las células (Herrera, 2002). Palmquist estudió, mediante suplementación de LCPUFA a las madres, si el incremento en AGE de los corderos afectaba a su crecimiento, resultando que dicho grupo creció un 66% respecto al grupo control; para explicar estos resultados, sugirieron que una elevada cantidad de LCPUFA en la leche sin un suplemento de tocoferol podía ser tóxica para los prerrumiantes (Palmquist y col., 1977).

### **3.8. Composición y calidad de la canal de los cabritos**

Las técnicas agrícolas modernas han originado un descenso en el contenido de ácidos grasos n-3 de la carne de los rumiantes debido al uso casi generalizado de concentrados de cereales ricos en ácidos grasos n-6 para alimentar al ganado (Trautwein, 2001). Según un estudio realizado por Foures en 1992, la composición lipídica de los rumiantes contiene: 23-27% de ácido palmítico, 2-4% de ácido palmitoleico, 14-29% de ácido esteárico, 36-50% de ácido oleico y 1-5% de ácido linoleico.

Para mejorar la calidad de la canal de los cabritos al sacrificio es importante determinar la fracción de la composición en ácidos grasos que incorpora el feto a través de la placenta y la parte que incorpora el cabrito durante las primeras semanas de vida a través de la lactación.

#### **3.8.1. Composición en ácidos grasos de la canal al nacimiento**

Hay un debate abierto sobre la procedencia de la grasa del recién nacido. La elevada concentración de los PUFA en el recién nacido puede deberse a la movilización de los depósitos maternos, al incremento de la síntesis materna o a los cambios en los hábitos alimenticios durante la gestación (Gil, 2002).

Los LCPUFA circulan por el plasma materno en las lipoproteínas y, en menor proporción, como FFA. A pesar de que puede existir una transferencia directa de triglicéridos a la placenta, la difusión de ácidos grasos a la misma, se asegura por los receptores de lipoproteínas, la actividad de la lipoprotein lipasa y la acción de la lipasa intracelular en la placenta (Uauy y col., 2000; Herrera, 2002). Los FFA del plasma materno son importantes como fuente de LCPUFA para el feto, y su captación ocurre bajo un proceso selectivo de translocación en el que interviene una

### *3.8. Composición y calidad de la canal de los cabritos*

---

proteína de unión de ácidos grasos de membrana. Estas proteínas también pueden estar implicadas en la regulación del crecimiento y diferenciación celular (Dutta-Roy, 1997). Este mecanismo, junto al metabolismo celular, determina la velocidad de transferencia a través de la placenta y su selectividad, con la peculiaridad que los niveles de AA y de DHA son más elevados en la circulación fetal que en la materna, mientras los niveles de LNA y LA son más bajos (Chambaz y col., 1985; Coleman, 1989; Innis, 1991; FAO, 1993; Herrera, 2002).

Con la excepción del cobaya y el conejo, el plasma de los fetos de mamíferos contienen una concentración mucho más alta de fosfolípidos que el plasma materno (Noble, 1980). En la oveja, la concentración de LNA y LA maternos es bastante menor en el corazón, hígado, riñón y cerebro que la del feto en dichos órganos (Noble, 1980). En humanos, se ha observado que el ácido linoleico cuando cruza la placenta va a formar parte de los triglicéridos del plasma, mientras que el AA se incorpora a los lípidos estructurales, sobre todo en los eritrocitos. Parece que los eritrocitos maternos actúan como fuente de AA y DHA, siendo éstos ácidos grasos rápidamente captados por los eritrocitos fetales (Gil, 2002).

Hay evidencias indirectas de que el paso a través de la placenta de rumiantes de los ésteres de colesterol es improbable. En la oveja, los ésteres de colesterol tienen un 35% de LA, mientras que los del cordero recién nacido solo contienen un 2-3% de LA. En la vaca, el contenido materno en LA de los ésteres de colesterol alcanza el 80%, mientras que en el ternero recién nacido únicamente representan un 6% (Noble, 1980).

En ovejas, se determinó que los triglicéridos tisulares del feto contenían una mayor cantidad de ácido oleico y una concentración más baja de ácido esteárico, LA y LNA, que en los correspondientes tejidos maternos. En el plasma de éstas se encontró que la concentración de ácido esteárico, oleico y LA era mucho mayor que la de los corderos recién nacidos, lo contrario ocurre con el ácido palmítico y el palmitoleico (Noble, 1980).

### 3. Antecedentes

---

Palmquist y col. (1997), suplementaron la dieta de ovejas preñadas con LCPUFA durante el último mes de gestación, con la intención de eliminar la deficiencia de AGE que suelen presentar los corderos al nacimiento (Noble y col., 1971 y 1972). Sin embargo, no pudieron reducir dicha deficiencia con respecto a la mostrada por el grupo control. Aunque si se observó, una vez nacidos los corderos, un rápido cambio en la composición en ácidos grasos de los fosfolípidos plasmáticos, que reflejan la composición de ácidos grasos de la leche materna que, efectivamente, había cambiado su composición en los animales suplementados. Sobre todo destaca un rápido incremento en el ácido linoleico (Palmquist y col., 1977).

Según Uauy y colaboradores, hasta un total de 600 g de AGE son transferidos de la madre al feto en humanos durante una gestación completa, aproximadamente una media de 2.2 g al día. Estudios recientes con isótopos estables demuestran que el feto es capaz de formar AA y DHA a partir de LA y LNA respectivamente, aunque ésta síntesis ocurre de forma muy lenta e insuficiente para las elevadas necesidades del feto (Uauy y col, 2000). El feto obtiene AA y DHA de la dieta materna y de la biosíntesis fetal endógena por desaturación y elongación en el hígado y en el tejido adiposo (Noble, 1980; Kasser y col., 1981; Chambaz y col., 1985; Leskanich y col., 1999; Uauy y col., 2000).

Crawford y col., realizaron un estudio con cobayas a las que se administró LNA marcado con C<sup>14</sup>, encontrando que una alta proporción de éste era oxidado en las primeras 24 horas, al igual que ocurre en la rata, y finalmente, sólo el 2.6% alcanzaba la placenta, para ser transformado, a las 96 horas, en DHA (Crawford, 2000). Por lo tanto, parecen existir ciertas evidencias de actividad desaturasa en la placenta y en el hígado fetal, sin embargo, el mecanismo principal de aporte de LCPUFA al feto sería la transferencia selectiva a través de la placenta (Herrera, 2002).

Al nacimiento, el plasma de los rumiantes contiene una concentración muy baja de ácidos grasos no esterificados, aunque las seis primeras horas la concentración de éstos en plasma se incrementa hasta diez veces (Palmquist y col., 1977; Noble y, 1980). Este incremento puede ser debido

a la rápida movilización de los ácidos grasos desde las reservas del tejido adiposo para producir la energía que necesita el recién nacido en sus primeras horas de vida, y es de tal magnitud, que los ácidos grasos no esterificados pasan a ser el 30% de los ácidos grasos totales en plasma (Noble, 1980).

La concentración de fosfolípidos y colesterol libre en plasma alcanza, en rumiantes, un máximo de aproximadamente el doble de la cantidad normal en un adulto a los veinte días del parto, y los triglicéridos elevan su concentración durante los diez primeros días hasta un valor máximo, ésta concentración es equivalente a la de los adultos (Noble, 1980). Este rápido incremento en la concentración de los lípidos plasmáticos, en las primeras horas de vida, también puede ser debido a la ingesta del calostro rico en grasa (Mersmann, 1974).

### **3.8.2. Composición y calidad en ácidos grasos de la canal de los neonatos.**

Durante los primeros días de vida de los cabritos, la única fuente de nutrientes que reciben es la leche materna (o en su caso lactorreemplazantes), por lo que en este periodo, la estrategia más efectiva para influir en la composición y calidad de la carne es a través de la composición de la leche (Sanz Sampelayo y col., 2002).

La composición en ácidos grasos de la canal está relacionada con varios aspectos tecnológicos de su carne con vistas al consumo humano (terneza, firmeza, punto de fusión, estabilidad frente a la oxidación). El perfil en ácidos grasos también interesa desde el punto de vista de obtener una canal saludable, especialmente el grado de saturación de la misma (Wood y col., 2003).

El ratio recomendado entre los PUFA n-6 y n-3 para el consumo humano está descompensado a favor de los PUFA n-6 en la carne de rumiantes en crecimiento (Wood y col., 2003). Se han realizado diversos

### 3. Antecedentes

---

estudios con la intención de modificar este ratio sin obtener buenos resultados (Raes y col., 2004). Según Smet y col. (2003), esta proporción está influida fundamentalmente por factores genéticos y por el nivel de grasa del animal y en menor medida por la composición de la grasa de la dieta. Otro grupo de estudios concluyen que es posible disminuir el valor del ratio PUFA n-6/n-3 mediante la dieta del rumiante (Enser y col., 1999; Choi y col., 2000; Sañudo y col., 2000; Scollan y col., 2001; Lorenz y col., 2002).

El alto porcentaje de lípidos saturados de la leche y la canal de los rumiantes es consecuencia del particular metabolismo del rumen, siendo ésta la misma causa de que estos animales produzcan de forma natural CLA, el cual tiene reconocidos efectos beneficiosos sobre la salud (Enser, 1999). Otra característica de las canales provenientes de rumiantes jóvenes en crecimiento es que son muy magras, puesto que en este estadio, el depósito de proteína es prioritario, consumiéndose la mayor parte de la energía de la dieta en el proceso de síntesis proteica (Sanz Sampelayo y col., 2002).

El ratio entre el AE y el LA proporciona la mejor medida de la firmeza o dureza de la carne (Wood y col., 2003), puesto que conforme se incrementa el número de enlaces insaturados el punto de fusión de los ácidos grasos de la carne disminuye, siendo este igual a 69,6°C para el AE y de -5°C para el LA (Enser, 1984). En un estudio con 1.000 corderos Enser y Wood (1993) describieron que la concentración de AE era mayoritariamente responsable del punto de fusión de la grasa de la carne de la canal.

La concentración de PUFA es muy importante para la vida media de la canal, puesto que son muy susceptibles a la oxidación si no están convenientemente protegidos por antioxidantes, pudiendo acelerar el enranciamiento y el deterioro del color de la canal (Renner, 2000; Warren y col., 2002).

### 3.8. Composición y calidad de la canal de los cabritos

---

Pomnampalam y col. (2001, 2002), suplementaron la dieta de corderos con aceite de pecado y harina de pescado obteniendo un incremento en EPA y DHA (LNA fue no diferente) en el *longissimus*. Sin embargo, estos autores no encontraron diferencias significativas en la composición en PUFA n-3 a nivel de la grasa intramuscular. La composición en ácidos grasos de los lípidos intramusculares tiene un especial interés porque está íntimamente ligada al músculo y no puede ser retirada por el consumidor humano. Además los PUFA se acumulan preferentemente en la grasa intramuscular frente a los depósitos intermusculares y de cobertura (Raes y col., 2004).

En otros estudios si se encontraron diferencias en la composición en PUFA n-3 de la grasa intramuscular al suplementar la dieta con aceite de pescado (Mandell y col., 1997; Choi y col., 2000; Scollan y col., 2001; Kitesa y col., 2001).

Los distintos isómeros de CLA se encuentran de forma natural en la carne de los rumiantes (Ching y col., 1992). La mayoría del CLA de la leche y carne de los cabritos tiene su origen en la biohidrogenación ruminal a partir del LA, pero estudios recientes han demostrado que también existe síntesis endógena en la glándula mamaria (Grinari y col., 2000) y en la grasa subcutánea e intramuscular (Raes y col., 2004). El contenido intramuscular de 9cis, 11tras CLA en terneros y corderos oscila entre 0,2 y 1 g/100 g (Mir y col., 2000; Ivan y col., 2001; Raes y col., 2004), dependiendo de la idiosincrasia del animal y de la dieta. Los contenidos más altos se deben a estudios que han suplementado la dieta con fuentes ricas en LNA como aceite de linaza o forraje (Enser y col., 1999; Lorenz y col., 2002; Scolland y col., 2002; Yangy col., 2002; Raes y col., 2004), dietas con alto contenido en LA (Ivan y col., 2001; Madron y col., 2002) o suplementos con aceite de pescado (Enser y col., 1999).

Raes y col. (2004), en una revisión sobre el efecto de los ácidos grasos de la dieta en la incorporación de PUFA y CLA en la carne de corderos, terneros y cerdos, concluyen que la suplementación de la dieta con aceite de pescado es la única estrategia efectiva para incrementar los depósitos de

### *3. Antecedentes*

---

DHA en la carne de rumiantes y de monogástricos. La suplementación de dietas con aceite de linaza rico en LNA puede incrementar levemente la cantidad de EPA y de DPA, sin que tengan efecto en la cantidad de DHA. En rumiantes, la cantidad de CLA en carne puede incrementarse mediante dietas ricas en LA, LNA o PUFA.

## 4. Desarrollo experimental

---



El desarrollo de este trabajo ha requerido la implementación de cuatro ensayos *in vivo*. La manipulación de todos los animales durante el desarrollo de la parte experimental ha seguido las directrices del Comité de Ética de Experimentación Animal del Consejo Superior de Investigaciones Científicas y las exigencias del Real Decreto 1201/2005 de 10 de octubre sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, siempre dentro del marco regulado por la legislación y recomendaciones de la Unión Europea.

En todos los ensayos se suplementó la dieta de los animales con aceite de pescado rico en PUFA n-3 o sus sales cálcicas.

#### **Aceite de pescado**

El aceite de pescado es un subproducto secundario en la producción de harinas de pescado, utilizado normalmente por la industria para la elaboración de jabones, pinturas, barnices y lubricantes, productos que no aprovechan el valor nutricional de esta materia prima. Su empleo como fuente natural de ácidos grasos poliinsaturados n-3 proporciona al subproducto un valor añadido muy alto (Ackman y col., 1990). El aceite de pescado empleado en los ensayos estaba compuesto de una mezcla de aceites de atún, salmón y caballa, obtenido como subproducto de la actividad industrial de la empresa Harinas de Andalucía, S.L., ubicada en Tarifa.

El aceite de pescado utilizado en los ensayos tenía un  $28\% \pm 3$  de PUFA n-3. Esta elevada proporción de ácidos grasos de larga cadena con varias insaturaciones hacía del aceite extraído en Tarifa una materia prima idónea para nuestro propósito. No obstante, el elevado número de enlaces insaturados también suponía un efecto negativo para su manejo, puesto que presentan una alta susceptibilidad al deterioro oxidativo, con la correspondiente limitación de su “vida útil” (Hsieh y Kinsella, 1989; Kaitaranta, 1992).

#### *4. Desarrollo experimental*

---

Los procesos oxidativos ligados a los PUFA, aunque pueden ser beneficiosos en algunos alimentos al generar compuestos carboxílicos de sabor deseable, suelen causar deterioros de sabor, olor, color y textura (Bruna y col., 1989). Para retardar el enranciamiento del producto, conservarlo el mayor tiempo posible, reducir sus pérdidas nutricionales y proteger al animal de la formación de peróxidos lipídicos, se utilizó una mezcla de antioxidantes compuesta por un 0,2% de BHA y un 0,03% de ascorbil palmitato -éster palmítico del ácido ascórbico o vitamina C- sobre la cantidad utilizada de aceite de pescado (Sanz Sampelayo y col., 2002a).

#### **Sales cálcicas de aceite de pescado.**

El aporte de lípidos protegidos contra la biohidrogenación ruminal en la alimentación de rumiantes es una alternativa muy extendida en los sistemas productivos en todo el mundo con el fin de incrementar el contenido energético de la dieta y modificar la composición en ácidos grasos de leche y la canal del rumiante (Franklin y col., 1999).

El método elegido para la obtención de las sales cálcicas utilizadas en este estudio, es el detallado en la patente ES 2 136 535 titulada “Procedimiento de obtención de una grasa para incluir en las dietas de los rumiantes y producto obtenido” (Boza y col., 1999), que es una adaptación novedosa del método de la doble descomposición publicado por Jenkins y Palmquist en 1984.

Para la obtención de las sales cálcicas de los ácidos grasos se somete el aceite de pescado a una hidrólisis alcalina con una solución de hidróxido sódico al 20% en etanol al 10%. Para formar una emulsión estable y homogénea entre el aceite y la sosa se introduce la mezcla en una cuba de saponificación donde se agita durante dos horas a 70°C, a continuación la mezcla se deja reposar durante dos horas a temperatura ambiente. Al jabón sódico formado se le añade fosfato sódico ( $\text{Na}_2 \text{HPO}_4$ ) y carbonato sódico ( $\text{Na}_2 \text{CO}_3$ ). A continuación se adiciona una solución de cloruro cálcico al 20% y se agita la mezcla para que precipiten las sales cálcicas de los ácidos grasos. Por último se prensan las sales cálcicas y se dejan secar a una

temperatura de 15-20 °C durante 5-6 días. Inmediatamente después del prensado, con objeto de proteger las sales cálcicas de la oxidación, se le añade una mezcla de antioxidantes compuesta por un 0,2% de BHA y un 0,03% de ascorbil palmitato (éster palmítico del ácido ascórbico o vitamina C), a su vez cuidadosamente mezclada con un 10%, sobre el total de las sales cálcicas, de polvo de alfalfa para asegurar que su distribución resultase homogénea.

El grado de saponificación de la grasa protegida fue de 0.848, proporción calculada como la fracción de grasa no extraída en soxtec previa hidrólisis ácida. El grado de protección de este producto frente al metabolismo ruminal fue investigado conforme al método descrito por Sukhija y Palmquist (1990), determinando la disociación de las sales cálcicas en líquido ruminal a diferentes niveles de pH (5.0, 5.5, 6.0 y 6.5). El contenido de calcio fue determinado por hidrólisis con 6 mol/l de HCl. La concentración de calcio fue determinada por espectrofotometría de absorción atómica. Los resultados obtenidos indican, que al pH fisiológico del rumen (entorno a 6.5) la proporción de sales cálcicas disociadas fue de 3.66 g por cada 100 g, lo que indica que el producto es prácticamente inerte en el rumen.

### **Protocolos desarrollados durante los ensayos**

#### **Ensayo 1**

Los resultados de este ensayo han sido publicados en el artículo “Polyunsaturated fatty acids and parasitism: effect of a diet supplemented with fish oil on the course of rat trichinellosis”. *Veterinary Parasitology*, 2003.

En la bibliografía, las propiedades inmunomoduladoras de los PUFA están suficientemente contrastadas (Calder y col., 1991, 1992, 2002). Sin embargo, el efectos de éstos ácidos grasos y sus mecanismos de actuación necesitan estudios específicos, puesto que la naturaleza de su influencia

#### 4. Desarrollo experimental

---

depende del tipo de ácido graso, cantidad de antioxidantes, edad, estado de salud, idiosincrasia del animal, etc. (FAO/OMS, 1997), existiendo al respecto conclusiones contradictorias en la bibliografía sobre el efecto de una suplementación con PUFA sobre el sistema inmune.

En este sentido, era de gran interés examinar los efectos de la suplementación del aceite de pescado obtenido en la empresa Harinas de Andalucía, SL de Tarifa sobre algunos parámetros inmunológicos y parasitológicos para generar nuevos conocimiento sobre el efecto de los PUFA n-3 en el sistema inmune. También se aprovechó este ensayo para estudiar el efecto de la suplementación sobre la utilización nutritiva de la dieta y sobre el crecimiento.

Para este ensayo se utilizaron 80 ratas Wistar macho al destete, libres de patógenos, con un peso inicial de  $40\pm 1$ g. Durante todo el estudio las ratas estuvieron en jaulas individuales de acero inoxidable en el interior de una cámara ecológica donde las condiciones ambientales estuvieron permanentemente controladas ( $21-24^{\circ}\text{C}$  y  $50-60\%$  de humedad relativa) con un ciclo diurno de doce horas.

Desde el primer día, las ratas fueron alimentadas con una dieta estándar cuya composición está calculada acorde con las necesidades de las mismas (AIN, 1977). En la primera etapa, las ratas se dividieron en un grupo de 40 que tomaba la dieta estándar y otro grupo de 40 cuya dieta se suplementaba con un 10% de aceite de pescado protegido contra la oxidación por 0.015% de vitamina E y 0.2% de BHT. Durante todo el estudio los animales tenían comida y agua *ad libitum* que se renovaba a diario. Durante el ensayo, a las 9:00 horas de cada día, se recogían y cuantificaban los restos de la dieta del día anterior, las heces y la orina de cada animal que eran conservados a  $-20^{\circ}\text{C}$  y liofilizados para su posterior análisis. Las ratas se pesaban dos veces a la semana.

A las cuatro semanas cada grupo se dividió en otros dos formándose cuatro grupos de 20 ratas. Un grupo de las que tomaban la dieta sin suplementar y otro de los que ingería la dieta suplementada, fueron

infectados por vía oral con 1000 larvas L1 de *Trichinella spiralis*. Los otros dos grupos restantes se usaron como control de los grupos infectados.

A los 6 días de la infección 10 animales de cada grupo fueron sacrificados para obtener y contar el número de parásitos adultos existente en el intestino de las ratas infectadas. Las 40 ratas restantes fueron sacrificadas a los 36 días de la infección con el objeto de determinar el número de larvas presentes en el diafragma de las ratas infectadas. En ambas fechas se obtuvieron los linfocitos del bazo de las 80 ratas para determinar los niveles de IL4 y de IFN $\gamma$  existentes en cada grupo. También se tomaron muestras de suero el día de la infección y a los 36 después de la misma (65 desde el comienzo del experimento) para realizar diferentes ensayos inmunológicos (ELISA, Western Blot e IFI).

## **Ensayo 2**

Los resultados de este ensayo han sido publicados en el artículo “Thermogenesis Associated to the intake of a Diet Non-supplemented or Supplemented with n-3 Polyunsaturated Fatty Acid-Rich Fat, Determined in Rats Receiving the Same Quantity of Metabolizable Energy”. *Nutrition & Metabolism*, 2006.

Con el fin de analizar la utilización metabólica de una dieta suplementada con aceite de pescado rico en PUFA n-3 frente a otra estándar. Las dietas se diseñaron bajo un mismo nivel de ingesta de energía metabolizable ( $720 \text{ KJ/Kg}^{0.75}$  al día), para comparar las posibles diferencias en función de la composición de la grasa. Conocido el contenido en energía metabolizable de las dietas de acuerdo con resultados previos (Gómez y col., 2003), la dieta se racionó bajo el nivel de ingesta voluntaria calculada para los animales que consumían la dieta no suplementada.

Para este ensayo se utilizaron dos lotes de 20 ratas Wistar macho al destete, libres de patógenos, con un peso inicial de  $40 \pm 1 \text{ g}$ . Durante todo el estudio las ratas estuvieron en jaulas individuales de acero inoxidable en el

#### *4. Desarrollo experimental*

---

interior de una cámara ecológica donde las condiciones ambientales estuvieron permanentemente controladas (21-24°C y 50-60% de humedad relativa) con un ciclo diurno de doce horas.

La composición de la dieta estándar está basada en las necesidades de las ratas (AIN, 1977). La dieta suplementada se preparaba cada semana utilizando 9 partes de la dieta estándar y una parte de aceite de pescado convenientemente protegido por 0.015% de vitamina E y 0.2% de BHT. El porcentaje total de grasa de la dieta suponía un 27.4% de la energía bruta de la misma, valor cercano al 30% máximo aconsejado (National Institute of Health, 2000).

El peso vivo de los animales y la ingesta se evaluaba dos veces a la semana. La composición química de las dos dietas y el perfil en ácidos grasos de ambas y del aceite de pescado se muestran en las tablas 1 y 2 del artículo 5.2.

A los 30 días del inicio del ensayo se sacrificaron 10 ratas de cada lote mediante una inyección de pentobarbital sódico (Pentothal; Abbot). Se vació el estómago y los intestinos de cada animal y se conservaron a -20°C hasta el momento de su análisis. Con las 10 ratas restantes de cada grupo se realizó un ensayo de balance a los 45 días de comienzo del experimento que duró otros 6 días, donde se recogieron las heces y la orinas de las mismas.

A los 60 días del inicio del ensayo se tomaron muestras de sangre del orbital de cada animal a las 9:00 h. y se sacrificaron siguiendo el mismo procedimiento utilizado en el sacrificio realizado a los 30 días

### Ensayo 3

Los resultados de este ensayo han sido publicados en el artículo “Effect of rumen-protected supplements of fish oil on intake, digestibility and nitrogen balance of growing goats”. *Animal Science*, 2004.

Para alcanzar el objetivo de conseguir una leche y una canal enriquecida de forma natural en PUFA n-3 con un rendimiento óptimo, necesitábamos determinar el efecto de la suplementación de la dieta con sales cálcicas de aceite de pescado sobre la ingesta, el balance de nitrógeno y la digestibilidad individual de cada ácido graso.

Se emplearon 12 cabras macho de la raza granadina (10±2 meses de edad y 27±3,02 kg de peso vivo) procedentes de la Granja Experimental de la Diputación Provincial de Granada. Se establecieron dos grupos de animales de acuerdo con su peso y edad, a los que se les administró una dieta constituida por una fracción de forraje (500 g/animal y día), compuesta por 350 g de heno de alfalfa y 150 g de paja de cereales, y una fracción de concentrado (600 g/animal y día), compuesta por 300 g de altramuz, 138 g de avena 138 g de maíz y 24 g de suplemento minero-vitamínico, disponiendo durante todo el ensayo de agua *ad libitum*. Los requerimientos específicos de esta especie y raza, se tuvieron en cuenta a la hora de diseñar ambos tipos de dieta (Aguilera et al., 1991). El concentrado se encontraba suplementado o no suplementado con 60 g/kg de grasa protegida frente al metabolismo ruminal. La grasa protegida tenía 850 g/kg de MS, 706 g/kg de grasa en MS. Su grado de saponificación fue de 0.848, cantidad calculada como la parte de la grasa que no se extraía sin previa hidrólisis ácida (Hermansen y Lund, 1990).

La duración del experimento fue de 37 días. Durante los 10 primeros días los animales se adaptaban, en boxes individuales, al consumo del concentrado suplementado con la grasa gradualmente, lo que se conseguía sustituyendo partes crecientes del concentrado estándar por el suplementado. Una vez conseguida la adaptación, los animales se mantuvieron bajo el consumo de las dietas experimentales durante 20 días

#### *4. Desarrollo experimental*

---

más. Transcurrido este periodo, los animales se dispusieron individualmente en células especiales de metabolismo durante 7 días, donde se realizaron los ensayos de balance, constituyendo los primeros dos días la fase de adaptación a la nueva situación y los cinco últimos, la fase principal de los ensayos.

Durante el ensayo de balance, a las 9:00 horas de cada día, se recogían y cuantificaban los restos de la dieta del día anterior, las heces y la orina de cada animal, tomándose alícuotas (10% para la orina, 20% para las heces y 100% para los rehusos de forraje y concentrado) que se conservaban a -20°C hasta su posterior análisis.

#### **Ensayo 4**

Parte de los resultados de este ensayo han sido publicados en el artículo “Effect of providing a polyunsaturated fatty acid-rich protected fat to lactating goats on growth and body composition of suckling goat kids”. *Animal Science* 2006.

Otra parte de los resultados de este ensayo fueron publicados y presentados oralmente en las IX Jornadas Internacionales de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia.

- “Efecto de la utilización de un concentrado suplementado con una grasa rica en ácidos grasos poliinsaturados n-3 sobre la capacidad reproductora de la cabra de raza malagueña”.
- “Composición al nacimiento de cabritos cuyas madres fueron alimentadas con un concentrado suplementado con una grasa protegida rica en ácidos grasos poliinsaturados n-3”.

El objetivo principal de este ensayo fue obtener una leche enriquecida de forma natural en PUFA n-3 y una canal de los cabritos gestados y amamantados por las madres que ingirieron la dieta suplementada con el

aceite de pescado, equivalentemente enriquecida de forma natural en PUFA n-3.

Para estudiar el efecto de los PUFA n-3 sobre el desarrollo y la composición de la canal, los cabritos nacidos se dividieron en dos lotes, uno de ellos fue sacrificado a los 45 días con el objeto de estudiar la composición en ácidos grasos de los distintos depósitos lipídicos de la pata trasera izquierda. El segundo lote fue sacrificado al nacimiento para estudiar la composición tisular de los cabritos con el objeto de contrastar el posible paso de los PUFA n-3 al feto a través de la placenta y su efecto sobre el desarrollo embrionario de diversos órganos.

Teniendo en cuenta que al suplementar la dieta de las madres con aceite de pescado podíamos modificar el estatus nutricional en ácidos grasos esenciales de éstas, afectando a la razón n-6/n-3 a nivel plasmático y en la leche, fue necesario comprobar que este hecho no afectaba negativamente al crecimiento del feto y de los cabritos. Por ello, y con objeto de asegurar la viabilidad económica del nuevo producto, se estudió el efecto de los PUFA n-3 sobre el peso al nacimiento y el crecimiento de los cabritos.

Por otra parte, está ampliamente contrastado que la suplementación de dietas con aceite de pescado o sales cálcicas de aceite de pescado a vacas y ovejas en lactación, suele mejorar las tasas de concepción (Kuran y col., 1999; O`Callaghan and Bolland, 1999; Mattos y col., 2002) e incrementar las posibilidades de supervivencia del embrión (Petit y col., 2002). En este ensayo también se estudió el efecto de la suplementación con aceite de pescado sobre la capacidad reproductora de la cabra, con especial hincapié en el efecto de los PUFA n-3 sobre los índices de prolificidad y fertilidad y su posible efecto sobre la sincronización del estro, puesto que estos parámetros son de gran importancia económica para los ganaderos.

Para este ensayo se escogieron dos lotes homogéneos de 15 cabras de raza malagueña en función de su peso, producción de leche y edad. Ambos grupos se mantuvieron durante todo el ensayo en condiciones de

#### *4. Desarrollo experimental*

---

explotación semi-extensiva, recibiendo cada animal 1 Kg de concentrado al día, además de la ración de forraje que tomaban en el campo.

Cada animal del lote control, recibía cada día la ración de concentrado empleada habitualmente por el ganadero (508 g de altramuz, 319g de avena, 133g de maíz y 40g de complemento minero-vitamínico), mientras el otro lote recibía cada día 1 Kg del mismo concentrado suplementado con 83g de sales cálcicas de aceite de pescado (50g de grasa), que reemplazaban la parte proporcional de los componentes de la dieta control excepto la correspondiente al suplemento minero-vitamínico. Los animales ingirieron la dieta experimental durante aproximadamente 7 meses, desde 20 días antes de la cubrición, durante toda la gestación y durante los primeros 45 días de lactación.

Antes de comenzar el ensayo se realizaron ecografías preventivas para comprobar que ninguna cabra seleccionada para formar parte de los lotes estaba preñada. A los 20 días del inicio se introdujeron dos machos con las aproximadamente 200 cabras de la ganadería de Juan Francisco Díaz Pedraza, ubicada en Casabermeja, Málaga. Los machos se retiraron a los 10 días. A los 45 días de la retirada de los machos se realizó una segunda ecografía para descartar las hembras que no habían quedado preñadas.

A los 75 y 195 días del comienzo del ensayo (45 días de gestación y 30 días después del parto) se tomaron muestras de sangre en vacutainer con heparina. La primera muestra de sangre se tomó aproximadamente a los 45 días de gestación por ser un momento clave para la supervivencia de los embriones (Boza, 1998; Mattos, 2002). La segunda toma se realizó aproximadamente 15 días después de los partos para comprobar como los niveles de progesterona y prostaglandinas respondían en el post-parto, momento en el que el organismo puede estar preparándose para el inicio de un nuevo ciclo estral (Boza, 1998), así como para contrastar el estatus en ácidos grasos esenciales (Koletzko y Braun, 1991).

De las 30 cabras que comenzaron el ensayo, 26 se quedaron preñadas (13 de cada lote) y una del grupo que tomó la dieta suplementada abortó.

Las 13 cabras del grupo control tuvieron 23 crías (16 machos y 7 hembras). Las 12 cabras del grupo experimental 26 crías (15 machos y 11 hembras).

Al nacimiento se sacrificaron aleatoriamente 6 cabritos machos de cada lote por sección de la yugular, después de ser anestesiados por una inyección intramuscular de Xylazine (Rompum Bayer). Antes del sacrificio se pesaron los animales y se tomaron muestras de sangre. Una vez sacrificados los cabritos, se extrajo la grasa epiplónica, riñonada y mesentérica, así como el bazo, timo, testículos, cerebro, hígado y corazón, se pesaron y conservaron a -20°C hasta el momento de su liofilización y análisis.

El resto de cabritos permanecieron con sus madres durante todas las horas del día los primeros siete días de vida. A partir del octavo día las madres salían al campo desde las 8:00 h. hasta las 17:00 h., permaneciendo el resto del día junto a sus crías. A los 30 días del parto se tomaron muestras de sangre. Cuando los cabritos tenían 45 días, seis machos de cada grupo fueron sacrificados por sección de la yugular, después de ser anestesiados por una inyección intramuscular de Xylazine (Rompum Bayer). Una vez sacrificados los cabritos, se extrajo la grasa epiplónica, riñonada y mesentérica, así como el bazo, timo, testículos, cerebro, hígado y corazón, se pesaron y conservaron a -20°C hasta el momento de su liofilización y análisis. Las medias canales fueron pesadas en caliente y en frío y la pata trasera izquierda de cada animal seccionada para su posterior disección. Cada parte se conservó a -20°C. La pata trasera izquierda de los cabritos fue diseccionada, separando hueso, músculos, grasa intermuscular y la grasa de cobertura

A los 15, 30 y 45 días del nacimiento de los cabritos se tomaron muestras de leche de todas las madres a las 7:30 h. Estas muestras fueron conservadas a -20°C para su posterior liofilización y análisis.



## 5. Publicaciones

---



- 5.1. Polyunsaturated fatty acids and parasitism: effect of a diet supplemented with fish oil on the course of rat trichinellosis**
  
- 5.2. Thermogénesis associated to the intake of a diet non-supplemented or supplemented with n-3 polyunsaturated fatty acid-rich fat, determined in rats receiving the same quantity of metabolizable energy**
  
- 5.3. Effect of rumen-protected supplements of fish oil on intake, digestibility and nitrogen balance of growing goats**
  
- 5.4. Effect of providing a polyunsaturated fatty acid-rich protected fat to lactating goats on growth and body composition of suckling goat kids.**
  
- 5.5. Efecto de la utilización de un concentrado suplementado con una grasa rica en ácidos grasos poliinsaturados n-3 sobre la capacidad reproductora de la cabra de raza malagueña.**
  
- 5.6. Composición al nacimiento de cabritos cuyas madres fueron alimentadas con un concentrado suplementado con una grasa protegida rica en ácidos grasos poliinsaturados n-3**





Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

SCIENCE @ DIRECT®

Veterinary Parasitology 117 (2003) 85–97

veterinary  
parasitology

[www.elsevier.com/locate/vetpar](http://www.elsevier.com/locate/vetpar)

## Polyunsaturated fatty acids and parasitism: effect of a diet supplemented with fish oil on the course of rat trichinellosis

V. Gómez García, M.R. Sanz Sampelayo, J.R. Fernández Navarro,  
F.D. Carmona López, F. Gil Extremera, M. Rodríguez Osorio\*

*Estación Experimental del Zaidín (CSIC), Profesor Albareda 1, 1808 Granada, Spain*

Received 7 March 2003; received in revised form 3 July 2003; accepted 19 July 2003

### Abstract

Dietary fish oil has a beneficial effect on heart and some bacterial diseases and apart from other effects, some studies have revealed their ability to modulate the course of inflammatory and autoimmune diseases. The study here reported was designed to evaluate the possible influence of a fish oil supplement on the course of a *Trichinella* infection. Nutritional, parasitological and immunological parameters were analyzed. Two groups of 20 Wistar rats, one fed a standard diet and the other one a standard diet supplemented with fish oil, were infected with 1000 L1 larvae. Other two uninfected groups served as control. Results were as follows: fish oil diet intake and infection have, respectively, a positive and a negative effect on growth and food utilization. The negative effect is detected later in animals fed the fish oil diet. A reduction of 30.9 and 36.6% in the number of adult worms and L1 larvae, respectively, was observed in the fish oil group as compared to the standard diet group. Production of IFN $\gamma$  (Th1 response) and IL4 (Th2) response was measured in stimulated splenic cells. The fish oil diet increased both IFN $\gamma$  and IL4 levels. At 6 days after infection both IFN $\gamma$  and IL4 responses were detected, but at 36 days after infection only IL4 was detected in the standard group. The level of somatic and cuticular antibodies was not affected by the diet. © 2003 Elsevier B.V. All rights reserved.

*Keywords:* *Trichinella spiralis*; Trichinellosis; Fish oil; PUFAs; Immunity

### 1. Introduction

After the epidemiological studies in Eskimos showing the beneficial effect of fish and fish oil consumption on heart diseases (Dyerberg and Bang, 1979), a great interest in this

\* Corresponding author. Tel.: +34-958572757; fax: +34-958572753.  
E-mail address: [mrosorio@eez.csic.es](mailto:mrosorio@eez.csic.es) (M. Rodríguez Osorio).

subject was generated and the studies were extended to many other diseases. Some studies have revealed the ability of fish oil to affect the course of inflammatory and autoimmune diseases (Kremer, 1996; Lawrence and Sorrel, 1993).

Although polyunsaturated fatty acids (PUFAs) are immunomodulators (Calder and Newsholme, 1992; Calder et al., 2002), few studies have examined how these dietary components influence infections. Dietary fish oil has been shown to impair the resistance of mice to infection with *Salmonella typhimurium* (Chang et al., 1992). A fish oil diet resulted in reduced survival and impaired bacterial clearance in mice challenged with *Listeria monocytogenes* (Fritsche et al., 1997). In mice fed *n* – 3 PUFAs and infected 4 weeks later with *L. monocytogenes*, IFN $\gamma$  and IL12 production was lower than in mice fed the control diet, this reduction having important implications for host resistance (Fritsche et al., 2000). After 120 h of infection with *Klebsiella pneumoniae*, survival of NMRI mice fed a fish oil enriched diet was higher than those fed standard, olive oil or corn oil diets (Bjornsson et al., 1997).

The effect of dietary fish oil on the growth suppressive effects of the inflammatory response, induced by injecting non-replicating immunogens, and indices of specific immunity in chicks has been studied. It has been found that the inclusion of increasing amounts of fish oil in the diet improves performance, decreases indices of inflammatory response and either improves or does not change indices of the specific immune response of growing chicks (Korver and Klasing, 1997). On the other hand, chickens fed a fish oil diet, rich in *n* – 3 PUFAs, and infected with *Eimeria tenella*, showed a reduced parasite invasion, decreased cecal lesions and maintained weight gain as compared to unsupplemented diets (Allen et al., 1996). In recent studies a protective effect of dietary fish oil on murine malaria has been reported (Levander et al., 1990; Taylor et al., 1997). The present study was specifically designed to examine the effect of a fish oil supplement on the nutritional (growth and food utilization), parasitological (number of adult and L1 larvae worms) and immunological (level of antibody and Th1 and Th2 cytokines) parameters in rats infected with *Trichinella spiralis*.

## 2. Material and methods

### 2.1. Animals

Eighty weaned male Wistar rats (Harlan Interfauna Iberica), with a initial weight of  $40 \pm 1$  g and free from specific pathogen (including ecto- and endoparasites) were used throughout this study. They were placed, individually, in wire stainless steel cages in an environmentally controlled room (21–24 °C and 50–60% relative humidity). A diurnal light cycle of 12 h was maintained throughout the study.

### 2.2. Diets

Upon receipt, the rats were fed a diet that contained 0% (standard diet) or 10% by weigh fish oil (fish oil diet). The composition of the experimental diet was based on the AIN77 purified diet for rats (AIN, 1977). The animals were provided food and water ad libitum

and water was always available. Oxidation of the fish oil was prevented by addition of antioxidants, 0.015 and 0.2% of Vitamin E and BHT, respectively (Boza et al., 2000).

The fatty acid composition of fish oil was determined by gas chromatography (Lepage and Roy, 1986) and was as follows (g/100 g total fatty acids)—C14: 0, 3, 8; C16: 0, 16.3; C16: 1 ( $n - 7$ ), 4, 4; C17: 0, 0, 4; C18: 0, 4, 6; C18: 1, 21, 2; C18: 2 ( $n - 6$ ), 2, 0; C18: 3 ( $n - 3$ ), 10, 1; C20: 0, 0.3; C20: 2 ( $n - 6$ ), 0.3; C20: 3 ( $n - 9$ ), 6, 9; C20: 4 ( $n - 6$ ), 1, 1; C20: 5 ( $n - 3$ ), 6, 3; C22: 6 ( $n - 3$ ), 22, 2. The source of fish oil was tunny and other related species and was provided by Harinas de Andalucía, Tarifa, Spain.

### 2.3. Experimental design

Four groups of 20 rats were used, two of which were fed a standard diet and the other two a standard diet plus 10% of fish oil (fish oil diet). After 4 weeks, one group fed the standard diet and one group fed the fish oil diet were inoculated with 1000 L1 (M SUS/ES/LASO, code ISS112) *T. spiralis* larvae, obtained by pepsic digestion, by oral route, with the two remaining groups serving as controls. At 35 days after initiating the experiment (6 days post-infection (PI) in infected animals), 10 animals from each group were anaesthetized by intraperitoneal injection of sodium pentobarbital (Pentothal, Abbot, Madrid, Spain) and killed in order to recover and count the number of adult *Trichinella* in the intestine of the infected rats. The other 10 rats were sacrificed at 36 days PI (65 days after initiating the experiment), to determine the number of larvae in the diaphragm. On the same dates, splenic lymphocytes were obtained from all animals to determine the IL4 and IFN $\gamma$  levels. Sera were taken from animals at 0 and 36 days PI (29 and 65 days after initiating the experiment) and assayed for antibodies by indirect immunofluorescence (IIF), ELISA and Western blot (WB). Food consumption and body weight were studied in animals maintained for 65 days.

All work was carried out following European Union and Spanish rules and guidelines regarding the ethical treatment of laboratory animals (BOE, 1988).

### 2.4. Growth and food utilization

Food consumption and body weight were recorded twice per week and food efficiency ratios (total g body weight gain/total g food intake) calculated.

### 2.5. Adult worms and larvae count

Rats were killed and the small intestine removed and flushed with 15 ml of PBS. Subsequently, each small intestine was opened longitudinally, cut into 1 cm sections and incubated in PBS at 37 °C for 2 h. Adult worms migrating into the PBS were counted. Larvae were recovered from the diaphragm after pepsin/ClH digestion and counted (Blair, 1983) to determine the number of larvae per gram of tissue.

### 2.6. Parasite antigens

*T. spiralis* first stage (L1) larvae, maintained in Swiss mice and recovered by acid-pepsin digestion were used as a source of antigen for an IIF test. Crude extracts were prepared by

homogenization of L1 larvae in phosphate-buffered saline (PBS) containing 1 mM phenyl-methylsulfonyl fluoride and 5 mM EDTA. The homogenate was sonicated, centrifuged at  $12,000 \times g$  for 30 min at 4 °C and the protein content measured (Bradford, 1976). Crude extracts were used in the ELISA and WB tests.

### 2.7. Serological tests

An IIF test with whole larvae was carried out to detect cuticular antibody (Sadun et al., 1962). L1 larvae, recovered by acid-pepsin digestion and fixed in a 10% formalin/0.5% bovine seroalbumin solution were used. Antibody against somatic antigens were detected by an indirect ELISA technique (Rodríguez Osorio et al., 1987). Two aliquots of each serum sample, diluted at 1:320 were incubated for 30 min at 37 °C. Rat anti-IgG conjugated to peroxidase (BioRad) diluted at 1:1500 was incubated for 30 min at 37 °C. Plates were developed with 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzyl-thiazoline-6-sulfonic acid). WB was applied to detect and identify anti-somatic antibodies. Six hundred micrograms of protein/gel from *Trichinella* extract were used, following the SDS-PAGE method described by (Towbin et al., 1979). Serum samples diluted at 1:100 were used. Anti-rat IgG horseradish peroxidase conjugate (BioRad) diluted at 1:1500 was employed. A previously stained molecular weight marker was included.

### 2.8. Spleen mononuclear cell culture

Immediately after the spleens were excised, splenocyte cell suspensions were prepared by gently teasing the spleens with forceps in sterile PBS. Membrane debris was removed by filtering the cell suspensions through sterile gauze. The suspension was centrifuged at  $250 \times g$  at 4 °C for 10 min and the supernatant discarded. Cells were isolated by Ficoll-Histopaque gradient (Sigma). In vitro culturing of spleen cells was performed following López Abán et al. (1999).

### 2.9. Th1 (IFN $\gamma$ ) and Th2 (IL4) cytokine production

Detection of these cytokines was carried out using a commercial kit (R&D Systems). The assay was based on a quantitative sandwich ELISA using a monoclonal antibody specific for rat IFN $\gamma$  and a polyclonal antibody specific for rat IL4 as captured antibody. Samples of undiluted supernatants were used in duplicate. The reaction was visualized with TMB substrate. Plates were read at 450 and 540 nm (correction wavelength) in a BioRad microplate reader. Analysis of the absorbance and curve fit reports was performed using the BioRad Microplate Manager version 4.0 program.

### 2.10. Statistical analysis

In all assays differences between mean values were assessed by an ANOVA with Duncan's multiple range test at a 5% level of significance.

### 3. Results

#### 3.1. Nutritional parameters

Fig. 1 shows the change in body weight of the animals maintained under experimental conditions throughout the experiment. Before infection, body weight change was similar in all groups; afterwards, it was affected by diet and the parasitological status (infection or no infection). Table 1 shows body weight at 6 and 9 days PI, final body weight, body weight gain, food intake and food efficiency ratio values obtained from infection to the end of the experiment. At 6 days PI, the mean body weight of infected animals fed the standard diet was lower ( $P < 0.05$ ) than that of uninfected ones. At 9 days PI, however, and, irrespective of the diet, the mean body weight value of infected animals was lower ( $P < 0.05$ ) than that of the uninfected ones. All the other parameters (final body weight, body weight gain, food intake and food efficiency ratio), were affected by infection and diet ( $P < 0.05$ ); within the same diet, mean values of infected animals were lower than those of uninfected ones. The animals with the same parasitological status and fed the standard diet showed lower mean values than those fed the fish oil diet.

#### 3.2. Intestinal and muscular parasite burden

A statistically significant reduction in the numbers of adult worms in the intestine (30.9%,  $P < 0.05$ ) and larvae per g of diaphragm (36.6%,  $P < 0.05$ ) was observed in the group fed the fish oil diet as compared to the standard diet (Table 2).

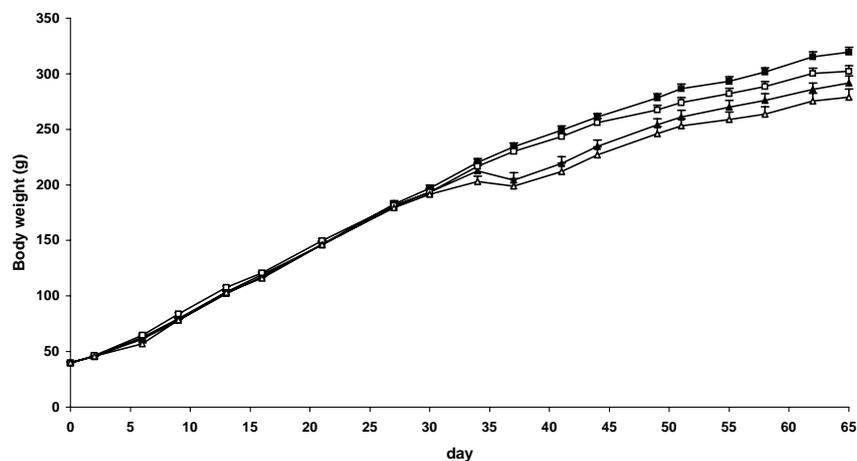


Fig. 1. Body weight change for each animal group: (□) animals fed a standard diet; (△) animals fed a standard diet and infected at 29 days; (■) animals fed a fish oil diet; (▲) animal fed a fish oil diet and infected at 29 days. Bars represent mean standard errors.

Table 1  
Effect of the fish oil diet on growth and food utilization in rats ( $n = 10$ ) uninfected and infected with *T. spiralis*<sup>a</sup>

|  | Diet         |                           |                           |                             |
|--|--------------|---------------------------|---------------------------|-----------------------------|
|  | Standard     |                           | Fish oil                  |                             |
|  | Control      | Infected                  | Control                   | Infected                    |
| Body weight (g) at 6 days PI date  | 216.9 ± 3.04 | 202.9 ± 5.01 <sup>b</sup> | 220.4 ± 3.43              | 212.5 ± 4.90                |
| Body weight (g) at 9 days PI date  | 230.3 ± 3.00 | 199.0 ± 6.51 <sup>b</sup> | 234.3 ± 3.39              | 204.2 ± 6.75 <sup>b</sup>   |
| Final body weight (g)  | 302.1 ± 5.06 | 279.0 ± 7.33 <sup>b</sup> | 319.5 ± 4.34 <sup>c</sup> | 291.6 ± 6.43 <sup>b,c</sup> |
| Body weight gain (g/day) <sup>d</sup>                                    | 3.1 ± 0.11   | 2.5 ± 0.13 <sup>b</sup>   | 3.5 ± 0.08 <sup>c</sup>   | 2.8 ± 0.09 <sup>b,c</sup>   |
| Food intake (g/day) <sup>d</sup>   | 21.8 ± 0.30  | 20.7 ± 0.53 <sup>b</sup>  | 20.6 ± 0.39 <sup>c</sup>  | 19.6 ± 0.58 <sup>b,c</sup>  |
| Food efficiency ratio<br>(g body weight gain/g food intake) <sup>d</sup> | 0.14 ± 0.005 | 0.12 ± 0.005 <sup>b</sup> | 0.17 ± 0.002 <sup>c</sup> | 0.14 ± 0.002 <sup>b,c</sup> |

<sup>a</sup> Data represent mean ± standard error.

<sup>b</sup> Within the same diet, means for infected animals differ from those for uninfected ones ( $P < 0.05$ ).

<sup>c</sup> Within the same parasitological status, means for fish oil diet differ from those for standard diet ( $P < 0.05$ ).

<sup>d</sup> Values obtained from infection date to the end of the experiment.

### 3.3. Serum antibody

Circulating antibodies to *Trichinella* were detected by IIF, ELISA and WB. All sera from infected animals were positive with the three tests. IIF titres ranged from 1:40 to 1:640 in animals fed the standard diet and from 1:20 to 1:1280 in those fed the fish oil diet. The difference between the mean values of the two groups, calculated after transforming titres into  $\log_2$ , was not statistically significant ( $P > 0.05$ ) (Fig. 2). The difference between the mean optical density values, obtained by ELISA, was not statistically significant ( $P > 0.05$ ) (Fig. 2). WB analysis showed no difference in the pattern obtained from animals fed the standard and fish oil diets (data not shown). Sera from uninfected animals were negative.

### 3.4. Cytokine production

Levels of IL4 and IFN $\gamma$  at 6 and 36 days PI (35 and 65 days after initiating the experiment) are shown in Fig. 3. In the absence of mitogen, lymphocytes produced little or no detectable cytokine (data not shown). In uninfected animals, those fed the fish oil diet showed higher values of IL4 and IFN $\gamma$  than those fed the standard diet ( $P < 0.05$ ). In infected animals, this effect was observed for IFN $\gamma$  at 6 and 36 days PI and for IL4 at 6 days PI. At 65 days

Table 2  
Adult and larvae per gram recovered from rats at 6 and 36 days, respectively, after infection with *T. spiralis*

| Diet     | Adults |                |                                      | Larvae per gram |                |                                      |
|----------|--------|----------------|--------------------------------------|-----------------|----------------|--------------------------------------|
|          | Mean   | Standard error | Percentage of reduction <sup>a</sup> | Mean            | Standard error | Percentage of reduction <sup>a</sup> |
| Standard | 915.9  | 73.40          |                                      | 5361.9          | 705.31         |                                      |
| Fish oil | 632.5  | 42.75          | 30.9                                 | 3402.1          | 248.87         | 36.6                                 |

<sup>a</sup> With respect to the standard diet group.

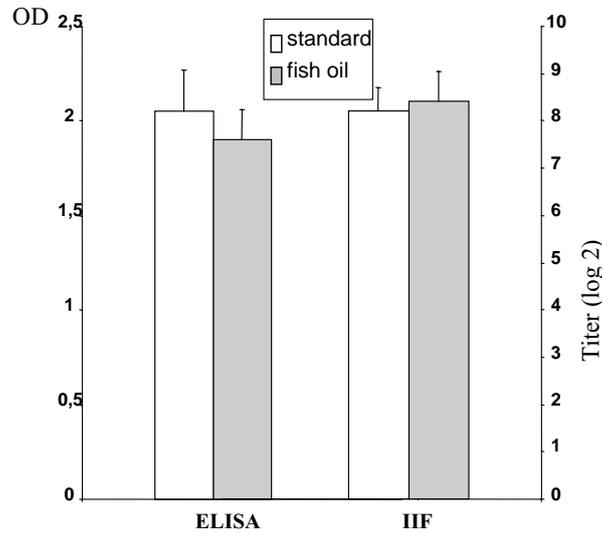


Fig. 2. Optical density of ELISA and IIF titres in rats infected with 1000 *T. spiralis* larvae at 36 days PI. Bars represent mean standard errors.

of feeding with the standard diet, the level of IL4, for both uninfected and infected animals was higher than that at 36 days. In animals fed the fish oil diet, a similar result was only observed in uninfected animals. With regard to IFN $\gamma$ , an opposite effect was seen in infected animals. At 6 days PI, increased values of IL4 and IFN $\gamma$  were observed compared to the uninfected control ( $P < 0.05$ ). At 36 days PI, similar results were only observed for IL4 in animal fed the standard diet.

#### 4. Discussion

Several recent studies have examined the interactions between nutrition and the response to parasitism (Etter et al., 2000; Hoskin et al., 2000; Zeng et al., 2001) but the available data for fish oil are mainly from protozoan and bacterial infections (Blok et al., 1992; Takeda et al., 1995; Korver and Klasing, 1997; Levander et al., 1990).

In the present study in both uninfected and infected animals, fish oil diet had a positive effect on growth and food utilization. Final body weights and body weight gains, and food efficiency ratios, obtained from the day after infection to the end of experiment, were higher in the animals fed the fish oil diet than those fed the standard diet. Food intake rates were lower in animals fed the fish oil diet, which might be due to the different energy content of the diets. It is well known that animal regulate their food intake mainly to satisfy their energy requirements (Forbes, 1986).

The effect of  $n-3$  PUFAs diet on growth and food utilization depends on the animal's age. Adult animals show lower body weight than growing ones (Fickova et al., 1998). However,

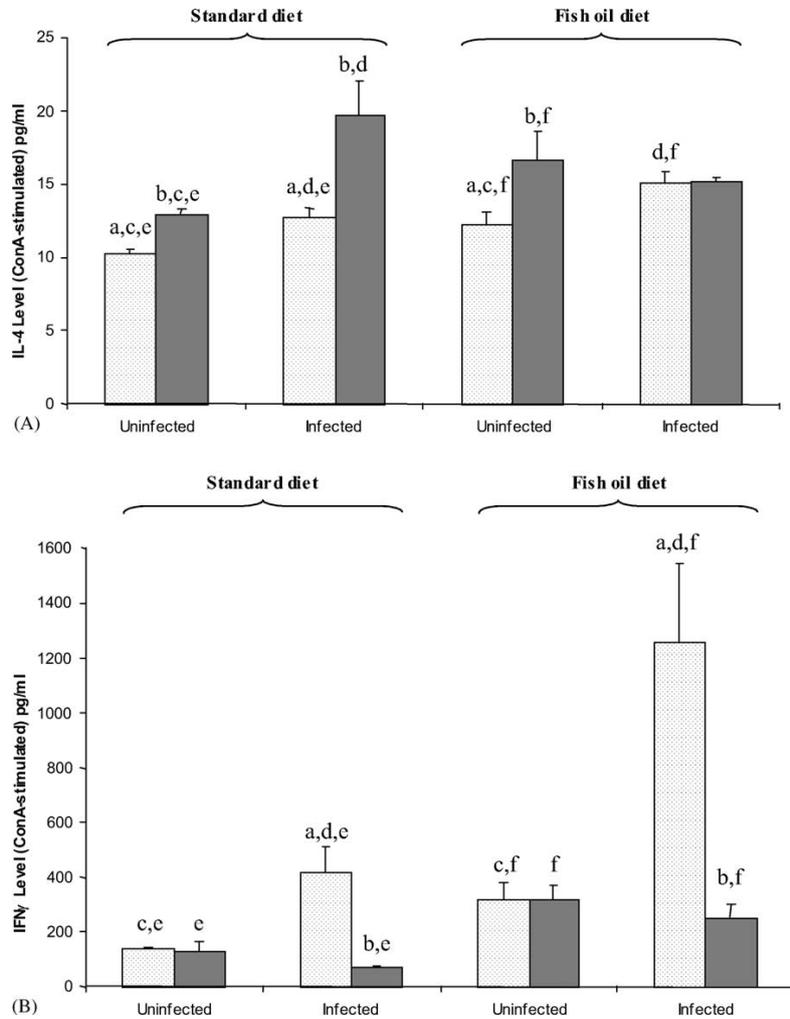


Fig. 3. Level of spleen cell IL4 (A) and IFN $\gamma$  (B) production in rats fed a standard or a fish oil diets (□) 6 days PI (35 days after initiating the experiment); (■) 36 days PI (65 days after initiating the experiment). Bars represent mean standard errors. a and b: within the same diet and parasitological status (time effect) values affected by different letters are different ( $P < 0.05$ ); c and d: within the same diet and time (infection effect) values affected by different letters are different ( $P < 0.05$ ); e and f: within the same time and parasitological status (diet effect) values affected by different letters are different ( $P < 0.05$ ).

during growth, body weight gain may be obtained without change (Fremoux et al., 2001) or may even be higher than that obtained for the standard diet (Gaiva et al., 2001). In the opinion of these authors, this higher value is the result of a higher food efficiency ratio, probably due to the lower energetic cost of lipid deposition from dietary fat than from dietary carbohydrates (Oudart et al., 1997). However, this greater weight gain may be the result of a higher protein retention (Su and Jones, 1993).

In growing animals, parasite infection can lead to a significant reduction in food intake, growth rate and in the efficient use of metabolizable energy (Dynes et al., 1998). The results obtained in the present study show that, irrespective of the diet, *Trichinella* infection had, as expected, a negative effect on animal growth and food utilization. Final body weights, body weight gains, food intake rates and food efficiency ratios, obtained from the day after infection to the end of the experiment, were lower in infected animals than in uninfected ones. On the other hand, and taking into account the body weight values obtained at 6 and 9 days PI, it may be concluded that this negative effect appears earlier in animals fed the standard diet. Loss of weight is a typical sign of intestinal trichinellosis that have been attributed to a decrease in food intake (Castro and Olson, 1967). Taking into account the body weight, our results show that the negative effect of infection was detected later in animal fed the fish oil diet. Inflammation is thought to be the major component of the immune response that results in lower and less efficient growth during some clinically important diseases. In mammals, it has been shown that in inflammatory responses, inflammatory cytokines act to decrease appetite and skeletal muscle protein retention (Klasing and Korver, 1997). A recent report showed that the decrease in food intake during enteric *T. spiralis* infection is directly linked to intestinal inflammation (Faro et al., 2000). As a result of the inclusion of fish oil in the diet, lower amounts as well as less potent mediators of inflammation are released (Billiar et al., 1988). This might explain, at least in part, that growth at 6 days PI in rats fed fish oil diet was not different from that in control animals, although other reasons may account for the loss of weight observed at 9 days PI, just when expulsion of adult worms and release of new born larvae are taking place. In chicks infected with *E. tenella*, the growth suppressive effect was notably reduced by the inclusion of fish oil in the diet (Allen et al., 1996).

In spite of the immunomodulating effect of PUFAs, few studies have examined their effect on infections and the results of these investigations are controversial. Dietary fish oil impaired the resistance of mice to infection with *S. typhimurium* (Chang et al., 1992). Survival is reduced and bacterial clearance impaired in mice fed a fish oil diet and infected with *L. monocytogenes* (Fritsche et al., 1997). However, survival of mice infected with *K. pneumoniae* and fed a fish oil enriched diet is higher than those fed a standard diet (Bjornsson et al., 1997). Our data show that the number of intestinal worms was reduced by 30.9% in rats fed the fish oil diet, compared with those given the standard diet. In intestinal trichinellosis, a temporal association between parasite loss and the local inflammatory response has long been recognized. However, recent data suggest that severe intestinal inflammation is not an essential requirement for the expression of protective immune responses to gastrointestinal parasites, including *Trichinella* (Lawrence et al., 1998). The fact that the group of animals fed the fish oil diet, rich in  $n - 3$  PUFAs, whose anti-inflammatory effect on gut is well known, showed lower number of adult worms in gut than that fed the standard diet, supports this view.

In this study, we determined the splenic production of IL4 and IFN $\gamma$  as parameters of Th1 and Th2 responses. Under our experimental conditions we found that dietary fish oil had an increasing effect on both responses. A large body of evidence from experimental studies supports the view that supplementation with  $n - 3$  PUFAs can modify a variety of cell functions and disease states although results from these studies are contradictory. Thus, although some studies have found no significant effect (Berger et al., 1993) or have even found a diminished effect on IL2 and IFN $\gamma$  production (Wander et al., 1997), other studies have shown a positive effect (Fowler et al., 1993). This disparity of results has been attributed to the quantity and the degree of fish oil protection, as well as the duration of fish oil feeding.

We found that the length of exposure to fish oil diet has an increasing effect on the IL4 response in uninfected and infected animals given the standard diet animals. However, in animal feed the fish oil diet increasing effect was only observed in uninfected animals. This effect was not observed for the IFN $\gamma$  response, for which, a opposite effect was seen in infected animals. Similar studies are not available for comparison, and so further experiments are necessary to clarify these findings.

At 6 days PI, our results show that in infected animals both Th1 and Th2 markers are present, although the IFN $\gamma$  (Th1 response) was significantly higher in the animals fed the fish oil diet. Infections with gastrointestinal nematodes elicit immune responses mediated by cytokines released from Th2 cells. In a continuous study of cytokines in the intestinal duct lymph of rats infected with *T. spiralis*, cytokines typical of Th2 type (IL4 and IL5) and a Th1 type (IFN $\gamma$ ) were detected simultaneously during the first 8 days of infection (Ramaswamy et al., 1996). More recently, similar results have been found during the early phase of intestinal infection, suggesting that in rats infected with *T. spiralis* a complex interplay between Th1 and Th2 helper subsets takes place (Stewart et al., 1999). Our results show higher levels of IL4 and IFN $\gamma$  in animals fed the fish oil diet than in those fed the standard diet, which might explain the lower number of adult worms found at 6 days PI.

Little is known about the role of Th cells and their cytokine response during the development of larvae in muscles. Recently, it has been demonstrated that, after injecting newborn larvae into muscle of mice, worms mainly elicit a Th2 response (Li and Ko, 2001). Our cytokine data also indicate that at 36 days after infection with L1 larvae, a clear Th2 response is activated in the group fed the standard diet, but that the fish oil diet reduces this response below the values obtained in the uninfected animals. If, by raising the Th2 response, larvae overcome rejection in muscle (Li and Ko, 2001) and taking into account that the Th2 response was lower in the fish oil group than that in the standard group, it may be assumed that the reduction in the number of larvae, is a consequence of the effect of the fish oil diet in reducing the number of intestinal worms, rather than a direct effect on muscular larvae. Further studies, by infecting with newborn larvae, are required to elucidate the result of a fish oil diet on the muscular phase of trichinellosis.

Under our experimental conditions neither cuticular nor somatic antibodies were altered by fish oil diet. Results from different studies on the effect of PUFAs on antibody production are discrepant. No effect on the production of antibody to bovine serum albumin and red blood cells in rats has been reported (Yoshino and Ellis, 1987; Fritsche et al., 1992), but higher antibody activity has been reported in rats fed a high fish oil content diet (Prickett et al., 1982). Differences in the level of PUFAs in the diet and the duration of feeding may explain, in part, the disparity in the results found by the different investigators.

## Acknowledgements

We are thankful to Vicente Agustín for technical assistance. This research received financial support from the grant AGL 2000-0926 (Plan Nacional, Ministerio de Ciencia y Tecnología) and grant AGR-171 (Junta de Andalucía).

## References

- AIN (American Institute of Nutrition), 1977. Report of the AIN an hoc committee on standards for nutritional studies. *J. Nutr.* 107, 1340–1348.
- Allen, P.C., Danforth, H.D., Levander, O.A., 1996. Association of lowered plasma carotenoids with protection against cecal coccidiosis by diets high in  $n - 3$  fatty acids. *Poult. Sci.* 75, 179–185.
- Berger, A., German, J.B., Chiang, B.L., Ansari, A.A., Keen, C.L., Fletcher, M.P., Gershwin, M.R., 1993. Influence of feeding unsaturated fats on growth and immune status of mice. *J. Nutr.* 123, 225–233.
- Billiar, T.R., Bankey, P.E., Svingen, B.A., Curran, R.D., West, M.A., Holman, R.T., Simmons, R.L., Cerra, F.B., 1988. Fatty acid intake and Kupffer cell function: fish oil alters eicosanoid and monokine production to endotoxin stimulation. *Surgery* 104, 343–349.
- Bjornsson, S., Hardardottir, I., Gunnarsson, E., Haraldsson, A., 1997. Dietary fish oil supplementation increases survival in mice following *Klebsiella pneumoniae* infection. *Sci. J. Infect. Dis.* 29, 491–493.
- Blair, L.S., 1983. Laboratory techniques. In: Campbell, W.C. (Ed.), *Trichinella and Trichinosis*. Plenum Press, London, pp. 563–570.
- Blok, W.L., Vogel, M.T., Curf, J.H., Eling, W.M., Buurman, W.A., Van der Meer, J.W., 1992. Dietary fish-oil supplementation in experimental Gram-negative infection and in cerebral malaria in mice. *J. Infect. Dis.* 165, 898–903.
- BOE (Boletín Oficial del Estado), 1988. Real Decreto 223/1988, de 14 de marzo, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.
- Boza, J., Pérez, L., Sanz Sampelayo, M.R., 2000. Producto y procedimiento de obtención de una grasa protegida para incluir en las dietas de los rumiantes (Product and procedures for obtaining a protect fat for inclusion in ruminant diets). Spain Patent No. 2,136,536.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Calder, P.C., Newsholme, E.A., 1992. Unsaturated fatty acids suppress interleukine-2 production and transferrin receptor expression by concanavalin A-stimulated rat lymphocytes. *Mediat. Inflamm.* 1, 107–115.
- Calder, P.C., Yacob, P., Thies, F., Wallace, F.A., Miles, E.A., 2002. Fatty acids and lymphocyte functions. *Br. J. Nutr.* 87 (Suppl. 1), 531–548.
- Castro, G.A., Olson, L.J., 1967. Relationship between body weight and food and water intake in *Trichinella spiralis* infection. *J. Parasitol.* 53, 589–594.
- Chang, H.R., Dulloo, A.G., Vladioianu, I.R., Pigué, P.F., Arsenijevic, D., Girardier, L., Pechere, J.C., 1992. Fish oil decreases natural resistance of mice infection with *Salmonella typhimurium*. *Metabolism* 41, 1–2.
- Dyerberg, J., Bang, H.O., 1979. Haemostatic function and platelet polyunsaturated fatty acids in Skimos. *Lancet* ii, 433–435.
- Dynes, R.A., Poppi, D.P., Barrel, G.K., Sykes, A.R., 1998. Elevation of feed intake in parasite-infected lambs by central administration of a cholecystokinin receptor antagonist. *Br. J. Nutr.* 79, 41–54.
- Etter, E., Hoste, H., Chartier, C., Pors, I., Koch, C., Brqua, C., Contineau, H., 2000. The effect of two levels of dietary protein on resistance and resilience of dairy goats experimentally infected with *Trichostrongylus colubriformis*: comparison between high and low producers. *Vet. Res.* 31, 247–258.
- Faro, C.J., Heidelberger, R.D., Palmer, J.M., 2000. Suppression of food intake is linked to enteric inflammation in nematode-infected rats. *Am. J. Physiol.* 278, R118–R124.
- Fickova, M., Hubert, P., Grémel, G., Leray, C., 1998. Dietary ( $n - 3$ ) and ( $n - 6$ ) polyunsaturated fatty acids rapidly modify fatty acid composition and insulin effects in rats adipocytes. *J. Nutr.* 128, 512–519.
- Forbes, J.M., 1986. Dietary factors affecting intake. In: Forbes, J.M. (Ed.), *The Voluntary Food Intake of Farm Animals*. Butterworths, London.

- Fowler, K.H., Chapkin, R.S., McMurray, D.N., 1993. Effect of purified dietary  $n - 3$  ethyl esters on murine T lymphocyte function. *J. Immunol.* 151, 5186–5197.
- Fremoux, J.M.R., Prost, E.D., Belleville, J.L., Prost, J.L., 2001. A polyunsaturated fatty acid diet lower blood pressure and improves antioxidant status in spontaneous hypertensive rats. *J. Nutr.* 131, 39–45.
- Fritsche, K.L., Nancy, A., Cassity, N.A., Huang, S.C., 1992. Dietary ( $n - 3$ ) fatty acid and vitamin E interactions in rats: effect on vitamin E status. Immune cells prostaglandine E production and primary antibody response. *J. Nutr.* 122, 1009–1018.
- Fritsche, K.L., Shahbazian, L.M., Feng, C., Berg, J.N., 1997. Dietary fish oil reduces survival and impairs bacterial clearance in C3H/He mice challenged with *Listeria monocytogenes*. *Clin. Sci.* 92, 95–101.
- Fritsche, K.L., Anderson, M., Feng, C., 2000. Consumption of eicosapentanoic acid and docosahexaenoic acid impairs murine interleukine-12 and interferon-gamma production in vivo. *J. Infect. Dis.* 182 (Suppl. 1), S54–S61.
- Gaiva, M.H.G., Couto, R.C., Oyama, L.M., Couto, G.E.C., Silveria, V.L.F., Ribeiro, E.B., Nascimento, C.M.O., 2001. Polyunsaturated fatty acid rich diets: effect on adipose tissue metabolism in rats. *Br. J. Nutr.* 86, 371–377.
- Hoskin, S.O., Wilson, P.R., Barry, T.N., Charleston, W.A.G., Waghorn, W.A.G., 2000. Effect of forage legumes containing condensed tannins on lungworm (*Dyctioacaulis* sp.) and gastrointestinal parasitism in young red deer (*Cervus elaphus*). *Res. Vet. Sci.* 68, 223–230.
- Klasing, K.C., Korver, D.R., 1997. Leucocytic cytokines regulate growth rate and composition following activation of the immune system. *J. Anim. Sci.* 75 (Suppl. 2), 58–67.
- Korver, D.R., Klasing, K.C., 1997. Dietary fish oil alters specific and inflammatory immune responses in chicks. *J. Nutr.* 127, 2039–2046.
- Kremer, J.M., 1996. Effects of modulation of inflammatory and immune parameters in patients with rheumatic and inflammatory disease receiving dietary supplementation of  $n - 3$  and  $n - 6$  fatty acids. *Lipids* 31, S243–S247.
- Lawrence, R., Sorrel, T., 1993. Eicosapentaenoic acid in cyst fibrosis: evidence of a pathogenetic role for leukotriene B<sub>4</sub>. *Lancet* 342, 465–469.
- Lawrence, C.E., Paterson, J.C.M., Higgins, L.M., MacDonald, T.T., Kennedy, M.W., Garside, P., 1998. IL-4-regulated enteropathy in an intestinal nematode infection. *Eur. J. Immun.* 28, 2672–2684.
- Lepage, G., Roy, C.C., 1986. Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. *J. Lipid Res.* 27, 114–120.
- Levander, O.A., Ager Jr., A.L., Morris, V.C., May, R.G., 1990. *Plasmodium yoelii*: comparative antimalarial activities of dietary fish oil and fish oil concentrates in vitamin E-deficient mice. *Exp. Parasitol.* 70, 323–329.
- Li, C.K.F., Ko, R.C., 2001. Inflammatory response during the muscle phase of *Trichinella spiralis* and *T. pseudospiralis* infections. *Parasitol. Res.* 87, 708–714.
- López Abán, J., Ramajo, V., Pérez Arellano, J.L., Oleaga, A., Hillyer, J.V., Muro, A., 1999. A fatty acid binding protein from *Fasciola hepatica* induced protection in C57/BL mice from challenge infection with *Schistosoma bovis*. *Vet. Parasitol.* 83, 107–121.
- Oudart, H., Groscolas, R., Calgari, C., Nibellinki, M., Leray, C., Malaan, A., 1997. Brown fat thermogenesis in rats fed high-fat diets enriched with  $n - 3$  polyunsaturated fatty acids. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disor.* 21, 955–962.
- Prickett, J.D., Robinson, D.R., Bloch, K.R., 1982. Enhanced production of IgE and IgG antibodies associated with a diet enriched in eicosapentaenoic acid. *Immunology* 46, 819–826.
- Ramaswamy, K., Negrao Correa, D., Bell, R., 1996. Local intestinal immune response to infection with *Trichinella spiralis*. Real-time continuous assay of cytokines in the intestinal (afferent) and efferent thoracic duct lymph of rats. *J. Immunol.* 156, 4328–4337.
- Rodríguez Osorio, M., Gómez Morales, M.A., Gómez García, V., López Cortés, L., Cuello Contreras, J.A., Pachón Díaz, J., 1987. Estudio de un amplio brote de triquinosis humana mediante las técnicas de inmunofluorescencia indirecta y ELISA. *Rev. Iber. Parasitol.* 47, 282–287.
- Sadun, E.H., Andersson, R.K., Williams, J.S., 1962. Fluorescent antibody test for the serological diagnosis of trichinosis. *Exp. Parasitol.* 12, 423–433.
- Stewart, G.L., Na, H., Smart, L., Seeling Jr., L.L., 1999. The temporal relationship among anti-parasite immune elements expressed during the early phase of infection of the rat with *Trichinella spiralis*. *Parasitol. Res.* 85, 672–677.
- Su, W., Jones, P.M.H., 1993. Dietary fatty acid composition influences energy accretion in rats. *J. Nutr.* 123, 2109–2114.

- Takeda, G.K.F., Starobinas, N., Marcondes, M.C.G., Mello, E.A.G., Russo, M., Stolf, A.M.S., 1995. Oral administration of fish-oil induces high levels of seric TNF in *Trypanosoma cruzi* infected C57BL/6 mice. *Acta Trop.* 60, 215–219.
- Taylor, D.W., Levander, O.A., Krishna, V.R., Morris, V.C., Barta, J.R., 1997. Vitamin E-deficient diets enriched with fish oil suppress lethal *Plasmodium yoelii* infections in athymic and scid/bg mice. *Infect. Immun.* 65, 197–202.
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J., 1979. Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4350–4354.
- Wander, R.C., Hall, J.A., Gradin, J.L., Du, S.H., Jewell, D.E., 1997. The ratio of dietary ( $n - 6$ ) to ( $n - 3$ ) fatty acids influences immune system function, eicosanoid metabolism, lipid peroxidation and vitamin E status in aged dogs. *J. Nutr.* 127, 1198–1205.
- Yoshino, S., Ellis, E.F., 1987. Effect of a fish oil-supplemented diet on inflammation and immunological processes in rats. *Int. Arch. Allerg. Appl. Immunol.* 84, 233–240.
- Zeng, S., Lawton, D.E.B., Przemec, S.M.C., Sincock, D.C., Simpson, H.V., 2001. Reduced *Ostertagia circumcincta* burdens in milk-fed lamb. *NZ Vet. J.* 49, 2–7.



## Thermogenesis Associated to the Intake of a Diet Non-Supplemented or Supplemented with n–3 Polyunsaturated Fatty Acid-Rich Fat, Determined in Rats Receiving the Same Quantity of Metabolizable Energy

M.R. Sanz Sampelayo J.R. Fernández Navarro R. Hermoso  
F. Gil Extremera M. Rodríguez Osorio

Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Estación Experimental del Zaidín, Unidad de Nutrición Animal,  
Granada, Spain

### Key Words

n–3 PUFA-rich fat · Supplemented diets ·  
Non-supplemented diets · Energy balance · Protein  
balance · Thermogenesis

### Abstract

The beneficial effects of n–3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) are well known, but their consumption in western countries is chronically insufficient, and so it is recommended that diets should be supplemented with a fat rich in these fatty acids. However, the effect of such diets on the energy expenditure remains a controversial question. Precise data concerning the effect of using under the same metabolizable energy intake, a diet non-supplemented or supplemented with a fat rich in n–3 PUFA are not available. This type of information was obtained using rats at weaning fed a diet supplemented or non-supplemented with 10% of fish oil. Between the 30th and 60th day after starting the experiment, the energy and protein balance was established by means of the comparative slaughter method. The blood levels of different metabolites were also determined. Although total thermogenesis did not vary between the two groups, consumption of the fish oil diet led to a lower level of thermogenesis associated with the oxidation of protein, and

a higher one of that associated with the oxidation of fat. We conclude that the thermic effect of feeding is a combination of independent processes. Due to their specific metabolism, n–3 PUFA may be considered essential compounds to maintain the energy balance.

Copyright © 2006 S. Karger AG, Basel

### Introduction

In order to reduce the incidence of cardiovascular disease, various types of cancer, obesity and diabetes, it has been recommended that the proportion of dietary fat should be no more than 30% of its energy content [1]. However, as reported by Astrup et al. [2], not all fats, but only the most saturated ones, together with *trans*-fatty acids, have been found to be atherogenic, contributing to the development of cardiovascular disease. Mono- and polyunsaturated fats, on the other hand, are considered more neutral or even beneficial in this respect. In recent years, therefore, there has been increasing interest in the function of n–3 series long-chain polyunsaturated fatty acids (PUFA). These latter are essential for different metabolic functions and although only small quantities are required [3–5], the human organism has difficulty in forming them from simpler precursors. Newborns and

### KARGER

Fax +41 61 306 12 34  
E-Mail karger@karger.ch  
www.karger.com

© 2006 S. Karger AG, Basel  
0250-6807/06/0503-0184\$23.50/0

Accessible online at:  
www.karger.com/ann

M.R. Sanz Sampelayo  
Consejo Superior de Investigaciones Científicas  
Estación Experimental del Zaidín, Unidad de Nutrición Animal  
C/ Profesor Albareda 1, ES-18008 Granada (Spain)  
Tel. +34 958 572757, Fax +34 958 572753, E-Mail rsanz@eez.csic.es

adults predisposed to the development of cardiovascular disease are the groups most vulnerable to the deficiency of such fatty acids [6–8].

As a result of changes in eating habits, the diet consumed in most western countries currently provides only small quantities of n–3 long-chain PUFA, and consequently there is believed to exist a chronic nutritional shortfall of these fatty acids. For these reasons, and to prevent the development of cardiovascular disease, it is recommended that the diet should be supplemented with a fat that is rich in the above-described type of fatty acids [7, 9, 10]. According to this it would be useful to analyze the utilization at the metabolic level of this kind of diet, one that in principle is rich in fat. However, the effect such diets on the energy expenditure is still a controversial question. Today, thermogenesis processes are known to play a fundamental role in regulating the energy balance, although their origin remains an open question. One of the most controversial aspects of this issue is the possibility that facultative thermogenesis may be induced by the diet consumed. In this sense, different studies have shown that heat loss may be greater when a fat-rich diet is consumed, with PUFA contained in this fat playing a crucial role [11, 12].

In order to determine the effect of the fatty acid composition of the diet on certain aspects of animal metabolism, and especially on the energy expenditure, various studies have been carried out involving the use of fat-rich diets differentiated by their fatty acid composition and generally administered under ad libitum conditions [7, 9, 13–17]; however, the results obtained are often contradictory, depending on the particular experimental model and on the procedure applied. With respect to the possible effect, not of the type of fat included in the diet but of its supplementation with a fat of a particular composition, only limited results have been reported in some of the above-mentioned studies, i.e., those in which together with fat-rich diets a low-fat diet was also tested to be used as a control [13, 17]. In these cases, the results obtained were effected by the different intake achieved with the different diets, an aspect that has even been commented upon by some of the authors [17].

So, data comparing the effects of using a diet non-supplemented or supplemented with a fat rich in long chain n–3 PUFA, which were provided at the same intake of metabolizable energy, are not available. Therefore, in the present study the energy expenditure induced by a diet supplemented with a fat rich in long-chain n–3 PUFA, in this case fish oil, versus that induced by a standard low-fat diet was analyzed. The results presented re-

fer to rats, given one or other of the two types of diet, which were provided at the same level of metabolizable energy intake. Thus, the differences observed would be solely due to the different composition of the nutrients in the diets [2]. As the metabolizable energy content of the diets was known from previous assays, the energy intake of the animals was limited to that consumed voluntarily by those given the non-supplemented diet, the lower of the two diets [18]. Together with the determination of total thermogenesis produced, the substrates associated to total thermogenesis were also identified. The animal's growth and body composition was also evaluated as was the serum concentrations of a series of relevant biochemical parameters related to the metabolism of both lipids and protein.

## Materials and Methods

### *Animals, Diets and Procedure*

The study was carried out with four groups of 10 weaned, male Wistar rats (Harlan Interfauna Ibérica), with an initial weight of  $40 \pm 1$  g, presenting no pathogens and kept in individual metabolism cages, within an ecologic chamber maintained under controlled conditions (21–24°C, 50–60% relative humidity, diurnal light cycle of 12 h). On arrival the animals were fed a diet containing 0% (standard diet) or 10% by weight fish oil (fish oil diet). As earlier studies have determined the metabolizable energy content of each diet [18], all the animals received the same intake of metabolizable energy, irrespective of the type of diet supplied, namely  $720 \text{ kJ/kg}^{0.75} \cdot \text{day}$ . The fish oil was derived from tunny, salmon, mackerel and related species, supplied by Harinas de Andalucía, Tarifa, Spain. Oxidation of the fish oil was prevented by the addition of antioxidants, 0.015 and 0.2% of vitamin E,  $\alpha$ -tocopherol (Ephynal; Roche, Basel, Switzerland) and butylated hydroxytoluene (Panreac, Barcelona, Spain), respectively [19]. The composition of the standard diet was based on the AIN-77 diet for rats [20] and was provided by Harlan Interfauna Iberica, Barcelona, Spain. The fish oil diet was prepared each week, using 9 parts of the standard diet and 1 of natural oil, stored in a freezer at  $-20^\circ\text{C}$ . Each diet was made available to the rats throughout the day. The live weight of the animals and the food intake in each case was evaluated twice weekly. The chemical composition of the two experimental diets, as well as the fatty acid profile of the fat in each diet and of the fish oil used, are shown in tables 1 and 2, respectively.

Thirty days after starting the experiment, all the animals belonging to one of the groups given the standard and one of the groups given the supplemented diet were anesthetized by intraperitoneal injection of sodium pentobarbital (Pentothal; Abbot, Madrid, Spain) and killed. Then, both the stomach and the intestines of each animal were emptied and cleaned, and the bodies stored at  $-20^\circ\text{C}$  until required for analysis. The other two groups of animals were held under the described experimental conditions until 60 days after starting the experiment; during the 6 days in the middle of this period, a balance assay was performed, during which, in addition to the daily measurement of food intake, quantitative tests of

**Table 1.** Chemical composition of experimental diets (g/kg DM) given to rats

|                       | Diet     |          |
|-----------------------|----------|----------|
|                       | standard | fish oil |
| Dry matter            | 878.3    | 859.0    |
| Organic matter        | 935.9    | 946.2    |
| Crude protein         | 191.3    | 176.4    |
| Fat                   | 34.3     | 139.0    |
| Gross energy, kJ/g DM | 18.20    | 20.16    |

**Table 2.** Fatty acid composition (g/100 g fatty acids), of fish oil and dietary fats given to rats

|                    | Fish oil | Standard diet fat | Fish oil diet fat |
|--------------------|----------|-------------------|-------------------|
| C14:0              | 4.95     | 0.46              | 3.89              |
| C14:1              | 0.46     | 1.02              | 0.64              |
| C16:0              | 16.28    | 17.85             | 16.65             |
| C16:1              | 6.22     | 0.79              | 4.94              |
| C18:0              | 3.60     | 3.97              | 3.68              |
| C18:1 n-9          | 20.10    | 24.62             | 21.16             |
| C18:1 <i>trans</i> | 3.29     | 1.14              | 2.78              |
| C18:2 n-6          | 3.56     | 46.90             | 13.78             |
| C18:3 n-3          | 1.82     | 3.25              | 2.16              |
| C20:1              | 5.76     |                   | 4.40              |
| C22:0              | 6.58     |                   | 5.02              |
| C20:4 n-6          | 0.59     |                   | 0.45              |
| C20:5 n-3          | 8.65     |                   | 6.60              |
| C22:5 n-3          | 2.86     |                   | 2.19              |
| C22:6 n-3          | 15.28    |                   | 11.67             |
| SFA                | 31.41    | 22.28             | 29.24             |
| MUFA               | 35.83    | 27.57             | 33.92             |
| n-6 PUFA           | 4.15     | 46.90             | 14.43             |
| n-3 PUFA           | 28.61    | 14.43             | 22.62             |

SFA = Saturated fatty acids; MUFA = monounsaturated fatty acids; PUFA = polyunsaturated fatty acids.

feces and urine were made and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until needed for analysis. On the final day of the balance assay, blood samples were taken from the orbital sinus of each animal at 09:00 h. The blood was allowed to clot and centrifuged at 1,500 g for 10 min; the serum was then removed and stored at  $-30^{\circ}\text{C}$  until required for analysis. Subsequently, and as described for the procedure at 30 days after starting the experiment, at 60 days these two groups of animals were killed and their bodies stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until needed for analysis. All management and experimental procedures conducted in this study were done in strict accordance with the requirements of the European Union and Spanish rules and guidelines regarding the ethical treatment of laboratory animals [21].

#### Measurements and Analyses

Samples of the diets, feces and urine were analyzed to determine the dry matter (DM), nitrogen (N) and energy contents. The fat and ash content of the diets and the fatty acid profile of the fish oil, of the fat for both diets and of the body mass were also evaluated.

While still frozen, the animal bodies were minced in a Retsch ZM1 mill (Retsch, Haan, Germany), using liquid nitrogen and a 1-mm matrix size. After mincing, samples were analyzed for DM, N, energy content and the fatty acid profile of the fat. The energy retained and the weight of protein deposited were measured by the comparative slaughter method, i.e., body composition of animals killed at 30 and at 60 days after starting the experiment. Energy retained as protein was calculated by multiplying the weight of protein by 23.8 (kJ/g protein) [22, 23]. Heat production was calculated as the difference between metabolizable energy intake and total energy retained. As the latter is primarily protein and fat, the energy retained as fat was calculated as the difference between total energy retained and that retained as protein. The weight of the fat deposited was calculated by dividing the energy retained as fat by 39.8 (kJ/g fat) [22, 23]. Values for each individual animal were calculated from its mean body weight over the experimental period, between days 30 and 60 after starting the experiment. Finally, heat production from protein was calculated as the difference between the corresponding metabolizable energy intake and energy retention. In the same way, heat production from fat was calculated with the assumption that fat deposition was entirely of dietary origin [2].

DM and N contents were determined using fresh samples and all other analyses were carried out using dry samples. The DM of the diets was calculated by heating on a stove at  $100 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , and that of the feces, urine and body mass by lyophilization. The ash content was determined by incineration in an electric oven at  $550^{\circ}\text{C}$  [24]. The N content was determined using Kjeldahl's method [24]. The fat content of the diets was determined after hydrochloric hydrolysis by extraction with petroleum ether (boiling point  $40-60^{\circ}\text{C}$ ) [25]. The energy content of the samples was determined by adiabatic bomb calorimetry. To determine the fatty acid composition of the fish oil, diets and body mass, the fatty acid methyl esters were separated on an autosystem gas chromatograph (Perkin-Elmer Corp., Norwalk, Conn., USA) with an SP-2560 fused silica capillary column (100 m  $\times$  0.25 mm (i.d.), 0.20  $\mu\text{m}$  film; Supelco, Bellefonte, Pa., USA) fitted with a flame ionization detector. The temperature was programmed from 150 to  $185^{\circ}\text{C}$  at  $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$  held for 30 min and then to  $230^{\circ}\text{C}$  at  $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$  held for 26 min. The carrier gas was  $\text{N}_2$ . Injector and detector temperatures were 250 and  $300^{\circ}\text{C}$ , respectively [26]. Serum glucose, cholesterol, high-density lipoprotein-cholesterol, triglycerides, non-esterified fatty acids (NEFA), urea, uric acid and creatinine were determined spectrophotometrically using commercial kits (Randox GL 2623, CH 200, CH 203, TR 210, FA 115, UR 107, UA 1613 and CR 2336, respectively).

#### Statistical Analysis

A completely randomized design procedure was used in the analysis of variance, using the least-squares method [27]. Statistical analyses were performed using the Statgraphics package [28]. The model accounts for variations caused by the type of diet. The tables describe the mean values, standard error deviations (square root of the residual mean square) and the level of significance of the effects.

**Table 3.** Effects of diet on body weight (BW) and BW composition at the start (initial values) and finish (final values) of the balance period (30 and 60 days from the start of the experiment (mean values for 8 rats)

|                      | Diet     |          | RSD   | Level of significance |
|----------------------|----------|----------|-------|-----------------------|
|                      | standard | fish oil |       |                       |
| Initial values BW, g | 195      | 198      | 10.39 | NS                    |
| Composition          |          |          |       |                       |
| Dry matter, % BW     | 28.86    | 30.21    | 1.26  | NS                    |
| Protein, % BW        | 17.22    | 17.31    | 0.74  | NS                    |
| Fat, % BW            | 10.11    | 10.89    | 1.41  | NS                    |
| Ash, % BW            | 2.66     | 2.55     | 0.26  | NS                    |
| Energy, kJ/g BW      | 7.49     | 7.74     | 0.52  | NS                    |
| Final body weight, g | 295      | 306      | 15.50 | NS                    |
| Composition          |          |          |       |                       |
| Dry matter, % BW     | 34.46    | 36.77    | 1.67  | *                     |
| Protein, % BW        | 20.35    | 20.46    | 0.97  | NS                    |
| Fat, % BW            | 11.57    | 13.53    | 1.70  | *                     |
| Ash, % BW            | 3.20     | 2.94     | 0.32  | NS                    |
| Energy, kJ/g BW      | 8.91     | 9.65     | 0.53  | *                     |

RSD = Residual standard deviation; NS = not significant; \* p < 0.05.

## Results

### *Live Weight Attained and Its Composition*

Table 3 presents the results obtained for live weights and compositions, for the animals given each type of diet; the values correspond to the start and finish of the period of energy and protein balance, i.e. at 30 and 60 days from the start of the experiment. The values for the live weight and its composition do not present significant differences ( $p > 0.05$ ) at the earlier of these two age points. By the second one, however, while no differences were detected between the two experimental groups concerning live weights or protein content ( $p > 0.05$ ), different values were found ( $p < 0.05$ ) with respect to DM, fat and energy content of the live weight. The latter values were higher among the animals given the diet supplemented with fish oil.

### *Fatty Acid Profile of the Body Fat*

Table 4 describes the fatty acid profile of the body fat corresponding to the animals fed the two types of diet, and killed at one or other of the stated times during the experiment. All the values shown are statistically different ( $p < 0.05$ ) for the earlier age. On the contrary, by the second age point, no differences were found ( $p > 0.05$ ) between the values for C18:1 n-9 and *trans* C18:1, or for the total quantity of saturated and monounsaturated fatty acids, according to the type of diet consumed. The differences observed for each fatty acid meant that for the

case of the body fat of the animals given the diet supplemented with fish oil, at the earlier age the concentrations of saturated and n-3 PUFA were higher than among the non-supplemented group, while the opposite was the case for the concentrations of monounsaturated, n-6 PUFA and n-6/n-3 PUFA. With respect to these same values, and for the same class of animals, by the second age point, the concentrations of saturated and monounsaturated fatty acids did not differ, while the other differences stated above, concerning the first age point, remained unchanged.

### *Energy Balance*

Table 5 shows the results obtained concerning the effect of the type of diet on the intake of metabolizable energy, and other data relating to the energy balance. Just as it was programmed, no differences were found ( $p > 0.05$ ) for metabolizable energy intake with respect to the type of diet consumed. The same was deduced for the energy retained as protein or for total loss of heat. On the contrary, total energy retained, energy retained as fat, the gross efficiency of the utilization of energy intake for its retention, the efficiency of the utilization of protein intake for its retention and the heat loss associated with the oxidation of protein or of fat did present differences ( $p < 0.05$ ) according to the type of diet consumed, such that, except for the case of heat loss associated with protein oxidation, the values corresponding to consumption of the supplemented diet were higher than for the non-supplemented group.

**Table 4.** Effects of diet on fatty acid composition (g/100 g fatty acids) of corporeal lipids at the start (initial values) and finish (final values) of the balance period (30 and 60 days from the start of the experiment) (mean values for 8 rats)

|                       | Diet     |          | RSD  | Level of significance |
|-----------------------|----------|----------|------|-----------------------|
|                       | standard | fish oil |      |                       |
| <b>Initial values</b> |          |          |      |                       |
| C14:0                 | 3.17     | 6.62     | 0.37 | ***                   |
| C14:1                 | 0.17     | 0.66     | 0.09 | ***                   |
| C16:0                 | 43.59    | 51.04    | 1.94 | ***                   |
| C16:1                 | 7.91     | 5.02     | 0.40 | ***                   |
| C18:0                 | 7.80     | 9.29     | 0.67 | *                     |
| C18:1 n-9             | 28.53    | 19.75    | 1.32 | ***                   |
| C18:1 <i>trans</i>    | 3.42     | 2.36     | 0.42 | **                    |
| C18:2 n-6             | 4.32     | 0.90     | 1.02 | ***                   |
| C18:3 n-3             | 0.15     | 0.71     | 0.13 | ***                   |
| C20:0                 | 0.23     | 0.51     | 0.05 | ***                   |
| C20:1                 | 0.20     | 1.63     | 0.16 | ***                   |
| C20:4 n-6             | 0.42     | 1.01     | 0.21 | **                    |
| C20:5 n-3             | 0.00     | 0.18     | 0.05 | ***                   |
| C22:6 n-3             | 0.09     | 0.34     | 0.12 | *                     |
| SFA                   | 54.78    | 67.45    | 2.36 | ***                   |
| MUFA                  | 40.23    | 29.41    | 1.66 | ***                   |
| n-6 PUFA              | 4.74     | 1.91     | 1.03 | **                    |
| n-3 PUFA              | 0.25     | 1.23     | 0.23 | ***                   |
| n-6/n-3 PUFA          | 19.11    | 1.56     | 3.74 | ***                   |
| <b>Final values</b>   |          |          |      |                       |
| C14:0                 | 2.89     | 6.14     | 0.61 | ***                   |
| C14:1                 | 0.30     | 0.87     | 0.12 | ***                   |
| C16:0                 | 46.85    | 43.21    | 3.25 | *                     |
| C16:1                 | 6.63     | 5.26     | 0.71 | **                    |
| C18:0                 | 7.59     | 9.51     | 5.05 | *                     |
| C18:1 n-9             | 25.72    | 25.32    | 2.25 | NS                    |
| C18:1 <i>trans</i>    | 3.37     | 3.37     | 0.42 | NS                    |
| C18:2 n-6             | 5.40     | 1.77     | 0.86 | ***                   |
| C18:3 n-3             | 0.20     | 0.77     | 0.12 | ***                   |
| C20:0                 | 0.27     | 0.53     | 0.16 | **                    |
| C20:1                 | 0.20     | 1.96     | 0.22 | ***                   |
| C20:4 n-6             | 0.47     | 0.84     | 0.21 | **                    |
| C20:5 n-3             | 0.00     | 0.11     | 0.02 | ***                   |
| C22:6 n-3             | 0.13     | 0.34     | 0.05 | ***                   |
| SFA                   | 57.60    | 59.39    | 3.43 | NS                    |
| MUFA                  | 36.20    | 36.78    | 2.86 | NS                    |
| n-6 PUFA              | 5.87     | 2.61     | 0.94 | ***                   |
| n-3 PUFA              | 0.33     | 1.22     | 0.12 | ***                   |
| n-6/n-3 PUFA          | 17.65    | 2.13     | 1.90 | ***                   |

SFA = Saturated fatty acids; MUFA = monounsaturated fatty acids; PUFA = polyunsaturated fatty acids; RSD = residual standard deviation; NS = not significant; \* p < 0.05; \*\* p < 0.01; \*\*\* p < 0.001.

*Concentrations in Serum of Glucose, Total Cholesterol, High-Density Lipoprotein-Cholesterol, Triglycerides, NEFA, Urea, Uric Acid and Creatinine*

Table 6 gives the values of the above biochemical parameters, classified according to the type of diet consumed. The values corresponding to the concentrations of total cholesterol, high-density lipoprotein-cholesterol and triglycerides were lower (p < 0.05) among the group given the diet supplemented with fish oil; on the contrary, the values among this group were higher (p < 0.05) with respect to the concentration of NEFA. As regards the values for the concentration of glucose, urea, uric acid and creatinine, no differences were found to arise (p > 0.05) from the type of diet consumed.

**Discussion**

*Live Weight and Body Composition at 30 and 60 Days after Starting the Experiments*

In terms of variables that are regulated at a homeostatic level, the body weight is a more suitable parameter than is the quantity of body fat, which varies more depending on dietary composition and on its energy density, even for the same level of energy intake [29]. At the same time, and concerning the changes in body composition that may be provoked by the consumption of diets varying in the profile of their fatty acids, various studies have been carried out to determine the minimum period during which such diets should be supplied for differences to become noticeable. Sherrington et al. [30] reported that, with respect to the greater or lesser development that may be attained by adipose tissue, this effect does not seem to become apparent in less than 4 weeks' consumption of the corresponding diet. The values obtained in the present study, for live weights and for their fat content, coincide with the above-cited results. As regards the protein content of the live weight, we found that the quantity and the nature of the fat utilized for the dietary supplement meant that, although the supplemented diet had a somewhat lower concentration of protein than did the standard diet, the proportion of protein in the live weight attained at each of the age points did not vary between the two groups of animals. Polyunsaturated fat oxidizes at a higher level than does saturated fat, thus producing energy that is employed in different metabolic processes, including the synthesis of protein, a process which thereby becomes more efficient [16, 31, 32].

**Table 5.** Effects of diet on metabolizable energy intake and energy balance data (mean values for 8 rats)

|                                   | Diet     |          | RSD   | Level of significance |
|-----------------------------------|----------|----------|-------|-----------------------|
|                                   | standard | fish oil |       |                       |
| MEI, kJ/kg W <sup>0.75</sup> ·day | 717      | 723      | 28.30 | NS                    |
| ER, kJ/kg W <sup>0.75</sup> ·day  | 115.5    | 137.8    | 17.29 | *                     |
| ERp, kJ/kg W <sup>0.75</sup> ·day | 60.5     | 63.7     | 8.18  | NS                    |
| ERf, kJ/kg W <sup>0.75</sup> ·day | 55.0     | 74.1     | 13.42 | *                     |
| ER/MEI, %                         | 16.1     | 19.1     | 2.32  | *                     |
| PR/PI, %                          | 22.2     | 29.2     | 2.95  | ***                   |
| HP, kJ/kg W <sup>0.75</sup> ·day  | 601      | 585      | 29.74 | NS                    |
| HPp, % HP                         | 16.2     | 11.0     | 1.89  | ***                   |
| HPf, % HP                         | 1.2      | 27.9     | 1.51  | ***                   |

MEI = Metabolizable energy intake; ER = total energy retained; ERp = energy retained as protein; ERf = energy retained as fat; PR = protein retained; PI = protein intake; HP = total heat production; HPp = heat production from protein; HPf = heat production from fat; RSD = residual standard deviation; NS = not significant; \* p < 0.05; \*\*\* p < 0.001.

**Table 6.** Effects of diet on serum concentrations of glucose, cholesterol, high-density lipoprotein-cholesterol (HDL cholesterol), triglycerides, non-esterified fatty acids (NEFA), urea, uric acid and creatinine (mmol/l) (mean values for 8 rats)

|                 | Diet     |          | RSD  | Level of significance |
|-----------------|----------|----------|------|-----------------------|
|                 | standard | fish oil |      |                       |
| Glucose         | 5.66     | 5.94     | 0.98 | NS                    |
| Cholesterol     | 1.86     | 1.40     | 0.16 | ***                   |
| HDL cholesterol | 1.66     | 1.29     | 0.20 | **                    |
| Triglycerides   | 1.13     | 0.66     | 0.29 | **                    |
| NEFA            | 0.65     | 1.16     | 0.27 | ***                   |
| Urea            | 7.12     | 7.40     | 0.54 | NS                    |
| Uric acid       | 4.75     | 4.60     | 2.40 | NS                    |
| Creatinine      | 0.79     | 0.86     | 0.37 | NS                    |

RSD = Residual standard deviation; NS = not significant; \*\* p < 0.01; \*\*\* p < 0.001.

Turning now to the fatty acid profile of the fat deposited in the body, we first note that differences in this respect, according to the type of diet consumed, were already evident at the first age point. Fickova et al. [33] found that 1 week seems sufficient for changes to become apparent in lipid composition and in certain metabolic responses related to the composition of the dietary fat. Moreover, in the case of the diet supplemented with fish oil, there was a preferential incorporation of n-3PUFA vs. n-6PUFA into the body, an effect that seemed to be

due to the fact that deposits of the former, which are more abundant in this oil, interfere with the synthesis of the latter [34].

#### Energy and Protein Balance

It is now well established that dietary composition and/or energy density affects fat deposits; thus, even when the total intake remains unchanged, fat deposits are higher when the diet consumed contains a greater proportion of fat [29]. In our case and due to the higher level of fat, the diet supplemented with fish oil produced a higher retention of energy, which is associated with a greater quantity of fat deposited. The level of fat in the diet supplemented with fish oil was 4.05 times as high as that in the non-supplemented one. However, the retention rate of fat for the animals fed with the supplemented diet was only 1.35 times as high as that for the animals fed with the non-supplemented one. Similarly, there was an increase in the gross efficiency of the utilization of the energy intake for retention. Moreover, it was concluded that total thermogenesis (total heat loss) did not vary between the two diet types. Today, thermogenesis processes are known to play a fundamental role in regulating the energy balance, although their origin remains an open question. One of the most controversial aspects of this issue is the possibility that facultative thermogenesis may be induced by the diet consumed. Various studies have suggested that a greater heat loss may occur when a carbohydrate-rich rather than a fat-rich diet is provided [36, 37]. The fact that dietary fat is deposited in the adipose tissue more efficiently than if the neces-

sary energy is derived from carbohydrates is cited as one of the possible causes of this difference in thermogenesis; moreover, this is one of the reasons why high-fat diets seem to be directly related to the development of obesity [38]. However, as reported by Müller and Kirchgessner [11], a series of studies have shown that heat loss may be greater when a fat-rich diet is consumed, with the PUFA contained in this fat playing a crucial role. These authors [11] believe the utilization of the energy contained in these fatty acids must take place within the obligatory ATP concept of thermogenesis. In accordance with this view, Clarke [12] put forward the hypothesis that PUFA may be oxidized at the level of the cellular peroxisome rather than in the mitochondria. Thus, each acetyl-CoA would yield two ATPs rather than three. This aspect of the metabolism of PUFA, and especially of the n-3 series, today seems to be well established. To see how the thermogenesis provoked by consuming a certain diet may vary depending on its composition, let us assume a situation in which a carbohydrate-rich diet is compared with one rich in saturated fat. In such a situation, according to currently available knowledge, the former diet will produce a higher degree of thermogenesis [36–38]. What would happen if the composition of the fat-rich diet were gradually changed, with the saturated fat being replaced by a polyunsaturated one? Again, according to currently available knowledge [12–16, 39], the thermogenesis associated with consumption of this new diet would increase, and, depending on the level and composition of the fat, might not only equal that of the carbohydrate-rich diet but perhaps even surpass it. All intermediate situations, in principle, are possible, with no contradiction existing between the final results obtained.

From the above conclusions, and as we know the source of fuel for energy metabolism can be greatly altered by diet, we believed it would be of interest to analyze the origin of the thermogenesis, according to the type of diet consumed. After having calculated the heat loss associated with oxidation of the protein, we observed this loss to be considerably reduced when the diet supplemented with fish oil was consumed. Concerning the fat content, and after estimating its oxidation taking into account only total fat intake, excretion and net accumulation, we calculated an oxidation rate that was notably higher for the diet supplemented with fish oil. With respect to this last, it is well known that the level of oxidized fat increases with the level of polyunsaturated fat in the diet [16, 31, 32]. PUFA, especially the n-3 series, generate energy at a greater rate than do saturated fatty acids, and this energy is used in

various metabolic processes, including the synthesis of protein [12, 17, 33]. Our results concerning the rates of protein and fat oxidation, together with those for the efficiency of the utilization of protein intake for its retention, concur absolutely with the conclusions cited above.

We see thus that the thermic effect of feeding results from the combination of separate processes. We believe, in agreement with Müller and Kirchgessner [11], that by identifying the effect exercised by certain subclasses of the main nutrients, it is possible to modulate the metabolism of energy with n-3 PUFA considered, in this respect essential compounds to maintain the energy balance.

*Blood Levels of Glucose, Total Cholesterol, High-Density Lipoprotein-Cholesterol, Triglycerides, NEFA, Urea, Uric Acid and Creatinine*

Muratta et al. [40] and Mattos et al. [41] reported that feeding fish oil reduced blood concentrations of glucose due to the inhibition of gluconeogenic enzymes. In the present study, no differences were recorded between blood levels of glucose, between the different types of diet consumed. This fact is taken to be related to the level and composition of the fat used in the diet supplement. Takahashi and Ide [17] provided fat-rich diets of varying composition to experimental rats, and obtained lower levels of blood glucose when a fish oil diet was consumed. However, when they compared the blood levels of the same metabolite for the fat-rich diet supplemented with fish oil versus the blood glucose levels achieved with a standard low-fat diet, similar values were recorded.

Nowadays, a large body of evidence suggests that dietary fatty acids are capable of modifying the composition of plasma lipids, and thus play an essential role in the prevention and treatment of cardiovascular disease [7, 9]. Very long-chain PUFA are considered strong inhibitors of the synthesis of triglycerides in the liver, and of their secretion [9, 42]. In addition to the triglycerides, other values that are modified by the type of fat included in the diet are those of total cholesterol and of HDL and LDL cholesterol. The values obtained in the present study coincide with the above-cited results. In our case the levels of LDL cholesterol were not determined. However, we can estimate these as the difference between the levels of total cholesterol and those of HDL cholesterol. According to Frenoux et al. [7], these results support the hypothesis that n-3 PUFA are effective nutrients as regards the prevention of hypertension and cardiovascular diseases such as atherosclerosis, which is indicative of the need to carry out further investigations into the mechanisms involved in such effects.

It has long been established that the blood levels of NEFA are related in linear fashion to their rate of oxidation, a process that does not seem to constitute any limitation as regards their concentration [43]. In the blood, fatty acids are precursors of certain essential molecules, including prostaglandins, leukotrienes and thromboxanes [44], while PUFA have been found to be the compounds from which these molecules originate [35, 45]. Taking these comments into account regarding the present study, the higher level of fat presented by the diet supplemented with fish oil, and the characteristics of this fat, with respect to the standard diet, are the factors responsible for the results obtained. Indeed, as remarked above, n-3 PUFA oxidate at a higher rate than saturated fatty acids [16, 31, 32], and produce the essential molecules indicated by Lafontan and Langin [44]. The higher levels of NEFA measured with the supplemented diet in principle would be the result of their relatively high rate of oxidation. This is not necessarily indicative of greater lipolysis but, rather, of a lower rate of lipogenesis. Today, it is known that n-3 PUFA suppress hepatic lipogenesis [9, 46], which would coincide with the fact that the blood level of triglycerides was lower for the animals given the supplemented diet.

With respect to the measured blood levels of urea, uric acid and creatinine, the better utilization made of dietary

protein achieved with the supplemented diet led us to believe these levels would be lower than with the standard diet, but this was not the case. Lu et al. [47] showed that a high-fat diet normally produces blood levels of urea and creatinine that are higher than those achieved with a low-fat diet. However, when comparing the concentrations of these metabolites, using a low-fat diet versus another with a high proportion of fish oil, the same authors found no difference between the levels of urea and creatinine.

### Conclusions

Under the same metabolizable energy intake, the thermogenesis associated with the consumption of a diet supplemented with a fat rich in n-3 PUFA will depend both on the level of the fat and on its particular composition. Due to their specific metabolism, n-3 PUFA may be considered essential compounds to maintain the energy balance.

### Acknowledgement

This study was supported financially by the Interministerial Commission of Science and Technology, Spain (Project AGL2000-0926).

### References

- National Institutes of Health: The Practical Guide: Identification, Evaluation and Treatment of Overweight and Obesity in Adults. NIH Publ 2000, No 00-4084. Bethesda, NIH, 2000.
- Astrup A, Buemann B, Flint A, Raben A: Low-fat diets and energy balance. How does the evidence stand in 2002? *Proc Nutr Soc* 2002;61: 299-309.
- Barlow SM, Young VK, Duthie IF: Nutritional recommendations for n-3 polyunsaturated fatty acids and the challenge to the food industry. *Proc Nutr Soc* 1990;49:13-21.
- Franklin ST, Martin KR, Baer RJ, Schingoethe DJ, Hippen AR: Dietary marine algae (*Schizochytrium* sp.) increases concentrations of conjugated linoleic, docosahexaenoic and trans-vaccenic acids in milk of dairy cows. *J Nutr* 1999;129:2048-2052.
- Simopoulos AP, Leaf A, Salem N Jr: Workshop on the essentiality of and recommended dietary intakes for  $\omega$ -6 and  $\omega$ -3 fatty acids. *J Am Coll Nutr* 1999;18:487-489.
- Uauy R, Valenzuela A: Marine oils: the health benefits of n-3 fatty acids. *Nutr Rev* 1996;54: 5102-5108.
- Frenoux JM, Prost ED, Belleville JL, Prost JL: A polyunsaturated fatty acid diet lowers blood pressure and improves antioxidant status in spontaneously hypertensive rats. *J Nutr* 2001; 131:39-45.
- Nordoy A, Marchioli R, Arnesen H, Videbaek J: n-3 polyunsaturated fatty acids and cardiovascular health. *Lipids* 2001;36(suppl):S127-S129.
- De Schrijver R, Vermeulen D, Viaene E: Lipid metabolism responses in rats fed beef tallow, native or randomized fish oil and native or randomized peanut oil. *J Nutr* 1991;121:948-955.
- Valenzuela A, Sanhueza J, Garrido A: Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga n-3: cuando y por qué es necesaria la suplementación con estos ácidos grasos (Long chain n-3 polyunsaturated fatty acids: when and why it is necessary to supplement with these fatty acids). *A&G* 1999;50:294-299.
- Müller HL, Kirchgessner M: Thermic effects of carbohydrates and unsaturated fats fed to sows below and above maintenance level; in McCracken K, Unsworth EF, ARG Wylie ARG (eds): *Energy Metabolism of Farm Animals*. New York, CAB International, 1998, pp 139-142.
- Clarke SD: Polyunsaturated fatty acid regulation of gene-transcription: a mechanism to improve energy balance and insulin resistance. *Br J Nutr* 2000;83(suppl 1):S59-S66.
- Mercer SW, Trayhurn P: Effect of high fat diets on energy balance and thermogenesis in brown adipose tissue of lean and genetically obese ob/ob mice. *J Nutr* 1987;117:2147-2153.
- Shimomura Y, Tamura T, Suzuki M: Less body fat accumulation in rats fed a safflower oil diet than in rats fed a beef tallow diet. *J Nutr* 1990;120:1291-1296.
- Pan DA, Stortien LH: Dietary lipid profile is a determinant of tissue phospholipids fatty acid composition and rate of weight gain in rats. *J Nutr* 1993;123:512-519.
- Su W, Jones PJH: Dietary fatty acid composition influences energy accretion in rats. *J Nutr* 1993;123:2109-2114.

- 17 Takahashi Y, Ide T: Dietary n-3 fatty acids affect mRNA level of brown adipose tissue uncoupling protein-1, and white adipose tissue leptin and glucose transporter 4 in rat. *Br J Nutr* 2000;84:175-184.
- 18 Gómez García V, Sanz Sampelayo MR, Fernández Navarro JR, Carmona López FD, Gil Extremera F, Rodríguez Osorio M: Polyunsaturated fatty acids and parasitism: effect of a diet supplemented with fish oil on the course of rat trichinellosis. *Vet Parasitol* 2003; 117:85-97.
- 19 Boza J, Pérez Martínez L, Sanz Sampelayo MR: Producto y procedimiento de obtención de una grasa protegida para incluir en las dietas de los rumiantes (Product and obtention procedure of a protected fat to be included in the ruminant diets). 2000, Patent No 2.136.536.
- 20 American Institute of Nutrition: Report of the AIN and Ad Hoc Committee on Standards for Nutritional Studies. *J Nutr* 1997;107:1340-1348.
- 21 Boletín Oficial del Estado: Real Decreto 223/1988 de 14 de marzo, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos (Royal Decree of March 14 about the protection of the animals used in experimentation and other scientific purposes), 1988.
- 22 Brouwer E: Report of sub-committee on constants and factors; in Blaxter KL (ed): *Energy Metabolism of Farm Animals*. London, Academic Press, 1965, pp 441-442.
- 23 Van Assendelft OW, Mook GA, Zijlstra WG: International system of units (SI) in physiology. *Pflügers Arch* 1973;339:265-272.
- 24 Association of Official Analytical Chemists: *Official Methods of Analysis*, ed 15. Washington, AOAC, 1990.
- 25 Sanderson P: A new method of analysis of feeding stuffs for the determination of crude oils and fats; in Haresign W, Cole, DJA (eds): *Recent Advances in Animal Nutrition*. London, Butterworths, 1986, pp 77-86.
- 26 Lepage G, Roy CC: Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. *J Lipid Res* 1986;27:114-120.
- 27 Steel RGD, Torrie JH: *Principles and Procedures of Statistics: A Biometrical Approach*, ed 4. Singapore, McGraw-Hill, 1984.
- 28 Statgraphics: *User's Manual: Statistical Graphics System*. Rockville, Statistical Graphics Corp, 1991.
- 29 Woods SC, Seeley RJ, Rushing PA, D'Alessio D, Tso P: A controlled high-fat diet induces an obese syndrome in rats. *J Nutr* 2003;133: 1081-1087.
- 30 Sherrington EJ, Jeffery MN, Calder PC: Time course of the effect of diets rich in n-6 or n-3 polyunsaturated fatty acids on serum cholesterol levels, liver weights and adipose deposition in the rats. *Proc Nutr Soc* 1995;54:45A.
- 31 Zhao QX, Jorgensen H, Jakobsen K: Retention and oxidation of nutrients in broilers chickens fed different levels of rapeseed oil during growth period; in Chwalibog A, Jakobsen K (eds): *Energy Metabolism in Animals*. Wageningen, Academic Publishers, 2001, pp 265-268.
- 32 Jorgensen H, Zheng CT, Theil PK, Jakobsen K: Effect of specific structured triglycerides on energy metabolism in broiler chickens; in Souffrant WB, Metges CC (eds): *Progress in Research on Energy and Protein Metabolism*. Wageningen, Academic Publishers, 2003, pp 417-420.
- 33 Fickova M, Hubert P, Crémel G, Leary C: Dietary (n-3) and (n-6) polyunsaturated fatty acids rapidly modify fatty acid composition and insulin effects in rat adipocytes. *J Nutr* 1998; 128:512-519.
- 34 Scollan NG, Choi NJ, Kurt E, Fisher AV, Enser M, Woods JD: Manipulation of the fatty acid composition of muscle and adipose tissue in beef cattle. *Br J Nutr* 2001;85:115-124.
- 35 Wainwright PE: Dietary essential fatty acids and brain function: a developmental perspective on mechanisms. *Proc Nutr Soc* 2002;61: 61-69.
- 36 Schwartz RS, Ravussin E, Massari M, O'Connell M, Robins DC: The thermic effect of carbohydrate versus fat feeding man. *Metabolism* 1985;34:285-293.
- 37 Halas V, Dijkstra J, Babinszky L, Versteegen MWA, Gerrits WJJ: Effect of dietary energy sources on energy metabolism of growing and fattening pigs: a model simulation; in Souffrant WB, Metges CC (eds): *Progress in Research on Energy and Protein Metabolism*. Wageningen, Academic Publishers, 2003, pp 171-174.
- 38 Boden G, Chen X: Effects of fat on glucose uptake and utilization in patients with non-insulin-dependent diabetes. *J Clin Invest* 1995;96: 1261-1268.
- 39 Storlien LH, Jenkins AB, Chisholm DJ, Pascoe WS, Khouri S, Kreamer EW: Influence of dietary fat composition on development of insulin resistance in rats. Relationship to muscle triglyceride and  $\omega$ -3 fatty acids in muscle phospholipids. *Diabetes* 1991;40:280-289.
- 40 Murata M, Kaji H, Iida K, Okimura Y, Chijara K: Dual action of eicosapentaenoic in hepatoma cells. *J Biol Chem* 2001;276:31422-31428.
- 41 Mattos R, Staples CR, Arteche A, Wiltbank MC, Diaz FJ, Jenkins TC, Thatcher WW: The effects of feeding fish oil on uterine secretion of PGF<sub>2</sub> $\alpha$ , milk composition, and metabolic status of periparturient Holstein cows. *J Dairy Sci* 2004;87:921-932.
- 42 Nestel PJ, Connor WE, Reardon MF, Connor S, Wong S, Boston R: Suppression by diets rich in fish oil of very low density lipoprotein production in man. *J Clin Invest* 1984;74:82-89.
- 43 Lindsay DB: Fatty acids as energy sources. *Proc Nutr Soc* 1975;34:241-248.
- 44 Lafontan M, Langin D: Cellular aspects of fuel mobilization and selection in white adipocytes. *Proc Nutr Soc* 1995;54:49-63.
- 45 Petit HV, Dewhurst RJ, Scollan ND, Proulx JG, Khalid M, Haresing W, Twagiramungu H, Mann GE: Milk production and composition, ovarian function, and prostaglandin secretion of dairy cows fed  $\omega$ -3 fats. *J Dairy Sci* 2002; 85:889-899.
- 46 Jump DB, Clarke SD: Regulation of gene expression by dietary fat. *Annu Rev Nutr* 1999; 19:63-90.
- 47 Lu J, Bankovic-Calic N, Ogborn M, Saboorian MH, Aukema HM: Detrimental effects of a high fat diet in early renal injury are ameliorated by fish oil in Han:SPRD-cy rats. *J Nutr* 2003;133:180-186.

Copyright: S. Karger AG, Basel 2006. Reproduced with the permission of S. Karger AG, Basel.  
Further reproduction or distribution (electronic or otherwise) is prohibited without permission  
from the copyright holder.

## Effect of rumen-protected supplements of fish oil on intake, digestibility and nitrogen balance of growing goats

J. R. Fernández, M. Rodríguez Osorio, E. Ramos, G. de la Torre, F. Gil Extremera and M. R. Sanz Sampelayot

Estación Experimental del Zaidín, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Unidad de Nutrición Animal, Profesor Albareda, 1, 18008 Granada, Spain

† Corresponding author e-mail : rsanz@eez.csic.es

### Abstract

Two groups of six male goats were used to assess the effects of rumen-protected supplements of fish oil on intake, digestibility and nitrogen (N) balance. The animals were offered a diet consisting of forage and concentrate, the latter fraction supplemented with 0 (control) or 100 g/kg of rumen-protected fish oil supplement (PFO), containing a high proportion of the n-3 series (whole diet contained 0 or 60 g PFO per kg dry matter). No significant differences ( $P > 0.05$ ) were found between the two groups concerning live-weight gain, food intake, digestibility of DM, organic matter, N, neutral-detergent fibre and energy. In contrast, there were differences ( $P < 0.05$ ) regarding the digestibility of fat and of acid-detergent fibre, which were higher among the animals given the PFO diet. With respect to the individual fatty acids, we observed higher digestibility ( $P < 0.05$ ) of C14:0, C16:0, C18:0 and C20:0 among the animals given the PFO diet. The digestibility of C14:0, C18:0 and C20:0 was found to be negative among the animals given the control diet. No significant differences ( $P > 0.05$ ) were found regarding digestibility of total C18:1. In contrast, the coefficients for C18:2 (n-6) and C18:3 (n-3) were higher ( $P < 0.05$ ) among the non-supplemented animals. The intake and faecal flow values of C18:0 suggest that the mono- and polyunsaturated fatty acids with 18 atoms of carbon may, in both cases, undergo partial hydrogenation, which would be greater among the control group. The utilization of C20:5 (n-3) and, especially, of C22:6 (n-3), which were consumed only by the animals given the PFO diet, was estimated at 1.000. The PFO diet also produced lower levels of urinary-N excretion ( $P < 0.05$ ), giving rise to higher N balances ( $P < 0.05$ ).

**Keywords:** digestibility, fish oils, goats, nitrogen balance, polyenoic fatty acids.

### Introduction

The use of protected fats in the ruminant diet is a strategy that has long been used to increase dietary energy density, especially at certain periods during the productive cycle (Baldi *et al.*, 1992; Jenkins and Palmquist, 1984). The milk and meat fat of ruminants contains a relatively high proportion of saturated fatty acids, which is a risk factor related to cardiovascular diseases (Ney, 1991). At the same time, it is also known that polyunsaturated fatty acids (PUFAs), which have been associated with a decrease in the risk of heart disease (Daviglius *et al.*, 1997), are low in the milk and meat fat of ruminants. Therefore, protected fats rich in certain PUFAs have been designed to modify the fat composition of the animal's milk or meat and make it healthier. These

fats, to a greater or lesser extent, subsequently pass to the milk or the carcass of the animal (Ashes *et al.*, 1992; Franklin *et al.*, 1999; Sanz Sampelayo *et al.*, 2002). As shown for various species, the appropriate inclusion of PUFAs in the diet may also benefit animal physiology, for example concerning fertility (Burke *et al.*, 1997) or the immune system (Rodríguez Osorio *et al.*, 2001).

If rumen-protected fat supplements are used to manipulate the fatty acid flow from the rumen, then the digestibility of the protected fatty acids is of vital importance, assuming that this material does indeed provide effective protection from the ruminal metabolism. Information on this question would be useful in developing diet supplement strategies to

make appropriate levels of certain fatty acids available (Grummer, 1991). Most of the trials designed to investigate the nutritional utilization of a protected fat in the ruminant have involved sheep, lambs, calves and cows (Shell *et al.*, 1978; Clapperton and Steele, 1983; Fallon *et al.*, 1986; Enjalbert *et al.*, 1994), while virtually no data have been reported concerning the goat.

This paper presents results obtained with male, uncastrated, growing goats of the Granadina breed. The experimental groups were fed a diet in which the concentrate fraction was supplemented or not with a rumen-protected fish oil supplement that was particularly rich in n-3 PUFAs. One of the main purposes of the experiment was to examine the digestibility of protected fatty acids. We also analysed the digestibility of the different nutrients and determined the nitrogen (N) balances.

## Material and methods

### Experimental design and procedures

Two groups of six male, uncastrated, growing goats of the Granadina breed, aged 8 to 12 months, were given a diet comprising a forage fraction, containing lucerne hay (400 g per animal per day) and cereal straw (100 g per animal per day), together with a concentrate fraction (600 g per animal per day). The baseline diet was supplemented with 0 (control) or (60 g/kg dry matter (DM)) of rumen-protected fish oil (PFO). The quantity and composition of the concentrate and forage were sufficient for the animals' nutritional requirements (Aguilera *et al.*, 1991). The original fat was a fish oil, derived from tunny, salmon, mackerel and related species, supplied by Harinas de Andalucía, Tarifa, Spain. The calcium (Ca) salts of the fish oil fatty acids were obtained by the double-decomposition method described by Jenkins and Palmquist (1984). A solution of sodium hydroxide in a water-ethanol mixture was added to warmed fat to obtain the soluble sodium salts of the fatty acids. An excess of calcium chloride solution was then added to provoke the precipitation of the Ca salts of the fatty acids. Finally, the excess liquid was separated by filtering and by compression. The Ca salts obtained were air-dried and pulverized. This product was incorporated into the concentrate replacing an equal weight of maize. Specific details of this process were reported by Boza *et al.* (2000). The protected fat contained 850 g/kg of DM, with 706 g fat per kg DM. The degree of saponification of the protected fat was 0.848. This proportion is defined as the fraction of the fat not extracted without previous acid hydrolysis (Hermansen and Lund, 1990). The fatty acid composition of the protected fat was (g/100 g total fatty acids): C14: 0, 4.41; C15: 0, 0.64; C16: 0, 21.83;

C16: 1, 4.65; C17: 0, 0.64; C18: 0, 6.10; total C18: 1, 29.17; C18: 2 (n-6), 2.23; C18: 3 (n-3), 7.87; C20: 0, 0.48; C20: 1, 2.57; C20: 5 (n-3), 5.69; C22: 0, 2.41; C22: 6 (n-3), 11.31. The degree of protection of this product against ruminal metabolism was investigated in accordance with the method described by Sukhija and Palmquist (1990), determining the dissociation of Ca soaps in ruminal liquid at different levels of pH (5.0, 5.5, 6.0 and 6.5). The total Ca content was established by acid hydrolysis with 6 mol/l HCl. The Ca concentration of the samples was determined by atomic absorption spectrophotometry. The results obtained showed that

**Table 1** Composition of concentrate mixtures used (g/kg), their chemical composition and that of lucerne hay and cereal straw (g/kg dry matter)

|                             | Concentrate† |      | Lucerne hay | Cereal straw |
|-----------------------------|--------------|------|-------------|--------------|
|                             | 1            | 2    |             |              |
| Ingredients                 |              |      |             |              |
| Oats                        | 220          | 220  |             |              |
| Maize                       | 250          | 150  |             |              |
| Lupin                       | 490          | 490  |             |              |
| Protected fat‡              |              | 100  |             |              |
| Mineral-vitamin complement‡ | 40           | 40   |             |              |
| Chemical composition        |              |      |             |              |
| Dry matter                  | 876          | 889  | 875         | 894          |
| Organic matter              | 963          | 949  | 885         | 948          |
| Crude protein               | 213          | 208  | 240         | 47           |
| Neutral-detergent fibre     | 431          | 406  | 393         | 741          |
| Acid-detergent fibre        | 117          | 147  | 255         | 458          |
| Total fatty acids           | 46           | 108  | 15          |              |
| C10: 0                      |              |      | 0.1         |              |
| C10: 1                      |              |      | 0.2         |              |
| C12: 0                      |              |      | 0.1         |              |
| C13: 0                      |              |      | 0.4         |              |
| C14: 0                      |              | 0.2  | 2.5         | 0.2          |
| C15: 0                      |              |      | 0.4         | 0.1          |
| C16: 0                      |              | 7.4  | 21.0        | 4.7          |
| C16: 1                      |              |      | 2.9         | 1.0          |
| C17: 0                      |              |      | 0.4         |              |
| C18: 0                      |              | 1.9  | 5.7         | 0.4          |
| Total C18: 1                |              | 14.9 | 32.4        | 0.2          |
| C18: 2 (n-6)                |              | 19.8 | 28.6        | 2.9          |
| C18: 3 (n-3)                |              | 1.3  | 2.4         | 4.6          |
| C20: 0                      |              | 0.3  | 0.6         | 0.2          |
| C20: 1                      |              | 0.2  | 1.8         |              |
| C20: 5 (n-3)                |              |      | 2.3         |              |
| C22: 0                      |              |      | 1.5         |              |
| C22: 6 (n-3)                |              |      | 5.8         |              |

† Concentrates 1 and 2 produce diets with 0 and 60 g/kg DM of a fat rich in rumen-protected polyunsaturated fatty acids, respectively.

‡ Mineral-vitamin complement composition (g/kg): Ca, 58.0; P, 171.0; NaCl, 250.0; Fe, 23.0; Cu, 3.0; Zn, 15.0; Mn, 12.0; Mg, 30.0; Co, 0.5; retinol, 20.0; cholecalciferol, 1.3; alpha-tocopherol, 13.0; nicotinic acid, 8.0; thiamine, riboflavin and cyanocobalamin, 2.5 (Musal Laboratory, Granada, Spain).

at the physiological pH of the rumen (around 6.5), the proportion of dissociated Ca was minimal (3.66 g/100 g). The product, thus, is considered inert in this medium (Martín Alonso, 2004). Table 1 shows the composition of the concentrates and of the two types of forage supplied.

The total duration of the experiment was 37 days. The animals were first adapted to the fat-supplemented concentrate, by gradually replacing the standard concentrate by the supplemented one. Following this process (after about 10 days), the animals were kept under experimental conditions for a further 20 days. The goats were then housed individually in metabolism cages for 7 days, during which, at 09:00 h each day, that refused of the previous day's food, together with the faeces and urine, were recovered and quantified. Subsequently, the animals were given their daily food, with water permanently available *ad libitum*. The goats were weighed on arrival at the laboratory and at the start and finish of the metabolism assays.

#### Measurements and analyses

Every day during the principal phase of the assay, samples were taken of the forage and concentrate provided, of the food refused and of the production of faeces and urine. These samples were maintained at -20°C until required for analysis. The DM and N content were determined using fresh samples and all other analyses were carried out using dry samples. The DM of the food and of the refused food was obtained by heating in an oven at 100±2°C, and that of the faeces and urine by lyophilization. The N content of the food, the refused food, the faeces and the urine was determined by the Kjeldahl method (Association of Official Analytical Chemists (AOAC), 1990), while that of the neutral-detergent fibre (NDF) and of the acid-detergent fibre (ADF) was determined using the methodology described by Van Soest *et al.* (1991). The fat in the food, in the refused food and in the faeces was determined after hydrochloric hydrolysis to dissociate Ca soaps, by extraction with petroleum ether (boiling point 40 to 60°C) (Sanderson, 1986). The quantities of ash from the food, the refused food and the faeces were determined by incineration in an electric oven at 550°C (AOAC, 1990). The energy content of the samples was determined by adiabatic bomb calorimetry. To determine the fatty acid composition of the food, the refused food and the faeces, the fatty acid methyl esters were separated on an autosystem gas chromatograph (Perkin-Elmer Corp., Norwalk, CT) with a Tr-Wax capillary column (30 m × 0.25 mm i.d., 0.25-µm film; Tracer, Technokroma, Barcelona, Spain) equipped with a flame ionization detector. The temperature was programmed from 50°C to

170°C at 20°C/min and from 170°C to 240°C at 5°C/min. The carrier gas was He. Injector and detector temperatures were 250°C and 300°C, respectively (Lepage and Roy, 1986).

#### Statistical analysis

A completely randomized design procedure was used in the analysis of variance, using the least-squares method (Steel and Torrie, 1984). Statistical analyses were performed using the Statgraphics statistical package (Statgraphics, 1991). The model accounts for variation caused by the type of concentrate. The tables describe the mean values, residual standard deviations (square root of the error mean square) and the level of significance of the effects.

## Results

#### Live weight of the animals

The mean live weight of the animals at the start of the experiment was 27.1 kg (experimental group) and 27.0 kg (control group) and the growth rate during the main assay phase was 143.2 g/day (experimental group) and 145.5 g/day (control group). No statistically significant differences ( $P > 0.05$ ) were found between these values.

#### Food intake, faecal flow and apparent digestibility of the different nutrients and of the energy

Table 2 gives the values for food intake, faecal flow and apparent digestibility of the DM, organic matter (OM), N, NDF, ADF and energy, for the two diets assayed. With regard to the food intake, both that of DM and of energy were very similar in the two groups; no significant differences were detected ( $P > 0.05$ ). Consequently, the intake of the different nutrients did not vary between the two groups ( $P > 0.05$ ), except in the case of the fat, which as expected was greater among the group of animals given the PFO diet ( $P < 0.05$ ). Moreover, the faecal flow of DM, OM, N, fat, fibre fractions and energy did not vary in terms of statistical significance ( $P > 0.05$ ) between the two groups. The same was true for apparent digestibility except as regards fat and ADF; the values of these latter parameters were higher among the group given the PFO diet ( $P < 0.05$ ).

#### Intake, faecal flow and apparent digestibility of the individual fatty acids

Table 3 gives the values for intake, faecal flow and digestibility of the different fatty acids; with respect to C14:0, C16:0, C16:1, total C18:1, C18:2 (n-6), C18:3 (n-3) and C20:0, both the intake quantities and those of faecal flow were higher among the animals given the PFO diet ( $P < 0.05$ ). The digestibility values were higher ( $P < 0.05$ ) for C14:0,

**Table 2** Intake (g/day unless otherwise stated) faecal flow (g/day unless otherwise stated) and total digestive tract digestibility of dry matter, organic matter, nitrogen, fat, neutral-detergent fibre (NDF), acid-detergent fibre (ADF) and energy. Nitrogen and energy urinary excretion (g/day and MJ/day, respectively) and nitrogen balance data also presented

|                            | Diet† |       | Residual<br>s. d. | Significance |
|----------------------------|-------|-------|-------------------|--------------|
|                            | 1     | 2     |                   |              |
| <b>Dry matter (DM)</b>     |       |       |                   |              |
| Intake                     | 775.5 | 800.5 | 61.14             |              |
| Faecal flow                | 167.0 | 171.2 | 32.87             |              |
| Digestibility              | 0.785 | 0.786 | 0.05              |              |
| <b>Organic matter</b>      |       |       |                   |              |
| Intake                     | 733.4 | 747.5 | 56.58             |              |
| Faecal flow                | 148.5 | 144.2 | 29.62             |              |
| Digestibility              | 0.798 | 0.807 | 0.03              |              |
| <b>Nitrogen</b>            |       |       |                   |              |
| Intake                     | 24.8  | 25.3  | 2.41              |              |
| Faecal flow                | 4.9   | 4.8   | 0.98              |              |
| Urinary excretion          | 10.6  | 9.5   | 0.85              | *            |
| Digestibility              | 0.802 | 0.810 | 0.03              |              |
| NR/NI†                     | 0.375 | 0.435 | 0.01              | *            |
| NR/ND†                     | 0.467 | 0.537 | 0.02              | *            |
| <b>Fat</b>                 |       |       |                   |              |
| Intake                     | 26.7  | 53.6  | 3.04              | ***          |
| Faecal flow                | 8.6   | 9.9   | 2.00              |              |
| Digestibility              | 0.678 | 0.815 | 0.06              | **           |
| <b>NDF</b>                 |       |       |                   |              |
| Intake                     | 336.1 | 342.9 | 23.75             |              |
| Faecal flow                | 93.8  | 87.0  | 20.06             |              |
| Digestibility              | 0.721 | 0.746 | 0.05              |              |
| <b>ADF</b>                 |       |       |                   |              |
| Intake                     | 151.9 | 154.9 | 13.09             |              |
| Faecal flow                | 58.6  | 52.0  | 12.37             |              |
| Digestibility              | 0.614 | 0.664 | 0.06              | *            |
| <b>Energy</b>              |       |       |                   |              |
| Intake (MJ/day)            | 14.37 | 15.05 | 1.19              |              |
| Faecal flow (MJ/day)       | 3.21  | 3.12  | 0.63              |              |
| Urinary excretion (MJ/day) | 0.65  | 0.57  | 0.08              | *            |
| Digestibility              | 0.777 | 0.793 | 0.04              |              |

† NR = N retained; NI = N intake; ND = N digested.

‡ Diets 1 and 2 with 0 and 60 g/kg DM of a fat rich in rumen-protected polyunsaturated fatty acids, respectively.

C16:0 and C20:0 and lower ( $P < 0.05$ ) for C18:2 (n-6) and C18:3 (n-3) among the animals given the PFO diet. No significant differences were detected ( $P > 0.05$ ) with respect to C16:1 and total C18:1. Faecal flow of C14:0 and C20:0 was greater than the intake among the animals given the control diet. With regard to C18:0, the intake, faecal flow and digestibility were statistically different between the two groups ( $P < 0.05$ ). The animals that consumed the PFO diet presented higher intake, lower faecal flow and, in consequence, higher digestibility. Faecal flow was in this instance much higher than intake for animals given the control diet. Intake of C20:1 was

**Table 3** Intake (g/day), faecal flow (g/day) and total digestive tract apparent digestibility of individual fatty acids

|                    | Diet†   |       | Residual<br>s. d. | Significance |
|--------------------|---------|-------|-------------------|--------------|
|                    | 1       | 2     |                   |              |
| <b>C14:0</b>       |         |       |                   |              |
| Intake             | 0.10    | 1.18  | 0.05              | ***          |
| Faecal flow        | 0.30    | 0.40  | 0.04              | ***          |
| Digestibility      | -2.000‡ | 0.661 | 0.77              | ***          |
| <b>C16:0</b>       |         |       |                   |              |
| Intake             | 4.77    | 10.94 | 0.53              | ***          |
| Faecal flow        | 2.49    | 3.46  | 0.53              | **           |
| Digestibility      | 0.478   | 0.684 | 0.08              | ***          |
| <b>C16:1</b>       |         |       |                   |              |
| Intake             | 0.28    | 1.61  | 0.07              | ***          |
| Faecal flow        | 0.06    | 0.22  | 0.04              | ***          |
| Digestibility      | 0.786   | 0.863 | 0.08              |              |
| <b>C18:0</b>       |         |       |                   |              |
| Intake             | 1.03    | 2.76  | 0.14              | ***          |
| Faecal flow        | 2.87    | 1.04  | 1.12              | *            |
| Digestibility      | -1.786‡ | 0.623 | 1.02              | **           |
| <b>Total C18:1</b> |         |       |                   |              |
| Intake             | 7.70    | 14.96 | 0.87              | ***          |
| Faecal flow        | 0.91    | 1.47  | 0.30              | **           |
| Digestibility      | 0.882   | 0.902 | 0.02              |              |
| <b>C18:2 (n-6)</b> |         |       |                   |              |
| Intake             | 11.09   | 14.16 | 0.97              | ***          |
| Faecal flow        | 0.32    | 0.56  | 0.11              | **           |
| Digestibility      | 0.971   | 0.960 | 0.01              | *            |
| <b>C18:3 (n-3)</b> |         |       |                   |              |
| Intake             | 1.51    | 2.32  | 0.24              | ***          |
| Faecal flow        | 0.10    | 0.24  | 0.03              | ***          |
| Digestibility      | 0.934   | 0.897 | 0.01              | ***          |
| <b>C20:0</b>       |         |       |                   |              |
| Intake             | 0.14    | 0.31  | 0.02              | ***          |
| Faecal flow        | 0.17    | 0.24  | 0.04              | *            |
| Digestibility      | -0.214‡ | 0.226 | 0.29              | **           |
| <b>C20:1</b>       |         |       |                   |              |
| Intake             | 0.12    | 0.81  | 0.05              | ***          |
| Faecal flow        | 0       | 0     | 0                 |              |
| Digestibility      | 1.00    | 1.00  | 0                 |              |
| <b>C20:5 (n-3)</b> |         |       |                   |              |
| Intake             | 0       | 1.15  | 0.19              | ***          |
| Faecal flow        | 0       | 0     | 0                 |              |
| Digestibility      |         | 1.00  |                   |              |
| <b>C22:0</b>       |         |       |                   |              |
| Intake             | 0       | 0.67  | 0.05              | ***          |
| Faecal flow        | 0       | 0     | 0                 |              |
| Digestibility      |         | 1.00  |                   |              |
| <b>C22:6 (n-3)</b> |         |       |                   |              |
| Intake             | 0       | 2.70  | 0.19              | ***          |
| Faecal flow        | 0       | 0     | 0                 |              |
| Digestibility      |         | 1.00  |                   |              |

† Diets 1 and 2 with 0 and 60 g/kg DM of a fat rich in rumen-protected polyunsaturated fatty acids, respectively.

‡ Faecal flow > intake.

higher ( $P < 0.05$ ) among the animals given the PFO diet, while faecal flow of this acid was absent among both groups. Finally, concerning C20:5 (n-3), C22:0

and C22 : 6 (n-3), the ingestion of which was derived from the fat included in the PFO diet, faecal excretion was absent among both groups of animals, and therefore the coefficient of apparent digestibility for the animals given the PFO diet was equal to 1.000.

*Urinary nitrogen and energy excretion and nitrogen balance data*

Table 2 shows the values for urinary N and energy excretion and N balances. Urinary N and energy excretion was lower ( $P < 0.05$ ) among the animals given the PFO diet. Due to N losses, the N balance (the proportion retained with respect to that consumed or absorbed) was statistically higher ( $P < 0.05$ ) among the animals in the fat-supplemented group.

## Discussion

*Live weight*

Initial live weights of the animals were similar, as were the live-weight gains achieved. If, as remarked below, food intake did not vary between the groups and, at the same time, the N balances were found to be higher among the animals given the PFO diet, then it might be expected that this latter group would achieve higher growth rates. We believe the results obtained in this study might be related to the stage of the animals' growth or to the composition of the corresponding live-weight gains, an aspect that was not analysed in this study.

*Food intake and apparent total nutrient and energy digestibilities*

The first effect remarked upon when a protected fat is included in the diet of any species of ruminant is the consequent fall in food intake, an effect that is attributed to the greater energy density of the diet (Forbes, 1986) or to an alteration in the ruminal function depending on the fat content and the degree of its protection (Clapperton and Steele, 1983; Davenport *et al.*, 1987; Kadzere and Jingura, 1993). Franklin *et al.* (1999) concluded that whether this fall in intake was due to reduced palatability of the diet, to greater energy density or to the ingestion of particular fatty acids remained an open question. In the present study, in which the subjects were growing animals, the intake of dry matter and that of gross energy did not vary between the two groups. Indeed, the values for the animals given the PFO diet were somewhat higher.

With respect to the digestibility of a PUFA-rich fat, the first question of importance would seem to be the degree of protection achieved, an aspect that crucially affects the hydrogenation of the fat within the rumen. According to Zinn *et al.* (2000), the lower the hydrogenation, the greater the digestibility

obtained, such that when hydrogenation is noticeable, low levels of digestibility of this nutrient at the intestinal level are produced. Accordingly, the higher digestibility of the fat obtained in the present study with consumption of the PFO diet would reflect a sufficient degree of protection achieved. Fallon *et al.* (1986) examined growing calves, providing them with a diet of Ca soaps of palm oil at differing levels, and concluded that the digestibility of the fat followed an exponential function depending on the level of diet supplementation. In the opinion of these authors, the fat utilized, once it is dissociated in the duodenum, and before entering the biliary tract, is to a large degree available for micellar formation with bile salts, and a high level of digestibility is achieved. The greater digestibility obtained from the fat included in the ruminant diet, whether protected or otherwise, has also been explained in terms of the greater availability presented by this fat in relation to that included in particles or membranes of other components of the diet. Another possible reason is that the diet supplement dilutes endogenous excretion, and thus the true digestibility value may be calculated more precisely (Grummer, 1988; Schneider *et al.*, 1988).

With respect to the digestibility of the fibre fractions, today it is well established that when the ruminant diet is supplemented with a polyunsaturated fat protected against ruminal metabolism, this digestibility provides an indicative value of the degree of protection achieved (Zinn *et al.*, 2000). The results obtained in the present study, therefore, seem to show that a sufficient degree of protection was achieved. Concerning the digestibility of ADF, Fallon *et al.* (1986) studied calves and obtained results similar to those presented here. Fallon *et al.* commented that although this might be considered of interest, it was nevertheless difficult to explain. In their opinion, the effect could have been mediated through a reduction in rapidly fermentable energy allowing cellulolysis to continue longer. In our case, and as indicated above, the protected fat was incorporated into the concentrate replacing an equal weight of maize.

The introduction of the protected fat had no effect on either the intake or the digestibility of N. Enjalbert *et al.* (1994) reported that irrespective of the form in which fat is added to the ruminant diet, protein digestibility values seem to be unaffected. Fallon *et al.* (1986) suggested a tendency for diet supplementation to achieve better digestibility of N.

The possible effect on the digestibility of energy of including a protected fat in the ruminant diet depends on its effects on the digestibility of different

nutrients in the diet. In our trials, no differences concerning coefficients of energy digestibility were observed between the two experimental groups. However, the digestible energy content of the food was calculated as 14.90 MJ/kg DM and 14.39 MJ/kg DM, for the PFO and the control diets, respectively. These values were statistically different at  $P < 0.10$ .

#### *Digestibility of the individual fatty acids*

The present study shows that certain fatty acids with ingestion values of zero (or practically so), namely C4:0, C10:0, C12:0, C15:0 and C17:0, appear in the faeces of both groups, in greater or lesser quantities. The fatty acids detected in the faeces of ruminants represent not only the undigested or unabsorbed fraction of fatty acids in the diet, but may also be of other origins; for example, they could have been synthesized in the rumen or in the large intestine, or derived from bacterial cells or various endogenous sources (Bock *et al.*, 1991).

In general, the digestibility of a fatty acid in the non-ruminant animal is known to diminish as the length of the fatty acid chain increases, while it increases with the number of double links (Lessire *et al.*, 1992). Ferlay *et al.* (1993) commented that these differences also apply to the digestibility of a fat in the ruminant, although to a lesser degree. Concerning the results obtained in the present study for C14:0, C16:0, C18:0 and C20:0, it should be taken into account that a high percentage of saturated fatty acids is normally detected in ruminant faeces. In the opinion of Shell *et al.* (1978), this could be due to any of three possible causes: the hydrogenation of dietary fat, either in the rumen or in the large intestine, endogenous excretion or the selective absorption of mono- and polyunsaturated fatty acids. In accordance with this, it may be assumed that when the PFO diet is consumed, the probably lower hydrogenation of the protected fat, together with the higher quantities ingested, gives rise to a higher digestibility of saturated fatty acids. However, it is also necessary to take into account the remarks of Grummer (1991) and of Zinn *et al.* (2000) about how the presence of PUFAs may aid the digestibility of saturated fatty acids. Referring to the particular case of C18:0, Bock *et al.* (1991) reported that the high concentrations of this acid in ruminant faeces, in addition to endogenous or bacterial origins, may also be caused by the saturation of C18:1, C18:2 and C18:3 in the rumen, a process that Ashes *et al.* (1992) and Zinn *et al.* (2000) considered could be widely extended depending on the degree of protection achieved by the fat against the ruminal metabolism. In this respect, Grummer (1991) reported that the hydrogenation of unsaturated fatty acids gives rise to high digestibility, at the level of the total intestinal

tract, of C18:1, C18:2 and C18:3, together with a negative digestibility of C18:0. According to this, and taking into account the results obtained in the present study, we deduce that in the group of animals given the control diet there must exist a considerable degree of hydrogenation of the unsaturated fatty acids of 18 atoms of carbon, a hydrogenation which if it also exists when the PFO diet was consumed, must be to a lower degree. This would be related to the fact that the fat used as a PUFA source was protected against the ruminal metabolism (Boza *et al.*, 2000) and that a high degree of protection was achieved (Martín Alonso, 2004).

With regard to the values reported for the digestibility of total C18:1, C18:2 (n-6) and C18:3 (n-3), as stated above, due to the fact that the hydrogenation of unsaturated fatty acids of 18 atoms of carbon takes place at a greater intensity in the control group, the coefficient of apparent digestibility of the hydrogenated fatty acids tends to be overestimated, and so the true differences between the two groups could differ from those recorded experimentally. Nevertheless, we reiterate that the digestibility of mono- and polyunsaturated fatty acids is normally high (Ferlay, 1993).

In relation to the digestibility estimated in the present study for the fatty acids of 18 atoms of carbon, it is also necessary to consider that, with respect to post-ruminal digestibility, another fact could also alter the characteristics of the dietary fatty acids, namely the desaturation activity of the intestinal epithelium, by which saturated fatty acids are converted into monounsaturated ones. Especially important is the conversion of C18:0 into C18:1, a process that in the opinion of Grummer (1991) is of lesser quantity and opposite nature to that of ruminal hydrogenation. According to this author, and taking into account the coefficients of digestibility estimated in the present study for C18:0 and C18:1, it does not seem logical to assume that the above-mentioned desaturation process could become highly significant with respect to that of hydrogenation.

With regard to C20:0 and C20:1, it could be assumed from the values for faecal flow and coefficient of digestibility that part of the dietary C20:1, in both cases, is hydrogenated. This would be responsible for the low, or even negative, coefficient recorded for C20:0, together with the high digestibility recorded in both experimental groups for C20:1. Finally, C20:5 (n-3) and C22:6 (n-3), which together with C22:0 were only ingested by the group given the PFO diet, presented no faecal flow, and so the coefficients of apparent digestibility

were equal to 1:000. With respect to C20:5 (n-3), and taking into account the faecal flow of C20:0, which has an equal number of atoms of carbon, we may assume that part of this could have been hydrogenated, which would result in an overestimation of the corresponding coefficient of digestibility. However, if we consider C22:6 (n-3), and bear in mind that the faecal flow of C22:0 was zero, it does not seem logical to believe that in this case there occurred any significant hydrogenation of the acid, and thus that the coefficient of digestibility could have been overestimated. The fact that C20:5 and C22:6 may be hydrogenated or not in the rumen has been known and studied for some time, with different methodologies being applied. Although Ashes *et al.* (1992) were originally of the opinion that it is impossible for such fatty acids to be hydrogenated to any significant degree in the rumen, due to the absence of specific enzymes or esterification factors, later results (Doreau and Chilliard, 1997; Gulati *et al.*, 1999; Fievez *et al.*, 2000; AbuGhazaleh and Jenkins, 2004) have shown that this hydrogenation is indeed possible, this process, moreover, being apparently dose-dependent (Gulati *et al.*, 1999). The results obtained in the present study for the digestibility of these fatty acids reflect the degree of protection achieved by the fat used as a PUFA source. The protection of this against ruminal metabolism was investigated according to the degree of dissociation of the Ca salts in ruminal liquid at different pH values (Martín Alonso, 2004). This protection was considerably greater than that obtained, using the same methodology, by Sukhija and Palmquist (1990). According to Martín Alonso (2004), this could be due both to the modifications made to the double decomposition method to produce the Ca salts (Boza *et al.*, 2000) and to the nature of the original product employed, that is, crude oil rather than refined oil or solutions of purified fatty acids.

In relation to the post-ruminal PUFAs digestibility estimated in the present study, another fact to take into consideration is the hydrogenation of dietary fat in the large intestine. Shell *et al.* (1978) reported that when unsaturated fatty acids achieve a high degree of protection against the ruminal metabolism, they are not hydrogenated in the rumen. At the same time, these fatty acids present high digestibility, due to the ease with which they enter micelle formation prior to absorption in the small intestine. Consequently, only a small proportion of these fatty acids could escape from small intestine absorption to be hydrogenated in the large intestine. This would explain the high proportion of saturated fatty acids and the low or even zero proportion of unsaturated fatty acids detected in the faeces of ruminants given

a diet containing protected fat. In the opinion of Shell *et al.* (1978), this would be the result of the preferential absorption of unsaturated fatty acids.

#### Nitrogen balances

In addition to the above-described results concerning N intake and faecal flow, our assays revealed that urinary losses of N were lower among the animals given the PFO diet. This fact led to greater retentions of N both in relation to the quantity ingested and to the quantity absorbed. These lower levels of urinary N excretion also explain why we detected lower levels of urinary energy excretion. With regard to the N balance data when the ruminant diet is supplemented with a protected fat, the published results vary considerably. In the study by Fallon *et al.* (1986), N retention was found to be lower with the supplemented diet. The authors ascribed this result to lower levels of food intake; this could have led to the quantity of energy consumed being a limiting factor for the process of protein synthesis. In the present study, the level of food intake was similar in the two experimental groups. Note, however, that during growth an increase in the quantity of fat in the diet normally produces improved utilization of protein, together with higher levels of retention. This circumstance, known as the protein-sparing effect of the fat, has been described in the pre-ruminant kid goat (Sanz Sampelayo *et al.*, 1997). It is also well known that PUFAs in the organism are basically oxidized as sources of energy, and thus satisfy part of the energy requirements for maintenance and protein synthesis (Su and Jones, 1993). We conclude, therefore, that the nature of the organism in question and that of the fat provided give rise to higher N balances when a PFO diet is consumed.

#### Acknowledgements

This study was supported financially by the Ministry of Science and Technology (Spain) (project INIA-RZ00-010-C3).

#### References

- AbuGhazaleh, A. A. and Jenkins, T. C. 2004. Disappearance of docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids from cultures of mixed ruminal microorganisms. *Journal of Dairy Science* 87: 645-651.
- Aguilera, J. F., Lara, L., Molina, E. and Prieto, C. 1991. Energy balance studies with growing Granadina goats during fasting and maintenance. *Small Ruminant Research* 5: 109-115.
- Ashes, J. R., Siebert, B. D., Gulati, S. K., Cuthbertson, A. Z. and Scott, T. W. 1992. Incorporation of n-3 fatty acids of fish oil into tissue and serum lipids of ruminants. *Lipids* 27: 629-631.
- Association of Official Analytical Chemists. 1990. *Official methods of analysis, 15th edition*. AOAC, Washington, DC.

- Baldi, A., Cheli, F., Corino, C., Dell'Orto, V. and Polidori, F. 1992. Effects of feeding calcium salts of long chain fatty acids on milk yield, milk composition and plasma parameters of lactating goats. *Small Ruminant Research* **6**: 303-310.
- Bock, B. J., Harmon, D. L., Brandt Jr, R. T. and Schneider, J. E. 1991. Fat source and calcium level effects on finishing steer performance, digestion, and metabolism. *Journal of Animal Science* **69**: 2211-2224.
- Boza, J., Pérez Martínez, L. and Sanz Sampelayo, M. R. 2000. Producto y procedimiento de obtención de una grasa protegida para incluir en las dietas de los rumiantes. *Patente de invención no. 2-136-536*.
- Burke, J. M., Staples, C. R., Risco, C. A., Sota, R. L. and Thatcher, W. W. 1997. Effect of ruminant grade menhaden fish meal on reproductive and productive performance of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* **80**: 3386-3398.
- Clapperton, J. L. and Steele, W. 1983. Fat supplementation in animal production ruminants. *Proceedings of the Nutrition Society* **42**: 243.
- Davenport, G., Boling, G., Gay, N. and Bunting, L. 1987. Effect of soybean lipid on growth and ruminal nitrogen metabolism in cattle fed soybean meal or ground whole soybean. *Journal of Animal Science* **65**: 1680-1689.
- Davignus, M. L., Stamler, J., Orenca, A. J., Dyer, A. R., Liu, K., Greenland, P., Walsh, M. K., Morris, D. and Sekelle, R. B. 1997. Fish consumption and the 30-years risk of fatal myocardial infarction. *New England Journal of Medicine* **336**: 1046-1053.
- Doreau, M. and Chilliard, I. 1997. Effects of ruminal or post-ruminal fish oil supplementation on intake and digestion in dairy cows. *Reproduction, Nutrition, Development* **37**: 113-124.
- Enjalbert, F., Moncoulon, R., Vernay, M. and Griess, D. 1994. Effects of different forms of polyunsaturated fatty acids on rumen fermentation and total nutrient digestibility of sheep fed prairie hay based diets. *Small Ruminant Research* **14**: 127-135.
- Fallon, R. J., Williams, P. E. V. and Innes, G. M. 1986. The effects on feed intake, growth and digestibility of nutrients of including calcium soaps of fat in diets for young calves. *Animal Feed Science and Technology* **14**: 103-115.
- Ferlay, A., Chabrot, J., Elmeddah, Y. and Doreau, M. 1993. Ruminant lipid balance and intestinal digestion by dairy cows fed calcium salts of rapeseed oil fatty acids or rapeseed oil. *Journal of Animal Science* **71**: 2237-2245.
- Fievez, V. L., Van Nevel, C. J. and Demeyer, D. I. 2000. Lipolysis and biohydrogenation of PUFA's from fish oil during *in vitro* incubations with rumen contents. *Proceedings of the Nutrition Society* **59**: 193A.
- Forbes, J. M. 1986. Dietary factors affecting intake. In *The voluntary feed intake of farm animals* (ed. J. M. Forbes), pp. 85-113. Butterworths, London.
- Franklin, S. T., Martin, K. R., Baer, R. J., Shingoethe, D. J. and Hippen, A. R. 1999. Dietary marine algae (*Schizochytrium* sp.) increases concentrations of conjugated linoleic, docosahexaenoic and transvaccenic acids in milk of dairy cows. *Journal of Nutrition* **129**: 2048-2052.
- Grummer, R. R. 1991. Effect of feed on the composition of milk fat. *Journal of Dairy Science* **74**: 3244-3257.
- Grummer, R. R. 1988. Influence of prilled fat and calcium salts of palm oil fatty acids on ruminal fermentation and nutrient digestibility. *Journal of Dairy Science* **71**: 117-123.
- Gulati, S. K., Ashes, J. R. and Scott, T. W. 1999. Hydrogenation of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids and their incorporation into milk fat. *Animal Feed Science and Technology* **79**: 57-64.
- Hermansen, J. E. and Lund, P. 1990. Fatty acid composition and milk quality related to feeding Ca-saponified palm acid oil to different breeds of dairy cows. *Journal of Dairy Research* **57**: 23-31.
- Jenkins, T. C. and Palmquist, D. L. 1984. Effect of fatty acids or calcium soaps on rumen and total nutrient digestibility of dairy rations. *Journal of Dairy Science* **67**: 978-986.
- Kadzere, C. T. and Jingura, R. 1993. Digestibility and nitrogen balance in goats given different levels of crushed whole soybeans. *Small Ruminant Research* **10**: 175-180.
- Lessire, M., Doreau, M. and Aumaitre, A. 1992. Utilisation digestive et métabolique des corps gras chez les animaux domestiques. In *Manuel des Corps Gras*, pp. 683-694. Lavoisier, Paris.
- Martín Alonso, J. J. 2004. [Preparation against ruminal metabolism of a protected fat rich in polyunsaturated fatty acids. Its utilisation with the aim of obtaining a healthier milk.] *Ph. D. thesis, University of Granada*.
- Ney, D. M. 1991. Potential for enhancing the nutritional properties of milk fat. *Journal of Dairy Science* **74**: 4002-4012.
- Rodríguez Osorio, M., Martín Alonso, J. J., Sanz Sampelayo, M. R., Gil Extremera, F. and Gómez García, V. 2001. N-3 polyunsaturated fatty acids and parasitism: effect of a diet supplemented with fish oil on the course of the rat trichinellosis. *Annals of Nutrition and Metabolism* **45**: 95-96.
- Sanderson, P. 1986. A new method of analysis of feedingstuffs for the determination of crude oils and fats. In *Recent advances in animal nutrition* (ed. W. Haresign and D. J. A. Cole), pp. 77-86. Butterworths, London.
- Sanz Sampelayo, M. R., Pérez, L., Martín Alonso, J. J., Amigo, L. and Boza, J. 2002. Effects of concentrates with different contents of protected fat rich in PUFAs on the performance of lactating Granadina goats. II. Milk production and composition. *Small Ruminant Research* **43**: 141-148.
- Sanz Sampelayo, M. R., Ruiz Mariscal, I., Gil Extremera, F. and Boza, J. 1997. The effect of different concentrations of protein and fat in milk replacers on protein utilization in kid goats. *Animal Science* **64**: 485-492.
- Schneider, P., Sklan, D., Chalupa, W. and Kronfeld, D. S. 1988. Feeding calcium salts of fatty acids to lactating cows. *Journal of Dairy Science* **71**: 2143-2150.
- Shell, L. A., Dryden, F. D., Mata-Hernández, A. and Hale, W. H. 1978. Protein protected fat for ruminants. III. Digestion and performance of lambs. *Journal of Animal Science* **46**: 1332-1337.
- Statgraphics. 1991. *User manual: Statistical Graphics System by Statistical Graphics Corporation*. Rock-Wille, MD.

- Steel, R. G. D. and Torrie, J. H. 1984. *Principles and procedures of statistics: a biometrical approach, fourth edition*. McGraw-Hill, Singapore.
- Su, W. and Jones, P. J. H. 1993. Dietary fatty acid composition influences energy accretion in rats. *Journal of Nutrition* **123**: 2109-2114.
- Sukhija, P. S. and Palmquist, D. L. 1990. Dissociation of calcium soaps of long-chain fatty acids in rumen fluid. *Journal of Dairy Science* **73**: 1784-1787.
- Van Soest, P. J., Robertson, J. B. and Lewis, B. A. 1991. Methods for dietary fibre, neutral detergent fibre and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science* **74**: 3583-3597.
- Zinn, R. A., Gulati, S. K., Plascencia, A. and Salinas, A. 2000. Influence of ruminal biohydrogenation on the feeding value of fat in finishing diets for feedlot cattle. *Journal of Animal Science* **78**: 1738-1746.

(Received 13 May 2004—Accepted 1 July 2004)



## Effect of providing a polyunsaturated fatty acid-rich protected fat to lactating goats on growth and body composition of suckling goat kids

M.R. Sanz Sampelayo<sup>†</sup>, J.R. Fernández, E. Ramos, R. Hermoso, F. Gil Extremera and J. Boza

Estación Experimental del Zaidín, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Unidad de Nutrición Animal, Profesor Albareda, 1, 18008 Granada, Spain

<sup>†</sup> E-mail: rsanz@eez.csic.es

### Abstract

The aim of this study was to investigate the possibility of improving the composition of goat meat, in terms of the fatty acid composition of the different fat deposits. For this purpose, we used two groups of 12 female goats each of which had recently undergone a double birth. The animals were maintained under semi-extensive conditions and trough-fed with a concentrate that was either non-supplemented or supplemented with 50 g/kg of polyunsaturated fatty acids (PUFA)-rich fat protected against ruminant metabolism. The kid goats born to each group were suckled by their dams and a representative sample of each was slaughtered at 45 days after birth. The milk produced by the dams receiving the fat-supplemented diet contained fat with a lower content of saturated fatty acids and a higher content of n-3 PUFA, trans-C18:1 and CLA. The kid goats suckled by these dams grew faster and the legs of the carcasses presented greater muscular development compared with the non-fat-supplemented diet group. The cover, intermuscular and intramuscular fat presented a different fatty acid composition, with a higher proportion of n-3 PUFA, trans C18:1 and CLA, while that of n-6 PUFA remained unchanged. The change in the lipid metabolism of the kid goats was made evident by the blood levels of certain biochemical parameters. We discuss the improvement in the quality of the meat obtained, taking into account the feeding strategy provided and the class of animal in question.

**Keywords:** body composition, goats, kids, polyenoic fatty acids.

### Introduction

The essential importance of n-6 and n-3 series polyunsaturated fatty acids (PUFA), first described by Burr and Burr (1929), is the fact that it is impossible for animals (though not for plants) to form these PUFA from structurally simpler precursors. Their absence from the mammalian diet, and especially from the human diet, leads to severe disorders affecting growth and the immune and nervous systems, and may also affect the cardiovascular health of the adult population (Innis, 1991). Changes in nutritional habits in developed countries have led to a considerable reduction in the consumption of PUFA of the n-3 series. Consequently, various organizations (Food and Agriculture Organisation, 1994) have recommended that steps should be taken to encourage their consumption. Specialists have reported that an effective and promising alternative is to make use of the food chain, manipulating the nutrition of food-producing animals as a means of supplying consumers with sufficient levels of n-3 PUFA (Born, 1998).

Different studies have shown that the fatty acid profile of the different fat deposits, as well as that of the milk fat, can be improved by including in the animal's diet a fat protected against the ruminal metabolism (Noakes *et al.*, 1996; Ashes

*et al.*, 1997; Franklin *et al.*, 1999; Scollan *et al.*, 2001 and 2003; Kiteessa *et al.*, 2001; Gulati *et al.*, 2002; Sanz Sampelayo *et al.*, 2004). From the first protection method to be employed (encapsulation of lipid particles in a matrix of formaldehyde treated protein) (Wren *et al.*, 1976) to the latest, the provision of fatty acids in the form of calcium salts (Jenkins and Palmquist, 1984), other protection methods have been contemplated, such as the adsorption of fats on an inert support (Jenkins and Palmquist, 1984) and the cold crystallization of the fatty acids (Schauff and Clark, 1989).

For various reasons, goat milk and meat are today considered high-quality foods, and superior to those obtained from other ruminant species. The milk fat obtained from goats contains a high proportion (over 30%) of medium-chain triglycerides (MCT) (C6–C14), in contrast to the milk fat from cows that presents a maximum of 20% MCT. These compounds are of very special interest even from a therapeutic viewpoint, because of their particular metabolism and, in consequence, their usefulness in dealing with certain metabolic diseases (Haenlein, 1996, 2001 and 2004; Boza and Sanz Sampelayo, 1997). As regard the meat, that of the goat is very lean with very little carcass fat. This aspect is characteristic of the species, the carcass of which

has a total adipose tissue content of 50 to 100 g/kg in the carcass, irrespective of whether the animal in question is bred for milk or for meat production (Morand-Fehr *et al.*, 1985; Sanz Sampelayo *et al.*, 1995). The goat carcass that is most appreciated in Spain and in the Mediterranean region in general is that obtained from young unweaned animals. Moreover, and given the present day demand for organic products, it is preferable to obtain this kind of meat from animals suckled by their dams (Boza, 2002). Thus, it seems logical to believe that a change in the composition of goat milk could alter that of the fat deposits in the suckling animal consuming such milk. However, in this particular case, the response of the kid goat would be influenced not only by the nature of the fat in question, a polyunsaturated one whose acids are oxidized as an energy source more quickly than are those of saturated fatty acids, and are thus deposited in much smaller proportions (Su and Jones, 1993; Clarke, 2000; Takahashi and Ide, 2000) but also by the particular metabolism of the animal.

The objective of this study was to analyse the possibility of obtaining a high quality goat meat in terms of the fatty acids composition of the different fat deposits. For this purpose, kid goats of the Malagueña breed were suckled by their dams to the age of 45 days. The dams, maintained under semi-extensive conditions, were given indoor, a concentrate containing, in one treatment, a rumen-protected fish oil supplement (calcium salts of the different fatty acids), that was rich in PUFA, particularly in the n-3 series (Boza *et al.*, 2000). In the other treatment, this fat supplement was absent from the concentrate. As well as the composition of the dam's milk, we analysed the growth, and the tissue and chemical composition of the legs obtained from the kid-goat carcasses as well as the fatty acid profile of the cover fat and the intermuscular and intramuscular fat of the leg. We also evaluated the concentration of certain indicative metabolites in the blood, especially those describing the metabolism of lipids.

## Material and methods

### Experimental design and procedure

Two groups of 12 goats of the Malagueña breed, which had recently undergone a double birth of male animals, were kept under semi-extensive conditions. From the start of lactation, both groups maintained under semi-extensive conditions, were indoor-fed with a concentrate, 1 kg per animal per day, which for one of the groups was supplemented with 50 g/kg polyunsaturated fatty acid (PUFA)-rich fat protected against the ruminal metabolism. Water was available at all times. The original fat was of marine origin (fish oil), while the protected fat was constituted of calcium salts of the corresponding fatty acids. The protected fat contained 850 g/kg dry matter (DM), with 706 g fat per kg DM and 27.09 (g per 100 g total fatty acids) PUFA in the fat, mainly the n-3 series, 24.91 (g per 100 g total fatty acids). The calcium salts of the fish oil fatty acids were obtained by the double-decomposition method described by Jenkins and Palmquist (1984). Specific details of this process were reported by Boza *et al.* (2000). The degree of saponification of the protected fat was 0.848, this proportion being calculated as the fraction of the fat not extracted without previous

acid hydrolysis. The degree of protection of this product against ruminal metabolism was investigated in accordance with the method described by Sukhija and Palmquist (1990), determining the dissociation of calcium salts in ruminal liquid at different levels of pH (5.0, 5.5, 6.0 and 6.5). The total calcium content was established by acid hydrolysis with 6 mol/l HCl. The calcium concentration of the samples was determined by atomic absorption spectrophotometry. The results obtained showed that at the physiological pH of the rumen (around 6.5), the proportion of dissociated calcium was minimal (3.66 g per 100 g) (Fernández *et al.*, 2004). The product, thus, may be considered inert in this medium. The fatty acid composition of the fish oil and the protected fat is shown in Table 1. The quantity of protected fat included in the supplemented concentrate, replaced an equal weight-for-weight quantity of the basal concentrate mix except for that corresponding to the mineral-vitamin supplement. The ingredients of the concentrates and their chemical composition are shown in Table 2. The intake of DM of the goats could not be quantified because of the type of trials carried out, and the consumption of concentrate was monitored as it disappeared from the food stall. The newborn kid goats remained with their dams all day for the first 7 days after birth; subsequently, they were separated during the day and reunited when the adult animals returned from grazing outdoors. Thus the kid goats remained with their dams from 17:00 h until 08:00 h the following day. When the kid goats were 30 days old, six animals from each group were randomly chosen and blood samples obtained by jugular venipuncture at 09:00 h. The blood was allowed to clot and centrifuged at 1500 g for 10 min; the serum was then removed and stored at -30°C until required for analysis. When the kid goats were aged 45 days, six animals from each group were randomly chosen and slaughtered by section of the jugular vein in the neck, after anaesthesia by intramuscular injection of Xylazine (Rompum Bayer). After slaughter, the skin and all internal organs were removed, the leg being obtained from the left side of the carcass. All management and experimental procedures conducted in this study were done in strict accordance with the requirements of the European Union

**Table 1** Fatty acid composition (g per 100 g total fatty acids) of the fish oil and the protected fat

|                    | Fish oil | Protected fat |
|--------------------|----------|---------------|
| C14:0              | 4.35     | 4.73          |
| C15:0              | 0.56     | 0.58          |
| C16:0              | 16.97    | 19.69         |
| C16:1              | 5.75     | 5.74          |
| C17:0              | 0.36     | 0.53          |
| C17:1              | 0.51     | 0.53          |
| C18:0              | 5.01     | 4.45          |
| C18:1 <i>trans</i> | 0.24     | 0.26          |
| C18:1 <i>cis</i>   | 24.22    | 25.08         |
| C18:2              | 1.48     | 1.29          |
| C18:3              | 0.71     | 0.59          |
| C18:4              | 1.46     | 1.18          |
| C20:1              | 6.06     | 6.08          |
| C20:4              | 0.99     | 0.76          |
| C20:5              | 7.07     | 6.41          |
| C22:0              | 5.42     | 5.24          |
| C22:4              | 0.36     | 0.13          |
| C22:5              | 1.62     | 1.55          |
| C22:6              | 16.85    | 15.18         |

## PUFA-rich protected fat for lactating goats

**Table 2** Ingredient (g/kg) and chemical composition of the concentrates (g/kg dry matter)

|   | Concentrate <sup>†</sup> |     |
|---|--------------------------|-----|
|   | 1                        | 2   |
| Ingredients                             |                          |     |
| Lupinus                                 | 508                      | 464 |
| Oats                                    | 319                      | 291 |
| Maize                                   | 133                      | 122 |
| Protected fat <sup>‡</sup>              |                          | 83  |
| Mineral-vitamin complement <sup>‡</sup> | 40                       | 40  |
| Chemical composition                    |                          |     |
| Dry matter                              | 893                      | 890 |
| Organic matter                          | 929                      | 931 |
| Crude protein                           | 193                      | 176 |
| Fat                                     | 49                       | 95  |
| Neutral-detergent fibre                 | 224                      | 223 |
| Acid-detergent fibre                    | 123                      | 101 |
| Acid-detergent lignin                   | 18                       | 18  |

<sup>†</sup> Concentrates 1 and 2 with 0 and 50 g/kg of a rumen-protected polyunsaturated fatty acids-rich fat, respectively.

<sup>‡</sup> Mineral-vitamin complement composition (g/kg): Ca, 58.0; P, 171.0; NaCl, 250.0; Fe, 23.0; Cu, 3.0; Zn, 15.0; Mn, 12.0; Mg, 30.0; Co, 0.5; retinol, 20.0; cholecalciferol, 1.3; alpha-tocopherol, 13.0; nicotinic acid, 8.0; vitamins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> and B<sub>12</sub>, 2.5 (Musal Laboratory Granada, Spain).

and Spanish rules and guidelines regarding the ethical treatment of animals used in experimentation (Boletín Oficial del Estado, 1988).

### Measurements and analyses

The composition of the milk produced by the goats fed the two concentrates (fat-supplemented and non fat-supplemented) was measured twice a week, throughout the rearing period. The dry matter of the milk samples was determined by lyophilization, and the nitrogen content by the Kjeldahl method. The protein nitrogen content was calculated as the difference between total nitrogen and non-protein nitrogen; total nitrogen was determined from whole milk samples and non-protein nitrogen from filtrates of whole milk after precipitation with 12% (w/v) trichloroacetic acid. The casein nitrogen content was calculated as the difference between the protein nitrogen and the whey nitrogen. The whey nitrogen was calculated as the difference between non-casein nitrogen and non-protein nitrogen; non-casein nitrogen was determined from filtrates of whole milk after precipitation at pH 4.6 with a buffer solution of 10% (w/v) acetic acid plus 1 mol/l sodium acetate. Protein, casein and whey nitrogen values were converted to protein, casein and whey protein by multiplying by a factor of 6.38. Fat content was determined by the Gerber method and ash was obtained by incineration in an electric muffle furnace at 550°C. The amount of lactose in the different samples of milk was calculated as the difference between the corresponding dry matter and the sum of protein, fat and ash.

Together with the weight at birth, the live weight of the kid goats was determined every week. Serum glucose, non-esterified fatty acids (NEFA), triglycerides, cholesterol, high density lipoprotein-cholesterol, albumin and urea were determined spectrophotometrically using commercial kits (glucose: Radox GL 2623, Barham and Trinder (1972);

NEFA: Radox FA 115, Matsubara *et al.* (1983); triglycerides: Radox TR 210, Koditscheck and Umbreit (1969); cholesterol: Radox CH 200, Bernt and Gruber (1974); high density lipoprotein-cholesterol: Radox CH 203, Assman (1979); albumin: Radox AB 388, Lasky *et al.* (1985); urea: Radox UR 107, Fawcett and Scott (1960)), total proteins were determined by the Bradford (1976) method (Biorad). The legs, obtained from the left side of the carcass, were separated by physical dissection into muscle, cover fat, intermuscular fat and bone. The DM content of the muscle, cover fat and intermuscular fat was determined by lyophilization, and the fat content (neutral lipid fraction plus phospholipid fraction) by extraction with a chloroform-methanol mixture (2:1, v/v; Folch *et al.* (1957)). The nitrogen content of the same tissues was determined by the Kjeldahl method, the values being converted into protein quantities by multiplying by a factor of 6.25.

To determine the fatty acid composition of the protected fat, milk fat, leg cover fat, intermuscular fat and intramuscular fat, fatty acid methyl esters were separated on an Autosystem gas chromatograph (Perkin-Elmer, Norfolk, CT) fitted with an SP-2560 fused silica capillary column (100 m × 0.25 mm (i.d.), 0.20 μm film; Supelco Bellefonte, PA) equipped with a flame ionization detector. The temperature was programmed from 150°C to 185°C at 5°C/min held for 30 min and then to 230°C at 5°C/min held for 26 min. The carrier gas was N<sub>2</sub>. Injector and detector temperatures were 250°C and 300°C, respectively. Peak for individual fatty acids were identified using pure methyl esters standards (Supelco, Bellefonte, PA). Standards for CLA isomers (*cis*-9, *trans*-11, CLA and *trans*-10, *cis*-12 CLA) were obtained from Matreya, Inc; PA. Peak areas for individual fatty acids were corrected for recovery using a butter-oil reference standard (CRM 164; Commission of the European Community Bureau of References, Brussels, Belgium).

### Statistical analysis

The model accounted for variations caused by the type of concentrate consumed by goats. The results were submitted to an ANOVA in accordance with the general linear model procedure (Steel and Torrie, 1984). Tables report mean values, residual standard deviations and the level of significance of the effects observed.

## Results

### Composition of the milk produced by the two groups of goats

Table 3 provides data on the composition of the milk produced by the goats, according to the type of concentrate consumed. In the milk produced by the goats that received the supplemented concentrate, higher total mineral and protein values ( $P < 0.05$ ) were recorded, this latter difference being due to the quantity of whey protein. Table 4 shows the fatty acid profile of the milk fat, according to the type of concentrate consumed. The quantity of total saturated fatty acids was lower ( $P < 0.05$ ) in the milk fat from the fat-supplemented group, whereas higher concentrations ( $P < 0.05$ )

**Table 3** Chemical composition (g/kg) of the goat milk: effects of the concentrate consumed by the goats

|              | Concentrate <sup>†</sup> |       | Residual s.d. | Significance |
|--------------|--------------------------|-------|---------------|--------------|
|              | 1                        | 2     |               |              |
| Dry matter   | 132.5                    | 140.5 | 14.6          |              |
| Protein      | 32.1                     | 35.8  | 4.1           | *            |
| Casein       | 25.3                     | 27.5  | 4.7           |              |
| Whey protein | 6.8                      | 8.3   | 1.7           | *            |
| Fat          | 39.6                     | 45.9  | 14.2          |              |
| Ash          | 7.8                      | 8.5   | 0.4           | **           |
| Lactose      | 53.0                     | 50.3  | 4.6           |              |

<sup>†</sup>Concentrates 1 and 2 with 0 and 50 g/kg of a rumen-protected polyunsaturated fatty acids-rich fat, respectively.

of PUFA and n-3 PUFA were found in the same group. The changes in the levels of saturated fatty acids were due, above all, to the lower ( $P < 0.05$ ) concentration of C18:0 and the higher ( $P < 0.05$ ) concentration of CLA, *trans*-C18:1, C20:1, C20:5, C22:5 and C22:6. These variations were also responsible for the higher levels of n-3 PUFA.

*Growth rate of kid goats and tissular and chemical composition of the legs obtained from the animal carcasses*

The mean weight of the kid goats at birth was  $3.2 \pm 0.11$  kg. The growth rate (g/day) and tissue proportions of the leg of the carcass in goat kids, for the animals whose dams were given the protected fat-supplement

**Table 4** Fatty acids composition (g per 100 g total fatty acids) of the goat milk fat: effects of the concentrate consumed by the goats

|                          | Concentrate <sup>†</sup> |       | Residual s.d. | Significance |
|--------------------------|--------------------------|-------|---------------|--------------|
|                          | 1                        | 2     |               |              |
| C4:0                     | 0.61                     | 0.53  | 0.11          |              |
| C6:0                     | 1.96                     | 1.57  | 0.26          |              |
| C8:0                     | 2.58                     | 2.17  | 0.49          |              |
| C10:0                    | 9.58                     | 9.54  | 1.78          |              |
| C12:0                    | 3.92                     | 4.53  | 0.79          |              |
| C14:0                    | 8.66                     | 9.74  | 1.19          |              |
| C14:1                    | 0.11                     | 0.13  | 0.02          |              |
| C15:0                    | 0.65                     | 0.66  | 0.05          |              |
| C16:0                    | 25.13                    | 26.00 | 1.67          |              |
| C16:1                    | 0.89                     | 1.66  | 0.17          | **           |
| C17:0                    | 0.40                     | 0.35  | 0.05          |              |
| C17:1                    | 0.05                     | 0.40  | 0.02          | **           |
| C18:0                    | 12.50                    | 5.72  | 1.27          | **           |
| C18:1 <i>trans</i>       | 0.77                     | 6.72  | 0.67          | **           |
| C18:1 <i>cis</i>         | 27.74                    | 23.01 | 3.79          |              |
| C18:2                    | 3.01                     | 2.63  | 0.37          |              |
| C18:3                    | 0.41                     | 0.37  | 0.03          |              |
| CLA (total) <sup>‡</sup> | 0.57                     | 1.68  | 0.63          | *            |
| C20:1                    | 0.06                     | 0.74  | 0.07          | ***          |
| C20:4                    | 0.13                     | 0.10  | 0.01          |              |
| C20:5                    | 0.05                     | 0.95  | 0.21          | **           |
| C22:5                    | 0.12                     | 0.43  | 0.04          | ***          |
| C22:6                    | 0.05                     | 0.36  | 0.10          | **           |
| Saturated                | 65.99                    | 60.81 | 3.47          | *            |
| PUFA                     | 4.34                     | 6.52  | 0.46          | **           |
| n-3 PUFA                 | 0.63                     | 2.11  | 0.19          | ***          |
| n-6 PUFA                 | 3.14                     | 2.73  | 0.34          |              |

<sup>†</sup>Concentrates 1 and 2 with 0 and 50 g/kg of a rumen-protected polyunsaturated fatty acids-rich fat, respectively.

<sup>‡</sup>Conjugated linoleic acid (CLA) (*cis*-9, *trans*-11 + *trans*-10, *cis*-12 isomers). *Cis*-9, *trans*-11 CLA was the major isomer present. Because the *trans*-10, *cis*-12 isomers were not always detectable it was combined with the *cis*-9, *trans*-11 isomer for total CLA.

compared with the group receiving no such supplement, the proportion of muscle (g/kg), cover fat (g/kg), intermuscular fat (g/kg), total fat (g/kg), bone (g/kg) and muscle/bone ration, were: 156 v. 138, 649 v. 629, 50 v. 47, 48 v. 52, 98 v. 99, 224 v. 250 and 2.90 v. 2.50 respectively. The growth rate, proportion of muscle and muscle/bone ratio were higher ( $P < 0.05$ ) among the kid goats suckled by fat-supplemented dams. On the other hand, the proportion of bone in the legs of the same animals was lower ( $P < 0.05$ ) than in the non-supplemented group.

In respect to the chemical composition of the tissues separated by dissection of the legs of the kid goat carcasses, for the animals whose dams were given the protected fat-supplement compared with the group receiving no such supplement, the content of DM (g/kg), fat (g/kg) and protein (g/kg), were: 232 v. 237, 146 v. 152 and 818 v. 814 respectively, in the muscle; 682 v. 682, 827 v. 835 and 167 v. 160 respectively, in the cover fat and, 667 v. 659, 845 v. 840 and 140 v. 154 respectively, in the intermuscular fat. In no case were these values affected ( $P > 0.05$ ) by the type of concentrate consumed by the kid goats' dams.

Table 5 give the values obtained for the fatty acid profile (g/100 g total fatty acid) of the cover fat, intermuscular and intramuscular fat of the legs of the kid goat carcasses. In the case of the animals whose dams were given the protected-fat supplement, compared with the group receiving no such supplement, the levels of n-3 series PUFA, *trans*-C18:1 and CLA were higher ( $P < 0.05$ ) among the animals whose dams were fat-supplemented and the n-6/n-3 PUFA ratio was lower ( $P < 0.05$ ) in the cover fat, intermuscular and intramuscular fat. In the case of the individual differences by fatty acids and together with those detected for *trans* C18:1 and CLA, we found a higher ( $P < 0.05$ ) concentration of the acids C16:0, C20:1, C20:5, C22:5 and C22:6, for the three types of fat deposit and for the same class of animals. We also detected a higher ( $P < 0.05$ ) concentration of C16:1 in the intermuscular fat and C17:1 in the cover fat, while that of C20:4 was greater ( $P < 0.05$ ) in the intermuscular fat but lower ( $P < 0.05$ ) in the cover fat. Lower ( $P < 0.05$ ) quantities of C18:0 were found in the three types of fat deposit.

*Serum levels of glucose, triglycerides, cholesterol, high density lipoprotein-cholesterol, non-esterified fatty acids, albumin, total proteins and urea in the kid goats*

In respect to the values corresponding to the concentrations of various parameters evaluated in the blood of the kid goats, for the animals whose dams were given the protected fat-supplement compared with the group receiving no such supplement, the concentrations of glucose (mmol/l), triglycerides (mmol/l), cholesterol (mmol/l), high density lipoproteins (mmol/l), NEFA (mmol/l), albumin (mg/ml), total protein (mg/ml) and urea (mmol/l), were: 4.907 v. 5.448, 0.290 v. 0.655, 2.245 v. 3.266, 1.139 v. 1.183, 0.237 v. 0.297, 39.25 v. 40.23, 66.71 v. 61.97 and 4.263 v. 3.887 respectively. The concentrations of glucose, triglycerides, cholesterol and NEFA were lower ( $P < 0.05$ ) in the group of animals whose dams received the fat supplement, while the level of total proteins was higher ( $P < 0.05$ ).

## PUFA-rich protected fat for lactating goats

**Table 5** Fatty acid composition (g per 100 g total fatty acids) of the cover fat, intermuscular fat and intramuscular fat of the leg in goat kids suckled by their dams: effects of the concentrate consumed by the goats

|                          | Cover fat                |       |               |              | Intermuscular fat        |       |               |              | Intramuscular fat        |       |               |              |
|--------------------------|--------------------------|-------|---------------|--------------|--------------------------|-------|---------------|--------------|--------------------------|-------|---------------|--------------|
|                          | Concentrate <sup>†</sup> |       | Residual s.d. | Significance | Concentrate <sup>†</sup> |       | Residual s.d. | Significance | Concentrate <sup>†</sup> |       | Residual s.d. | Significance |
|                          | 1                        | 2     |               |              | 1                        | 2     |               |              | 1                        | 2     |               |              |
| C10:0                    | 0.30                     | 0.38  | 0.09          |              | 0.38                     | 0.35  | 0.09          |              | -                        | -     |               |              |
| C12:0                    | 0.87                     | 0.85  | 0.22          |              | 0.95                     | 0.91  | 0.20          |              | 0.42                     | 0.40  | 0.08          |              |
| C14:0                    | 8.29                     | 8.15  | 1.04          |              | 8.71                     | 8.43  | 0.91          |              | 4.90                     | 5.20  | 0.51          |              |
| C14:1                    | 0.52                     | 0.34  | 0.13          |              | 0.33                     | 0.31  | 0.05          |              | 0.83                     | 0.91  | 0.55          |              |
| C15:0                    | 0.72                     | 0.63  | 0.04          |              | 0.51                     | 0.60  | 0.06          |              | 0.66                     | 0.55  | 0.08          |              |
| C16:0                    | 25.40                    | 28.83 | 1.42          | **           | 26.00                    | 28.78 | 1.10          | **           | 21.29                    | 23.35 | 1.26          | *            |
| C16:1                    | 3.32                     | 3.43  | 0.18          |              | 3.04                     | 3.68  | 0.20          | **           | 2.11                     | 2.28  | 0.48          |              |
| C17:0                    | 0.74                     | 0.97  | 0.07          | ***          | 0.63                     | 0.71  | 0.03          | ***          | 0.37                     | 0.33  | 0.03          |              |
| C17:1                    | 0.04                     | 0.84  | 0.03          | ***          | 0.61                     | 0.64  | 0.02          |              | 0.42                     | 0.39  | 0.02          |              |
| C18:0                    | 11.60                    | 8.32  | 2.33          | *            | 11.04                    | 7.80  | 0.75          | ***          | 12.49                    | 9.18  | 1.24          | **           |
| C18:1 <i>trans</i>       | 2.58                     | 9.01  | 0.29          | ***          | 0.46                     | 6.44  | 0.12          | ***          | 0.73                     | 1.98  | 0.13          | ***          |
| C18:1 <i>cis</i>         | 39.87                    | 30.72 | 3.53          | **           | 42.15                    | 33.82 | 3.11          | **           | 37.89                    | 33.92 | 4.02          |              |
| C18:2                    | 3.71                     | 3.73  | 0.52          |              | 3.47                     | 3.58  | 0.30          |              | 10.19                    | 10.38 | 1.97          |              |
| C18:3                    | 0.31                     | 0.23  | 0.07          |              | 0.26                     | 0.25  | 0.02          |              | 0.52                     | 0.55  | 0.08          |              |
| CLA (total) <sup>‡</sup> | 1.14                     | 2.51  | 0.40          | ***          | 0.93                     | 2.43  | 0.30          | ***          | 0.62                     | 1.69  | 0.29          | ***          |
| C20:1                    | 0.22                     | 0.51  | 0.09          | ***          | 0.27                     | 0.50  | 0.16          | *            | 0.40                     | 0.74  | 0.23          | *            |
| C20:4                    | 0.17                     | 0.11  | 0.03          | *            | 0.14                     | 0.16  | 0.02          | *            | 4.25                     | 3.80  | 0.97          |              |
| C20:5                    | 0.05                     | 0.09  | 0.03          | *            | 0                        | 0.13  | 0.02          | ***          | 0.41                     | 1.55  | 0.16          | ***          |
| C22:5                    | 0.11                     | 0.21  | 0.03          | **           | 0.12                     | 0.27  | 0.03          | ***          | 1.14                     | 1.62  | 0.23          | **           |
| C22:6                    | 0.04                     | 0.14  | 0.05          | **           | 0                        | 0.21  | 0.04          | ***          | 0.36                     | 1.18  | 0.14          | ***          |
| Saturated                | 47.92                    | 48.13 | 3.96          |              | 48.22                    | 47.58 | 2.95          |              | 40.13                    | 39.01 | 2.27          |              |
| PUFA                     | 5.53                     | 7.02  | 0.59          | **           | 4.82                     | 7.03  | 0.42          | ***          | 17.47                    | 20.77 | 2.83          | *            |
| n-3 PUFA                 | 0.51                     | 0.67  | 0.11          | *            | 0.38                     | 0.86  | 0.05          | ***          | 2.43                     | 4.90  | 0.49          | ***          |
| n-6 PUFA                 | 3.88                     | 3.84  | 0.52          |              | 3.61                     | 3.74  | 0.30          |              | 14.44                    | 14.18 | 2.96          |              |
| n-6/n-3 PUFA             | 7.61                     | 5.73  | 1.43          | *            | 9.50                     | 4.35  | 1.41          | ***          | 5.94                     | 2.89  | 0.67          | ***          |

<sup>†</sup> Concentrates 1 and 2 with 0 and 50 g/kg of a rumen-protected polyunsaturated fatty acids (PUFA)-rich fat, respectively.

<sup>‡</sup> Conjugated linoleic acid (CLA) (*cis*-9, *trans*-11 + *trans*-10, *cis*-12 isomers). *Cis*-9 *trans*-11 CLA was the major isomer present. Because the *trans*-10, *cis*-12 isomers was not always detectable it was combined with the *cis*-9, *trans*-11 isomer for total CLA.

## Discussion

### Chemical composition of the milk

As reported by Chilliard *et al.* (2003), the response of the dairy goat to dietary supplementation with fish oil has yet to be analysed in detail. Kitessa *et al.* (2001) provided goats with a fish oil protected with a casein-formaldehyde coating and found that, in comparison to a control diet, food intake was similar and milk production was unchanged, as was the concentration in it of fat and protein. In our assays, the milk fat concentrations for the fat-supplemented and non-supplemented groups were not statistically different. With respect to the protein-concentration result here obtained, Chilliard *et al.* (2003) reported that different results show that responses to fat supplementation differ considerably according to the species. Milk protein content decreases in dairy cows and ewes, but not in goats in which a higher concentration of protein may be obtained if the fat included in the diet is saturated or sufficient protected (Morand-Fehr *et al.*, 2000). The higher concentration of total minerals that we measured in the milk produced by the goats that received the supplemented concentrate could be due to the fat being included as calcium soaps of the different fatty acids.

When long-chain PUFA forming part of a protected fat are included in the diet, the transfer of these PUFA to the animal's milk, particularly of C20:5, C22:5 and C22:6, is very limited. In the previously cited study by Kitessa *et al.* (2001), slight increases in C20:5 and C22:6 were obtained. In the present study, when the protected fat was provided, the concentrations of C20:5 and C22:6 in the milk

produced were greater and lesser, respectively, than those obtained by Kitessa *et al.* (2001). We also measured a significant increase in C22:5. By calculating the diet-to-milk transfers of C20:5, C22:5 and C22:6, assuming a minimum daily milk production of 1500 g/animal, we obtained values of 3.27% for C22:6, 20.37% for C20:5 and 38.19% for C22:5, these quantities being notably higher than those obtained by Kitessa *et al.* (2001). These low transfer rates could be considered to be due to the fact that the PUFA in the fat used for the diet supplements were extensively hydrogenated in the rumen. In this sense, Gulati *et al.* (1999) sought to establish the intensity with which the acids C20:5 and C22:6, obtained from fish oil, are hydrogenated in the rumen; this was done by *in vitro* anaerobic incubation tests, using the ruminal fluid of sheep. These authors concluded that the hydrogenation capability is dose-dependent in the sense that it is greater when the concentration of oil is less than 1 mg/ml of ruminal fluid. We believe the lower degree of hydrogenation observed in the higher concentrations of oil could be due to the bactericidal action of the fat. A marked fall in the microbial population responsible for biohydrogenation would give rise to a lower intensity of this process. In addition to this, and as a consequence of it, other effects would also be caused. *In vivo*, a lower food intake could be obtained, together with a decrease in the production of milk and/or in its fat content, etc. In our case, using the same fat as was used in this study, we obtained different experimental results, which shows how this use did not produce notable alterations in the ruminal function, obtaining with respect to the use of a non fat-supplemented

diet an equal level of food intake and digestive utilization of the fibre fractions of the diet (Sanz Sampelayo *et al.*, 2002b; Fernández *et al.*, 2004). At the same time, in lactating animals, and depending on the stage of lactation, i.e. whether in the middle or at the end of this period, either an unchanged amount of milk and fat content is obtained (Sanz Sampelayo *et al.*, 2002a), or there is a higher volume of milk production and higher concentrations of its principal components (Sanz Sampelayo *et al.*, 2004). Therefore, and although the transfer of PUFA from the diet to the milk cannot be considered high, the different results we recorded when the protected fat was used led us to consider this product to have been sufficiently protected.

As noted by Chilliard *et al.* (2003), when the ruminant is fed a PUFA-rich protected fat, and taking into account that the degree of protection is never absolute, the processes of biohydrogenation and isomerization that take place in the rumen give rise, on the one hand, to a milk fat with a higher dietary PUFA content and, on the other, to a higher concentration of C18:1 *trans* fatty acids and of conjugated linoleic acid (CLA). In the present study, the consumption of the concentrate supplemented with the protected fat produces an increase in the concentrations of both C18:1 *trans* fatty acids and of CLA. The level of the C18:1 *trans* fatty acids was similar to that reported by Kitesa *et al.* (2001). The level of CLA logically was higher than that given by various authors as the normal value (0.4 to 0.9%) of goat-milk fat obtained from animals given a non fat-supplemented diet (Alonso *et al.*, 1999; Gulati *et al.*, 2000).

*Growth rate of kid goats and tissue composition of the legs obtained from the animal carcasses*

Today, it is well known that during growth an increase in the quantity of fat in the diet produces a more effective utilization and higher retention of dietary protein; this phenomenon is known as the sparing effect of the fat. On the basis of previous experiments carried out with pre-ruminant kid goats, it has been concluded that the fat in the milk diet contributes to the energy requirements associated with protein synthesis (Sanz Sampelayo *et al.*, 1997). Concerning the present study, the results obtained for growth rates, proportion of muscle in the leg and the muscle/bone ratio are in agreement with the above comments.

*Chemical composition of the tissues obtained from the legs of the kid goat carcasses. Fatty acid composition of the cover, intermuscular and intramuscular fat*

In order to obtain, from different species of ruminants, meat that is enriched in n-3 PUFAs, the effects of including a dietary fat supplement rich in such fatty acids have been the object of various studies (Ashes *et al.*, 1992; Scollan *et al.*, 2001, 2003; Wachira *et al.*, 2002; Demirel *et al.*, 2004). From the studies in which one of the fat sources employed was fish oil, certain results may be deduced, these being summarized as follows: the incorporation of C20:5 and C22:6 fatty acids took place at the level of the phospholipids of the muscle (Ashes *et al.*, 1992; Scollan *et al.*, 2001; Wachira *et al.*, 2002; Demirel *et al.*, 2004), while they were either not detected in the triglycerides of the adipose tissues

(Ashes *et al.*, 1992; Scollan *et al.*, 2001) or were found in much lower quantities, what would be due to the greater quantity of phospholipids present in the muscle, and to the low rate of incorporation of such fatty acids at the level of the triglycerides (Wachira *et al.*, 2002). Secondly, this incorporation is fundamentally effected by the substitution of the C18:1 fatty acid (Ashes *et al.*, 1992; Scollan *et al.*, 2001; Wachira *et al.*, 2002). Thirdly, the incorporation of n-3 PUFA is preferential to that of n-6 PUFA (Ashes *et al.*, 1992; Scollan *et al.*, 2001; Wachira *et al.*, 2002), as the former seem to interfere with the synthesis of the latter (Scollan *et al.*, 2001). Our results are in total agreement with those described above. Depending on the composition of the milk fat, the fat deposits in the legs obtained from the kid goats fed by fat-supplemented dams presented higher levels of C20:5 and C22:6 and lower ones of C18:1. Furthermore, higher quantities of n-3 PUFA were recorded, while those of n-6 PUFA remained practically unchanged.

Moreover, and as a result of the *trans* C18:1 and CLA contents in the milk consumed by the kid goats, the fat deposits in the legs obtained from the kid goats fed by fat-supplemented dams presented higher levels of both fatty acids. With respect to this, Wachira *et al.* (2002) studied dietary supplements for sheep with either a saturated fat or PUFA-rich fats, including fish oil. When the fish-oil diet was provided, there was a higher level of *trans* C18:1 in the muscle, while that of CLA remained unchanged. In this case, the concentration of *trans* C18:1 in the muscle fat was significantly higher than was observed by us among the kid goats fed by fat-supplemented dams (7.06 v. 1.98%), while that of CLA, on the other hand, was slightly lower (1.1 v. 1.69%). Scollan *et al.* (2001) analysed the effects of adding a saturated fat or a fish oil to the beef-cattle diet, while Scollan *et al.* (2003) studied the addition of a mixture of soybean, linseed and sunflower-seed oils. The fish oil produced a rise in the level of *trans* C18:1 in the muscle. The values measured in these assays were higher than those obtained by us in kid-goat muscle (4.43 v. 1.98%). When the supplement used was the mixture of different vegetable oils, the level of *trans* C18:1 in the muscle fell, while that of CLA was unchanged. The average level of *trans* C18:1 detected in muscle fat by Scollan *et al.* (2003) was similar to that recorded by us (1.80 v. 1.98%). On the contrary, the level of CLA was quite a lot lower (0.50 v. 1.99%).

The bibliography contains recommendations and calculations concerning n-3 PUFA requirements; these values vary considerably, such that while Franklin *et al.* (1999) consider the optimum intake of n-3 PUFA to be 300–400 mg/day, Kromhout (1989) reported that a person should consume about 1 g C20:5 + C22:6 per day in order to meet the appropriate balance of fats in his diet and Barlow *et al.* (1990) suggest that patients suffering from blood vessel disorders or inflammatory diseases should consume 2 to 3 g/day of C20:5 + C22:6. In the present study, and on the basis of the weights of the legs of the kid goat carcasses, and the composition of their muscle, cover fat and intermuscular fat fractions, it was possible to calculate the quantities of n-3 PUFA and of C20:5 + C22:6 measured. These quantities were 0.523 and 0.144 g respectively, for the

## PUFA-rich protected fat for lactating goats

animals whose dams received the non-supplemented concentrate and, 1.072 and 0.538 g respectively, when the dams' diet was supplemented with fish oil. According to the above recommendations, it is also deduced that the quantity of n-3 PUFA in the legs of the kid goats whose dams received the protected-fat supplement was 2.0 times higher than that of the non-supplemented group; in the case of the C20:5 + C22:6 combination, the corresponding values were 3.7 times higher. Finally, concerning the n-6/n-3 PUFA ratio values obtained here, and the recommendations that are made today for the population to consume foods rich in n-3 PUFA, with a lower n-6/n-3 PUFA ratio (Scollan *et al.*, 2001; Wachira *et al.*, 2002), it is deduced that an improvement is achieved in the composition of the different fat deposits of the kid goats suckled by dams given the fat-supplemented diet. As noted above, in the present study the values recorded of *trans* C18:1 were equal to or below those found in other studies, while those of CLA were higher.

*Levels of glucose, triglycerides, cholesterol, high density lipoprotein-cholesterol, NEFA, albumin, total proteins and urea in the blood of kid goats*

The reduced levels of total lipids and, specifically, of cholesterol in the blood is one of the beneficial effects achieved, both in man and in various animal species, by consuming fats rich in n-3 PUFA (Noakes *et al.*, 1996; Takahashi and Ide, 2000; Gaiva *et al.*, 2001). Gaiva *et al.* (2001) reported that n-3 PUFA reduce lipolysis and thus lead to lower plasma levels of NEFA. According to these authors, the latter effect could be considered a mechanism that, at least in part, contributes to lowering levels of triglycerides in plasma. At the same time, the greater cellular sensitivity to insulin, an effect that Clarke (2000) believes is due to the enrichment of the plasma membrane with long-chain PUFA, stimulates the transport and utilization of glucose. Consequently, the concentration of glucose in the blood may fall significantly (Takahashi and Ide, 2000). The results obtained in the present study are in fairly good agreement with the effects reported on the concentration of certain metabolites in the blood, achieved by the consumption of an n-3 PUFA-enriched diet and by the changes provoked in the animal's lipid metabolism. Finally, the better utilization of the diet protein that is normally obtained when the diet consumed is supplemented with a fat rich in n-3 PUFA may be the reason why, in the present study, higher total protein levels were detected in the blood of the kid goats suckled by dams given the fat-supplemented diet than in that of those suckled by non-supplemented dams. This could be related, moreover, to the higher growth rates and to the higher muscle proportions recorded for the same animals. This effect, however, could also be provoked by the above-mentioned higher cellular sensitivity to insulin (Clarke, 2000).

## Acknowledgements

This study was supported financially by the Ministry of Science and Technology (Project INIA: RZ00-010-C3).

## References

- Alonso, L., Fontecha, J., Lozada, M., Fraga, J. and Juárez, M. 1999. Fatty acid composition of caprine milk: Major, branched-chain, and *trans* fatty acids. *Journal of Dairy Science* **82**: 878-884.
- Ashes, J. R., Gulati, S. K. and Scott, T. W. 1997. Potential to alter the content and composition of milk fat through nutrition. *Journal of Dairy Science* **80**: 2204-2212.
- Ashes, J. R., Siebert, B. D., Gulati, S. K., Cuthbertson, A. Z. and Scott, T. W. 1992. Incorporation of n-3 fatty acids of fish oil into tissue and serum lipids of ruminants. *Lipids* **27**: 629-631.
- Assman, G. 1979. Current diagnosis of hyperlipidemias. *Internist (Berlin)* **20**: 559-564.
- Barham, D. and Trinder, P. 1972. An improved colour reagent for the determination of blood glucose by the oxidase system. *Analyst* **97**: 142-145.
- Barlow, S. M., Young, F. V. K. and Duthie, I. F. 1990. Nutritional recommendations for n-3 polyunsaturated fatty acids and the challenge to the food industry. *Proceedings of the Nutrition Society* **49**: 13-21.
- Bernt, E. and Gruber, W. J. 1974. Enzymatic determination of total cholesterol in serum. *Zeitschrift für Klinische Chemie und Klinische Biochemie* **12**: 226-229.
- Boletín Oficial del Estado. 1988. [Royal decree of March 14: the protection of the animals used in experimentation and other scientific purposes.]
- Born, F. 1998.  $\omega$ -3 Products. from research to retail. *World Review of Nutrition and Dietetics* **83**: 166-175.
- Boza, J. 2002. *Los alimentos ecológicos*. International University of Andalusia. Association Headquarters, Plaza de Santa María, Jaén, Spain.
- Boza, J., Pérez, L. and Sanz Sampelayo, M. R. 2000. Producto y procedimiento de obtención de una grasa protegida para incluir en las dietas de los rumiantes. *Patente de invención no. 2.136.536*.
- Boza, J. and Sanz Sampelayo, M. R. 1997. Aspectos nutricionales de la leche de cabra. *Anales de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental* **10**: 109-139.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248-254.
- Burr, G. O. and Burr, M. M. 1929. A new deficiency disease produced by rigid exclusion of fat from the diet. *Journal of Biological Chemistry* **82**: 345-367.
- Chilliard, Y., Derlay, A., Rouel, J. and Lamberet, G. 2003. A review of nutritional and physiological factors affecting goat milk lipid synthesis and lipolysis. *Journal of Dairy Science* **86**: 1751-1770.
- Clarke, D. 2000. Polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription: a mechanism to improve energy balance and insulin resistance. *British Journal of Nutrition* **83**: (suppl. 1) 59-66.
- Demirel, G., Wachira, A. M., Sinclair, L. A., Wilkinson, R. G., Wood, J. D. and Enser, M. 2004. Effects of dietary n-3 polyunsaturated fatty acids, breed and dietary vitamin E on the fatty acids of lamb muscle, liver and adipose tissue. *British Journal of Nutrition* **91**: 551-565.
- Fawcett, J. K. and Scott, J. E. 1960. A rapid and precise method for the determination of urea. *Journal of Clinical Pathology* **13**: 156-159.
- Fernández, J. R., Rodríguez Osorio, M., Ramos, E., de la Torre, G., Gil Extremera, F. and Sanz Sampelayo, M. R. 2004. Effect of rumen-protected supplements of fish oil on intake, digestibility and nitrogen balance in growing goats. *Animal Science* **79**: 483-491.
- Folch, J., Lees, M. and Stanley, G. H. S. 1957. A simple method for the isolation and purification of lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry* **226**: 497-509.
- Food and Agriculture Organisation. 1994. Fats and oils in human nutrition. *Food and Nutrition paper no. 57*.
- Franklin, S. T., Martin, K. R., Baer, R. J., Schingoethe, D. J. and Hippen, A. R. 1999. Dietary marine algae (*Schizochytrium* sp.)

- increases concentrations of conjugated linoleic, docosahexaenoic and transvaccenic acids in milk of dairy cows. *Journal of Nutrition* **129**: 2048-2052.
- Gaiva, M. H. C., Couto, R. C., Oyama, L. M., Couto, G. E. C., Silveira, V. L. F., Riberio, E. B. and Nascimento, C. M. O. 2001. Polyunsaturated fatty acid-rich diets: effect on adipose tissue metabolism in rats. *British Journal of Nutrition* **86**: 371-377.
- Gulati, S. K., Ashes, J. R. and Scott, T. W. 1999. Hydrogenation of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids and their incorporation into milk fat. *Animals Feed Science and Technology* **79**: 57-64.
- Gulati, S. K., Kitesa, S. M., Ashes, J. R., Fleckm, E., Byers, E. B., Byers, Y. G. and Scott, T. W. 2000. Protection of conjugated linoleic acids from ruminal hydrogenation and their incorporation into milk fat. *Animal Feed Science and Technology* **86**: 139-149.
- Gulati, S. K., May, C., Wynn, P. C. and Scott, T. W. 2002. Milk fat enriched in n-3 fatty acids. *Animal Feed Science and Technology* **98**: 143-152.
- Haenlein, G. F. W. 1996. Nutritional value of dairy products of ewe and goat milk. In *Proceeding of the IDF/CIRVAL seminar: production and utilization of ewe and goat milk, Crete, vol. 9603*, pp. 159-178. International Dairy Federation Publication Brussels, Belgium.
- Haenlein, G. F. W. 2004. Goat milk in human nutrition. *Small Ruminant Research* **51**: 155-163.
- Haenlein, G. F. W. 2001. Past, present and future perspectives of small ruminant research. *Journal of Dairy Science* **84**: 2097-2115.
- Innis, S. 1991. Essential fatty acids on growth and development. *Progress in Lipid Research* **30**: 39-103.
- Jenkins, T. C. and Palmquist, D. L. 1984. Effect of fatty acids or calcium soaps on rumen and total nutrient digestibility of dairy rations. *Journal of Dairy Science* **67**: 978-986.
- Kitesa, S. M., Gulati, S. K., Ashes, J. R., Fleck, E., Scott, T. W. and Nichols, P. D. 2001. Utilisation of fish oil in ruminants. II Transfer of fish oil fatty acids into goats' milk. *Animal Feed Science and Technology* **89**: 201-208.
- Koditscheck, J. K. and Umbreit, W. W. 1969. Alpha-glycerophosphate oxidase in *Streptococcus faecium* F 24. *Journal of Bacteriology* **98**: 1063-1068.
- Kromhout, D. 1989. Fish (oil) consumption and coronary heart disease. In *Dietary  $\omega$ 3 and  $\omega$ 6 fatty acids. Biological effects and nutritional essentiality* (ed. C. Galli and A. P. Simopoulos), pp. 273-282. Plenum Publishing, New York.
- Lasky, F. D., Li, Z. M., Shaver, D. D., Savory, J., Savory, M. G., Willey, D. G., Mikolak, B. J. and Lantry, C. L. 1985. Evaluation of a bromocresol purple method for the determination of albumin adapted to the DuPont aca discrete clinical analyzer. *Clinical Biochemistry* **18**: 290-296.
- Matsubara, C., Neshikawa, Y., Yoshida, Y. and Tateamura, K. 1983. A spectrophotometric method for the determination of free fatty acid in serum using acyl-coenzyme A synthetase and acyl-coenzyme A oxidase. *Analytical Biochemistry* **130**: 128-133.
- Morand-Fehr, P., Bas, P., Rozeau, A. and Hervieu, J. 1985. Development and characteristics of adipose deposits in male kids during growth from birth to weaning. *Animal Production* **41**: 349-357.
- Morand-Fehr, P., Sanz Sampelayo, M. R., Fedele, Y. V., Le Frioux, Y., Eknaes, M., Schmidely, P. H., Giger Reverdin, S., Bas, P., Rubino, R., Havrevoll, O. and Sauvant, D. 2000. Effect of feeding on the quality of goat milk and cheeses. *Proceedings of the seventh international conference on goats, Tours, France, vol. 1*, pp. 53-58.
- Noakes, M., Nestel, P. J. and Clifton, P. M. 1996. Modifying the fatty acid profile of dairy products through, feed lot technology lowers plasma cholesterol of humans consuming the products. *American Journal of Clinical Nutrition* **63**: 42-46.
- Sanz Sampelayo, M. R., Allegretti, L., Ruiz Mariscal, I., Gil Extremera, F. and Boza, J. 1995. Dietary factors affecting the maximum feed intake and the body composition of pre-ruminant kid goats of the Granadina breed. *British Journal of Nutrition* **74**: 335-345.
- Sanz Sampelayo, M. R., Martín Alonso, J. J., Pérez, L., Gil Extremera, F. and Boza, J. 2004. Dietary supplements for lactating goats by polyunsaturated fatty acid-rich protected fat. Effects after supplement withdrawal. *Journal of Dairy Science* **87**: 1796-1802.
- Sanz Sampelayo, M. R., Pérez, L., Martín Alonso, J. J., Amigo, L. and Boza, J. 2002a. Effects of concentrations of protein and fat in milk replacers on protein utilization in kid goats. *Small Ruminant Research* **43**: 141-148.
- Sanz Sampelayo, M. R., Pérez, L., Martín Alonso, J. J., Gil Extremera, F. and Boza, J. 2002b. Effects of concentrates with different contents of protected fat rich in PUFAs on the performance of lactating Granadina goats. 1. Feed intake, nutrient digestibility, N and energy utilisation for milk production. *Small Ruminant Research* **43**: 133-139.
- Sanz Sampelayo, M. R., Ruiz Mariscal, I., Gil Extremera, F. and Boza, J. 1997. The effect of different concentrations of protein and fat in milk replacers on protein utilization in kid goats. *Animal Science* **64**: 485-492.
- Schauff, D. J. and Clark, J. H. 1989. Effect of prilled fatty acids and calcium salts of fatty acids on rumen fermentation, nutrient digestibilities, milk production and milk composition. *Journal of Dairy Science* **72**: 917-927.
- Scollan, N. G., Choi, N. J., Kurt, E., Fisher, A. V., Enser, M. and Wood, J. D. 2001. Manipulation of the fatty acid composition of muscle and adipose tissue in beef cattle. *British Journal of Nutrition* **85**: 115-124.
- Scollan, N. D., Enser, M., Gulati, S. K., Richardson, I. and Wood, J. D. 2003. Effects of including a ruminally protected lipid supplement in the diet on the fatty acid composition of beef muscle. *British Journal of Nutrition* **90**: 709-716.
- Steel, R. G. D. and Torrie, J. H. 1984. *Principles and procedures of statistics: a biometrical approach, fourth edition*. McGraw-Hill, Singapore.
- Su, W. and Jones, P. J. H. 1993. Dietary fatty acid composition influences energy accretion in rats. *Journal of Nutrition* **123**: 2109-2114.
- Sukhija, P. S. and Palmquist, D. L. 1990. Dissociation of calcium soaps of long-chain fatty acids in rumen fluid. *Journal of Dairy Science* **73**: 1784-1787.
- Takahashi, Y. and Ide, T. 2000. Dietary n-3 fatty acids affect mRNA level of brown adipose tissue uncoupling protein 1, and white adipose tissue leptin and glucose transporter 4 in rat. *British Journal of Nutrition* **84**: 175-184.
- Wachira, A. M., Sinclair, L. A., Wilkinson, R. G., Enser, M., Wood, J. D. and Fisher, A. V. 2002. Effects of dietary fat source and breed on the carcass composition, n-3 polyunsaturated fatty acid and conjugated linoleic acid content of sheep meat and adipose tissue. *British Journal of Nutrition* **88**: 697-709.
- Wren, T. R., Weyaut, J. R., Wood, D. L., Bitman, J., Rawlings, R. M. and Lyon, E. 1976. Increasing polyunsaturation of milk fat by feeding formaldehyde protected sunflower-soyabean supplement. *Journal of Dairy Science* **59**: 627-635.

(Received 28 November 2005—Accepted 31 January 2006)

### **5.5. Efecto de la utilización de un concentrado suplementado con una grasa rica en ácidos grasos poliinsaturados n-3 sobre la capacidad reproductora de la cabra de raza malagueña.**

FERNÁNDEZ, J.R.<sup>1</sup>; SÁNCHEZ, A.<sup>2</sup>; MICHEO, J.M.<sup>2</sup>; RAMOS MORALES, E.<sup>1</sup>.  
Y SANZ SAMPELAYO, M.R.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Unidad de Nutrición Animal. Estación Experimental del Zaidín. CSIC. Profesor Albareda, 1, 18008. Granada.

<sup>2</sup> Asociación Española de criadores de la cabra malagueña. El Pozuelo, 29160. Casabermeja, Málaga.

#### **RESUMEN**

Con objeto de determinar los efectos que la suplementación de la dieta con aceite de pescado, protegido frente al metabolismo ruminal, rico en PUFA n-3 tiene sobre la capacidad reproductiva de la cabra, se llevaron a cabo unos ensayos en hembras de la raza malagueña, las cuales eran mantenidas en condiciones de explotación semiextensiva, alimentándose en pesebre con un concentrado suplementado o no con un 5% de la grasa indicada desde 20 días antes de la cubrición hasta 45 días después del parto. Resultó una tasa de fertilidad igual en ambos grupos (86,7%), mientras que los animales que tomaron la dieta suplementada mostraron una tasa de prolificidad bastante mayor (2,17 frente a 1,77), observándose además, un posible efecto de sincronización del parto. Al mismo tiempo se deducía que la composición de la grasa utilizada, establecía el perfil en ácidos grasos del plasma de los animales, lo que hacía suponer que los efectos logrados a nivel reproductivo dependían de la composición específica de la grasa, aunque no podía descartarse la existencia de un efecto producido por un distinto estatus energético.

**Palabras clave:** Ácidos grasos poliinsaturados n-3, reproducción, suplementación, cabra.

## INTRODUCCIÓN

La suplementación de dietas con aceite de pescado o sales cálcicas ricas en aceite de pescado a vacas y ovejas en lactación suele mejorar las tasas de concepción (O'Callaghan and Bolland, 1999; Mattos *et al.*, 2002) e incrementar las posibilidades de supervivencia del embrión (Staples *et al.*, 1998; Petit *et al.*, 2002). Los mecanismos por los que la grasa de una dieta puede llegar a mejorar la capacidad reproductora del animal no son aún bien conocidos, habiéndose postulado al respecto distintas hipótesis. En primera instancia, la suplementación puede suponer una mejora en el estatus energético, lo que determina que después del parto, el animal entre antes en celo, esto repercutiría de manera positiva sobre la fertilidad. Además los precursores de las prostaglandinas y de las hormonas esteroideas son diferentes ácidos grasos (Petit *et al.*, 2002), por lo que es lógico suponer que una suplementación de la dieta con grasa puede afectar a la capacidad reproductiva del animal en razón de su composición específica. Dado que estos aspectos no han sido estudiados en la especie caprina, se presentan aquí unos resultados obtenidos en hembras de la raza malagueña, analizándose para ambos grupos de animales los índices de fertilidad y prolificidad junto al perfil en ácidos grasos del plasma a los 45 días de la gestación y a los 30 días del parto.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Dos lotes de quince cabras de raza malagueña, mantenidos bajo un régimen semiextensivo, fueron alimentados en pesebre con un concentrado compuesto por altramuza, avena y maíz. Este concentrado se suplementaba para uno de los lotes con un 5% de aceite de pescado rico en PUFA n-3 protegida en forma de sales cálcicas, desde 20 días antes de la cubrición hasta 45 días después del parto. Se realizaron ecografías antes de la cubrición y se repitieron a los 45 días de gestación. Se tomaron muestras de sangre en vacutainers con heparina a los 45 días de gestación y a los 30 días después del parto, para posteriormente separar el plasma mediante centrifugación en frío a 2.600 rpm. Con los correspondientes kits se determinaron aquellos parámetros hemáticos que están relacionados con

aspectos reproductivos o del metabolismo energético, estableciéndose igualmente la composición en ácidos grasos del plasma, la cual se determinó mediante cromatografía de gases.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 1, se presentan los diferentes resultados obtenidos en relación con la capacidad reproductora, destacando la diferencia encontrada en el índice de prolificidad (número de animales vivos nacidos de cada madre), valor que resultaba más alto para el lote de animales suplementados con el aceite de pescado protegido (2,17 frente a 1,77). El índice de fertilidad (% de animales que quedan gestantes) resultó ser idéntico para ambos lotes (86,7%). También se observó un posible efecto de sincronización del parto, medido por el número de días por lote entre el primer y el último parto. El peso medio al nacimiento de los cabritos fue no diferente entre ambos grupos (3,26 frente a 3,38).

**Tabla 1.- Fertilidad, Prolificidad y amplitud entre partos según el tipo de concentrado consumido**

| Concentrado  | Hembras gestantes | Abortos | Partos triples | Patos dobles | Partos simples | Cabritos nacidos | Amplitud entre partos |
|--------------|-------------------|---------|----------------|--------------|----------------|------------------|-----------------------|
| Estándar     | 13                | -       | 1              | 8            | 4              | 23               | 18 días               |
| Suplementado | 13                | 1       | 5              | 4            | 3              | 26               | 9 días                |

En la tabla 2, se muestra el efecto del tipo concentrado consumido y del momento de toma de muestra (45 días después de gestación y a los 30 días del parto) sobre los niveles séricos de progesterona,  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , colesterol, HDL-colesterol, triglicéridos, glucosa, ácidos grasos no esterificados y  $\beta$ -hidroxibutirato. Los valores de progesterona fueron menores para el lote de animales suplementados con la grasa, a pesar de obtenerse niveles más altos de colesterol junto a unos no diferentes de HDL-colesterol. Esto

demuestra que, en estos animales, la concentración de colesterol no es un factor limitante como precursor de la progesterona. También se observa, que después del parto los niveles de PGF2 $\alpha$  aumentan para ambos grupos, siendo en este momento superior la concentración en el grupo de animales que ingirió la dieta estándar ( $P < 0,001$ ). La menor concentración de PGF2 $\alpha$  en el plasma de los animales que tomaron el aceite de pescado se explica por el incremento de PUFA n-3 en plasma que podría propiciar una mayor síntesis de PG de la serie 3, que compiten con las de la serie 2. La posible mayor concentración de PGF3 $\alpha$ , pudo influir sobre la viabilidad embrionaria, resultando la prolificidad más alta.

En la tabla 3, se muestra el perfil en ácidos grasos del plasma de los animales 45 días después de la cubrición y a los 30 días del parto, aspecto que refleja claramente la composición de la grasa de la dieta, detectándose para el grupo que consumía el concentrado suplementado unos niveles más altos de PUFA n-3. Estos datos confirman que la grasa estaba bien protegida y que la asimilación de los PUFA n-3 por los animales era óptima.

## **CONCLUSIONES**

Cuando se administra una dieta suplementada con una grasa al rumiante, la ingesta energética depende de la naturaleza, de la composición y del grado de protección de la grasa suplementada. Suponiendo que la ingesta de materia seca fue similar en ambos grupos (Fernández y col., 2004), y teniendo en cuenta los resultados obtenidos sobre la composición del perfil en ácidos grasos del plasma de las cabras, así como de la respuesta reproductora, resulta lógico concluir que los resultados obtenidos son consecuencia de la naturaleza de la grasa empleada en la suplementación.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- O'CALLAGHAN, D. Y BOLAND, M.P., 1999. Nutritional effects on ovulation, embryo development and the establishment of pregnancy in ruminants. *Animal Science*, 68, 299-314.
- MATTOS, R.; STAPLES C.R.; J. WILLIAMS; A. AMOROCHO; M.A. MCGUIRE; Y W.W. THACHER, 2002. Uterine, Ovarian, and production responses of lactating dairy cows to increasing dietary concentrations of Menhaden Fish meal. *Journal of Dairy Science* 85, 755-764.
- PETIT H.V.; R.J. DEWHURST; N.D. SCOLLAN; J.G. PROULX; M. KHALID; W. HARESIGN; H. TWAGIRAMUNGU Y G.E. MANN, 2002. Milk production and composition, ovarian function, and prostaglandin secretion of dairy cows fed omega-3 fats. *J. Dairy Science* 85: 889-899.
- STAPLES,C.R., BURKE,J.M. Y THATCHER,W.W., 1998. Influence of supplemental fat on reproductive tissues and performance of lactating cows. *Journal of Dairy Science*, 81: 856-871.

### **Utilization of a concentrate non-supplemented or supplemented with a n-3 polyunsaturated fatty acids-rich fat. effect on reproductive capability of the goats of malagueña breed.**

#### SUMMARY

With the aim of determining the effects that n-3 PUFA-rich fat have on reproductive capability, an experiment was carried out with Malagueña goats. The animals were maintained under semiextensive conditions being indoor fed with a concentrate non-supplemented or supplemented with 5% of fat from one month before gestation to 45 days after kidding. The pregnancy rate was equal for both groups (86.7%). However, the prolificacy rate was higher for the supplemented animals (2.17 versus 1.77). In the last case was also observed a kidding synchronization effect. It was also deduced the composition of used fat determined that of the animal plasma. So, it was supposed that the effects on reproductive efficiency depended on the specific composition of the fat. However a possible effect of the animal energy status can not be rejected.

**Tabla 2.- Efecto del tipo concentrado consumido y momento de toma de muestra sobre los niveles séricos de progesterona ( $\mu\text{g/ml}$ ), prostaglandinas  $F_{2a}$  ( $\text{PGF}_{2a}$ ,  $\mu\text{g/ml}$ ), colesterol ( $\text{mmol/l}$ ), HDL-colesterol ( $\text{mmol/l}$ ), triglicéridos ( $\text{mmol/l}$ ), glucosa ( $\text{mmol/l}$ ), ácidos grasos no esterificados (AGNE;  $\text{mmol/l}$ ) y  $\beta$ -hidroxibutirato ( $\text{mmol/l}$ ).**

|                          | © Estándar |        | © Suplementado |        | DER   | Nivel de significación |     |       |
|--------------------------|------------|--------|----------------|--------|-------|------------------------|-----|-------|
|                          | $M_1$      | $M_2$  | $M_1$          | $M_2$  |       | ©                      | (M) | © x M |
| Progesterona             | 7,27       | 0,81   | 5,33           | 0,69   | 0,63  | ***                    | *** | **    |
| $\text{PGF}_{2a}$        | 350,27     | 570,72 | 352,37         | 460,04 | 38,30 | **                     | *** | **    |
| Colesterol               | 2,879      | 2,171  | 3,296          | 2,600  | 0,38  | **                     | *** | NS    |
| HDL-colesterol           | 1,875      | 1,491  | 1,714          | 1,642  | 0,66  | NS                     | **  | *     |
| Triglicéridos            | 0,181      | 0,102  | 0,202          | 0,143  | 0,05  | *                      | *** | NS    |
| Glucosa                  | 2,396      | 1,094  | 2,089          | 1,091  | 0,23  | *                      | *** | *     |
| AGNE                     | 0,386      | 0,438  | 0,439          | 0,336  | 0,07  | NS                     | NS  | ***   |
| $\beta$ -hidroxibutirato | 0,719      | 0,622  | 0,793          | 0,536  | 0,21  | NS                     | **  | NS    |

$M_1$ : 45 días de gestación;  $M_2$ : 30 días post-parto; DER: desviación estándar residual; ©: Concentrado; M: Momento;

NS: No significativo; \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$

**Tabla 3.- Efecto del tipo concentrado y del momento de toma de muestra sobre el perfil en AG (%) del plasma**

| (%)      | © Estándar     |                | © Suplementado |                | DER  | Nivel de significación |     |       |
|----------|----------------|----------------|----------------|----------------|------|------------------------|-----|-------|
|          | M <sub>1</sub> | M <sub>2</sub> | M <sub>1</sub> | M <sub>2</sub> |      | ©                      | M   | © x M |
| C14:0    | 2,35           | 0,78           | 1,64           | 0,80           | 0,27 | ***                    | *** | ***   |
| C16:0    | 27,81          | 24,53          | 25,41          | 22,86          | 3,67 | NS                     | **  | **    |
| C16:1    | 4,66           | 4,80           | 3,22           | 5,72           | 1,29 | NS                     | **  | **    |
| C18:0    | 20,07          | 23,83          | 18,04          | 17,92          | 1,90 | ***                    | **  | **    |
| C18:1    | 18,43          | 20,58          | 15,87          | 15,94          | 1,82 | ***                    | *   | NS    |
| C18:1t   | 2,94           | 2,68           | 7,68           | 7,50           | 1,55 | ***                    | NS  | NS    |
| C18:2    | 11,78          | 14,10          | 13,37          | 14,73          | 2,57 | NS                     | *   | NS    |
| C18:3    | 2,52           | 1,51           | 2,19           | 1,38           | 0,46 | NS                     | *** | NS    |
| C20:0    | 5,67           | 2,31           | 4,35           | 2,80           | 0,11 | NS                     | *** | **    |
| C20:4    | 2,49           | 3,86           | 2,39           | 2,72           | 0,92 | *                      | **  | NS    |
| C20:5    | 0,00           | 0,00           | 2,73           | 2,86           | 0,93 | ***                    | NS  | NS    |
| C22:5    | 1,28           | 1,03           | 1,17           | 1,36           | 0,61 | NS                     | NS  | NS    |
| C22:6    | 0,00           | 0,00           | 1,75           | 3,54           | 0,71 | ***                    | *** | ***   |
| AGS      | 55,90          | 51,45          | 49,65          | 44,29          | 3,48 | ***                    | *** | NS    |
| AGM      | 26,03          | 28,05          | 26,77          | 29,16          | 2,49 | NS                     | **  | NS    |
| PUFA     | 18,08          | 19,58          | 23,58          | 26,59          | 3,91 | ***                    | NS  | NS    |
| PUFA n-6 | 14,27          | 17,96          | 15,75          | 17,46          | 2,98 | NS                     | **  | NS    |
| PUFA n-3 | 3,80           | 2,54           | 7,83           | 9,14           | 1,82 | ***                    | NS  | *     |

M<sub>1</sub>: 45 días de gestación; M<sub>2</sub>: 30 días post-parto; DER: desviación estándar residual; ©: Concentrado; M: Momento;

NS: No significativo; \* P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\*P < 0,001



### **5.6. Composición al nacimiento de cabritos cuyas madres fueron alimentadas con un concentrado suplementado con una grasa protegida rica en ácidos grasos poliinsaturados n-3.**

FERNÁNDEZ, J.R.<sup>1</sup>; SÁNCHEZ, A.<sup>2</sup>; MICHEO, J.M.<sup>2</sup>; DE LA TORRE ADARVE<sup>1</sup>, G. Y SANZ SAMPELAYO, M.R.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Unidad de Nutrición Animal. Estación Experimental del Zaidín. CSIC. Profesor Albareda, 1, 18008. Granada.

<sup>2</sup> Asociación Española de criadores de la cabra malagueña. El Pozuelo, 29160. Casabermeja, Málaga.

#### **RESUMEN**

Cabras de raza malagueña recibieron durante toda la gestación un concentrado suplementado con sales cálcicas de aceite de pescado ricas en PUFA n-3 y se sacrificaron los cabritos al nacimiento con el objeto de conocer si dicha suplementación quedaba reflejada en el perfil en ácidos grasos de los diferentes tejidos de los neonatos. En los cabritos nacidos de madres que tomaron la dieta suplementada se observó un incremento en el perfil de PUFA n-3 en determinados órganos (cerebro, timo, bazo, testículos, hígado y corazón), así como en los depósitos de grasa mesentérica, epiplónica y riñonada. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto la existencia de un paso selectivo a través de la placenta favorable a estos ácidos grasos y que su suplementación durante la gestación puede suplir deficiencias y mejorar la composición al nacimiento de los cabritos.

**Palabras clave:** ácidos grasos poliinsaturados n-3, composición órganos, cabritos.

## INTRODUCCIÓN

Los ácidos grasos esenciales y sus derivados poliinsaturados de larga cadena desempeñan un papel crucial en el desarrollo fetal. Varios estudios ponen de manifiesto la importancia que tiene la nutrición materna durante el período de la gestación sobre el desarrollo del feto, de forma que al nacimiento existe una relación directa entre el estatus en PUFA de la madre y del recién nacido. El feto capta 50-60 mg/d de PUFA n-3 durante el último trimestre de gestación, aproximadamente un 4-5% de la energía requerida. Para que exista un equilibrio adecuado, la madre gestante debería ingerir alrededor de 100 mg/d de estos ácidos grasos (Uauy *et al.*, 1992). Según Uauy y colaboradores, hasta un total de 600 g de ácidos grasos esenciales son transferidos en humanos de la madre al feto durante una gestación completa, aproximadamente una media de 2.2 g al día. Estudios recientes con isótopos estables demuestran que el feto es capaz de formar ácido araquidónico y docosahexaenoico a partir de ácido linoleico y linolenico respectivamente, aunque ésta síntesis ocurre de forma muy lenta e insuficiente para las elevadas necesidades del feto (Uauy *et al.*, 2000). En este sentido, es prácticamente nula la información referente a lo que sucede en la especie caprina, presentándose en este trabajo resultados obtenidos en cabras de raza malagueña.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Dos lotes de 15 cabras de raza malagueña, mantenidos bajo un régimen semiextensivo, fueron alimentados con un concentrado compuesto de altramuza, avena y maíz, además del forraje que tomaban en el campo. El concentrado fue suplementada con 0 (control) o con un 5% (materia seca) de grasa protegida en forma de sales cálcicas de los correspondientes ácidos grasos rica en PUFA n-3. Dos lotes de seis cabritos machos fueron retirados de las madres justo al nacimiento para ser sacrificados. El cerebro, timo, bazo, testículos, hígado y corazón; así como los depósitos de grasa mesentérica, epiplónica y riñonada fueron separados, pesados y congelados a -20° C. Para determinar la composición en ácidos grasos de estos órganos y depósitos lipídicos, los ésteres metílicos de los ácidos

grasos fueron separados por cromatografía de gases en un autosistema Perkin-Elmer Corp., Norwalk, CT con una columna capilar de 30m x 0.25mm d.i. y 0.25 µm de película (Tracer, Tecknocroma, Barcelona, España), equipado con un detector de ionización de llama.

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 1. Los pesos de los depósitos de grasa riñonada resultaban más altos para los cabritos nacidos de madres que tomaron la dieta suplementada, esto supone una clara ventaja, puesto que, además de incrementarse el reservorio lipídico del animal, este suele ser uno de los parámetros indicativos del engrasamiento a nivel de la canal. Igualmente, encontramos diferencias significativas en la composición en PUFA n-3 de los depósitos de grasa riñonada, epiplónica y mesentérica, mejorándose la composición de la grasa almacenada para su utilización metabólica por el animal.

Koletzko y Braun (1991), indican que durante el desarrollo fetal, el ácido araquidónico (C20:4 n-6) puede actuar como promotor del crecimiento, por lo tanto, se podría suponer que la suplementación con n-3 afectaría negativamente al crecimiento del feto, puesto que ambas familias de ácidos grasos compiten por las mismas enzimas desaturasas. En nuestro caso, el peso de los cabritos al nacimiento, resultó no diferente (3,26 frente a 3,38 Kg) para ambos grupos y el de sus órganos tampoco presentó diferencias, excepto para el timo y los testículos. Los testículos del grupo control pesaban más, pudiendo deberse esta diferencia a que su composición presentaba una mayor cantidad de ácido araquidónico. El caso del timo es opuesto, resultando su peso relativo superior para los cabritos nacidos de madres suplementadas, pudiendo este hecho tener relación con una posible potenciación de la respuesta inmune (Gómez *et al.*, 2003).

En cuanto al perfil en PUFA, se observan claras diferencias, determinando el consumo del aceite de pescado un incremento en los de la serie n-3 en todos los órganos a excepción de los testículos.

**Tabla 1. Efecto del tipo de concentrado sobre el peso y el porcentaje en PUFA n-6 (C18:2 y C20:4) y PUFA n-3 (C18:3, C20:5, C22:6) de los órganos de los cabritos al nacimiento.**

|                                |                | 1     | 2     | DER  | Significación |
|--------------------------------|----------------|-------|-------|------|---------------|
| Peso vivo de los cabritos (Kg) |                | 3,26  | 3,38  | 0,23 | NS            |
| Grasa riñonada                 | Peso (g)       | 14,87 | 20,10 | 3,20 | *             |
|                                | PUFA n-6       | 1,16  | 1,02  | 0,62 | NS            |
|                                | PUFA n-3       | 0,67  | 1,41  | 0,36 | **            |
| Grasa epiplónica               | Peso (g)       | 5,40  | 6,77  | 1,17 | NS            |
|                                | PUFA n-6       | 1,16  | 1,02  | 0,62 | NS            |
|                                | PUFA n-3       | 0,67  | 1,41  | 0,36 | **            |
| Grasa mesentérica              | Peso (g)       | 12,47 | 10,33 | 1,35 | *             |
|                                | PUFA n-6       | 2,09  | 2,27  | 0,71 | NS            |
|                                | PUFA n-3       | 1,20  | 2,05  | 0,29 | ***           |
| Bazo                           | Peso (g/Kg pv) | 1,15  | 1,11  | 0,11 | NS            |
|                                | PUFA n-6       | 12,14 | 10,45 | 2,21 | NS            |
|                                | PUFA n-3       | 6,69  | 8,81  | 1,23 | *             |
| Timo                           | Peso (g/Kg pv) | 0,68  | 1,75  | 0,31 | ***           |
|                                | PUFA n-6       | 6,98  | 6,79  | 4,07 | NS            |
|                                | PUFA n-3       | 3,07  | 5,93  | 1,68 | *             |
| Testículos                     | Peso (g/Kg pv) | 1,68  | 1,35  | 0,17 | **            |
|                                | PUFA n-6       | 1,96  | 1,23  | 0,42 | *             |
|                                | PUFA n-3       | 1,53  | 1,68  | 0,24 | NS            |
| Cerebro                        | Peso (g/Kg pv) | 16,19 | 17,35 | 1,46 | NS            |
|                                | PUFA n-6       | 29,40 | 27,18 | 0,67 | ***           |
|                                | PUFA n-3       | 17,82 | 20,81 | 0,78 | ***           |
| Hígado                         | Peso (g/Kg pv) | 21,83 | 24,34 | 4,19 | NS            |
|                                | PUFA n-6       | 7,08  | 6,94  | 1,58 | NS            |
|                                | PUFA n-3       | 4,49  | 8,83  | 1,14 | ***           |
| Corazón                        | Peso (g/Kg pv) | 7,71  | 7,49  | 1,23 | NS            |
|                                | PUFA n-6       | 3,35  | 5,02  | 1,21 | *             |
|                                | PUFA n-3       | 1,51  | 3,11  | 0,50 | ***           |

1: Dieta estándar; 2: dieta suplementada; DER: desviación estándar residual; NS: No significativo; \* P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\*P < 0,001; pv: peso vivo.

**Tabla 2. Perfil en ácidos grasos (%) del cerebro al nacimiento.**

|       | 1     | 2     | DER  | Significación |
|-------|-------|-------|------|---------------|
| C14:0 | 1,10  | 0,93  | 0,08 | **            |
| C16:0 | 23,85 | 22,68 | 0,32 | ***           |
| C16:1 | 2,19  | 1,93  | 0,13 | **            |
| C18:0 | 4,20  | 4,73  | 0,34 | *             |
| C18:1 | 19,53 | 20,01 | 0,26 | **            |
| C18:2 | 25,07 | 24,22 | 0,54 | *             |
| C20:1 | 1,91  | 1,73  | 0,15 | NS            |
| C20:4 | 1,24  | 0,59  | 0,36 | **            |
| C20:5 | 6,73  | 6,27  | 0,31 | *             |
| C22:4 | 3,09  | 2,37  | 0,22 | ***           |
| C22:5 | 1,02  | 1,71  | 0,23 | ***           |
| C22:6 | 10,08 | 12,83 | 0,42 | ***           |
| AGS   | 29,15 | 28,34 | 0,23 | ***           |
| AGM   | 23,63 | 23,67 | 0,29 | NS            |
| PUFA  | 47,22 | 47,99 | 0,35 | **            |

1: Dieta estándar; 2: dieta suplementada; DER: desviación estándar residual;

NS: No significativo; \* P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\*P < 0,001; pv: peso vivo.

**Tabla 3. Niveles séricos de glucosa (mmol/l), triglicéridos (mmol/l), colesterol (mmol/l), HDL-colesterol (mmol/l), ácidos grasos no esterificados (AGNE; mmol/l), albúmina (mg/dl), proteínas totales (mg/dl) y urea (mmol/l).**

|                   | 1      | 2      | DER  | Significación |
|-------------------|--------|--------|------|---------------|
| Glucosa           | 3,142  | 7,260  | 1,84 | **            |
| Triglicéridos     | 0,537  | 0,738  | 0,89 | NS            |
| Colesterol        | 1,436  | 1,283  | 0,47 | NS            |
| HDL-colesterol    | 0,517  | 0,445  | 0,21 | NS            |
| AGNE              | 1,103  | 1,062  | 0,47 | NS            |
| Albúmina          | 20,745 | 21,672 | 1,90 | NS            |
| Proteínas totales | 52,901 | 57,400 | 7,57 | NS            |
| Urea              | 6,921  | 12,800 | 0,47 | ***           |

1: Dieta estándar; 2: dieta suplementada; DER: desviación estándar residual;

NS: No significativo; \* P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\*P < 0,001

En la tabla 3 se observaron diferencias significativas en la cantidad de glucosa en plasma. Es lógico suponer que esta diferencia se debe al aporte de nutrientes que recibieron los fetos a través de la placenta según la dieta ingerida por las madres. La mayor cantidad de grasa que tomaron las madres del lote experimental, y naturaleza de la misma, pudo originar en el feto, tal y como ocurre en el adulto, un ahorro de glucosa (Grummer y Carroll, 1991), lo que pudo determinar que el nivel detectado en sangre de glucosa, resultara más alto en los cabritos del grupo experimental.

La mayor cantidad de grasa disponible por el feto, también pudo determinar una mejor utilización de los aminoácidos y péptidos que atraviesan la placenta para la retención de proteína. Este hecho conocido como el ahorro de proteína debido a la ingesta de grasa ya fue demostrado en el cabrito (Sanz Sampelayo *et al.*, 1997). En este sentido, el nivel de proteínas totales y urea, resultaban más altos en el plasma de los cabritos nacidos de las madres que tomaron el suplemento de aceite de pescado, aunque solo en la urea se detectó una diferencia significativa.

### CONCLUSIONES

La suplementación con aceite de pescado contribuye a mejorar el engrasamiento de la canal a nivel de la grasa riñonada. Por otra parte, la alimentación de las madres influye en la composición de los distintos tejidos y órganos del animal al nacimiento. La suplementación durante la gestación con sales cálcicas de aceite de pescado es positiva no solo por el incremento energético que supone para el animal gestante, también por determinar la composición de los depósitos grasos y del cerebro, timo, bazo, hígado y corazón, pudiendo se esta base de una posible mejora de las funciones fisiológicas en las que intervienen dichos órganos.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- UAUY, R.; BIRCH, E. Y BIRCH, D., 1992. Visual and brain function measurements in study of n-3 fatty acid requirements of infants. *Journal of Pediatrics*, (120), 168-180.
- UAUY, R.; MENA, P. Y ROJAS, C., 2000. Essential fatty acids in early life: structural and functional role. *Proceedings of the Nutrition Society*, (59), 3-15.
- KOLETZKO, B. Y BRAUN, M., 1991. Araquidonic acid and early human growth: is there a relation?. *Ann. Nutr. Metab*, 35(3) 128-131.
- CRAWFORD, M.A., 1993. The role of essential fatty acids in neuronal development: implications for perinatal nutrition. *Am. J. Clin Nutr*, 57(5 Suppl.) 703S- 709S.

#### **Body composition at birth of kid goats born of dams fed with a concentrate supplemented with n-3 polyunsaturated fatty acids rich protected.**

#### SUMMARY

Goats of malagueña breed were fed during the gestation period with a concentrated supplemented or not with a polyunsaturated fatty acids (PUFA) rich fat. The kid goats were slaughtered at birth and the fatty acids composition of different tissues and organs were established. Versus control animals, those which were born from the supplemented goats showed an enrichment in n-3 PUFA in determined organs (brain, thymus, spleen, testicles, liver and heart), as well as in the mesenteric, epiploic, and kidney fat deposits. The results that were obtained revealed the existence of a selective moving across the placenta of the w-3 PUFA. So, the supplementation during gestation with these kind of fatty acids may be beneficial for the body composition of the newborn.



## 6. Discusión General

---



En este estudio se han abordado diferentes efectos producidos por la utilización metabólica y fisiológica de los PUFA n-3, con el objeto de aclarar ciertos aspectos poco estudiados hasta el momento y comprobar la viabilidad de introducir en el mercado un suplemento de aceite de pescado protegido contra la biodegradabilidad ruminal, que genere dos nuevos productos: leche de cabra y canal de cabrito enriquecidas de forma natural en PUFA n-3 con un perfil lipídico funcional para la salud humana.

En los artículos 5.1 y 5.2 se muestran los resultados obtenidos sobre el efecto que produce la suplementación de la dieta con el aceite de pescado obtenido en Harinas de Andalucía, SL (Tarifa) en algunos parámetros del sistema inmune frente a infecciones por nematodos y en los procesos de termogénesis relacionados con el balance energético. Aspectos que se deben tener en cuenta al suplementar la dieta con este tipo de grasa. Se emplearon ratas Wistar como modelo animal por ser el adecuado para controlar el mayor número de factores implicados y porque nos permitía realizar los ensayos con un número de animales estadísticamente óptimo. Los resultados obtenidos determinaron que los PUFA n-3 ejercen un efecto positivo sobre la respuesta inmune y que intervienen decisivamente en el mantenimiento del balance energético.

A partir de estos resultados, el aceite de pescado se protegió frente al metabolismo ruminal en forma de jabones cálcicos para ser incorporado en la dieta de rumiantes. En el artículo 5.3 se estudió el efecto de la dieta sobre la ingesta y la digestibilidad de la dieta, como estudio de viabilidad para obtener exitosamente una leche y una canal enriquecida en PUFA n-3. Para asegurarnos de que la grasa estaba bien protegida y que iba a ser bien aprovechada por el animal, se realizaron ensayos de balance y digestibilidad, resultando la ingesta no afectada por la suplementación ( $P > 0,05$ ) y la digestibilidad aparente de los componentes de la dieta muy favorable a nuestro propósito.

Una vez contrastados los efectos de nuestro aceite de pescado sobre el sistema inmune, el balance energético, la ingesta y la digestibilidad, realizamos un ensayo en una explotación ganadera con el objeto de

## 6. Discusión General

---

producir de forma natural una leche y una canal con una composición lipídica mejorada para el consumidor. Para que el producto final fuese rentable era necesario comprobar que la suplementación no afectaba negativamente la capacidad reproductora de los animales (artículo 5.5), ni al desarrollo y crecimiento de los cabritos (artículo 5.4). En este sentido, se obtuvo un índice de prolificidad superior ( $P < 0,05$ ) en el grupo de animales que recibieron la suplementación y una tasa de crecimiento superior ( $P < 0,05$ ), para los cabritos gestados y amamantados por la madres que habían tomado el aceite de pescado.

Una vez obtenida una leche enriquecida en PUFA n-3 (artículo 5.4) se estudió la composición al nacimiento de los cabritos (artículo 5.6) para contrastar el efecto de la suplementación de la dieta de las madres sobre el feto y el desarrollo de sus tejidos. Por último se estudió la composición de la canal de los cabritos a los 45 días de vida para determinar la calidad de su perfil lipídico, después de haber recibido un suplemento de PUFA n-3 durante su desarrollo embrionario (a través de las madres) y durante los primeros 45 días de vida a través de la leche enriquecida en PUFA n-3 de sus madres (artículo 5.4).

A continuación se discuten con más detalle los resultados obtenidos en el presente estudio, que se encuentran publicados en los artículos descritos en el apartado anterior.

### **6.1 Aceite de pescado rico en PUFA n-3 y parasitosis**

Varios estudios han relacionado la interacción entre nutrición y parasitismo (Etter y col., 2000; Hoskin y col., 2000; Zeng y col., 2001). Sin embargo, la mayoría de los datos publicados sobre la relación entre el consumo de aceite de pescado y su efecto sobre infecciones parasitarias corresponden a infecciones por protozoos y bacterias (Block y col., 1992; Korver y Klasing, 1997), existiendo poca literatura científica que relacione a los PUFA n-3 con infecciones por nematodos.

Los resultados obtenidos al contar el número de adultos de *Trichinella spiralis* por gramo de intestino de las ratas a los 6 días de la infección y de larvas por gramo de diafragma a los 36 días de la misma (Tabla 2, artículo 5.1) muestran una reducción significativa en el grupo cuya dieta se suplementó con aceite de pescado frente al grupo control. Los helmintos adultos hallados en las ratas que ingirieron el aceite de pescado resultaron un 30.9% ( $P < 0.05$ ) inferiores en número a los encontrados en los animales que tomaron la dieta estándar. El número de larvas también fue inferior en un 36.6% ( $P < 0.05$ ) en los animales cuya dieta se suplementó con el aceite de pescado rico en PUFA n-3.

Los estudios que relacionan a los PUFA n-3 con infecciones por bacterias, mayoritariamente concluyen que éstos ácidos grasos favorecen la infección, siendo la explicación más extendida la que relaciona a los PUFA n-3 con un descenso de la respuesta inflamatoria local (Chag y col., 1992; Fritsche y col., 1997). En este sentido, un estudio de 1998 sugiere que la inflamación intestinal no es un requisito esencial para proteger al organismo frente a parásitos intestinales, incluido *Trichinella* (Lawrence y col., 1998). Para aclarar los resultados obtenidos sobre la disminución del número de adultos en intestino y de larvas en el diafragma serán necesarios futuros estudios sobre el mecanismo de acción de los PUFA n-3 al respecto.

Para los dos lotes de ratas que no fueron infectadas, los niveles de IL4 y de IFN $\gamma$  producidos por los esplenocitos a los 35 y 65 días del comienzo del experimento, fueron superiores ( $P < 0.05$ ) en el grupo que tomaron la dieta suplementada (figura 3, artículo 5.1). Estos resultados indican que los PUFA n-3 podrían actuar como estimuladores del sistema inmune y explicar la reducción obtenida en el número de adultos y de larvas.

En los animales infectados, la producción de IFN $\gamma$  (a los 6 y 36 días de la infección) por los esplenocitos de los animales que ingirieron la suplementación de aceite de pescado triplicó aproximadamente la del lote de animales que tomó la dieta estándar. La producción de IL4 fue superior ( $P < 0.05$ ) a los 6 días de la infección para el lote que ingirió la dieta

suplementada, sin embargo a los 36 días no se encontraron diferencias significativas ( $P > 0,05$ ). Estos resultados están en consonancia con los estudios de Ramawamy y col. (1996) y de Stewart y col. (1999), que detectan un incremento de la respuesta Th2 (medida por los valores de IL4 y IL5) y de la respuesta Th1 (medida por los niveles de  $IFN\gamma$ ) simultánea en ratas infectadas con *Trichinella spiralis*. Aunque en nuestros resultados la respuesta Th1 alcanza unos niveles muy superiores a los de la Th2.

### **6.2 Aceite de pescado rico en PUFA n-3 y termogénesis.**

En el artículo 5.2, se analiza la utilización metabólica de una dieta suplementada con aceite de pescado rico en PUFA n-3, frente a otra estándar con un nivel inferior de grasa. Estas dietas se administraron bajo un mismo nivel de ingesta de energía metabolizable con el objeto de que las posibles diferencias detectadas se debieran a la distinta composición en nutrientes de las mismas.

#### **Peso vivo y composición corporal**

El peso corporal es una variable que está mejor regulada a nivel homeostático que la cantidad de grasa corporal. Esta última varía más en razón de la composición de la dieta como de la densidad energética de la misma, incluso bajo un mismo nivel de ingesta energética (Woods y col., 2003).

En la tabla 3 del artículo 5.2, se muestran los efectos de la dieta sobre el peso vivo y la composición corporal al inicio y al final del ensayo de balance (a los 30 y 60 días desde el comienzo del experimento). En el peso alcanzado por los animales en ambas fechas, no se encontraron diferencias ( $P > 0,05$ ). Tampoco se detectaron variaciones en la composición corporal a los 30 días ( $P > 0,05$ ). Los cambios en la composición del tejido adiposo mediante el consumo de dietas con un elevado porcentaje de grasa suelen mostrarse después de las cuatro semanas de consumo de la dieta correspondiente (Sherrington y col., 1996). A los 60 días del inicio del experimento, el contenido total en grasa del peso vivo fue un 16,9%

superior ( $P < 0.05$ ) a nivel de la canal en el grupo de animales que ingirieron la dieta rica en grasa.

Respecto del contenido en proteína del peso vivo, se podía esperar una concentración de proteína más baja en la dieta rica en grasa que la estándar. Sin embargo, el resultado fue un contenido en proteína no diferente entre dietas ( $P > 0,05$ ). Esto se puede explicar porque los PUFA se oxidan a un nivel más alto que la saturada, originándose una energía que se emplea en distintos procesos metabólicos, entre ellos la síntesis proteica, proceso que alcanza de ese modo una mayor eficiencia (Su y Jones, 1993; Zhao y col., 2001; Jorgensen y col., 2003).

### **Perfil en ácidos grasos de la grasa corporal**

El perfil en ácidos grasos de la grasa depositada a nivel corporal a los 30 y 60 días desde el inicio del experimento se muestra en la tabla 4 del artículo 5.2. Las diferencias según el tipo de dieta consumida, ya eran significativas a los 30 días ( $P < 0.05$ ). En animales de corta edad, una semana parece ser tiempo suficiente para inducir cambios en la composición de los lípidos, así como en determinadas respuestas metabólicas relacionadas con la composición de la grasa dietética (Fickova y col., 1998).

El análisis del perfil en ácidos grasos de la grasa corporal según dieta y edad, muestra una estrecha relación entre la composición de la grasa de la dieta y la depositada a nivel corporal, relación que se establece independientemente del nivel de grasa de la dieta. Los animales que tomaron la dieta suplementada con el aceite de pescado, logran una incorporación preferencial de PUFA n-3 frente a los PUFA n-6. Este efecto puede ser debido a que el depósito de los ácidos grasos n-3, mucho más abundantes en esta dieta, podría interferir con la síntesis de los ácidos grasos n-6 (Scollan y col., 2000).

La competencia que a nivel de utilización metabólica se origina entre los PUFA n-6 y n-3 y el desequilibrio de su ingesta (Frenoux y col., 2001;

Wainwright, 2002), son las principales causas por las que se aconseja el incremento del aporte dietético de los PUFA n-3 frente a los n-6. En este estudio se ha conseguido incrementar aproximadamente en un 1% la cantidad total de PUFA n-3 de la grasa corporal, disminuyendo la cantidad de PUFA n-6 prácticamente hasta la mitad, con lo que la razón n-6/n-3 disminuye ( $P < 0.05$ ) drásticamente (19,11 frente a 1,56 a los 30 días y 17,65 frente a 2,13 a los 60 días), obteniendo un resultado acorde con las recomendaciones actuales (Budowsky y col., 1987, FAO/OMS, 1997; Mata y col., 2002; Simopoulos, 2002a).

### **Balance energético y proteico**

En la tabla 5 del artículo 5.2 se muestra el efecto del tipo de dieta sobre la ingesta de energía metabolizable y el balance energético. La ingesta de energía metabolizable fue no diferente ( $P > 0,05$ ). Se obtuvo una mayor retención de energía total ( $P < 0.05$ ) en los animales que consumieron la dieta con aceite de pescado, asociada a una mayor retención de energía como grasa y a unos mayores depósitos lipídicos. La diferencia en la retención de energía puede deberse al bajo coste energético asociado al depósito de grasa a partir de la grasa contenida en la dieta (Gaiva y col., 2001).

No se observaron diferencias en la pérdida de calor total ( $P > 0,05$ ), sin embargo, en la producción de calor asociada a la fracción proteica y grasa si se encontraron diferencias ( $P < 0.05$ ) según el tipo de dieta consumida. La pérdida de calor asociada a la oxidación de la proteína resultó menor en los animales que tomaron el aceite de pescado. La pérdida de calor asociada a la oxidación de la grasa (la oxidación de ésta se calculó teniendo en cuenta la ingesta total de grasa, la excreción y la acumulación neta de la misma), fue sensiblemente mayor en los animales que consumieron el aceite de pescado. En este sentido, cuando se incrementa la cantidad de grasa de la dieta de animales en crecimiento, se produce una mejor utilización de la proteína, incrementándose su retención, sobre todo si la grasa es rica en PUFA n-3 (Sanz Sampelayo y col., 1997; Jorgensen y col., 2003).

Por lo tanto, conociendo los nutrientes principales de una dieta, podemos diseñar dietas en función del metabolismo energético que queremos que provoquen (Müller y Kichgessner, 1998), considerándose en este sentido a los PUFA n-3 como compuestos esenciales para el mantenimiento del balance energético (Clarke, 2000).

### **Parámetros hemáticos**

La tabla 6 del artículo 5.2, muestra los resultados obtenidos sobre el efecto de la dieta sobre las concentraciones en suero de glucosa, colesterol, HDL-colesterol, triglicéridos, NEFA, urea, ácido úrico y creatinina.

No se detectaron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en los niveles de glucosa de los animales de ambos grupos. Normalmente, los ácidos grasos influyen negativamente en la secreción de insulina inducida por glucosa, lo que determina un descenso de los niveles séricos de insulina y un incremento de glucosa en sangre (Randle, 1993). Sin embargo, los PUFA n-3 parecen tener un efecto más moderado en este sentido (Grill y Qvigstad, 2000; Takahashi e Ide, 2001) por la influencia que pueden tener en la liberación de insulina cuando se incorporan en los fosfolípidos de las membranas plasmáticas (Clarke, 2000).

La cantidad de colesterol, HDL-colesterol y Triglicéridos en sangre resultó menor ( $P < 0.05$ ) en el lote de animales que ingirió el aceite de pescado. Estos datos son coincidentes con un número extenso de trabajos y estudios epidemiológicos (Fickova y col., 1998; Frémont y col., 1998; Ruiz-Gutierrez y col., 1999; Takahashi e Ide, 2000; Frenoux y col., 2001) que apoyan la hipótesis de que los PUFA n-3 son nutrientes efectivos para la prevención de las enfermedades cardiovasculares. Asimismo, los PUFA n-3 se consideran fuertes inhibidores de la síntesis de triglicéridos en el hígado (Nestel y col., 1984; De Schrijver y col., 1991).

La concentración de NEFA en el suero fue superior ( $P < 0.05$ ) para los animales que tomaron la dieta con aceite de pescado. Los NEFA suelen ser un indicativo del proceso de lipólisis (Mersmann y MacNeil, 1985). En

este sentido las dietas ricas en PUFA n-3 disminuyen la tasa de lipólisis frente a otras dietas con el mismo nivel de grasa de otra naturaleza (Otto y col., 1992; Gaiva y col., 2001). Nuestro resultado puede ser consecuencia del nivel más alto de grasa en la dieta experimental frente a la estándar o por la mayor tasa de oxidación de los PUFA n-3. Los elevados niveles de NEFA detectados en los animales que tomaron aceite de pescado, puede deberse a una menor lipogénesis (Jump y Clarke, 1999) consecuencia de su elevada tasa de oxidación, más que a una elevada lipólisis.

Los niveles de urea, ácido úrico y creatinina en sangre fueron no diferentes entre los grupos ( $P > 0,05$ ). En general, una dieta alta en grasa suele generar niveles de urea y creatinina en sangre mayores que los correspondientes a una dieta baja en grasa (Lu et al., 2003). Sin embargo, al comparar las concentraciones de estos metabolitos en animales que consumieron de una dieta baja en grasa frente a otra que presentaba un nivel alto por suplementación de aceite de pescado, se detectaron niveles de urea y creatinina no diferentes (Lu et al., 2003). Este resultado puede deberse a la mejor utilización de la proteína dietética.

### **6.3 Aceite de pescado rico en PUFA n-3, ingesta y digestibilidad**

#### **Ingesta**

La ingesta ejerce una gran influencia en la producción y composición de la leche (Hadjipanayiotou y Morand-Fehr, 1991), resultando de gran interés el estudio de aquellos factores que la determinan. Generalmente, los nutrientes requeridos para una adecuada actividad microbiana promueven la ingesta de alimento, mientras que los nutrientes que alteran la funcionalidad del rumen (lípidos) la reducen (Faverdin, 1999, Morand-Ferh, 2005).

En la tabla 2 del artículo 5.3, se presentan los valores de la ingesta de MS, MO, N, grasa, FND, FAD y energía de la dieta estándar y de la dieta

suplementada con aceite de pescado. Las ingestas de alimento, tanto de MS como de energía, resultan muy similares entre tratamientos, no detectándose diferencias significativas ( $P > 0.05$ ). Como consecuencia, la ingesta de los distintos nutrientes fue muy similar para ambas dietas ( $P > 0.05$ ), excepto para la ingesta de grasa que, de manera lógica, resulta superior ( $P < 0.05$ ) para el lote de animales suplementados con la grasa protegida. Este dato indica que el aceite de pescado suplementado a la dieta estaba bien protegido, por lo que no afectó significativamente la ingesta de MS (Kitessa y col., 2001; Cant y col., 1996; Loor y col., 2005).

En este ensayo, y por extensión en el resto de ensayos en los que se utilizaron estas sales cálcicas de aceite de pescado, no se producen los efectos negativos característicos sobre el metabolismo ruminal que suelen acompañar a dietas suplementadas con aceite de pescado sin proteger o deficientemente protegido, hecho que varios autores señalan como motivo de una considerable disminución de la ingesta de MS (Kitessa y col., 2001; Chilliard, 2003). La hidrogenación de los PUFA afecta a las bacterias celulolíticas, que pueden ser responsables de la reducción de la ingesta de MS y de la inhibición de la digestibilidad de la fibra (Casali y col., 1994).

Otros estudios indican como primer efecto de la suplementación de la dieta con grasa protegida, para cualquier especie de rumiante, la disminución de la ingesta, efecto que se suele atribuir a una mayor densidad energética de la dieta (Forbes, 1986) o a las posibles alteraciones de la función ruminal producidas en función del grado de protección de la suplementación (Clapperton y Steele, 1983; Davenport y col., 1987; Kadzere y Jingura, 1993).

Franklin y col. (1999), opinan que la disminución de la ingesta se debe a una menor palatabilidad, a una mayor densidad energética y/o a la ingesta de determinados ácidos grasos. En nuestro caso un posible efecto negativo en la palatabilidad o la posibilidad de una protección defectuosa quedan prácticamente descartados al resultar tanto la ingesta de MS como de energía bruta no diferentes, siendo incluso algo superiores los valores

correspondientes al lote de animales cuya dieta se suplementó con la grasa protegida.

### **Digestibilidad**

En la tabla 2 del artículo 5.3, se muestran los resultados correspondientes al flujo fecal y la digestibilidad aparente de la MS, MO, N, grasa, fracciones fibrosas y energía. Los datos referentes al flujo fecal resultaron estadísticamente no diferentes ( $P > 0.05$ ) para los dos tipos de dieta consumida. En cuanto a la digestibilidad aparente obtenemos el mismo resultado, excepto para la grasa y la FAD que aumentaron su digestibilidad ( $P < 0.05$ ) en los animales que tomaron la dieta suplementada con el aceite de pescado protegido.

El hecho de que la suplementación con sales cálcicas no afecte al flujo fecal y a la digestibilidad de la MS, MO, N y FND podría explicarse por el efecto by-pass producido por la protección de la grasa suplementada (Sanz Sampelayo y col., 2002; Enjalbert y col., 1994; Shell y col., 1978; Elmeddah y col., 1991).

### **Digestibilidad aparente de la grasa de la dieta**

Un elevado nivel de grasa en la dieta suele disminuir la digestibilidad de la misma y la digestibilidad de la fibra (Doreau y Ferlay, 1994). Sin embargo, nuestros resultados muestran que la cantidad consumida de grasa aumenta con la suplementación de las sales cálcicas y la digestibilidad de la misma resulta superior en el grupo de animales que tomaron el aceite de pescado. Cuando se suministra una grasa en forma de jabones cálcicos, no se altera la función ruminal como consecuencia de la insolubilidad de los mismos, por lo que no se produce una disminución en la digestibilidad de la grasa (Jenkins y Palmquist, 1984; Fallon y col., 1986; Kadzere y Jingura, 1993; Enjalbert y col., 1994; Shell y col., 1994).

La grasa utilizada se disocia en el duodeno a la altura del conducto biliar, por lo que resulta altamente disponible para la formación de miscelas con las sales biliares, alcanzando unos niveles elevados de digestibilidad (Shell y col., 1994; y Fallon y col., 1986). La composición de la grasa y la absorción diferencial de los distintos ácidos grasos es otro factor que puede influir en la alta digestibilidad. También se debe tener en cuenta el efecto negativo sobre la digestibilidad, que puede ocasionar que algunas fracciones de la grasa de la dieta base se encuentren formando parte de membranas celulares o adheridas a diferentes partículas de otros componentes de la dieta. También hay que tener en cuenta que la suplementación de la dieta con grasa disminuye la excreción endógena, estimándose de manera más precisa la digestibilidad verdadera (Grummer, 1988; Schneider y col., 1988).

#### **Digestibilidad aparente de la FAD**

La relación entre la digestibilidad de las fracciones fibrosas y la suplementación de la dieta con grasa es controvertida. En nuestro estudio la digestibilidad de la FAD es superior ( $P < 0.05$ ) para los animales que tomaron el aceite de pescado, siendo este resultado opuesto a la tesis más frecuente encontrada en la bibliografía, que aboga por una disminución de la digestibilidad de la fibra al incrementar la cantidad de grasa de la dieta (Machmüller y col., 2000; Park y col., 1982; Ikwuegbu y Sutton, 1982). En la mayoría de los estudios que obtienen un efecto negativo sobre la digestibilidad de la fibra al suplementar la dieta con grasa, podemos encontrar como factor común que la proporción del concentrado era muy alta (un 60-70% de la MS). Los rumiantes son muy sensibles a dietas pobres en fibra y ricas en concentrado, puesto que el pH ruminal desciende cuando la proporción de concentrado de la dieta excede del 60% de la MS, pudiendo provocar síntomas de acidosis como la disminución de la ingesta (Morand-Ferh, 2005).

En otros trabajos, la digestibilidad de la fibra no se modificaba o incluso mejoraba cuando se suplementaba la dieta con aceite de linaza o de pescado (Doreau y Chilliard, 1997; Ueda y col., 2003). En estos ensayos el

## 6. Discusión General

---

porcentaje de concentrado oscilaba entre un 30 y un 35%. Parece ser que la digestibilidad de la fibra está más influenciada por el porcentaje de concentrado de la dieta que por la cantidad de grasa suplementada, siempre que ésta no supere el 10% de la dieta.

También hay que destacar que estudios recientes indican que cuando la dieta del rumiante es suplementada con una grasa rica en PUFA, protegida frente al metabolismo ruminal, la digestibilidad de la fibra no varía demasiado (Machmüller y col., 2000; Kitessa y col., 2001; Harvatine y Allen, 2006). Este efecto podría deberse a una reducción en la dieta suplementada de sustratos que fermentan con rapidez, lo que permitiría que durase más tiempo la celulolisis (Fallon y col., 1986). En general, puede deducirse que las diferencias en la digestibilidad de la fibra proporcionan un valor indicativo del grado de protección alcanzado en la grasa suministrada (Zinn y col., 2000).

### **Digestibilidad aparente del Nitrógeno y balance nitrogenado**

No se encontraron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) entre la digestibilidad del nitrógeno de las dos dietas. La suplementación de grasa sólo afecta a la digestibilidad del nitrógeno en el caso de que dicha grasa no esté bien protegida y modifique el ecosistema microbiano del rumen. (Shell y col., 1978; Enjalbert y col., 1994; Doreau y Ferlay, 1995).

Los valores de pérdida de N y energía por la orina junto a los balances de N, se muestran en la Tabla 2 del artículo 5.3. Tanto la pérdida de N como de energía por la orina, resultaban menores ( $P < 0.05$ ) en el grupo de animales suplementados con la grasa, lo que originaba unas retenciones mayores de N ( $P < 0.05$ ) en relación con la cantidad ingerida y con la aparentemente absorbida. Esta menor pérdida de N por orina, fue causante de que también se detectara una menor pérdida de energía por orina.

Para explicar la relación entre los balances de nitrógeno obtenidos y la suplementación lipídica, es necesario indicar cómo durante el crecimiento, un aumento en la cantidad de grasa de la dieta conduce normalmente a una

mejor utilización de la proteína y a una retención más alta de la misma. Este ahorro de proteína debido a la ingesta de grasa ha sido demostrado en cabritos (Sanz Sampelayo y col., 1997). Asimismo, como se discutió en el capítulo anterior, los PUFA son oxidados preferentemente como fuente de energía en el organismo, satisfaciendo parte de las necesidades energéticas de mantenimiento y de síntesis de proteína (Su y Jones, 1993). Por lo tanto, el ahorro de proteína y la naturaleza de la grasa empleada, pueden ser los causantes del resultado obtenido.

#### **Ingesta, flujo fecal y digestibilidad aparente de los ácidos grasos.**

La determinación de la digestibilidad de los lípidos de la dieta es complicada, puesto que no todos los lípidos que aparecen en heces provienen de la ingesta. Una fracción desconocida de los lípidos de las heces puede derivar de descamaciones de células intestinales, de la síntesis bacteriana producida en el rumen y en el intestino grueso y de bacterias residuales. Normalmente, la digestibilidad aparente del extracto etéreo se incrementa cuando se eleva la ingesta (Czerkawski, 1966), sobre todo cuando se protege la grasa frente al metabolismo ruminal (Machmüller y col., 2000).

Los valores de ingesta, flujo fecal y digestibilidad aparente de los distintos ácidos grasos, se muestran en la Tabla 3 del artículo 5.3. Para los ácidos grasos C14:0, C16:0, C16:1, C18:1, C18:2, C18:3 y C20:0, tanto las cantidades de ingesta como de flujo fecal, resultaban significativamente superiores ( $P < 0.05$ ) en el grupo de animales suplementados con la grasa protegida frente al grupo de animales no suplementados. Los ácidos grasos C 20:5, C22:0, C22:6 no se detectaron en la dieta del grupo control ni en las heces de ambos grupos.

Como consecuencia de una ingesta superior, los valores de digestibilidad fueron mayores ( $P < 0.05$ ) para los ácidos grasos saturados: C14:0, C16:0, C18:0 y C20:0 en el grupo de animales suplementados con respecto al grupo que tomó la dieta sin suplementar.

## 6. Discusión General

---

Independientemente de los valores presentados en la Tabla 3, en el presente estudio se detectaron en las heces de ambos grupos de animales, ciertos ácidos grasos cuyas ingestas habían sido nulas o no detectadas por el cromatógrafo: C4:0, C10:0, C12:0, C15:0 y C17:0. En este sentido, es necesario indicar que los ácidos grasos que aparecen en las heces de los rumiantes, no solo representan la fracción de origen dietético no digerida o no absorbida, sino que pueden haber sido sintetizados en el rumen, provenir de células bacterianas o proceder de distintas fuentes endógenas (Viavini, 1970; Bauchart y col., 1990; Bock y col., 1991; Doreau y Felay, 1994).

La digestibilidad aparente de los ácidos C14:0, C18:0 y C20:0, alcanzaba valores negativos bajo el consumo de la dieta no suplementada. De acuerdo con estos resultados, y teniendo en cuenta que los valores de flujo fecal de los ácidos C14:0, C18:0 y C20:0 también mostraban diferencias significativas, puede suponerse que una parte de los mismos es de procedencia endógena o bacteriana. Esta hipótesis también explicaría la aparición en las heces de los ácidos grasos saturados C4:0, C10:0, C12:0, C15:0 y C17:0.

Los mono-acilglicerol liberados durante la digestión de la grasa rica en PUFA, resultan ser unos potentes emulgentes que contribuyen a la solubilización de los ácidos grasos saturados en las miscelas, dirigiendo de esta forma los productos de la digestión hacia los enterocitos (Schrijver y col., 1991).

Las altas concentraciones existentes del ácido graso C18:0 en las heces de los animales pueden deberse, además de lo comentado anteriormente, a la hidrogenación de los ácidos grasos C18:1, C18:2 y C18:3 existentes en la dieta (Ashes y col. 1992; White y col., 1987). Teniendo en cuenta que el flujo fecal de este ácido graso para el grupo de animales no suplementados llegaba a ser casi el triple que el alcanzado por el del grupo suplementado (Andrews y Lewis, 1970), a pesar de resultar menor la cantidad de ingesta, es lógico suponer que una fracción procedía de la hidrogenación de los ácidos grasos no saturados de igual número de átomos de carbono

contenidos en la dieta. En el grupo de animales que ingirieron el aceite de pescado, la posible hidrogenación fue mucho menor, de acuerdo con el valor positivo de flujo fecal del C18:0. Este dato es un argumento a favor de la correcta protección del aceite de pescado (White y col., 1987; Doreau y Ferlay, 1994; Machmüller y col., 2000).

La digestibilidad de los ácidos grasos C16:1 y C18:1 se mostraba sin diferencias entre tratamientos ( $P > 0.05$ ), este dato puede tener explicación por una sobreestimación de la digestibilidad de estos ácidos grasos, en el lote de animales que no recibió la suplementación, por hidrogenación de los mismos (Grummer, 1991; Gulati y col., 1999; Zinn y col. 2000). También pudo influir en este resultado el metabolismo post-ruminal del epitelio intestinal que convierte a los ácidos grasos de 16 y 18 carbonos en insaturados, por lo que es probable que los animales hayan sintetizado endógenamente C18:1 a partir de C18:0 mediante la  $\Delta^9$ -desaturasa (García Muriana, 2002; Lehninger, 1993). Este proceso es de menor cuantía que la hidrogenación ruminal (Grummer, 1991).

La digestibilidad de los ácidos grasos C18:2 y C18:3 resultó estadísticamente más alta en el grupo de animales que no tomaron el aceite de pescado ( $P < 0.05$ ). La razón de estos resultados podría ser, como hemos indicado anteriormente, la hidrogenación de los ácidos grasos no saturados de 18 átomos de carbono que tendría lugar con mayor intensidad en el lote control frente al que recibió la suplementación (Ashes y col., 1992; Zinn y col., 2000). Esta posibilidad sobreestimaría los valores de los coeficientes de digestibilidad aparente de los ácidos grasos que fueron hidrogenados, con lo que las diferencias verdaderas entre tratamientos, podrían ser distintas a las aquí estimadas. No obstante, la digestibilidad de los ácidos grasos mono y poliinsaturados, resulta normalmente alta (Ferlay y col., 1993; Machmüller y col., 2000), puesto que los ácidos grasos saturados forman miscelas con más dificultad que los insaturados, dificultándose su captación por las células endoteliales y retrasándose su reesterificación (Ockner y col. 1972; Freeman, 1984).

## 6. Discusión General

---

Para el ácido graso C20:1, se detectó una ingesta más alta ( $P < 0.05$ ) en el grupo de animales que consumían la dieta suplementada, no detectándose en las heces de ambos grupos. Parte de este ácido graso de origen dietético pudo ser hidrogenado, hecho que determinaría el coeficiente negativo detectado para el C20:0 y la alta digestibilidad detectada en ambos tratamientos para el C20:1.

Los ácidos grasos C20:5, C22:0 y C22:6, solo fueron ingeridos por el lote de animales que tomó el aceite de pescado, resultando para ambos grupos de animales su excreción fecal nula, lo que determinaba la estimación de una digestibilidad aparente del 100% en el grupo de animales que consumieron la dieta suplementada con el aceite de pescado.

Estudiando los coeficientes del ácido graso C20:5, y teniendo en cuenta que el valor del flujo fecal del saturado con igual número de átomos de carbono (C20:0) fue muy elevado, puede suponerse que parte del mismo podría haber sido hidrogenado, lo que daría lugar a una sobreestimación del coeficiente de digestibilidad correspondiente (Kitessa y col., 2001). Sin embargo, este argumento no explica la elevada digestibilidad aparente del C22:6, puesto que el flujo fecal del C22:0 también fue nulo y no se detectó ninguna cantidad significativa de otros ácidos grasos de 22 átomos de carbono con un número intermedio de insaturaciones. Por lo tanto, el elevado coeficiente de digestibilidad que presentan los LCPUFA n-3, y en especial el C22:6, no parece ser resultado de una sobreestimación por haber sido transformados en otros ácidos grasos con menor número de insaturaciones.

En este sentido, hay estudios que detectan una mayor biohidrogenación ruminal para el C20:5 que para el C22:6, puesto que la relación C22:6/C20:5 suele ser mayor en el duodeno que en la dieta (Chilliard y Doreau, 1997; Kitessa y col., 2001). Además, hay que tener en cuenta que la digestibilidad de un ácido graso disminuye conforme aumenta la longitud de su cadena y se incrementa al aumentar el número de sus dobles enlaces (Lessire y col., 1992; Ferlay y col., 1993; Machmüller y col., 2000).

Además de la biohidrogenación ruminal, hay que hacer referencia a la posible hidrogenación postruminal que pueden sufrir los diferentes ácidos grasos poliinsaturados en el intestino grueso. Generalmente, se acepta que el flujo de ácidos grasos que deja el intestino delgado es muy parecido al flujo fecal de ácidos grasos, puesto que el mecanismo de absorción en el intestino grueso es similar al del rumen (Stevens y col., 1980) y los ácidos grasos de larga cadena no pueden ser absorbidos.

Los resultados obtenidos sobre la ingesta, digestibilidad aparente y flujo fecal demuestran el buen aprovechamiento de los diferentes ácidos grasos constituyentes de las sales cálcicas suplementadas en la dieta de grupo experimental. Esto demuestra que el aceite de pescado había sido suficientemente protegido frente al metabolismo ruminal, así como adecuadamente estabilizado con antioxidantes.

#### **6.4 Aceite de pescado rico en PUFA n-3 y capacidad reproductora.**

La suplementación de la dieta del rumiante con PUFA n-3 puede mejorar su capacidad reproductora influyendo sobre los índices de fertilidad y prolificidad (Mattos y col., 2002; Petit y col., 2002). Este efecto puede deberse a modificaciones en la función ovárica, en la actividad uterina o en el balance energético. Para aclarar este aspecto, se determinaron los niveles sanguíneos de progesterona, PGF2 $\alpha$ , colesterol, HDL-colesterol, glucosa, triglicéridos, ácidos grasos no esterificados y  $\beta$ -hidroxibutirato.

En la tabla 1 del artículo 5.5 se muestran los resultados de fertilidad y prolificidad obtenidos según el tipo de concentrado consumido. De los dos lotes de animales, formados por 15 cabras cada uno, 13 quedaron gestantes, por lo que el índice de fertilidad resultó idéntico para ambos grupos ( $P > 0,05$ ). Un animal del lote que tomó la suplementación abortó. El índice de prolificidad (número de animales vivos nacidos de cada madre) fue superior para el grupo que ingirió el aceite de pescado (2,17 frente a 1,77).

## 6. Discusión General

---

La duración media de la gestación fue similar ( $P > 0,05$ ), sin embargo se observó un efecto de concentración de los partos en un menor intervalo de tiempo para el grupo de los animales que tomaron aceite de pescado (9 días frente a 18 días). Finalmente, el peso medio al nacimiento de los cabritos nacidos de ambos grupos de madres, resultaba idéntico (3.700g).

En la tabla 2 del artículo 5.5, se muestra el efecto del tipo concentrado consumido y del momento de toma de muestra (45 días después de la cubrición y a los 30 días del parto) sobre los niveles séricos de progesterona,  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , colesterol, HDL-colesterol, triglicéridos, glucosa, ácidos grasos no esterificados y  $\beta$ -hidroxibutirato.

Los niveles de progesterona, independientemente del tipo de concentrado, fueron superiores ( $P < 0.05$ ) en el primero de los momentos considerados, resultado lógico por tratarse de una hormona esencialmente progestágena. La progesterona prepara al útero para la implantación del embrión, disminuye la frecuencia de las contracciones uterinas, manteniendo el estado de preñez y estimulando los cambios secretores en la mucosa que reviste las trompas, resultando esencial para la nutrición del huevo que comienza a dividirse pero aún no está implantado en el útero (Petit y col., 2001, 2002).

Los niveles de progesterona fueron menores ( $P < 0.05$ ) para el lote de animales suplementados con la grasa, a pesar de obtenerse niveles más altos de colesterol junto a unos no diferentes de HDL-colesterol. Según Staples y col., (1998), la concentración de progesterona en el fluido folicular suele ser superior en los casos en que la dieta se suplementa con una grasa. Dado que el colesterol es un precursor de la síntesis de progesterona en las células luteales del ovario (Kuran y col., 1999), el aumento que tiene lugar en el colesterol circulante cuando la dieta del rumiante se suplementa con una grasa, debe determinar un incremento en la síntesis de progesterona en las células foliculares y del cuerpo lúteo (Carroll y col., 1992; Grummer y Carroll, 1991; Oldick y col., 1997; Fahey y col., 2002; Petit y col., 2002). Sin embargo, Staples y col. (1998), indican que en el rumiante alimentado con una dieta suplementada con grasa, se

detectan generalmente, pequeños cambios en las concentraciones sanguíneas de progesterona, resultando más alta su concentración en el fluido folicular.

La menor cantidad de progesterona detectada en los animales que tomaron el aceite de pescado, demuestra que la concentración de colesterol no es un factor limitante como precursor de progesterona. Este resultado también podría indicar que existe una mayor de utilización de la hormona en el fluido folicular. Por lo tanto, no hay datos que indiquen que la mejora del índice de prolificidad se debe a un incremento de los niveles de progesterona en plasma.

En la tabla 2 del artículo 5.5, podemos observar que a los 45 de gestación los niveles de PGF2 $\alpha$  son no diferentes ( $P > 0,05$ ) entre los animales que tomaron la dieta suplementada y el lote control. Sin embargo, después del parto, los niveles de PGF2 $\alpha$  aumentan para ambos grupos. Es lógico que después del parto el nivel de de PGF2 $\alpha$  sea superior ( $P < 0,001$ ) frente a los valores obtenidos durante la gestación, puesto que las PGF2 $\alpha$  son luteolíticas, favorecen el crecimiento folicular y la involución uterina (Grummer y Carroll, 1991). Durante el parto y post-parto, las prostaglandinas experimentan una gran subida, la que parece quedar asociada con la regresión del cuerpo lúteo y del útero que tiene lugar en dichos momentos (Staples y col., 1998).

A los 30 días del parto, la concentración de PGF2 $\alpha$  es superior en el grupo de animales que ingirió la dieta estándar ( $P < 0,001$ ). Este resultado puede ser debido a una mayor síntesis de PGF3 $\alpha$  en el grupo que tomó aceite de pescado, en lugar de la síntesis de PGF2 $\alpha$ . Este resultado puede originar una mayor viabilidad embrionaria en razón de la menor actividad que las PGF3 $\alpha$  alcanzan frente a las de las PGF2 $\alpha$  (Mattos y col., 2000; Petit y col., 2002).

El LA n-6 es el precursor del AA n-6, que a su vez es el precursor de las PGF2 $\alpha$ . Las mismas enzimas que determinan la elongación y desaturación del LA para convertirlo en AA, son las que convierten el

## 6. Discusión General

---

LNA n-3 en EPA n-3, precursor de las PGF3 $\alpha$  (Abayasekara y Wathes, 1999). La competencia que puede originarse por los enzimas de elongación y desaturación entre los ácidos LA y LNA con objeto de convertirse en los precursores de la síntesis de estas PG, hace que un incremento en la administración de LCPUFA n-3, haga disminuir la síntesis de PGF2 $\alpha$  (Gurr y col., 1991; Barnonin y Chassagne, 1991; Cunnane, 1995; Rooke y col., 2003). Distintos autores indican que las PGF3 $\alpha$  son consideradas menos activas que las de las PGF2 $\alpha$  (Fly y Johnston, 1990; Petit y col., 2002), aunque algunos cambios relacionados con la señal luteolítica parecen deberse a la concentración relativa de ambas clases de PG (Rooke y col., 1993).

Las PG ejercen un papel importante en el establecimiento del ciclo estral, desde después del parto hasta que el animal quede otra vez gestante. Por esto se utilizan para sincronizar el estro, aspecto que presenta ventajas económicas y de manejo de los rebaños (Xu y Burton, 2000; Leblanc y Leslie, 2003; Tenhagen y col., 2004).

En la tabla 2 del artículo 5.5, se muestran los resultados de la concentración en plasma de AGNE y  $\beta$ -hidroxibutirato. A los 45 días de la gestación, los niveles de AGNE y de  $\beta$ -hidroxibutirato fueron no diferentes. Normalmente, los animales suplementados muestran unos niveles de AGNE más altos que los no suplementados, en razón del tipo de suplementación practicada, puesto que la hidrólisis neta de triglicéridos en el tejido adiposo, aumenta cuando se incluye una grasa en la dieta (Grummer y Carroll, 1991; Staples y col., 1998). A pesar de no encontrar diferencias significativas ( $P > 0,05$ ), a los 45 días se observó una concentración media de AGNE superior en los animales que tomaron la suplementación lipídica (0.439 frente a 0.386), lo que parece indicar que la ingesta energética no experimentó cambios influyentes.

La cantidad de glucosa en plasma a los 45 días de gestación, resultó inferior ( $P < 0.05$ ) para el grupo que tomó el suplemento, este resultado puede ser consecuencia del suplemento energético de la dieta que deriva en un ahorro en la utilización de la glucosa. Respecto de este resultado,

Grummer y Carroll (1991), indican que el suministro de ácidos grasos que pueden ser utilizados como fuente de energía en distintos tejidos, produce un ahorro de glucosa. En este sentido, la mayor disponibilidad de glucosa podría ser una señal metabólica para la liberación de hormonas gonadotrópicas, como son la FSH y la LH (Staples y col., 1998).

En la tabla 3 del artículo 5.5 se muestra el perfil en ácidos grasos de la grasa plasmática según tipo de concentrado consumido a los 45 días de gestación y a los 30 días del parto.

El porcentaje de AGS en plasma resultaba mayor ( $P < 0,05$ ) en el grupo que consumió el concentrado estándar y en la gestación frente al periodo post-parto ( $P < 0,05$ ). Los AGM resultaban por el contrario, mayores ( $P < 0,05$ ) en el segundo de los momentos de toma de muestra y no diferentes en función del tipo de concentrado consumido. El porcentaje de PUFA en plasma resultó afectado por el tipo de concentrado consumido ( $P < 0,05$ ), obteniéndose valores más altos para el grupo que consumió el concentrado suplementado con la grasa. A los 30 días del parto se observa una tendencia ( $P = 0,06$ ) de incremento de los valores de los PUFA frente a la muestra tomada a los 45 días de la gestación.

Por tanto, en el postparto se obtuvieron concentraciones más altas de los distintos ácidos grasos no saturados. El inicio de la lactación se caracteriza por una subida en los requerimientos nutritivos, una bajada en la ingesta voluntaria y una menor lipogénesis, orientándose la grasa circulante especialmente a la producción de leche así como a satisfacer los distintos requerimientos energéticos. Bajo estas circunstancias, resulta lógico detectar mayores niveles de ácidos grasos no saturados, puesto que se depositan menos y se utilizan más como fuente de energía (Su y Jones, 1993; Clarke, 2000; Takahashi e Ide, 2000).

### **6.5 Aceite de pescado rico en PUFA n-3, composición tisular al nacimiento y crecimiento**

#### **Composición tisular al nacimiento**

A partir de dos lotes de 6 animales nacidos de cabras cuya dieta había sido suplementada o no con sales cálcicas de aceite de pescado desde 20 días antes del inicio de la gestación, se analizó en función del tipo de concentrado consumido por las madres, el peso al nacimiento de los cabritos, el desarrollo de diferentes depósitos adiposos (grasa riñonada, epiplónica y mesentérica) así como el peso relativo (g/kg peso vivo) de diferentes órganos (cerebro, timo, bazo, testículos, hígado y corazón) relacionados con el desarrollo de importantes funciones fisiológicas. También se determinaron los niveles sanguíneos de ciertos metabolitos indicativos del metabolismo intermedio relacionado con la utilización de la energía y proteína (glucosa, triglicéridos, colesterol, HDL-colesterol, AGNE, albúmina, proteínas totales y urea). Finalmente se determinó el perfil en ácidos grasos de los depósitos grasos y de los órganos elegidos.

#### **Desarrollo de los depósitos grasos y peso relativo del bazo, timo, testículos, cerebro, hígado y corazón**

En la Tabla 1 del artículo 5.6, se presentan los valores correspondientes a estas variables, así como el resultado del análisis estadístico llevado a cabo. Los valores detectados diferentes ( $P < 0,05$ ) según tipo de concentrado consumido por las madres fueron: grasa riñonada, grasa mesentérica, peso del timo y de los testículos. La grasa riñonada y peso del timo, resultaban mayores en los cabritos nacidos de las madres que tomaron la dieta suplementada. Por el contrario, la grasa mesentérica y peso de los testículos, alcanzaban valores más altos en los cabritos nacidos de las madres que ingirieron la dieta estándar. La grasa epiplónica alcanzaba en los animales nacidos de las cabras alimentadas con el concentrado suplementado con la grasa, valores más altos ( $P = 0,08$ ).

La cantidad de grasa riñonada es uno de los parámetros indicativos del engrasamiento de la canal, que al ser mayor ( $P < 0,05$ ) en el grupo experimental, confiere un valor superior a la canal de los cabritos nacidos de madres que tomaron la dieta suplementada. Además, al tener un reservorio lipídico superior al nacimiento, éstos animales estarán más protegidos frente al cambio de temperatura ambiental que tiene lugar en el momento del nacimiento.

En cuanto al tamaño de los órganos, excepto para el timo y los testículos no se encontraron diferencias significativas, por lo que se puede concluir que la suplementación lipídica no afecta al desarrollo en peso vivo del cerebro, bazo, hígado y corazón. Sin embargo, la funcionalidad de estos órganos parece depender más de su composición que de su tamaño (Uauy y col., 2000), aspecto que se abordará en los siguientes apartados.

### **Niveles plasmáticos de glucosa, triglicéridos, colesterol, HDL-colesterol, AGNE, albúmina, proteínas totales y urea al nacimiento.**

Los valores correspondientes a estas variables según tipo de concentrado consumido por las madres, se muestran en la tabla 3 del artículo 5.6. El tipo de concentrado consumido, determinaba unos efectos significativos ( $P < 0,05$ ) sobre los niveles de glucosa y urea, siendo éstos superiores en los cabritos nacidos de las madres que ingirieron el concentrado suplementado. Asimismo, se detectaba una mayor cantidad de triglicéridos, aunque no fue significativa ( $P = 0,09$ ), en los animales nacidos de las cabras que tomaron el aceite de pescado. Los niveles de colesterol, HDL-colesterol, AGNE, albúmina y proteínas totales fueron no diferentes entre grupos ( $P > 0,05$ ).

Es lógico suponer que estas diferencias se debieron al aporte de nutrientes que recibieron los fetos a través de la placenta según la dieta ingerida por las madres. La mayor cantidad de grasa que tomaron las madres del lote experimental y la naturaleza de la misma, pudo originar un ahorro de glucosa (Grummer y Carroll, 1991), lo que pudo determinar que

## 6. Discusión General

---

el nivel de glucosa detectado en la sangre de los cabritos recién nacidos en el grupo experimental resultase más elevado ( $P < 0,05$ ).

La mayor cantidad de grasa disponible por el feto, también pudo determinar una mejor utilización de los aminoácidos y péptidos que atraviesan la placenta para la retención de proteína. Este ahorro de proteína debido a la ingesta de grasa ya ha sido demostrado en cabritos (Sanz Sampelayo y col., 1997). En este sentido, resultaban superiores los niveles de proteínas totales ( $P > 0,05$ ) y urea ( $P < 0,05$ ) en el plasma de los cabritos nacidos de las madres que tomaron el suplemento de aceite de pescado, aunque solo en la urea se detectó una diferencia significativa.

### **Perfil en ácidos grasos de la grasa riñonada, epiplónica y mesentérica, y del bazo, timo, testículos, cerebro, hígado y corazón.**

Los lípidos que se acumulan en el feto, sobre todo durante el último período de gestación, pueden proceder de una síntesis de novo o directamente de la madre a través de la placenta (Noble, 1980). En este sentido, es de especial interés analizar en que medida, la nutrición de la madre es capaz de determinar la composición del animal al nacimiento, alcanzando gran importancia el aporte de la cantidad necesaria de ácidos grasos esenciales (Uauy y col., 2000). Asimismo, el perfil en ácidos grasos del feto debe de estar relacionado directamente con la composición en ácidos grasos del plasma de la madre y, por lo tanto, con el de la grasa que ésta ingiera en la dieta y con los lípidos depositados a nivel corporal. Modificaciones en la composición en ácidos grasos de la grasa corporal materna y en el perfil de los ácidos grasos libres circulantes, determinará cambios en la composición de la grasa de los tejidos del feto.

En la tabla 1 del artículo 5.6, se puede observar para todos los depósitos grasos y órganos elegidos (excepto los testículos), que las concentraciones en PUFA n-3 (LNA + EPA + DHA) resultaban mayores ( $P < 0,05$ ) en los cabritos nacidos de madres que tomaron la suplementación.

Habitualmente, la placenta capta de manera preferencial LCPUFA y los transfiere al feto, hecho que establece que en el momento del nacimiento la concentración de estos ácidos grasos en el feto (Leskanich y Noble, 1999). La diferente composición de los órganos, podría influir en el desarrollo de las funciones fisiológicas de los mismos, por modificaciones en la fluidez de las membranas de sus células o por la utilización de los PUFA n-3 como precursores de diversas biomoléculas.

La alimentación de las madres (que determina su estatus nutritivo) es la que determina la composición de los distintos tejidos y órganos del feto. De esta forma, se establece una relación directa entre el perfil en PUFA n-3 del plasma de las madres (tabla 3, artículo 5.5) y el de los tejidos y órganos analizados en los cabritos al nacimiento (tabla 1, artículo 5.6).

El perfil en ácidos grasos del cerebro (tabla 2, artículo 5.6), adquiere un elevado nivel de significación, puesto que su particular composición requiere gran cantidad de PUFA. El desarrollo de este órgano es muy vulnerable durante la vida intrauterina y totalmente dependiente del suministro materno, alcanzando porcentajes óptimos en el caso de los cabritos del lote experimental (Crawford, 1993). En opinión de Valenzuela y col. (1999), la carencia de DHA puede tener un importante impacto negativo sobre la capacidad de aprendizaje y el desarrollo óptimo del cerebro. Las concentraciones obtenidas de C20:5 y C22:6, llegan a ser tres y seis veces más altas que las encontradas en el plasma de las madres suplementadas con la grasa (tabla 3, artículo 5.5). En este sentido, se ha estimado que en el cerebro del feto humano, durante el último tercio de la gestación, se acumulan unos 20 mg/semana de PUFA n-3, especialmente de DHA (Connor y col., 1996; Francois y col., 1998).

En nuestro experimento, la concentración en el cerebro de PUFA n-3 resultó más alta en los cabritos nacidos de las madres cuya dieta se suplementó con el aceite de pescado. Sin embargo, en el grupo control la cantidad de EPA y DHA resultó elevada, a pesar de que en el plasma de las madres que no ingirieron el aceite de pescado, no se detectó la presencia de estos ácidos grasos. También hay que tener en cuenta, que en el plasma de

## 6. Discusión General

---

los dos grupos de madres se detectaban unos niveles de LNA (precursor de EPA y DHA) prácticamente iguales.

En este sentido, se puede deducir que la fracción de forraje de la alimentación de ambos grupos de madres pudo determinar la concentración de LNA a nivel plasmático. Este ácido graso, tuvo que ser elongado y desaturado hasta formar una parte importante de la cantidad de EPA y DHA encontradas en el cerebro de los cabritos recién nacidos. Este hecho explicaría que en la composición en ácidos grasos del cerebro no se detectó LNA.

### **Crecimiento**

Durante el desarrollo fetal y primeros estadios de vida, el AA puede actuar como promotor del crecimiento (Koletzko y Braun, 1991; Wotil y col., 1998). También se ha descrito la importancia de los PUFA n-3 sobre el mantenimiento de un óptimo crecimiento pre- y postnatal (Leskanich y Noble, 1999) y una reducción del número de prematuros en madres que tomaron una dieta rica en LCPUFA durante la gestación (Olsen y col., 2000).

En este estudio, el peso al nacimiento tanto de los cabritos cuyas madres tomaron el aceite de pescado como el de los cabritos nacidos de las que ingirieron la dieta estándar, resultó no diferente entre grupos ( $P > 0,05$ , Tabla 1, artículo 5.6).

La tasa de crecimiento de los cabritos que fueron sacrificados a los 45 días de su nacimiento (artículo 5.4), fue superior ( $P < 0,05$ ) en el lote nacido de madres que tomaron el aceite de pescado (155,9 g/día frente a 137,9 g/día), el porcentaje de músculo extraído en la disección de la pata izquierda trasera sobre la composición tisular de la pata, también fue superior ( $P < 0,05$ ) en el lote de cabritos experimental (64,89% frente a 62,86%) y la proporción entre el músculo y el hueso de la pata trasera izquierda también fue superior ( $P < 0,05$ ) en el lote experimental (2,91 frente a 2,52). Sin embargo, no se encontraron diferencias entre grupos ( $P$

> 0,05) en el porcentaje de los depósitos de grasa de cobertura, intermuscular e intramuscular de la pata trasera izquierda con respecto a la composición tisular total de la misma.

Estos resultados podrían deberse a que, en el momento elegido para determinar el perfil en ácidos grasos en plasma durante la gestación, los niveles de AA de las madres alcanzaban valores no diferentes ( $P > 0,05$ , Tabla 3, artículo 5.5). Por el contrario, la concentración de PUFA n-3, se detectaba claramente mayor en el plasma de las madres suplementadas. Por lo tanto, puede deducirse que al nacimiento y durante los primeros 45 días de vida, no existía en los cabritos un estado carencial en el estatus en AA y que la suplementación de la dieta de las madres con aceite de pescado no produjo diferencias significativas en el peso vivo de los cabritos al nacimiento y durante los primeros días de vida.

### **6.6. Aceite de pescado rico en PUFA n-3 y calidad de la leche**

En la tabla 3 de artículo 5.4, se muestra la composición química de la leche de las cabras según el tipo de concentrado. La cantidad de MS, grasa, caseína y lactosa fue no diferente ( $P > 0,05$ ). La cantidad de proteína y minerales fue superior ( $P < 0,05$ ) en los animales que tomaron el aceite de pescado.

La diferencia en la cantidad de proteína puede deberse al ahorro de la misma producida como consecuencia de la suplementación lipídica (Sanz Sampelayo y col., 1997; Jorgensen y col., 2003). En el artículo 5.3 (tabla 2), se detectó que la pérdida de N por la orina era menor ( $P < 0,05$ ) en el grupo de animales suplementados con la grasa, lo que originaba unas retenciones mayores de N ( $P < 0,05$ ) en relación con la cantidad ingerida y con la aparentemente absorbida. Asimismo, en el artículo 5.2 (tabla 5), la retención de energía como proteína fue superior ( $P < 0,05$ ) en los animales que tomaron el aceite de pescado, mientras que la pérdida de calor asociada

## 6. Discusión General

---

a la oxidación de la proteína resultó menor ( $P < 0.05$ ) en los animales que ingirieron el aceite de pescado. Estos resultados indican que cuando se suplementa la dieta con una grasa rica en PUFA n-3, se produce una mejor utilización de la proteína que incrementa su retención. Esta relación entre el metabolismo lipídico y proteico se reflejó en una mayor cantidad de proteína en leche.

La elevada concentración de minerales en leche del grupo que tomó el aceite de pescado frente al control ( $P < 0.05$ ), pudo ser debida al calcio incorporado en el suplemento lipídico como consecuencia de proteger a los ácidos grasos frente al metabolismo ruminal en forma de sales cálcicas.

En la tabla 4 del artículo 5.4, se muestra el perfil en ácidos grasos de la leche según el tipo de concentrado consumido. La cantidad de AGS fue menor ( $P < 0.05$ ) en la leche de las cabras que tomaban el suplemento lipídico, fundamentalmente por una drástica disminución ( $P < 0.01$ ) del ácido esteárico. La reducción de la cantidad de ácido esteárico en más de la mitad, en la leche del grupo experimental frente a la cantidad que se detectó en la leche del grupo testigo, no se corresponde con los niveles de digestibilidad detectados para este ácido graso en el artículo 5.3 (tabla 3). No obstante, al estar los animales de este ensayo bajo un régimen semiextensivo, la suplementación de la dieta con la grasa protegida, pudo contribuir a que los animales seleccionaran el forraje consumido en el campo conforme a sus necesidades energéticas y nutritivas. Normalmente la mayor fuente de LA y de LNA de las cabras en régimen semiextensivo proviene del pasto, y gran parte de estos ácidos grasos al ser hidrogenados en el rumen determinan la cantidad de ácido esteárico en leche (Chilliard y col., 2001).

Las cantidades de EPA (C20:5), DPA (C22:5) y DHA (C22:6), todos ellos PUFA de la serie 3, fueron sensiblemente superiores ( $P < 0.01$ ) en la leche de los rumiantes que ingirieron el aceite de pescado frente a la leche de las cabras del grupo control. La transferencia de estos ácidos grasos desde la dieta hasta la leche fue de 3,27% para el DHA, 20,37% para el EPA y de 38,19% para el DPA. La tasa de transferencia desde la dieta

hasta la leche obtenida es superior a la detectada por otros autores (Kitesa y col., 2001; Gulati y col., 1999).

La cantidad de C18:1 *trans* y de CLA (isómeros *cis*-9, *trans*-11 y *trans*-10, *cis*-12) también fue estadísticamente superior ( $P < 0.05$ ) en la leche de los animales que consumieron el aceite de pescado. El porcentaje de C18:1 *trans* respecto al C18:1 total en la especie caprina oscila entre un 5 y un 15% (Alonso y col., 1999). En la leche de las cabras que tomaron la suplementación obtuvimos un 22,6% de C18:1 *trans* respecto al C18:1 total, mientras que en el grupo control este porcentaje fue de 2,7. El porcentaje medio de CLA en la especie caprina oscila entorno a 0,4 y 0,9% del total de ácidos grasos (Alonso y col., 1999; Gulati y col., 2000; Chilliard y col., 2002), resultando en la leche del grupo experimental un 1,68% del total de ácidos grasos.

Los resultados obtenidos para la digestibilidad aparente del EPA y DHA (tabla 3, artículo 5.3), así como los obtenidos en la transferencia a leche (tabla 4, artículo 5.4) indican que el aceite de pescado había sido suficientemente protegido frente al metabolismo ruminal, así como adecuadamente estabilizado con antioxidantes. Sin embargo, el alto porcentaje obtenido de C18:1 *trans* y de CLA, podría ser consecuencia de que la protección de los PUFA del aceite de pescado no fue total, y por tanto, una parte de estos PUFA sufrieron procesos de hidrogenación e isomerización dando lugar al elevado porcentaje detectado de C18:1 *trans* y de CLA (Kitesa y col., 2001; Chilliard y col., 2003).

La composición en ácidos grasos obtenida en la leche de las cabras cuya dieta se suplementó con aceite de pescado, confiere a esta leche un carácter saludable para el consumidor humano. La ingesta de las cantidades obtenidas de forma natural de EPA y DHA en leche, pueden tener efectos beneficiosos frente algunas de las enfermedades crónicas más relevantes en la actualidad, como la aterosclerosis, la diabetes mellitus, la hipertensión arterial, la enfermedad inflamatoria, la obesidad y determinados cánceres (Bartsch y col., 1999; James y col., 2000; Hu y col., 2002; Kris-Etherton y col., 2002; Ruxton y col., 2004.). Las recomendaciones de consumo diario

de DHA para humanos oscilan entre 0,2 y 0,6 g (Sociedad Española de Nutrición Comunitaria, 2001; Mataix, 2001b; Ruxton y col., 2004), por lo que con la cantidad obtenida en la leche del grupo experimental un vaso de esta leche al día bastaría para consumir la cantidad recomendada de éste ácido graso.

Asimismo el CLA se ha asociado con importantes actividades biológicas, incluyendo la anticarcinogénica y aterogénica, la reducción de los efectos catabólicos de la estimulación inmune, la mejora del crecimiento, la disminución de la grasa corporal y la regulación de la glucosa en sangre (Murphy, 2001; Pariza y col., 2001; Evans y col., 2002). Sin embargo, el ácido graso C18:1 *trans* presenta un efecto potencialmente negativo sobre la salud humana (aunque es el precursor del CLA), estando su ingesta asociada con el incremento de la frecuencia de padecer aterosclerosis y cáncer (Chilliard y col., 2000).

### **6.7 Aceite de pescado rico en PUFA n-3 y calidad de la canal.**

En la tabla 5 del artículo 5.4, se muestran los valores del perfil en ácidos grasos obtenidos de la grasa de cobertura, intermuscular e intramuscular de la pata trasera izquierda de los cabritos que fueron gestados y amamantados por cabras que tomaron aceite de pescado en la dieta frente a los depósitos de los cabritos del grupo control.

La cantidad de C18:1 *trans* y de CLA (isómeros *cis*-9, *trans*-11 y *trans*-10, *cis*-12) obtenida en los tres depósitos de grasa analizados fue superior ( $P < 0.05$ ) en los cabritos cuyas madres ingirieron el aceite de pescado. Este resultado coincide con el detectado en la leche de sus madres. El rumen del cabrito durante sus primeros días de vida no es funcional, comenzando su actividad cuando ingiere alimentos sólidos. Por lo tanto, se deduce que estos valores de C18:1 *trans* y de CLA proceden de la leche materna. Ensayos similares, obtienen unos valores de éstos ácidos

grasos similares a los presentados en el artículo 5.4 (Ashes y col., 1992; Scollan y col., 2001, 2003).

La cantidad de AGS y de AGMI totales fue no diferente entre grupos ( $P > 0,05$ ), en los tres tipos de grasa analizados. Tampoco se detectaron diferencias significativas en la cantidad de PUFA n-6 ( $P > 0,05$ ) entre los dos grupos, siendo el AA inferior ( $P < 0,05$ ) en la grasa de cobertura de los cabritos nacidos de madres que tomaron la suplementación y superior ( $P < 0,05$ ) en la grasa intermuscular del mismo grupo de animales frente al grupo control. Aunque se detectaron las diferencias indicadas para el AA, éstas fueron insignificantes (0,17 frente a 0,11 en la grasa de cobertura y 0,14 frente a 0,16 en la grasa intermuscular) para determinar un estatus carencial de este ácido grasos que pudiese influir en su actividad como promotor del crecimiento (Koletzko y Braun, 1991; Wotil y col., 1998). Los datos obtenidos para el peso al nacimiento de los cabritos (tabla 1, artículo 5.6) y la tasa de crecimiento de estos cabritos demuestran que no existió un estado carencial en el estatus en AA.

Los valores de EPA, DPA y DHA fueron superiores ( $P < 0,01$ ) en la grasa de cobertura, intermuscular e intramuscular de los cabritos nacidos de las madres que tomaron la suplementación con aceite de pescado. La cantidad de PUFA n-3, detectada en la grasa intramuscular es más de 5 veces superior a la de la grasa de cobertura e intermuscular. Cuando se suplementa una dieta con PUFA n-3, los ácidos grasos EPA y DHA se incorporan preferentemente en los fosfolípidos del músculo (Ashes y col., 1992; Scollan y col., 2001; Wachira y col., 2002). Por lo tanto, la cantidad de éstos ácidos grasos puede estar sobreestimada al analizar junto a esta grasa, los ácidos grasos que componen las membranas celulares del músculo. Este razonamiento supone una modificación en la composición en ácidos grasos de las membranas celulares en favor de los PUFA n-3, lo cual podría tener efectos positivos sobre la fisiología de las mismas.

Esta modificación de la composición en ácidos grasos de la canal, con un incremento en la proporción de EPA y DHA, está en sintonía con los resultados obtenidos en la composición de los órganos y depósitos grasos

## 6. Discusión General

---

analizados en la tabla 1 del artículo 5.6, con la composición corporal indicada en la tabla 4 del artículo 5.2, con la alta digestibilidad aparente obtenida en la tabla 3 del artículo 5.3 y con el perfil en ácidos grasos del plasma de las madres detectados en la tabla 3 del artículo 5.5.

La cantidad de PUFA n-3 en la pata trasera de los cabritos cuyas madres tomaron el aceite de pescado fue aproximadamente 2 veces superior a la cantidad detectada en los cabritos del grupo control. La cantidad de EPA + DHA fue aproximadamente 3,7 veces superior para los animales del grupo experimental. El ratio n-6/n-3 también se redujo significativamente ( $P < 0.05$ ). Esto valores confieren a la canal obtenida en los cabritos del grupo experimental, una composición con un carácter saludable y posiblemente funcional para el consumidor humano.

## 7. Conclusiones

---



Con el objeto de aportar nuevos conocimientos sobre los efectos que los ácidos grasos poliinsaturados n-3 ejercen sobre la fisiología animal y diseñar un método natural de obtención de alimentos enriquecidos en dichos ácidos grasos, se han desarrollado varios estudios en diferentes modelos experimentales, cuyos resultados nos permiten deducir las siguientes conclusiones:

1. Durante una infección por *Trichinella spiralis*, la suplementación de la dieta con aceite de pescado rico en ácidos grasos poliinsaturados n-3, determina una reducción del número de helmintos en intestino y del número de larvas en el diafragma, así como un incremento en las respuestas Th1 y Th2.
2. La termogénesis asociada al consumo de dos dietas con el mismo nivel de energía metabolizable, se debe a la distinta composición en nutrientes de las mismas. Los ácidos grasos poliinsaturados n-3 de la dieta presentan una elevada tasa de oxidación, contribuyendo sensiblemente al mantenimiento del balance energético.
3. Mediante el análisis de la utilización nutritiva de una dieta, suplementada con las sales cálcicas de ácidos grasos procedentes de aceite de pescado, se deduce a partir de los resultados obtenidos sobre la digestibilidad aparente de la fibra y de los principales PUFA n-3, un grado de protección del aceite de pescado óptimo.
4. La suplementación de la dieta de la cabra durante la gestación con aceite de pescado protegido rico en ácidos grasos poliinsaturados n-3, determina un incremento sobre el índice de prolificidad.
5. La composición en PUFA n-3 de la grasa riñonada, epiplónica y mesentérica, así como la del cerebro, timo, bazo, hígado y corazón en el feto, puede modificarse suplementando la dieta de las madres con una grasa rica en PUFA n-3, aspecto que determina la fisiología de éstos órganos y depósitos grasos.

6. La suplementación de la dieta de la cabra con aceite de pescado protegido frente al metabolismo ruminal, produce una leche cuya composición lipídica presenta una menor cantidad de ácidos grasos saturados y una mayor cantidad de PUFA n-3 y CLA, obteniéndose un producto más saludable para el consumidor humano.
7. Los cabritos gestados y amamantados por madres que toman un suplemento de aceite de pescado protegido, proporcionan a los 45 días de su nacimiento una canal enriquecida en PUFA n-3 y CLA.

## Bibliografía

---



- Abayassekara, D.R.E. and Whates, D.C., 1999. Effects of altering dietary fatty acid composition on prostaglandin synthesis and fertility. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 61:275-287.
- Abecia, J. A., Rhind, S. M., Bramley, T.A. and McMillen, S. R., 1995. Steroid production and LH receptor concentrations of ovarian follicles and corpora lutea and associated rates of ova wastage in ewes given high and low levels of food intake before and after mating. *Animal Science* 61: 57-62.
- Abijaoudé J.A., Morand-Fehr P., Tessier J., Schmidely P., Sauvant D., 2000. Influence of forrage:concentrate ratio and type of starch in the diet on feeding behaviour, dietary preferences, digestion, metabolism and performance of dairy goats in mid lactation. *Animal Science*. 71:359-368.
- AbuGhazaleh, A.A. and Jenkins, T. C. 2004. Disappearance of docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids from cultures of mixed ruminal microorganisms. *Journal of Dairy Science* 87: 645-651.
- Ackman, RG, 1995. Composition and nutritive value of fish and shellfish lipids. *Fish and fishery products. Composition, nutritive properties and stability.* (a. Ruiter, ed). Cab international. Wallingford. U.k.
- Ackman, RG, Ratnayake, WMN, Olsson, B, 1988. The basic fatty acid composition of atlantic fish oil: potential similarities useful for enrichment of polyunsaturated fatty acids by urea complexation. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 65: 136-138.
- Adler AJ, Holub BJ, 1997. Effect of garlic and fish-oil supplementation on serum lipid and lipoprotein concentration in hypercholesterolemic men. *Am J Clin Nutr*, 65:445-450.
- Agüera, S. 1998. Fundamentos fisiológicos. Órganos y mecanismos neuroendocrinos sexuales. En: *Reproducción y mejora de pequeños*

## *Bibliografía*

---

- rumiantes. Ed. Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía. Sevilla. Cursos Superiores, 4: 55-68.
- Aguilera Sánchez, J. F. 1998. Nutrición y manejo alimentario de los reproductores machos destinados a inseminación artificial. En: Reproducción y mejora de pequeños rumiantes. Ed. Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía. Sevilla. Cursos Superiores, 4: 351-361.
- Aguilera, J. F., Lara, L., Molina, E. and Prieto, C. 1991. Energy balance studies with growing Granadina goats during fasting and maintenance. *Small Ruminant Research* 5: 109-115.
- Allen, P.C., Danforth, H.D., Levander, O.A., 1996. Association of lowered plasma carotenoids with protection against cecal coccidiosis by diets high in n – 3 fatty acids. *Poult. Sci.* 75, 179–185.
- Al MDM; Hornstra G; Van der Schouw YT; Bultra-Ramakers MT and Huisjes HJ, 1990. Biochemical EFA status of mothers and their neonates after normal pregnancy. *Early Human Development* 24, 239–248.
- Al MDM; Van Houwelingen AC; Kester AD; Hasaart TH; Jong EP and Honstra G, 1995. Maternal essential fatty acid pattern during normal pregnancy and their relationship to the neonatal essential fatty acid status. *British Journal of Nutrition* 74, 55–68.
- Albert CM, Hennekens CH, O'Donnell CJ, 1998. Fish consumption and risk of sudden cardiac death. *JAMA*, 279:23-8.
- Alfárez, M.J.M., Barrionuevo, M., López Aliaga, I., Sanz Sampelayo, M.R., Lisbona, F., Robles, J.C., Campos, M.S., 2001. Digestive utilization of goat and cow milk fat in malabsorption syndrome. *J. Dairy Sci.* 64: 451-461.

- Alonso R., Aguirre A., Marzo F. 2000. Effects of extrusion and tradicional processing methods on antinutrients and in vitro digestibility of protein and starch in faba and kidney beans. *Food Chemistry*. 68:159-165.
- Alonso L., Fontecha J., Lozada L., Fraga M.J., Juárez M. 1999. Fatty acid composition of caprine milk: major, branched-chain, and trans fatty acids. *Journal of Dairy Science*. 82: 878-884.
- Ambrosoli R., DiStasio L., Mazzocco P. 1988. Content of alpha<sub>s1</sub>-casein and coagulation properties in goat milk. *Journal of Dairy Science*. 71: 24-28.
- American Academy of Pediatrics. Committee on Nutrition, 1986. Prudent life-style for children: dietary fat and cholesterol. *Pediatrics* 78: 521–525.
- American Academy of Pediatrics, 1992. Committee on Nutrition. Statement on cholesterol. *Pediatrics* 90: 469–473.
- Andrews , R.J., Lewis, D., 1970. The utilisation of dietary fats by ruminants. II. The effect of fatty acid chain lenth and unsaturation on digestibility. *J. Agric. Sci.*: 75, 55-60.
- Andrew, S. M., Tyrrell, H. F., C. K. Reynolds, and R. A. Erdman. 1991. Net energy for lactation of calcium salts of long-chain fatty acids for cows fed silage-based diets. *J. Dairy Sci*. 74:2588–2600.
- Appel, LJ; Miller, ER; Seidler, AL; Whelton, PK, 1993. Does supplementation of diet with “fish oil” reduce blood presure?. A meta-analysis of controlled clinical trial. *Arch intern Med* 153:1429-1438.
- Armstrong, J. D., E. A. Goodall, F. J. Gordon, D. A. Rice, and W. J. McCaughey. 1990. The effects of levels of concentrate offered and inclusion of maize gluten or fish meal in the concentrate on reproductive performance and blood parameter of dairy cows. *Anim. Prod.* 50:1–10.

## *Bibliografía*

---

- Ashes, J. R., Siebert, B. D., Gulati, S. K., Cuthbertson, A. Z. and Scott, T. W., 1992. Incorporation of n-3 fatty acids of fish oil into tissue and serum lipids of ruminants. *Lipids* 277: 629-631.
- Association of Official Analytical Chemists, 1990. Official methods of analysis, 15th edition. AOAC, Washington, DC.
- Astrup A, Buemann B, Flint A, Raben A: Lowfat diets and energy balance. How does the evidence stand in 2002? *Proc Nutr Soc* 2002; 61: 299–309.
- Auestad N, Halter R, Hall RT, 2001. Growth and development in term infants fed long-chain polyunsaturated fatty acids: a double-masked, randomized, parallel, prospective, multivariate study. *Pediatrics*. 108:372-81.
- Baldi, A., Cheli, F., Corino, C., Dell'Orto, V. and Polidori, F., 1992. Effects of feeding calcium salts of long chain fatty acids on milk yield, milk composition and plasma parameters of lactating goats. *Small Ruminant Research* 6: 303-310.
- Bang, HO; Dyerberg, J; Sinclair, HM, 1980. The composition of the Eskimo food in Northwestern Greenland. *Am J Clin Nutr*: 33, 2657-2666.
- Banks, W., Capperton, JL, Girdler AK, 1990. Effect of dietary unsaturated fatty acids in various forms on de novo synthesis of fatty acids in the bovine mammary gland. *J. Dairy res.* 57: 179-185.
- Barber Cárcamo, A y Ponz Piedrafita, F, 1998. *Principios de Fisiología Animal*. Ed. Síntesis. Madrid.
- Barnouin, J. and M. Chassagne, 1991. An aetiological hypothesis for the nutrition-induced association between retained placenta and milk fever in the dairy cows. *Ann. Rech. Vet.* 22:331-343.

- Barrionuevo M., Alférez M.J.M., López Aliaga I., Sanz Sampelayo M.R., Campos M.S. 2002. Beneficial effects of goat milk on nutritive utilization of iron and copper in malabsorption syndrome. *Journal of Dairy Science*. 85: 657-664.
- Bartsch, H; Nair, J; Owen, RW, 1999. Dietary polyunsaturated fatty acids and cancers of the breast and colorectum: emerging evidence for their role as risk modifiers. *Carcinogenesis*, 20 (12): 2209-2218.
- Bateman, H.G., J.N. Spain, and M.R. Ellersieck., 1996. Influence of by-product feeds and tallow on lactation performance of Holstein cows during two seasons. *J. Dairy Sci*. 79: 114–120.
- Bauchart, D., Legay-Carmier, F., Doreau, M. and Gaillard, B., 1990. Lipid metabolism of liquid-associated and solid-adherent bacteria in rumen contents of dairy cows offered lipidsupplemented diets. *Br. J. Nutr.*, 63: 563-578.
- Bickerstaffe R., Noakes D.E., Anninson E.F. 1972. Quantitative aspects of fatty acid biohydrogenation, absorption and transfer into milk fat in the lactating goat, with special reference to the cis- and trans-isomers of octadecenoate and linoleate. *Biochemical Journal*. 130: 607-617.
- Birch, D.G., Birch, E.E., Hoffman, D.R., and Uauy, R.D. 1992a. Retinal development in very-low-birth-weight infants fed diets differing in omega-3 fatty acids. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 33(8): 2365-2376.
- Birch, E.E., Birch, D.G., Hoffman, D.R., and Uauy, R. 1992b. Dietary essential fatty acid supply and visual acuity development. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 33(11): 3242-3253.
- Birch, E.E., Birch, D. Hoffman, D., Hale, L., Everett, M. and Uauy, R. 1993. Breast-feeding and optimal visual development. *Journal of Pediatric Ophthalmology and Strabismus*. 30(1): 33-38.

## Bibliografía

---

- Bjornsson, S., Hardardottir, I., Gunnarsson, E., Haraldsson, A., 1997. Dietary fish oil supplementation increases survival in mice following *Klebsiella pneumoniae* infection. *Sci. J. Infect. Dis.* 29, 491–493.
- Blok, W.L., Vogel, M.T., Curf, J.H., Eling, W.M., Buurman, W.A., Van der Meer, J.W., 1992. Dietary fish-oil supplementation in experimental Gram-negative infection and in cerebral malaria in mice. *J. Infect. Dis.* 165, 898–903.
- Bock, B. J., Harmon, D. L., Brandt Jr, R. T. and Schneider, J. E., 1991. Fat source and calcium level effects on finishing steer performance, digestion, and metabolism. *Journal of Animal Science* 69: 2211-2224.
- Bodary PF, Wickenheiser KJ, Eitzman DT, 2002. Recent advances in understanding endogenous fibrinolysis: implications for molecular-based treatment of vascular disorders. *Expert Rev Mol Med*, 26: 1-10.
- Boden G, Chen X: Effects of fat on glucose uptake and utilization in patients with non-insulin-dependent diabetes. *J Clin Invest* 1995; 96: 1261–1268.
- Booyse FM, Aikens ML, Grenett HE, 1999. Endothelial cell fibrinolysis: transcriptional regulation of fibrinolytic protein gene expression (t-PA, u-PA, and PAI-1) by low alcohol. *Alcohol Clin Exp Res*, 23: 1119-24.
- Boulanger A., Grosclaude F., Mahé M.F. 1984. Polymorphisme des caséines  $\alpha_{s1}$  et  $\alpha_{s2}$  de la chèvre (*Capra hircus*). *Genetics Selection Evolution*. 16: 157-175.
- Bourre, J.M., Francois, M., Youyou, A., Dumont, O., Piciotti, M., Pascal, G. and Durand, G., 1989. 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. *Journal of Nutrition*. 119(12): 1880-1892.

- Bouthegourd JC, Even PC, Gripois D, Tiffon B, Blouquit MF, Roseau S, Lutton C, Tome, Martin JC, 2002. A CLA mixture prevents body triglyceride accumulation without affecting energy expenditure in Sgrian hamster. *J Nutr*; 132: 2682-2689.
- Boza J., Sanz Sampelayo M.R. 1997. Aspectos nutricionales de la leche de cabra. *Anales de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental*. 10: 109-139.
- Boza López, J., 1998. Efecto del nivel alimentario en la esfera reproductiva de la oveja y la cabra. En: *Reproducción y mejora de pequeños rumiantes*. Ed. Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía. Sevilla. *Cursos Superiores*, 4: 287-295.
- Boza, J., Pérez Martínez, L. and Sanz Sampelayo, M. R., 1999. Procedimiento de obtención de una grasa protegida para incluir en las dietas de los rumiantes y producto obtenido. Patente de invención nº 2·136·536.
- Boza J. 2005. Alimentación de la cabra de aptitud láctica. *Curso Nutrición de Rumiantes*. CIHEAM. Zaragoza.
- Branen, AL, 1975. Toxicology and biochemistry of Bha and Bht. *J. Am. Oils Chem. Soc.* 52: 59-63.
- Brenner RR, 1977. Regulatory function of delta 6 desaturase. Key enzyme of polyunsaturated fatty acid synthesis. *Avd. Exp. Med. Biol.* 83: 85-101.
- Brenner RR, 1987. Byosynthesis and interconversión of essential fatty acids. En: *Handbook of Eicosanoids: Prostaglandins and Related Lipids*, Vol I, Chemical and Biochemical Aspects, Part A, ed. A.L. Willis, CRC Press, Florida pp 99-107.

## *Bibliografía*

---

- British Nutrition Foundation. Task Force on Unsaturated Fatty Acids, a report of the British Nutrition Foundation. Chapman and Hall. London 1992.
- Brown AA, Hu FB, 2001. Dietary modulation of endothelial function: implications for cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr*, 73:673-686.
- Bruce, J. M. Broadbent, P. J. And Topps, J. H., 1984. A model of the energy system of lactating and pregnant cows. *Animal Production* 38: 351-362.
- Bruna, E., Petit, E., Beljean-Leymarie, M., Huynh, S., Nouvelot, A., 1989. Specific susceptibility of docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid to peroxidation in aqueous solution. *Lipids*. 24: 970-975.
- Budowski, P., Leighfield, M.J. and Crawford, M.A., 1987. Nutritional encephalomalacia in the chick: an exposure of the vulnerable period for cerebellar development and the possible need for both w6 and w3 fatty acids. *British Journal of Nutrition*. 58: 511 – 520.
- Bull, A.W., Bronstein, J.C. and Nigro, N.D., 1989. The essential fatty acid requirements for azoxymethane-induced intestinal carcinogenesis in rats. *Lipids*. 24: 340-436.
- Bulliyya, G, 2002. Influence of fish consumption on the distribution of serum cholesterol in lipoprotein fractions: comparative study among fish-consuming and non-fish consuming populations. *Asia Pac J Clin Nutr* 11(2): 104-111.
- Burdge G.C., Jones AE and Wootton S.A., 2002. Eicosapentaenoic and docosahexanoic acids are the principal products of  $\alpha$ -linolenic acid metabolism in young men. *Br J Nutr* 88, 355-363.

- Burdge G.C., Wootton S.A., 2002. Conversion of  $\alpha$ -linolenic acid to eicosapentaenoic, docosapentaenoic and docosahexanoic acids in young women. *Br J Nutr* 88, 411-420.
- Burke, J. M., D. J. Carroll, K. E. Rowe, W. W. Thatcher, and F. Stormshak., 1996. Intravascular infusion of lipid into ewes stimulates production of progesterone and prostaglandin. *Biol. Reprod.* 55:169–175.
- Burke, J. M., Staples, C. R., Risco, C. A., Sota, R. L. And Thatcher, W. W. 1997. Effect of ruminant grade menhaden fish meal on reproductive and productive performance of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 80: 3386-3398.
- Burr GO and Burr MM, 1929. A new deficiency disease produced by rigid exclusion of fat from the diet. *J. Biol. Chem.* 82: 345-367.
- Burr ML, Fehily AM, Gilbert JF, 1989. Effects of changes in fat, fish, and fibre intakes on death and myocardial reinfarction: diet and reinfarction trial (DART). *Lancet*, 2:757-761.
- Caja G., Bocquier F. 2000. Effects of nutrition on the composition of sheep's milk. *Options méditerranéennes.* 52: 59-74.
- Caja G., Schmidely P. Feeding and milk quality in sheep and goats. 2005. 11 Seminar of the FAO-CIHEAM Sub-Network on Sheep and Goat Nutrition. Catania. Italia.
- Calder PC, Bond JA, Bevan SJ, Hunt SV, Newsholme, EA, 1991. Effect of fatty acids on the proliferation of concanavalina A stimulated rat lymph node lymphocyte. *International journal of Biochemistry* 23: 579-588.
- Calder PC, Newsholme, EA, 1992. Polyunsaturated fatty acids suppress human peripheral blood lymphocyte proliferation and interleukin-2 production. *Clinical Science* 82: 695-700.

## *Bibliografía*

---

- Calder, P.C., Yacob, P., Thies, F., Wallace, F.A., Miles, E.A., 2002. Fatty acids and lymphocyte functions. *Br. J. Nutr.* 87 (Suppl. 1), 531–548.
- Calderon I., De Peters E.J., Smith N.E., Franke A.A. 1984. Composition of goat's milk: Changes within milking and effects of a high concentrate diet. *Journal of Dairy Science.* 67: 1905-1911.
- Campos M.S., López Aliaga I., Alférez M.J.M., Nestares T., Barrionuevo M. 2003. Effects of goat's and cow's milks on nutritive utilization of calcium and phosphorous in rats with intestinal resection. *British Journal of Nutrition.* 90: 61-67.
- Cant JP, McBride BW, Croom WJ Jr, 1996. The regulation of intestinal metabolism and its impact on whole animal energetics. *J Anim Sci* 74(10): 2541-53.
- Cañeque, V. y Sañudo, C., 2001. Metodología para el estudio de la calidad de la canal y de la carne en rumiantes. Ed: Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria. Ministerio de Ciencia y Tecnología, Madrid, España.
- Carlson, S.E., Cooke, R.J., Werkman, S.H. and Tolley, E.A. 1992. First year growth of preterm infants fed standard compared to marine oil n-3 supplemented formula. *Lipids.* 27(11): 901-907
- Carlson, SE, 1996. Arachidonic acid status of human infants: influence of gestational age at birth and diets with very long chain n-3 and n-6 fatty acids. *J. Nutr.* Apr; 126 (4 Suppl.): 1092S-1098S.
- Carlson, S.E., Werkman, S.H., Rhodes, P.G. and Tolley, E.A. 1993a. Visual acuity development in healthy preterm infants: effect of marine-oil supplementation. *American Journal of Clinical Nutrition.* 58(1):35-42.

- Carlson, S.E., Werkman, S.H., Peeples, J.M., Cooke, R.J. and Tolley, E.A. 1993b. Arachidonic acid status correlates with first year growth in preterm infants. *Proceedings of the National Academy of Sciences. (USA)* 90(3): 1073-1077.
- Carrero, JJ; Martín Bautista, E; Baró, L; Fonollá, J; Jiménez, J; Boza, JJ y López-Huertas, E, 2005. Cardiovascular effects of omega-3 fatty acids and alternatives to increase their intake. *Nutr Hosp*, 20:63-69.
- Carrié I; Guesnet P; Bourre JM; Francès H, 2000. Diets containing long-chain polyunsaturated fatty acids affect behaviour differently during development than ageing in mice. *British Journal of Nutrition*. 83: 439-447.
- Carroll, K.K. and Khor, H.T., 1975. Dietary fat in relation to tumorigenesis. *Progress in Biochemical Pharmacology*. 10: 308-353.
- Carroll, K.K., 1989. Fish oils and cancer. In Chandra, R.K. *Health Effects of Fish and Fish Oils*. ARTS Biomedical Publishers and Distributors, St. John's, Newfoundland, pp. 395-408.
- Carroll, D.J., R.R. Grummer, and M.K. Clayton., 1992a. Stimulation of luteal cell progesterone production by lipoproteins from cows fed control or fat-supplemented diets. *J. Dairy Sci*. 75:2205–2214.
- Carroll, D.J., R.R. Grummer, and F.C. Mao., 1992b. Progesterone production by cultured luteal cells in the presence of bovine low and high density lipoproteins purified by heparin affinity chromatography. *J. Anim. Sci*. 70:2516–2526.
- Carroll, D. J., F. R. Hossain, and M. R. Keller. 1994. Effect of supplemental fish meal on the lactation and reproductive performance of dairy cows. *J. Dairy Sci*. 77:3058–3072.

## *Bibliografía*

---

- Carstairs, J.A., D.A. Morrow and R.S. Emery, 1980. Interrelationships between energy balance and postpartum reproductive function in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 72: 767.
- Casali, E., Gesmundo, N., Farruggia, G., Spisni, A., Masotti, L., 1994. Hydroxystearic acid effects on CDC2/histone H1 Kinase activity in C108 carcinoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 203 (3), 1385-1391.
- Cave, W.T., Jr., 1991a. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acid effects on animal tumorigenesis. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal.* 5: 2160-2166.
- Cave, W.T, Jr., 1991b. Omega-3 fatty acid diet effects on tumorigenesis in experimental animals. *World Review of Nutrition and Dietetics.* 66: 462-476.
- Chalon S; Vancassel S; Zimmer L; Guilloteau D; Durand G, 2001. Polyunsaturated fatty acids and cerebral function: focus on monoaminergic neurotransmission. *Lipids.* Sep; 36(9): 937-944.
- Chambaz J, Ravel D, Manier MC, 1985. Essential fatty acids interconversion in the human fetal liver. *Biol. Neonate.* 47: 136-140.
- Chandan R.C., Attaie R., Sahani K.M. 1992. Nutritional aspects of goat milk and its products. *Proceedings of V International Conference on goats.* Nueva Delhi, India. Vol II. Part I. 399-420.
- Chang, H.R., Dulloo, A.G., Vladioianu, I.R., Piguet, P.F., Arsenijevic, D., Girardier, L. and Pechere, J.C. 1992. Fish oil decreases natural resistance of mice to infection with salmonella typhimurium. *Metabolism.* 41: 1-2.
- Chianese L., D'Auria R., Ferranti P., Garro G., Mauriello R., Rubino R., Addeo F. 1995. Occurrence of novel  $\alpha_{s1}$ -casein variants in Italian goat breeds. *Seminar on Production and Utilization of ewes and goats milk.*

- Federación Internacional de Lechería. Limmin-Hersonissos, Creta (Grecia).
- Chilliard, Y., Bauchart, D., Gagliostro, G., Oilier, A. and Vermorel, M., 1991a. Duodenal rapeseed oil infusion in early and midlactation cows. 1. Intestinal apparent digestibility of fatty acids and lipids. *J. Dairy Sci.*, 74: 490-498.
- Chilliard, Y., Gagliostro, G., Flechet, J., Lefaivre, J., Sebastian, I., 1991b. Duodenal rapeseed oil infusion in early and midlactation cows. 5. Milk fatty acids and adipose tissue lipogenic activities. *J. Dairy Sci.* 74, 1844–1854.
- Chilliard, Y., Vacelet, J.M., Durand, D. and Bauchart, D., 1992. Portal-drained viscera (PDV) and hepatic balances of energy metabolites in high-yielding dairy cows. Effects of a fat supplement on PDV rates. *Reprod. Nutr. Dev.*, 32: 501.
- Chilliard, Y., and J.F. Ottou., 1995. Duodenal infusion of oil in midlactation cows. 7. Interaction with niacin on responses to glucose, insulin, and b-agonist challenges. *J. Dairy Sci.* 78: 2452–2463.
- Chilliard, Y., Doreau, M., 1997. Effects of ruminal or postruminal fish oil supply on cow milk yield and composition. *Reprod. Nutr. Dev.* 37, 338–339.
- Chilliard, Y.; Ferlay, A.; Doreau, M., 2001. Effect of different types of forages, animal fat or marine oils in cow's diet on milk fat secretion and composition, especially conjugated linoleic acid (CLA) and polyunsaturated fatty acids. *Livestock Production Science*, 70 (1-2): 31-48.
- Chilliard Y., Chabosseau J.M., Rouel J., Capitan P., Gominard C., Gaborit P., Juanéda P., Ferlay A. 2002. Interactions between forage nature and sunflower or linseed oil supplementation on goat milk fatty acids of

- interest for human nutrition. Multi-Function Grasslands: Quality Forages, Animal Products and Landscapes. Proc. 19<sup>th</sup> Gen. Mtg. of the Eur. Grassl. Fed. (Durand J.L., Emile J.C., Huyghe C., Lemaire G. eds). La Rochelle. Grassl. Sci. Eur. 7:548-549.
- Chilliard Y., Ferlay A., Mansbridge R.M, Doreau M. 2000. Ruminant milk fat plasticity: nutritional control of saturated, polyunsaturated, trans and conjugated fatty acids. *Annales de Zootechnie*. 49:181-205.
- Chilliard Y., Ferlay A., Rouel J., Lamberet G. 2003. A review of nutritional and physiological factors affecting goat milk lipid synthesis and lipolysis. *Journal of Dairy Science*. 86: 1751-1770.
- Chin, S.F., Liu, W., Storkson, J.M., Ha, Y.L., Pariza, M.W., 1992. Dietary sources of conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a newly recognized class of anticarcinogens. *J. Food Compos. Anal.* 5, 185–197.
- Cho H.P.; Nakamura M.T. and Clarke S.D., 1999. Cloning, expression, and nutritional regulation of the mammalian delta 6-desaturase. *Journal of Biological Chemistry* 274, 471-477.
- Choi, B.R., D.L. Palmquist, and M.S. Allen., 1996. Effects of endogenous cholecystokinin (CCK) on feed intake, plasma insulin, pancreatic polypeptide (PP) and metabolite levels in heifers fed fat. *J. Dairy Sci.* 79(Suppl. 1):169.
- Choi, N.J., Enser, M., Wood, J.D., Scollan, N.D., 2000. Effect of breed on the deposition in beef muscle and adipose tissue of dietary n-3 polyunsaturated fatty acids. *Anim. Sci.* 71, 509–519.
- Chouinard, P.Y., Corneau, L., Bauman, D.E., Butler, W.R., Chilliard, Y., Drackley, J.K., 1998. Conjugated linoleic of milk from cows fed different sources of dietary fat. *J. Anim. Sci.* 76 (Suppl. 1), 233.

- Clandinin MT, Jumpsen J, Suh M, 1994. Relationship between fatty acid accretion, membrane composition, and biologic functions. *Pediatr. Nov*;125(5 Pt 2): S25-32.
- Clandinin MT; JE Chappell; S Leong; T Heim; PR Swyer and GW Chance, 1980a. Intrauterine fatty acid accretion rates in human brain: implications for fatty acid requirements. *Early Human Development*. Vol 4, 2: 21-29.
- Clandinin MT; JE Chappell ; S Leong ; T Heim ; P R Swyer and GW Chance, 1980b. Extrauterine fatty acid accretion infant brain: implications for fatty acid requirements. *Early Human Development*. Vol 4, 131-138.
- Clandinin, MT.; Chappell, JE., Heim, T; Swyer, PR; and Chance, GW, 1981. Fatty acid utilization in perinatal de novo synthesis of tissues. *Early Human Dev.* 5, 355-366.
- Clapperton, J.L. and Steele, W., 1983. Fat supplementation in animal production ruminants. *Proceedings of the Nutrition Society*, 42: 243.
- Clark S., Sherbon J.W. 2000. Genetic variants of alpha<sub>s1</sub>-CN in goat milk: breed distribution and associations with milk composition and coagulation properties. *Small Ruminant Research*. 38:135-143.
- Clarke SD: Polyunsaturated fatty acid regulation of gene-transcription: a mechanism to improve energy balance and insulin resistance. *Br J Nutr* 2000; 83(suppl 1):S59–S66.
- Cobiac L, Clifton PM, Abbey M, Belling GB, Nestel PJ, 1991. Lipid, lipoprotein, and hemostatic effects of fish vs fish-oil n-3 fatty acids in mildly hyperlipidemic males. *Am J Clin Nutr*, 53:1210-16.
- Coleman, R.A., 1989. The role of placenta in lipid metabolism and transport. *Semin. Perinatal*. 13, 180-191.

## *Bibliografía*

---

- Connor WE; Lowensohn R and Hatcher L, 1996. Increased docosahexaenoic acid levels in human newborn infants by administration of sardines and fish oil during pregnancy. *Lipids*. Vol 31(Suppl.): 183S-187S.
- Connor, WE, 2000. Importance of n-3 fatty acids in health and disease. *Am J Clin Nutr*, 71:171S-175S.
- Cook, D.A., McGilliard, A.D. and Richard, M., 1967. In vitro conversion of long-chain fatty acids to ketones by bovine rumen mucosa. *J. Dairy Sci.*, 51:715-720.
- Coppen, PP, 1994. The use of antioxidants”, rancidity in foods. Ch 5. Applied Science Publishers. (JC Allen, RJ Hamilton, Eds). New York. USA.
- Corteel, J.M., 1981. Colección, procesing and artificial insemination of goat semen. *Goat Production*. Ed. C. Gall. Academic Press. Londres, 171-191.
- Crawford MA, 1993. The role of essential fatty acids in neuronal development: implications for perinatal nutrition. *Am. J. Clin Nutr*. 57(5 Suppl.): 703S- 709S.
- Crawford MA, 2000. Placental delivery of arachidonic and docosahexanoic acids: implications for the lipid nutrition of preterm infants. *Am. J. Clin. Nutr*. 71(suppl): 275-284.
- Crawford, M.A., Doyle, W., Drury, P.J., Lennon, A., Costeloe, K. and Leighfield, M. 1989. n-6 and n-3 fatty acids during early human development. *Journal of Internal Medicine*. 225 suppl. 1: 159-169.
- Christensen, R.A., M.R. Cameron, J.H. Clark, J.K. Drackley, J.M. Lynch, and D.M. Barbano., 1994a. Effects of amount of protein and ruminally

- protected amino acids in the diet of dairy cows fed supplemental fat. *J. Dairy Sci.* 77:1618–1629.
- Christensen, R.A., J.K. Drackley, D.W. LaCount, and J.H. Clark., 1994b. Infusion of four long-chain fatty acid mixtures into the abomasum of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 77: 1052–1069.
- Cruickshank, J.K., Cooper, J., Burnett, M., MacDuff, J., Drubra, U., 1991. Ethnic differences in fasting plasma C-peptide and insulin in relation to glucose tolerance and blood pressure. *The Lancet.* 338(8771): 842-7.
- Cunnane SC; Menard CR; Likhodii SS; Brenna JT; Crawford MA, 1999a. Carbon recycling into the novo lipogenesis is a mayor pathway in neonatal metabolism of linoleate and alpha- linolenate. *Prost. Leukot Essent. Fatty Acids.* 60 (5-6): 387-392.
- Cunnane SC; Francescutti V; Brenna JT, 1999b. Docosaheaxaenoate requirement and infant development. *Nutrition.* 15:801-802.
- Cunnane, S. C. 1995. Metabolism and function of á-linolenic acid in humans. Pages 99-127.En: S. Cunnane C. and Thompson L. U., eds. *Flaxseed in human nutrition.* AOCS Press, Champaign, IL.
- Czerkawski, J.W., Blaxter, K.L., Wainman, F.W., 1966. The effect of linseed oil fatty acids incorporated in the diet on the metabolism of sheep. *Br. J. Nutr.* 20: 485-494.
- Danet-Desnoyers, G.J.W., Johnson, S.F., O'Keefe, and W.W. Thatcher, 1993. Characterization of a bovine endometrial prostaglandin synthesis inhibitor (EPSI). *Biol. Reprod.*48(Suppl. 1):115.
- Davenport, G., Boling, G., Gay, N. and Bunting, L., 1987. Effect of soybean lipid on growth and ruminal nitrogen metabolism in cattle fed soybean meal or ground whole soybean. *Journal of Animal Science* 65: 1680-1689.

Daviglus, M. L., Stamler, J., Orenca, A. J., Dyer, A. R., Liu, K., Greenland, P., Walsh, M. K., Morris, D. and Sekelle, R. B. 1997. Fish consumption and the 30-years risk of fatal myocardial infarction. *New England Journal of Medicine* 336: 1046-1053.

Daviglus, ML; Stamler, J; Orenca, AJ, 1997. Fish consumption and the 30-year risk of fatal myocardial infarction. *N Engl Med*: 336: 1046-1053.

Dawson, RMC, Kemp, P, 1970. Biohydrogenation of dietary fats in ruminants. En: *Physiology of digestion and metabolism in the ruminant*. (A.T. Phillipson, Ed.) Oriel Press. Newcastle-upon-tyne, England.

De la Torre Adarve, MG, 2006. Interacción entre el genotipo de la  $\alpha_{S1}$ -caseína y el nivel de proteína de la dieta. Utilización nutritiva, producción y composición de la leche en cabras de raza malagueña. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.

De Peters E.J., Cant J.P. 1992. Nutritional factors influencing the nitrogen composition of bovine milk: a review. *Journal of Dairy Science*. 75:2043-2070.

De Schrijver R, Vermeulen D, Viaene E: Lipid metabolism responses in rats fed beef tallow, native or randomized fish oil and native or randomized peanut oil. *J Nutr* 1991; 121: 948-955.

Devlin, TM, 2004. *Bioquímica. Libro de texto con aplicaciones clínicas*. Ed. Reverté SA. Barcelona.

Dewailly, E; Blanchet, C; Gingras, S, Lemieux, S; Holub, BJ, 2003. Fish consumption and blood lipids in three ethnic groups of Quebec (Canada). *Lipids* 38(4): 359-365.

Di Luzio, N.R., 1972. Employment of lipids in the measurement and modification of cellular, humoral, and immune responses. In Paoletti, R.

- and Kritchevsky, D. *Advances in Lipid Research*. New York: Academic Press. 43-88.
- Díaz E., Analla M., Muñoz-Serrano A., Alonso-Moraga A., Serradilla J.M. 1999. Variation of milk yield and contents of total casein and casein fraction in Murciano-Granadina goats. *Small Ruminant Research*. 34: 141-147.
- Díaz Lopez M. y Moyano López F. J. 1996. En: *Zootecnia. Bases de producción animal*. Tomo IX producción caprina: 85-101.
- Doreau, M; Legay, F; Bauchart, D, 1991. Effect of source and level of supplemental fat on total and ruminal organic matter and nitrogen digestion in dairy cows. *J Dairy Sci* 74(7): 2233-42.
- Doreau, M. and Chilliard, I. 1997. Effects of ruminal or postruminal fish oil supplementation on intake and digestion in dairy cows. *Reproduction, Nutrition, Development* 37: 113-124.
- Doreau, M., Ferlay A., 1994. Digestion and utilisation of fatty acids by ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, 45: 379-396.
- Doreau, M., Ferlay A., 1995. Effect of dietary lipids on nitrogen metabolism in the lumen: a review. *Animal Feed Science and Technology*, 43: 97-110.
- Doreau, M., Chilliard, Y., Rulquin, H., Demeyer, D.I., 1999. Manipulation of milk fat in dairy cows. In: Garnsworthy, P.C. Wiseman, J. (Eds.), *Recent Advances in Animal Nutrition*. Nottingham University Press, Nottingham, pp. 81–109.
- Drackeley, J. K., Clark, A.K., Sahlu, T., 1985. Ration digestibilities and ruminal characteristics in steers fed sunflower seed with additional calcium. *J. Dairy Sci.*, 68: 356-376.

## *Bibliografía*

---

- Drackley, J.K., Klusmeyer, T.H., Trusk, A.M. and Clark, J.H., 1992. Infusion of long-chain fatty acids varying in saturation and chain length into the abomasum of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 75: 1517-1526.
- Dutta-Roy, AK, 1997. Placental transfer of long-chain polyunsaturated fatty acids. *Prenatal and Neonatal Medicine* 2:101-107.
- EAAP (European Association for Animal Production). *Goat Nutrition*. Ed. P. Morand-Fehr. Publ. N°46 de la EAAP. Pudoc. Wageningen.
- Elgersma A., Tamminga S., Ellen G. 2006. Modifying milk composition through forage. *Animal Feed Science and Technology*. En prensa.
- Elmeddah, Y., Doreau, M. and Michalet-Doreau, B., 1991. Interaction of lipid supply and carbohydrates in the diet of sheep with digestibility and ruminal digestion. *J. Agric. Sci.*, 116: 437-445.
- Emery R.S. 1978. Feeding for increased milk protein. *Journal of Dairy Science*. 61:825-828.
- Endres, S., Ghorbani, R., Kelley, V.E., Georgilis, K., Lonnemann, G., van der Meer, J.W., Cannon, J.G., Rogers, T.S., Klemper, M.S., Weber, P.C., Schaefer, E.J., Wolff, S.M. and Dinarello, C.A. 1989. The effect of dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids on the synthesis of interleukin-1 and tumor necrosis factor by mononuclear cells. *New England Journal of Medicine*. 320(5):265-271.
- Enjalbert, F., Moncoulon, R., Vernay, M. and Griess, D., 1994. Effects of different forms of polyunsaturated fatty acids on rumen fermentation and total nutrient digestibility of sheep fed prairie hay based diets. *Small Ruminant Research* 14: 127-135.
- Enser, M, 1984. The chemistry, biochemistry and nutritional importance of animal fats. In J. Wiseman (Ed.), *Fats in Animal Nutrition*, pp 23-51. London: Butterworths.

- Enser, M & Wood, JD, 1993. Effect of time of year on fatty acid composition and melting point of UK lamb. Proceedings of the 39<sup>th</sup> International Congress of Meat Science and Technology, 1, 12-13.
- Enser, M., Scollan, N.D., Choi, N.J., Kurt, E., Hallet, K., Wood, J.D., 1999. Effect of dietary lipid on the content of conjugated linoleic acid (CLA) in beef. *Anim. Sci.* 69, 143–146.
- Es, A.J.H.Van, 1991. Animal nutrition and human health. Lecture of Prize Roche Research for Animal Nutrition, 1-37.
- Espino, A; López-Miranda, J; Castro, P, 1996. Monounsaturated fatty acid enriched diets lower plasma insulin levels and blood pressure in healthy young men. *Nut Met Cardiovasc Dis*: 6, 147-154.
- Etter, E., Hoste, H., Chartier, C., Pors, I., Koch, C., Brqua, C., Contineau, H., 2000. The effect of two levels of dietary protein on resistance and resilience of dairy goats experimentally infected with *Trichostrongylus colubriformis*: comparison between high and low producers. *Vet. Res.* 31, 247–258.
- European Society of Paediatric Gastroenterology and Nutrition Committee on Nutrition: Comment on the content and composition of lipids in infant formulas. *Acta Paediatr. Scand.* 80:887-896. 1991.
- Evans M.E., Brown J.M., McIntosh M.K. 2002. Isomer-specific effects of conjugated linoleic acid (CLA) on adiposity and lipid metabolism. *Journal of Nutritional Biochemistry.* 13:508-516
- Fahey J., J. F. Mee, D. O'Callaghan and J.J. Murphy, 2002. Effect of calcium salts of fatty acids and calcium salt of methionine hydroxy analogue on reproductive responses and milk production in Holstein-Friesian cows. *Animal Science* 74: 145-154.

## *Bibliografía*

---

- Fallon, R.J., Williams, P.E.V. and Innes, G.M., 1986. The effects on feed intake, growth and digestibility of nutrients of including calcium soaps of fat in diets for young calves. *Animal Feed Science and Technology* 14: 103-115.
- FAO/WHO, 1997. Report of Expert Consultation. The Role of Dietary Fats and Oils in Human Nutrition. FAO. Rome.
- FAO/WHO, 2003. Report of a Joint Expert Consultation: Diet, Nutrition and the prevention of chronic diseases. WHO Technical Report Series 916. Ginebra.
- FAOSTAT. Base de datos estadísticos de la FAO. <http://faostat.fao.org>.
- Faverdin P. 1999. The effect of nutrients on feed intake in ruminants. *Proceedings of the Nutrition Society*. 58: 523-531.
- Ferguson, J.D., Sklan, W.V. Chalupa and D.S. Kronfeld., 1990. Effects of hard fats on in vitro and in vivo rumen fermentation, milk production, and reproduction in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 73: 2864-2879.
- Ferlay, A. and Doreau, M., 1993. Effect of lipid supply in the diet of cows on calcium and magnesium pools in the rumen. *Proc. Nutr. Soc.*, 52:151.
- Ferlay, A., Chabrot, J., Elmeddah, Y. and Doreau, M., 1993. Ruminant lipid balance and intestinal digestion by dairy cows fed calcium salts of rapeseed oil fatty acids or rapeseed oil. *Journal of Animal Science* 71: 2237-2245.
- Ferlay, A., Chilliard, Y. and Doreau, M., 1992. Effects of calcium salts differing in fatty acid composition on duodenal and milk fatty acid profiles in dairy cows. *J. Sci. Food Agric.*, 60: 31-37.

- Fickova M, Hubert P, Crémel G, Leary C, 1998. Dietary (n-3) and (n-6) polyunsaturated fatty acids rapidly modify fatty acid composition and insulin effects in rat adipocytes. *J Nutr*; 128: 512-519
- Fievez, V.I., Van Nevel, C.J. and Demeyer, D.I. 2000. Lipolysis and biohydrogenation of PUFA's from fish oil during in vitro incubations with rumen contents. *Proceedings of the Nutrition Society* 59: 193.
- Finstand, HS, Devon, CA, Kulseth, MA, Synstad, AV, Knudsen, E, Kolset, SO, 1998. Cell proliferation, apoptosis and accumulation of lipid droplets in U937-1 cells incubated with eicosapentaenoic acid. *Biochem J* 336: 451-459.
- Fly, A.D. and P.V. Johnston., 1990. Tissue fatty acid composition, prostaglandin synthesis, and antibody production in rats fed corn, soybean, or low erucic acid rapeseed oil (canola oil). *Nutr. Res.* 10: 1299-1310.
- Folman, Y., M. Rosenberg, Z. Herz and M. Davidson. 1973. The relationship between plasma progesterone concentration and conception in postpartum dairy cows maintained on two levels of nutrition. *J. Reprod. Fertil.* 34:267.
- Fonseca, F. A., J. H. Britt, B. T. McDaniel, J. C. Wilk and A. H. Rakes., 1983. Reproductive traits of Holsteins and Jerseys. Effects of age, milk yield, and clinical abnormalities on involution of cervix and uterus, ovulation, estrous cycles, detection of estrus, conception rate, and days open. *J. Dairy Sci.* 66:1128.
- Forbes, J.M., 1986. Dietary factors affecting intake. In *The voluntary feed intake of farm animals* (Ed. J. M. Forbes), pp. 85-113. Butterworths, London.

## *Bibliografía*

---

- Forbes J.M. 1995. Prediction of voluntary intake. En: Voluntary food intake and diet selection in farm animals. (J.M. Forbes ed). CAB. Internacional Wallingford. Reino Unido. 384-415.
- Foures, C., 1992. Corps gras d'animaux terrestres. In: Karleskind, A. (Ed.), Manuel des Corps Gras. Elsevier, Paris, pp. 242–260.
- Frabe A. 1997. Perspectives actualles d'utilisation du lait de chevre dans l'alimentation infantile. En: Proceedings de Colloque Interets Nutritionnel et Dietetique du Lait de chevre. Vol 81. INRA. Paris, Francia. pp: 123-126.
- Franklin, S.T., Martin, K.R., Baer, R.J., Shingoethe, D.J. and Hippen, A.R., 1999. Dietary marine algae (*Schizochytrium* sp.) increases concentrations of conjugated linoleic, docosahexaenoic and transvaccenic acids in milk of dairy cows. *Journal of Nutrition* 129: 2048-2052.
- Fredeen A.H. 1996. Considerations in the nutritional modification of milk composition. *Animal Feed Science and Technology*. 59: 185-197.
- Freeman, C.P., 1984. The digestion, absorption and transport of fats-non-ruminants. In: J. Wiseman (Editor), *Fats in Animal Nutrition*. Butterworth, London, pp. 105-122.
- Frémont L, Gozzélino MT, Franchi MP, Linard A., 1998. Dietary flavonoids reduce lipid peroxidation in rats fed polyunsaturated or monounsaturated fat diets. *J Nutr*;128(9):1495-502
- Frenoux JM, Prost ED, Belleville JL, Prost JL: A polyunsaturated fatty acid diet lowers blood pressure and improves antioxidant status in spontaneously hypertensive rats. *J Nutr* 2001; 131: 39–45.

- Friend DW, 1974. Effect on the performance of pigs from birth to market weight of adding fat to the lactation diet of their dams. *Journal of Animal Science* 39: 1073–1081.
- Fritsche KL, Huang S-C, Cassity NA, 1993. Enrichment of omega-3 fatty acids in suckling pigs by maternal dietary fish oil supplementation. *Journal of Animal Science*. 71:1841–1847.
- Fritsche, K.L., Shahbazian, L.M., Feng, C., Berg, J.N., 1997. Dietary fish oil reduces survival and impairs bacterial clearance in C3H/Hen mice challenged with *Listeria monocytogenes*. *Clin. Sci.* 92, 95–101.
- Fritsche, K.L., Anderson, M., Feng, C., 2000. Consumption of eicosapentanoic acid and docosahexaenoic acid impairs murine interleukine-12 and interferon-gamma production in vivo. *J. Infect. Dis.* 182 (Suppl. 1), S54–S61.
- Gagliostro, G., and Y. Chilliard., 1991. Duodenal rapeseed oil infusion in early and midlactation cows. 2. Voluntary intake, milk production, and composition. *J. Dairy Sci.* 74: 499–509.
- Gagliostro, G.A., Chilliard, Y., 1992. Utilización de lípidos protegidos en la nutrición de vacas lecheras. I. Efectos sobre la producción y la composición de la leche y sobre la ingestión de materia seca y energía. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 12: 1-15.
- Gaiva, M. H. C., Couto, R. C., Oyama, L. M., Couto, G. E. C., Silveira, V. L. F., Riberio, E. B. and Nascimento, C. M. O. 2001. Polyunsaturated fatty acid-rich diets: effect on adipose tissue metabolism in rats. *British Journal of Nutrition* 86: 371-377.
- García-Bojalil C.M., C.R. Staples, C.A. Risco, J.D. Savio, and W.W. Thatcher, 1998. Protein degradability and calcium salts of long-chain fatty acids in the diets of lactating dairy cows: reproductive responses. *Journal of Dairy Science* 81: 1385-1395.

## *Bibliografía*

---

- García Muriana, F. J., 2002. Metabolismo de los ácidos grasos. En: Libro blanco de los omega-3. Ed. Puleva Food. Granada.
- García Salcedo M. A., 1998. Endocrinología. Hormonas sexuales. Definición, modo y tiempo de acción. En: Reproducción y mejora de pequeños rumiantes. Ed. Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía. Sevilla. Cursos Superiores, 4: 35-51.
- García Unciti M.S. 1996. Utilidad terapéutica de los triglicéridos de cadena media (MCT). Dietas cetogénicas en la epilepsia infantil. *Nutrición Clínica*. 16:7-35.
- Gardner, HW, 1979. Lipid hydrogenation reactivity with proteins and amino acids: a review. *J.agric. Food chem.* 27: 220-229.
- Gerson T., John A., King A.S.D. 1985. The effects of dietary starch and fibre on the in vitro rates of lipolysis and hydrogenation by sheep rumen digesta. *Journal of Agricultural Science*. 105: 27-30.
- Gibson RA & Kneebone GM, 1981. Fatty acid composition of human colostrum and mature breast milk. *American Journal of Clinical Nutrition* 34: 252–257.
- Gibson, R.A. and Makrides, M., 2001. Long-chain polyunsaturated fatty acids in breast milk: are they essential?. *Adv. Exp. Med. Biol.* 501: 375-83.
- Giger-Reverdin S., Le Pierres J.L., Duvaux-Ponter C., Morand-Fehr P., Tessier J., Dupas G., Martin O., Rouzeau A., Sauvant D. 2004. Influence of the degree of dietary fatty acid unsaturation on rumen fermentation parameters. *Options Méditerranéennes*. 59: 67-71

- Giger S., Sauvant D., Hervien J. 1987. Influence of the kind of compound feed on goat milk production and composition. *Annales de Zootechnie*. 36: 334-335.
- Gil A; Gil M, 2002. Funciones de los ácidos grasos poliinsaturados y oleico durante la gestación, lactación y la infancia. En: Libro blanco de los omega-3. Ed. Puleva Food. Granada.
- Givens, D.I., Cottrill, B.R., Davies, M., Lee, P., Mansbridge, R., Moss, A.R., 2000. Sources of n-3 polyunsaturated fatty acids additional to fish oil for livestock diets. A review. *Nutr. Abstr Rev. B* 70, 1–19.
- Givens D.I., Shingfield K.J. 2004. Foods derived from animals: the impact of animal nutrition on their nutritive value and ability to sustain long-term health. *Nutrition Bulletin*. 29: 325-332.
- Gooden, J.M., 1973. The importance of lipolytic enzymes in milk fed and ruminating calves. *Aust. J. Biol. Sci.*, 26:1189-1199.
- Goodman, M.G., Weigle, W.O. 1980. Modulation of lymphocyte activation I. Inhibition by an oxidation product of arachidonic acid. *Journal of Immunology*. 125: 593-600.
- Goodwin, J.S., Messner, R.P., Peake, G.T. 1974. Prostaglandin suppression of mitogen stimulated leukocytes in culture. *Journal of Clinical Investigation*. 4: 368-378.
- Goosen, P.C.M., 1975. Absorption of long-chain fatty acids by rumen epithelium; experiments in vivo and in vitro. *Z. Tierphysiol. Tierern~klarg. Futtermittelkde*, 35: 296-302.
- Gordon, D., Bray, M., Morley, J. 1976. Control of lymphokine secretion by prostaglandins. *Nature*. 262: 401-402.

## *Bibliografía*

---

- Grasas y aceites en la nutrición humana, 1993. Consulta FAO/OMS de expertos. Estudio FAO Alimentación y Nutrición – 57.
- Greiner, RC; Winter, J; Nathanielsz, PM; Brenna, JT, 1997. Brain docosahexaenoate accretion in fetal baboons: bioequivalence of dietary alpha linolenic acid and docosa hexaenoic. *Pediatr Res* 42: 826-834.
- Griinari J.M., Bauman D.E. 1999. Biosynthesis of conjugated linoleic acid and its incorporation into meat and milk ruminants. *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research*, vol 1 (Yurawecz M., Mossoba M., Kramer J., Pariza M., Nelson G. eds.) 180-200, American Oil Chemists Society Press, Champaign.
- Griinari, J.M., Corl, B.A., Lacy, S.H., Chouinard, P.Y., Nurmela, K.V.V., Bauman, D.E., 2000. Conjugated linoleic acid is synthesised endogenously in lactating dairy cows by  $\Delta^9$ -desaturase. *J. Nutr.* 130, 2285–2291.
- Grosclaude F., Mahé M. F., Brignon G., Di Stasio L., Jeunet R. 1987. A mendelian polymorphism underlying quantitative variations of goat  $\alpha_{s1}$ -casein. *Genetics Selection Evolution.* 19: 399-411.
- Grosclaude F., Ricordeau G., Martin P., Remeuf F., Vassal L., Bouillon J. 1994. Du gène au fromage: le polymorphisme de la caséine  $\alpha_{s1}$  caprine, ses effets, son évolution. *INRA. Production Animale.* 7: 3-19.
- Grummer, R.R. and Carroll, D.J., 1991. Effects of dietary fat on metabolic disorders and reproductive performance of dairy cattle. *Animal Science.* 69:3838-3852.
- Grummer, R.R., 1988. Influence of prilled fat and calcium salts of palm oil fatty acids on ruminal fermentation and nutrient digestibility. *Journal of Dairy Science* 71: 117-123.

- Grummer, R.R., 1991. Effect of feed on the composition of milk fat. *Journal of Dairy Science* 74: 3244-3257.
- Grzesiak T. 1997. Lait de chevre, lait d'avenir pour les nourrissons. En: *Proceedings de Colloque Interets Nutritionnel et Dietetique du Lait de chevre*. Vol 81. INRA. Paris, Francia. pp: 127-148.
- Gulati S.K., Byers E.B., Byers Y.G, Ashes J.R, Scott T.W. 1997. Effects of feeding different fat supplements on the fatty acid composition of goat milk. *Animal Feed Science and Technology*. 66: 159-164.
- Gulati S.K., Kitessa S.M., Ashes J.R., Fleck E., Byers E.B., Byers Y.G., Scott T.W. 2000. Protection of conjugated linoleic acids from ruminal hydrogenation and their incorporation into milk fat. *Animal Feed Science and Technology*. 86: 139-148.
- Gulati, S.K., Ashes, J.R. and Scott, T.W., 1999. Hydrogenation of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids and their incorporation into milk fat. *Animal Feed Science and Technology* 79: 57-64.
- Gurr, M.I., and J.L. Harwood., 1991. Dietary lipids: implications for health and disease. Page 162 in *Lipid Biochemistry*. M.I. Gurr and J.L. Harwood, ed. Chapman and Hall, London, United Kingdom.
- Hadjipanayiotou M. 1995. Composition of ewe, goat and cow milk and of colostrums of ewes and goats. *Small Ruminant Research*. 18: 255-262.
- Hadjipanayiotou M, Morand-Fehr P. 1991. Intensive feeding of dairy goats. En: *Goat Nutrition*. (Morand-Fehr P. ed). Pudoc. Wageningen. pp: 197-208.
- Haenlein G.F.W., 1992. Role of goat meat and milk in human nutrition. *Proceedings of. V International Conference on Goats*. Inter. Goat Association. Nueva Delhi. India. Vol 2: 575-580.

## *Bibliografía*

---

- Haenlein G.F.W., 1996. Nutritional value of dairy products of ewe and goat milk. Proc IDF/CIRVAL Seminar Production and Utilization of Ewe and Goat milk. Vol 9603, Internat. Dairy Fed. Publ. Bruselas. Bélgica. pp: 159-179.
- Haenlein G.F.W., 2004. Goat milk in human nutrition. Small Ruminant Research. 51: 155-163.
- Hagemeister, H., Precht, D., Franzen, M., Barth, C.A., 1991.  $\alpha$ -Linolenic acid transfer into milk fat and its elongation by cows. Fat Sci. Technol. 10, 387–391.
- Halas V, Dijkstra J, Babinszhy L, Verstegen MWA, Gerrits WJJ: Effect of dietary energy sources on energy metabolism of growing and fattening pigs: a model simulation; in Souffrant WB, Metges CC (eds): Progress in Research on Energy and Protein Metabolism. Wageningen, Academic Publishers, 2003, pp 171–174.
- Hamosh M, Salem N Jr, 1998. Long-chain polyunsaturated fatty acids. Biol Neonate. 74: 106-20.
- Handin R, Loscalzo J, 1988. Hemostasis, Thrombosis, Fibrinolysis and Cardiovascular disease. En: Braunwald E, ed. Heart Disease. A textbook of cardiovascular medicine. PA W.B. Saunders Company, 1758-9.
- Harris WS, 1996. n-3 fatty acids and lipoproteins: comparison of results from human and animal studies. Lipids, 31: 243-252.
- Harris, WS, 1997. n-3 fatty acids and serum lipoproteins: human studies. Am J Clin Nutr, 65: 1645S-1654S.
- Harrison, J. H., J. P. McNamara, and R. L. Kincaid., 1995. Production responses in lactating dairy cattle fed rations high in fat. J. Dairy Sci. 78:181–193.

- Harvatine, K.J. and Allen M.S., 2006. Effects of fatty acids supplements on ruminal and total tract nutrient digestion in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 89: 1092-1103.
- Hawkins, D.E., K.D. Niswender, G.M. Oss, C.L. Moeller, K.G. Odde, H.R. Sawyer, and G.D. Niswender., 1995. An increase in serum lipids increases luteal lipid content and alters the disappearance rate of progesterone in cows. *J. Anim. Sci.* 73:541–545.
- Hepburn FN, Exler J, Weihrauch JL, 1986. Provisional tables on the content of omega-3 fatty acids and other fat components of selected foods. *J Am Diet Assoc* 1986, 86:788-93.
- Hermansen, J.E. and Lund, P., 1990. Fatty acid composition and milk quality related to feeding Ca-saponified palm acid oil to different breeds of dairy cows. *Journal of Dairy Research* 57: 23-31.
- Herrera E., 2002. Implications of Dietary Fatty Acids During Pregnancy on Placental, Fetal and Postnatal Development. *Placenta* 23 (suppl A): S9-S19.
- Hoffman DR, Uauy R., 1992. Essentiality of dietary  $\omega$ 3 fatty acids for premature infants: plasma and red blood cell fatty acid composition. *Lipids*.27:886-95.
- Holm, T; Andreassen, AK; Aukrust, P, 2001. Omega-3 fatty acids improve blood pressure control and preserve renal function in hypertensive heart transplant recipients. *Eur Hearrt J*:22, 428-436.
- Holman RT, Smythe L, Johnson S, 1979. Effect of sex and age on fatty acid composition of human serum lipids. *Am J Clin Nutr.* 32:2390-2399.
- Hopper L, Ness A, Higgins JP, Moore T, Ebrahim S, 1999. GISSI Prevenzione trial. *Lancet*, 354:447-455.

## *Bibliografía*

---

- Hoskin, S.O., Wilson, P.R., Barry, T.N., Charleston, W.A.G., Waghorn, W.A.G., 2000. Effect of forage legumes containing condensed tannins on lungworm (*Dyctiocaulus* sp.) and gastrointestinal parasitism in young red deer (*Cervus elaphus*). Res. Vet. Sci. 68, 223–230.
- Hsieh, RJ, Kinsella, JE, 1989. Oxidation of PUFA: mechanism, products and inhibition with emphasis on fish. Adv. Food nutr. Res. Vol. 33. Academic press.
- Hu, FB; Bronner, L; Willett, WC; y col., 2002. Fish and omega-3 fatty acid intake and risk of coronary heart disease in women. Jama-Journal of the American Medical Association, 287 (14): 1815-1821.
- Hulshof KF, Van Erp-Baart MA, Anttolainen M y cols., 1999. Intake of fatty acids in western Europe with emphasis on trans fatty acids: the Transfair Study. Eur J Clin Nutr, 53:143-157.
- Hunter, J.E. and Applewhite, T.H., 1991. Reassessment of *trans* fatty acid availability in the U.S. diet. American Journal of Clinical Nutrition. 54: 363-369.
- Hyvönen, L., Lampi, AM, Varo, P., Koivistoinen, P., 1993. Fatty acid analysis, tag equivalents as net fat value and nutritional attributes of commercial fats and oils. J. Food comp. Anal. 6: 24-40.
- Ikwuegbu, OA, Sutton, ID, 1982. The effect of varying the amount of linseed oil supplementation on rumen metabolism in sheep. Br J Nutr 48(2): 365-75.
- Illera, M. 1979. Fisiología de la reproducción. En: Fundamento de Fisiología Animal. Ed. Castejon, Fraile y Ponz. EUNSA. Pamplona, 493-530.
- Innis S, Auestad N, Siegman JS, 1996. Blood lipid docosahexaenoic and arachidonic acid in term gestation infants fed formulas with high

- docosahexaenoic acid, low eicosapentaenoic acid fish oil. *Lipids*. 31:617-625.
- Innis SM, Akrabawi SS, Diersen-Schade DA, 1997. Visual acuity and blood lipids in term infants fed human milk or formulae. *Lipids*. 32:63-72.
- Innis, S.M., 1991. Essential fatty acids in growth and development. *Prog. Lipid Res.* 30, 39-103.
- INRA (Institut National de la Recherche Agronomique), 1988. Alimentation des caprins (Mornd-Fehr y Sauvant). Plub. INRA. Paris.
- Ip, C., 1987. Fat and essential fatty acids in mammary carcinogenesis. *American Journal of Clinical Nutrition*. 45: (Suppl): 218s-224s.
- Ivan, M., Mir, P.S., Koenig, K.M., Rode, L.M., Neill, L., Entz, T., Mir, Z., 2001. Effect of dietary sunflower seed oil on rumen protozoa population and tissue concentration of conjugated linoleic acid in sheep. *Small Ruminant Res.* 41, 215–227.
- Jackson, H.D., Taylor, J.A., Hatcher, B.W. and Carter, J.M., 1964. Formation of ketone bodies from long-chain fatty acids in rumen epithelium and liver from ketotic sheep. *Arch. Biochem. Biophys.*, 105: 575-581.
- James, MJ; Gibson, RA; Cleland, LG, 2000. Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammatory mediator production. *American Journal of Clinical Nutrition*, 71 (1): 343S-348S.
- Jandal J.M. 1996. Comparative aspects of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*. 22:177-185.
- Jenkins, K.J., 1988. Factors affecting poor performance and scours in preruminant calves fed corn oil. *J. Dairy Science*. 71: 3013-3020.

## *Bibliografía*

---

- Jenkins, TC, Palmquist, DL, 1984. Effects of fatty acids or calcium soaps on rumen and total nutrient digestibility of dairy rations. *J. Dairy sci.* 67: 978-986.
- Jensen CL, Prager TC, Fraley JK, 1997. Effect of dietary linoleic/alpha-linolenic acid ratio on growth and visual function of term infants. *J Pediatr.* 131:200-209.
- Jerred, M. J., D. J. Carroll, D. K. Combs, and R. R. Grummer., 1990. Effects of fat supplementation and immature alfalfa to concentrate ratio on lactation performance of dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 73:2842–2854.
- Jesse, B.W., Solomon, R.K. and Baldwin, VI, R.L., 1992. Palmitate metabolism by isolated sheep rumen epithelial cells. *J. Anita. Sci.*, 70: 2235-2242.
- John A. Rooke, Elizabeth M. Ferguson, Anna G. Sinclair and Brian K. Speake, 2003. Fatty acids and reproducción in the pig. *Recent Advances in Animal Nutrition.* Pp 47-66.
- Jones A.E., Murphy J.L., Stolinski M. and Wootton S.A., 1998. The effect of age and gender on the metabolic disposal of 1-<sup>13</sup>C palmitic acid. *Eur J Clin Nutr* 52, 22-28.
- Jones, D.F., Weiss, W.P., Palmquist, D.L., 2000. Short communication: Influence of dietary tallow and fish oil on milk fat composition. *J. Dairy Sci.* 83, 2024–2026.
- Jorgensen MH, Holmer G, Lund P, 1998. Effect of formula supplemented with docosahexaenoic acid and  $\gamma$ -linolenic acid on fatty acid status and visual acuity in term infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 26:412-21.
- Jorgensen H, Zheng CT, Theil PK, Jakobsen K, 2003. Effect of specific structured triglycerides on energy metabolism in broiler chickens; in

- Souffrant WB, Metges CC (eds): Progress in Research on Energy and Protein Metabolism. Wageningen, Academic Publishers, 2003, pp 417–420.
- Judd, J.T., Clevidence, B.A., Muesing, R.A., Wittes, J., Sunkin, M.E. and Podczasy, J.J. 1994. Dietary *trans* fatty acids: effects on plasma lipids and lipoproteins of healthy adult men and women. American Journal of Clinical Nutrition. 59: 861-868.
- Jump, DB, 2002. Dietary polyunsaturated fatty acids and regulation of gene transcription Current Opinion In Lipidology, 13 (2): 155-164.
- Jump DB, Clarke SD, 1999. Regulation of gene expression by dietary fat. Annu Rev Nutr; 19: 63–90.
- Jung Hoon Lee, Govind Kannan, Brou Kouakou. 2006. Concentration and distribution of conjugated linoleic acids and trans-fatty acids in small ruminant milk and meat lipids. Journal of Food Lipids. 13: 100-111.
- Kadzere, C.T. and Jingura, R., 1993. Digestibility and nitrogen balance in goats given different levels of crushed whole soybeans. Small Ruminant Research 10: 175-180.
- Kaitaranta, J., 1992. Control of lipids oxidation in fish oil with various antioxidative compounds. J. Am. Oils Chem. Soc. 69: 810-813
- Kasser TR; Martin RJ; and Allen CE, 1981. Effect of gestational alloxan diabetes and fastig on fetal lipogenesis and lipid deposition in pigs. Biology of the Neonate. 40: 105-112.
- Kawas J.R., Lopes J., Danelon D.L., Lu C.D. 1991. Influence of forage to concentrate ratios on intake, digestibility, chewing and milk production of dairy goats. Small Ruminant Research. 4:11-18.

## *Bibliografía*

---

- Keady, T.W.J., Mayne, C.S., Fitzpatrick, D.A., 2000. Effects of supplementation of dairy cattle with fish oil on silage intake, milk yield and milk composition. *J. Dairy Res.* 67, 137–153.
- Kim Ha J., Lindsay R.C. 1991. Contributions of cow, sheep, and goat milks to characterizing branched-chain fatty acid and phenolic flavors in varietal cheeses. *Journal of Dairy Science.* 74:3267-3274.
- Kinsella JE; Lokesh B; Stone RA, 1990. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids and amelioration of cardiovascular disease: possible mechanisms. *Am. J. Clin. Nutr.* 52: 1-28.
- Kitajka, K; Puskas, LG; Zvara, A; y col., 2002. The role of n-3 polyunsaturated fatty acids in brain: Modulation of rat brain gene expression by dietary n-3 fatty acids *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, 99 (5): 2619-2624.
- Kitessa, S.M., Gulati, S.K., Ashes, J.R., Fleck, E., Scott, T.W., Nichols, P.D., 2001. Utilisation of fish oil in ruminants. I. Fish oil metabolism in sheep. *Animl Feed Science and Technology* 89: 189-199.
- Kobayashi Y., C.K. Boyd, B.L. McCormack, and M.C. Lucy, 2002. Reduced Insulin-Like Growth Factor-I after acute feed restriction in lactating dairy cows is independent of changes in growth hormone receptor 1A mRNA. *J. Dairy Science* 85: 748-754.
- Koletzko, B., Schmidt, E., Bremer, H.J., Haug, M. and Harzer, G., 1989. Effects of dietary long-chain polyunsaturated fatty acids on the essential fatty acid status of premature infants. *European Journal of Pediatrics.* 148(7): 669-675.
- Koletzko B, Braun M, 1991. Araquidonic acid and early human growth: is there a relation?. *Ann. Nutr. Metab.* 35(3): 128-131.

- Koletzko, B., Thiel, I., Abiodun, P.O. 1992. The fatty acid composition of human milk in Europe and Africa. *The Journal of Pediatrics*. 120(4): S62-S70.
- Korver, D.R., Klasing, K.C., 1997. Dietary fish oil alters specific and inflammatory immune responses in chicks. *J. Nutr.* 127, 2039–2046.
- Kramer, T.R., Schoene, N., Douglass, L.W., Judd, J.T., Ballard-Barbash, R. Taylor, P.R., Bhagavan, H.N. and Nair, P.P., 1991. Increased vitamin E intake restores fish-oil-induced suppressed blastogenesis of mitogen-stimulated T lymphocytes. *American Journal of Clinical Nutrition*. 54(5): 896-902.
- Kremer, J.M., Jubiz, W., Michalek, A., Rynes, R.I., Bartholomew, L.E., Bigaouette, J., Timchalk, M., Beeler, D. Lininger, L. 1987. Fish oil fatty acid supplementation in active rheumatoid arthritis. A double-blinded, controlled, crossover study. *Annals of Internal Medicine*. 106(4): 497-503.
- Kremer, J.M., 1996. Effects of modulation of inflammatory and immune parameters in patients with rheumatic and inflammatory disease receiving dietary supplementation of n–3 and n–6 fatty acids. *Lipids* 31, S243–S247.
- Kris-Etherton PM, Taylor DS, Yu-Poth S y cols., 2000. Polyunsaturated fatty acids in the food chain in the United States. *Am J Clin Nutr*, 71: 179S-188S.
- Kris-Etherton P, Eckel RH, Howard BV y col., 2001. AHA Science Advisory: Lyon Diet Heart Study. Benefits of a Mediterranean-style, National Cholesterol Education Program/American Heart Association Step I Dietary Pattern on Cardiovascular Disease. *Circulation*, 103:1823-1825.

## *Bibliografía*

---

- Kris-Etherton, P; Harris, WS; Appel, LJ, 2002. Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *CIRCULATION*, 106 (21): 2747-2757.
- Kris-Etherton PM, Harris WS, Appel LJ, 2003. AHA Nutrition Committee. American Heart Association: Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: new recommendations from the American Heart Association. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23:151-152.
- Kromhout, D, 1989. n-3 fatty acids and coronary heart disease epidemiology from Eskimos to Western populations. *J Intern Med*: 225, 47-51.
- Kromhout, D; Bosschieter, EB; De Lezenne Coulander, C, 1985. The inverse relationship between fish consumption and 20-year mortality from coronary heart disease. *N Engl Med*: 312: 1205-1209.
- Kuran M., A. G. Onal, J. J. Robinson, K. Mackie, B. K. Speake and T. G. McEvoy, 1999. A dietary supplement of calcium soaps of fatty acids enhances luteal function in sheep. *Animal Science* 69: 385-393.
- Kurlak L. O. y Stephenson T. J., 1999. Plausible explanations for effects of long chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFA) on neonates. *Arch. Dis. Child Fetal Neonatal* 88: F148-F154.
- Lahoz, C; Alonso, R; Porres, A; Mata, P, 1999. Las dietas ricas en ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados omega 3 disminuyen la presión arterial sin modificar la concentración de insulina plasmática en sujetos sanos. *Med Clin*: 112, 133-137.
- Lamprey, M.S. and Walker, B.L., 1976. A possible essential role for dietary linolenic acid in the development of the young rat. *Journal of Nutrition*. 10:86-89.

- Langhout, D.J., L.J. Spicer, and R.D. Geisert., 1991. Development of a culture system for bovine granulosa cells: effects of growth hormone, estradiol, and gonadotropins on cell proliferation, steroidogenesis, and protein synthesis. *J. Anim. Sci.* 69: 3321-3384.
- Lapillonne A; Picaud JC; Chirouze V; Goudable J; Reygrobellet B; Claris O and Salle BL, 2000. The use of low-EPA fish oil for long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation of preterm infants. *Pediatric Research* 48: 835-841.
- Laryea M, Cieslicki P, Diekmann E, Wendel U, 1990. Age-dependent fatty acid composition of erythrocyte membrane phospholipids in healthy children. *Z Ernährungswiss.* 29:284-294.
- Lawrence, R., Sorrel, T., 1993. Eicosapentaenoic acid in cyst fibrosis: evidence of a pathogenetic role for leukotriene B4. *Lancet* 342, 465–469.
- Lawrence, C.E., Paterson, J.C.M., Higgins, L.M., MacDonald, T.T., Kennedy, M.W., Garside, P., 1998. IL-4-regulated enteropathy in an intestinal nematode infection. *Eur. J. Immun.* 28, 2672–2684.
- Layne KS, Goh YK, Jumpsen JA, Ryan EA, Chow P, Clandinin MT, 1996. Normal subjects consuming physiological levels of 18:3(n-3) and 20:5(n-3) from flaxseed or fish oils have characteristic differences in plasma lipid and lipoprotein fatty acid levels. *J Nutr*, 266: 2130-2140.
- Leaf, A.A., Leighfield, M.J., Casteloe, K.L. and Crawford, M.A., 1992. Factors affecting long-chain polyunsaturated fatty acid composition of plasma choline phosphoglycerides in preterm infants. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition.* 14: 300-308.
- LeBlanc S. J. and K. E. Leslie, 2003. Presynchronization using a single injection of PGF<sub>2α</sub> before synchronized ovulation and first timed artificial insemination in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 86: 3215-3217.

## *Bibliografía*

---

- LeDoux M., Rouzeau A., Bas P., Sauvant D. 2002. Occurrence of trans- $C_{18:1}$  fatty acid isomers in goat milk: effect of two dietary regimens. *Journal of Dairy Science*. 85:190-197.
- Legay-Carmier, F., 1989. Effets de rations riches en matieres grasses sur le metabolisme lipidique des principanx compartiments microbiens du contenu de rumen chez la vache laitiere; consequences sur le flux duodenal des constituants microbiens. These Doct. Sci. Univ. Clermont-Ferrand II, France, 231 pp.
- Lehninger AL; Nelson DL; Cox MM, 1993. Principios de Bioquímica. Segunda Edición. Ed. Omega.
- Leskanich CO and Noble RC, 1999. The comparative roles of polyunsaturated fatty acids in pig neonatal development. *British Journal of Nutrition* 81: 87-106.
- Lessire, M., Doreau, M. and Aumaitre, A. 1992. Utilisation digestive et métabolique des corps gras chez les animaux domestiques. In *Manuel des Corps Gras*, pp. 683-694. Lavoisier, Paris.
- Lin, MP, Staples, CR, Sims, CA, O'Keefe, SF, 1996. Modification of fatty acids in milk by feeding calcium protected high oleic sunflower oil. *J. Food sci.* 61: 24-27.
- Linscheer WG, Vergroesen J, 1994. Lipids. In: Shils ME, Olson JA, Shike M, eds. *Modern nutrition in health and disease*, 8<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lea and Febiger: 47-88.
- Loor, J.J., Ueda, K., Ferlay, A., Chilliard, Y., Doreau, M., 2005. Intestinal flow and digestibility of trans fatty acids and conjugated linoleic acids (CLA) in dairy cows fed a high-concentrate diet supplemented with fish oil, linseed oil, or sunflower oil. *Animl Feed Science and Technology* 119: 203-225.

- López Aliaga I., Alférez M.J.M., Barrionuevo M., Nestares T., Sanz Sampelayo M.R., Campos M.S. 2003. Study on nutritive utilization of protein and magnesium in rats with resection of the distal small intestine. Beneficial effect of goat milk. *Journal of Dairy Science*. 86: 2958-2966.
- Lorenz, S., Buettner, A., Ender, K., Nürnberg, G., Papstein, H.J., Schieberle, P., Nürnberg, K., 2002. Influence of keeping system on the fatty acid composition in the longissimus muscle of bulls and odorants formed after pressure-cooking. *Eur. Food Res. Technol.* 214, 112–118.
- Lu C.D., Kawas J.R., Mahgoub O.G. 2005. Fibre digestion and utilization in goats. *Small Ruminant Research*. 60: 45-52
- Lucy, M.C. 2000. Regulation of ovarian follicular Growth by somatotropin and insulin-like growth factors in cattle. *Journal of Dairy Science* 83: 1635-1647.
- Lucy, M.C., C.R. Staples, F.M. Michel, W.W. Thatcher and D.J. Bolt, 1991. Effect of feeding calcium soaps to early postpartum dairy cows on plasma prostaglandin  $F_{2\alpha}$ , luteinizing hormone, and follicular growth. *Journal of Dairy Science* 74: 483-489.
- Lucy, M.C., T.S. Gross, and W.W. Thatcher., 1990. Effect of intravenous infusion of soybean oil emulsion on plasma concentration of 15-keto-13,14-dihydro-prostaglandin  $F_{2\alpha}$  and ovarian function in cycling Holstein heifers. Page 119 in *Livestock Reproduction in Latin America*. Int. At. Energy Agency, Vienna, Austria.
- Lucy M.T., W.W. Thatcher, F.J. Michel and C.R. Staples. 1989. Effect of dietary calcium soaps of long chain fatty acids (Megalac) on plasma prostaglandin F metabolite (PGFM), LH, energy balance, and follicular populations in early postpartum dairy cattle. *J. Anim. Sci.* 67(Suppl. 1): 389.

- Lucy, M.C., C.R. Staples, W.W. Thatcher, P.S. Erickson, R.M. Cleale, J.L. Firkins, J.H. Clark, M.R. Murphy, and B.O. Brodie., 1992. Influence of diet composition, dry matter intake, milk production and energy balance on time of postpartum ovulation and fertility in dairy cows. *Anim. Prod.* 54: 323–331.
- Lucy, M. C., R. L. De La Sota, C. R. Staples, and W. W. Thatcher. 1993. Ovarian follicular populations in lactating dairy cows treated with recombinant bovine somatotropin (somatotribove) or saline and fed diets differing in fat content and energy. *J. Dairy Sci.* 76:1014–1027.
- Lusis, AJ, 2000. Atherosclerosis. *Nature*, 407:233-241.
- Machmüller, A., Ossowski, D.A., Kreuzer M., 2000. Comparative evaluation of the effects of coconut oil, oilseeds and crystalline fat on methane release, digestion and energy balance in lambs. *Animl Feed Science and Technology*, 85, 41-60.
- Maczulak, AE, Dehority, BA, Palmquist, DL, 1981. Effects of long chain fatty acids on growth of rumen bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 11: 856-862.
- Makrides M, Neumann MA, Gibson RA, 1996 Is dietary docosahexaenoic acid essential for term infants?. *Lipids.* 31:115-119.
- Makrides M, Neumann MA, Simmer K, Gibson RA, 1999. Dietary long-chain polyunsaturated fatty acids do not influence growth of term infants: A randomized clinical trial. *Pediatrics.* 104:468-75.
- Mandell, I.B., Buchanan-Smith, J.G., Holub, B.J., Campbell, C.P., 1997. Effects of fish meal in beef cattle diets on growth performance, carcass characteristics and fatty acid composition of longissimus muscle. *J. Anim. Sci.* 75, 910–919.

- Madron, M.S., Peterson, D.G., Dwyer, D.A., Corl, B.A., Baumgard, L.H., Beermann, D.H., Baumann, D.E., 2002. Effect of extruded full-fat soybeans on conjugated linoleic acid content of intramuscular, intermuscular and subcutaneous fat in beef steers. *J. Anim. Sci.* 80, 1135–1143.
- Marckmann, P; Grombaek, M, 1999. Fish consumption and coronary heart disease mortality. *Eur J Clin Nutr*: 53, 585-590.
- Marshall, J.A., Hamman, R.F., Baxter, J., 1991. High-fat, low-carbohydrate diet and the etiology of non-insulin-dependent diabetes mellitus: the San Luis Valley Diabetes Study. *American Journal of Epidemiology* 134(6): 590-603.
- Martín L, Rodríguez P, Rota A, Rojas A, Pascual MR, Patón D, Tovar J, 1999. Effect of protected fat supplementation to lactating goats on growth and fatty acid composition of perirenal fat in goat kids. *Anim Sci* 68: 195-200.
- Martin P., Addeo R. 1996. Genetic polymorphism of casein in the milk of goats and sheep. En: *Production and Utilization of Ewe and Goat Milk. Proceedings of the IDF/Greek National Committee of IDF/CIRVAL Seminar, Creta, Grecia.* Pp: 45-58.
- Martínez M, 1995. Polyunsaturated fatty acids in developing human brain, erythrocytes and plasma in peroxisomal disease: therapeutic implications. *J. Inherit. Metab. Dis.* 18: 61-75.
- Massart-Leen A.M., De Pooter H., Decloedt M., Schamp N. 1981. Composition and variability of the branched-chain fatty acid fraction in the milk of goats and cows. *Lipids.* 16: 286-292.
- Mata, P.; Alonso, R.; López-Farré, A., 1996. Effect of dietary fat saturation on LDL oxidation and monocyte adhesion to human endothelial cells in vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*: 16, 1347-1355.

## *Bibliografía*

---

- Mata, P; Alonso, R; Mata, N, 2002. Los omega-3 y omega-9 en la enfermedad cardiovascular. Libro Blanco de los omega-3: 5, 50-63. Ed. Puleva Food. Granada.
- Mata, P; Alonso, R, 2001. Phenolics in olive oil. Bioactive micronutrients in Mediterranean diet and health. European Commission, Brussels: 177-183.
- Mataix, J; Quiles, JL, 2001a. Aceites y grasas. En Sociedad Española de Nutrición Comunitaria. Guías Alimentarias para la población española. Madrid, 121-131.
- Mataix, J; Quiles, JL ; Rodriguez, J, 2001b. Aporte de grasa. En Sociedad Española de Nutrición Comunitaria. Guías Alimentarias para la población española. Madrid, 231-237.
- Mataix , J, 2002. En: Libro blanco de los omega-3. Ed. Puleva Food. Granada.
- Mattos R., C. R. Staples, J. Williams, A. Amorocho, M. A. McGuire, and W. W. Thacher, 2002. Uterine, Ovarian, and production responses of lactating dairy cows to increasing dietary concentrations of Menhaden Fish meal. *Journal of Dairy Science* 85: 755-764.
- Mattos, R., J. Williams, C. R. Staples, and W. W. Thacher, 2000. Effect of menhaden fish meal on uterine secretion of PGF<sub>2α</sub>, dry matter intake, milk yield and milk composition. *Journal of Dairy Science* 83.(Suppl. 1): 212.
- Maurage C, Guesnet P, Pinault M,1998. Effect of two types of fish oil supplementation on plasma and erythrocyte phospholipids in formula-fed term infants. *Biol Neonate*. 74:416-429.

- McKeigue, P.M., Marmot, M.G., Syndercombe-Court, Y.D., Cottier, D.E., Rahman, S. and Riemersma, R.A., 1988. Diabetes, hyperinsulinaemia, and coronary risk factor in Bangladeshis. *Br. Heart Journal*. 60,5, 390-396.
- Meydani, S.N., Endres, S., Woods, M.N., Goldin, B.R., Soo, C., Morrill-Labrode, A., Dinarello, C.A., and Gorbach, S.L. 1991. Oral (n-3) fatty acid supplementation suppresses cytokine production and lymphocyte proliferation: Comparison between young and older women. *Journal of Nutrition*. 121(4): 547-555.
- Meydani, S.N., Lichtenstein, A.H., Cornwall, S., Meydani, M., Goldin, B.R., Rasmussen, H., Dinarello, C.A. and Schaefer, E.J. 1993. Immunologic effects of national cholesterol education panel step-2 diets with and without fish-derived N-3 fatty acid enrichment. *Journal of Clinical Investigation*. 92(1): 105-113.
- Mensink, R.P. and Katan, M.B. 1990. Effect of dietary *trans* fatty acids on high-density and low-density lipoprotein cholesterol levels in healthy subjects. *New England Journal of Medicine*. 323: 439-445.
- Mercer SW, Trayhurn P, 1987. Effect of high fat diets on energy balance and thermogenesis in brown adipose tissue of lean and genetically obese ob/ob mice. *J Nutr*; 117: 2147–2153.
- Mersmann HJ; Underwood MC; Brown LJ and Houk JM, 1973. Adipose tissue composition and lipogenic capacity in developing swine. *American Journal of Physiology*. 224: 1130-1135.
- Mersmann HJ, 1974. Metabolic patterns in the neonatal swine. *Journal of Animal Science* 38, 1022–1030.
- Mersmann HJ, MacNeil MD., 1985. Relationship of plasma lipid concentrations to fat deposition in pigs. *J Anim Sci*;61(1):122-8.

## *Bibliografía*

---

- Mertin, J. and Hughs, D., 1975. Specific inhibitory action of polyunsaturated fatty acids on lymphocyte transformation induced by PHA and PPD. *International Archives of Allergy and Applied Immunology*. 15: 203-210.
- Mertin, J. and Stackpoole, A. 1981. Prostaglandin precursors and cell-mediated immune response. *Cellular Immunology*. 62: 293-300.
- Mertin, J. and Hunt, R. 1976. Specific inhibitory action of polyunsaturated fatty acids on lymphocyte transformation induced by PHA and PPD. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA*. 73: 928-931.
- Mir, Z., Rushfeldt, P.S., Mir, L.J., Paterson, L.J., Weselake, R.J., 2000b. Effect of dietary supplementation with either conjugated linoleic acid (CLA) or linoleic acid rich oil on the CLA content of lamb tissues. *Small Ruminant Res.* 36, 25–31.
- Mitchell, A.D., Pursel, V.G. 2003. Efficiency of energy deposition and body composition of control and IGF-I transgenic pigs. In: *Progress in Research on Energy and Protein Metabolism*. (W.B. Souffrant and C.C. Metges, Eds.), EAAP Scientific Series. v 109:61-64.
- Montgomery Colette, Brian K. Speake, Alan Cameron, Naveed Sattar and Lawrence T. Weaver, 2003. Maternal docosahexaenoic acid supplementation and fetal accretion. *British Journal of Nutrition*, 90: 135-145.
- Morand-Fehr. 2005. Recent developments in goat nutrition and application: A review. *Small Ruminant Research*. 60: 25-43.
- Morand-Fehr P., Bas P., Blanchart G., Daccord R., Giger-Reverdin S., Gihad E.A., Hadjipanayiotou M., Mowlen A., Remeuf F., Sauvant D. 1991. Influence of feeding on goat milk composition and technological characteristic. En: *Goat Nutrition*. 209-224. Wageningen.

- Morand-Fehr P., Chilliard Y., Sauvant D. 1982. Goat milk and its components: secretory mechanism and influence of nutritional factors. 3<sup>rd</sup> International Conference on goat production and disease. Tucson, Arizona (USA). pp: 113-121.
- Morand-Fehr P., Sanz Sampelayo M.R., Fedele Y.V., Le Frileux Y., Eknaes M., Schmidely P.H., Giger Reverdin S., Bas P., Rubino R., Havrevoll Ø, Sauvant D. 2000. Effects of feeding on the quality of goat milk and cheeses. 7<sup>th</sup> International Conference on Goats. Francia, 15-21 Mayo pp: 53-58.
- Mori, TA; Bao, DQ; Burke, V, Puddey IB, Beilin, LJ, 1999. Docosaehaenoic acid but not eicosapentaenoic acid lowers ambulatory blood pressure and heart rate in humans. *Hypertenion*: 34, 253-260.
- Morris MC, Sacks F, Rosner B, 1993. Does fish oil lower blood pressure? A meta-analysis of controlled trials. *Circulation*, 88:523-533.
- Morrison y Boyd, "Química Orgánica". 1990. 5<sup>a</sup> edición, Adison-Wesley Iberoamericana.
- Mousa M, Tkaczuck J, Ragab J, García J, Abbad M, Ohayon E, Ghisolfi J, Thovenot J, 2000. Relationship between the fatty acid composition of rat lymphocytes and immune functions. *British Journal of Nutrition* 83: 327-333.
- Müller HL, Kirchgessner M: Thermic effects of carbohydrates and unsaturated fats fed to sows below and above maintenance level; in McCracken K, Unsworth EF, ARG Wylie ARG (eds): *Energy Metabolism of Farm Animals*. New York, CAB International, 1998, pp 139–142.
- Murphy J.J. 1995. Modification of bovine milk fat and protein concentration by nutritional means. En: *Proceedings of 46<sup>th</sup> Annual*

## *Bibliografía*

---

- Meeting of the European Association for Animal Production. p:44. Praga República Checa.
- Murphy J. J. 2001. Milk Fat Composition and Nutritional Value. Teagasc, Dairy Production Research Centre, Moorepark, Fermoy, Co Cork, Ireland. 255-257.
- Murphy J.J., O'Mara F. 1993. Nutritional manipulation of milk protein concentration and its impact n the dairy industry. *Livestock Production Science*. 35: 117-134
- Murray, RK; Mayes, PA; Granner, DK; Rodwell, VW, 2001. *Bioquímica de Harper*. Ed. El Manual Moderno. Santafé de Bogota.
- Muturi KN, Scaife, JR, Lomax MA, Jackson F, Huntley J, Coop RL, 2005. The effect of dietary polyunsaturated fatty acids (PUFA) on infection with the nematodes *Ostertagia ostertagi* and *Cooperia oncophora* in calves. *Veterinary parasitology* 129: 273-283.
- National Institutes of Health: The Practical Guide: Identification, Evaluation and Treatment of Overweight and Obesity in Adults. NIH Publ 2000, No 00-4084. Bethesda, NIH, 2000.
- National Research Council., 1982. Committee on Diet, Nutrition and Cancer. National Academy Press, Washington, D.C.
- National Research Council., 1989. Diet and Health: Implications for reducing chronic disease risk. National Academy Press, Washington, D.C.
- National Research Council. 2001. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 7<sup>th</sup> rev. National Academy of Science. Washington DC.

- Nestel PJ, Connor WE, Reardon MF, Connor S, Wong S, Boston R, 1984. Suppression by diets rich in fish oil of very low density lipoprotein production in man. *J Clin Invest* 1984; 74: 82–89.
- Neuringer M; Anderson, GJ; Connor WE, 1988. The essentiality of n-3 fatty acids for unfuntion of the retina and brain. *Annu Rev nutr* 8: 517-541.
- Ney, D. M. 1991. Potential for enhancing the nutritional properties of milk fat. *Journal of Dairy Science* 74: 4002-4012.
- Ngidi, ME, Loerch, SC, Fluharty, FL, Palmquist, DL, 1990. Effects of calcium soaps of long chain fatty acids on feedlot prformance, carcass characteristics and ruminal metabolism of steers. *J. Animal sci.* 68: 2555-2565.
- Noble RC, 1980. Lipid metabolism in the neonatal ruminant. *Progress in Lipid Research* 18, 179-216.
- Noble RC, Steele W, Moore JH, 1971. Diet and the fatty acids in the plasma of lambs during the first eight days after birth. *Lipids.* 6: 26–34.
- Noble RC, SteeleW, Moore JH, 1970. The composition of ewe’s milk fat during early and late lactation. *Journal of Dairy Research.* 37: 297–301.
- Noble RC, 1981. Digestion, absorption and transport of lipids in ruminant animals. In: W.W.Christie (Editor), *Lipid Metabolism in Ruminant Animals*. Pergamon Press, Oxford, pp.57-94.
- NRC (National Research Council). 1981. *Nutrient Requirements of Goat*. Publ. n° 15. National Acdey Press. Washington.
- O’Callaghan D. and M.P. Boland, 1999. Nutritional effects on ovulation, embryo development and the establishment of pregnancy in ruminants. *Animal Science*, 68: 299-314.

- O'Doherty J. V. and T.F. Crosby.,1998. Blood metabolite concentrations in late pregnant ewes as indicators of nutritional status. *Animal science*, 66:675-683.
- Ockner, R.K., Pitman, J.P. and Yager, J.L., 1972. Differences in the intestinal absorption of saturated and unsaturated long chain fatty acids. *Gastroenterology*, 62:981-992.
- O'Dea, K., White, N.G., Sinclair, A.J., 1988. An investigation of nutrition-related risk factors in an isolated Aboriginal community in northern Australia: advantages of a traditionally-oriented life-style. *Med. J. Aust.* 148(4): 177-80.
- Offer, N.W., Marsden, M., Dixon, J., Speake, B.K., Thacker, F.E., 1999. Effect of dietary fat supplements on levels of n-3 poly-unsaturated fatty acids, trans acids and conjugated linoleic acid in bovine milk. *Anim. Sci.* 69, 613–625.
- Oldick, B.S., C.R. Staples, W.W. Thatcher, and P. Gyawu, 1997. Abomasal infusion of glucose and fat—effect on digestion,production, and ovarian and uterine function of cows. *J.Dairy Sci.* 80:1315–1328.
- Olsen S, Soorensen J, Secher N, Hedegaard M, Henriksen TB, Hansen HS, Grant A, 1992. Randomized controlled trial of effect of fish oil supplementation on pregnancy duration. *Lancet.* 339: 1003–1007.
- Olsen SF, Soorensen JD, Secher NJ, Hedegaard M, Henriksen TB, Hansen HS, Grant A., 1994. Fish oil supplementation and duration of pregnancy. A randomized controlled trial.*Ugeskr Laeger: Feb 28;156(9):1302-1307.*
- Olsen SF; Secher NJ; Tabor A; Weber T; Walker JJ; Glud C, 2000. Randomised clinical trials of fish oil supplementation in high risk pregnancies. Fish Oil Trials In Pregnancy (FOTIP) Team. *BJOG Mar; 107(3): 382-395.*

- Otto DA, Baltzell JK, Wooten JT., 1992. Reduction in triacylglycerol levels by fish oil correlates with free fatty acid levels in ad libitum fed rats. *Lipids*;27(12):1013-7.
- Outen, G.E., Beever, D.E., Osbourn, D.F. and Thomson, D.J., 1975. The digestion of the lipids of processed red clover herbage by sheep. *J. Sci. Food Agric.*, 26:1381-1389.
- Palmquist DL; McClure KE; Parker CF, 1977. Effect of protected saturated or polyunsaturated fat fed to pregnant and lactating ewes on milk composition, lamb plasma fatty acids and growth. *J. of Anim. Science*. Vol 45. N° 5: 1152-1159.
- Palmquist, DL, 1984. Calcium soap of fatty acids with varying unsaturation as fat supplements for lactating cows. *Com. J. Anim. Sci.* 64 (suppl): 240-241.
- Palmquist, DL, 1988. The feeding value of fats. In: E.R. Orskov (Editor), *Feed Science*. Elsevier, Amsterdam, pp. 293-311.
- Palmquist, DL, Jenkins TC, 1980. Fat in lactations rations: a review. *J. Dairy sci.* 63: 1-14.
- Palmquist, DL, Jenkins, TC, Soyner jr, AE, 1986. Effect of dietary fat and calcium source on insoluble soap formation in the rumen. *J. Dairy sci.* 69: 1020-1025.
- Palmquist, D. L., and W. P. Weiss. 1994. Blood and hydrolyzed feather meals as sources of undegradable protein in high fat diets for cows in early lactation. *J. Dairy Sci.* 77: 1630–1643.
- Pan DA, Storlien LH: Dietary lipid profile is a determinant of tissue phospholipids fatty acid composition and rate of weight gain in rats. *J Nutr* 1993; 123: 512–519.

- Parcerisa, J, Boatella, J, Codony, R, Rafecas, M, Castellote, A, García, J, López, A, Romero, A, 1995. Comparison of fatty acids and triacylglycerol compositions of different hazelnut varieties (*Corylus avellana* L.) Cultivated in Catalonia (Spain). *J. Agric. Food Chem.* 43: 13-16.
- Pariza M.W., Park Y., Cook M.E. 2001. The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. *Progress in Lipid Research.* 40:283-298.
- Park Y.W. 1992. Comparison of buffering components in goat and cow milk. *Small Ruminant Research.* 8: 75-81.
- Park Y.W. 1994. Hypo-allergenic and therapeutic significance of goat milk. *Small Ruminant Research.* 14: 151-159.
- Park Y.W., Mahoney A.W., Hendricks D.G. 1986. Bioavailability of iron in goat milk compared with cow milk fed to anemic rats. *Journal of Dairy Science.* 69: 2608-2615.
- Parodi P.W. 1999. Conjugated linoleic acid and other anticarcinogenic agents in bovine milk. *Journal of Dairy Science.* 82 : 1339-1349.
- Pasten, C.; Grenett, H, 2006. Wine, fibrinolysis and health. *Rev Med Chile,* 134: 1040-1048.
- Pépin L. 1995. Recherche de polymorphisme génétique chez les caprins. Applications à l'étude de la diversité des populations, au contrôle de filiation et à la résistance génétique à la coudriose. Tesis Doctoral. Universidad de París.
- Petit, HV, RJ Dewhurst, JG Proulx, M Khalid, W Haresign, and H Twagiramungu, 2001. Milk production, milk composition, and reproductive function of dairy cows fed different fats. *J. Anim. Sci.* 81:263-271.

- Petit, H. V., R. J. Dewhurst, N. D. Scollan, J. G. Proulx, M. Khalid, W. Haresign, H. Twagiramungu, and G. E. Mann, 2002. Milk production and composition, ovarian function, and prostaglandin secretion of dairy cows fed omega-3 fats. *J. Dairy Sci.* 85:889-899.
- Pierre A., Michel F., Le Graet Y. 1995. Variation in size of goat milk casein micelles related to casein genotype. *Lait.* 75: 489-502.
- Pin-der, D, Wenjye, Y, Gow-Chin, Y, 1999. Oxidative stability of polyunsaturated fatty acids and soybean oil in a aqueous solution with emulsifiers. *J. Am. Oils chem. Soc.* 76: 201-204.
- Plaut, M. 1979. The role of cyclic AMP in modulating cytotoxic T lymphocytes. *Journal of Immunology.* 123:692-701.
- Podleski W.K. 1992. Milk protein sensitivity and lactose intolerance with special reference to goat milk. Proceedings of V International Conference on goats. Nueva Delhi, India. Vol II. Part I. 610-613.
- Ponnampalam, E.N., Sinclair, A.J., Egan, A.R., Blakeley, S.J., Li, D., Leury, B.J., 2001. Effect of dietary modification of muscle long chain n-3 fatty acid on plasma insulin and lipid metabolites, carcass traits and fat deposition in lambs. *J. Anim. Sci.* 79, 895–903.
- Ponnampalam, E.N., Sinclair, A.J., Hosking, B.J., Egan, A.R., 2002. Effects of dietary lipid type on muscle fatty acid composition, carcass leanness and meat toughness in lambs. *J. Anim. Sci.* 80, 628–636.
- Posati L.P., Orr M.L. 1976. Composition of Foods, Dairy and Egg Products. En: *Agriculture Handbook.* No 8-1. USDA-ARS, Consumer and Food Economics Institute Publishers. Washington D.C. pp: 77-109.

## *Bibliografía*

---

- Poveda J.M., Cabezas L. 2006. Free fatty acid composition of regionally-produced Spanish goat cheese and relationship with sensory characteristics. *Food Chemistry*. 95: 307-311.
- Precht D., Molkentin J. 1996. Rapid analysis of the isomers of trans-octadecenoic acid in milk fat. *International Dairy Journal*. 6: 791-809.
- Quiles A., Gonzalo C., Barcina Y., Fuentes F., Hevia M. 1994. Protein quality of Spanish Murciano-Granadina goat milk during lactation. *Small Ruminant Research*. 14: 67-72.
- Raes, K., S. De Smet, D. Demeyer, 2004. Effect of dietary fatty acids on incorporation of long chain polyunsaturated fatty acids and conjugated linoleic acid in lamb, beef and pork meat: a review. *Animal Feed Science and Technology* 113: 199–221.
- Ramaswamy, K., Negrao Correa, D., Bell, R., 1996. Local intestinal immune response to infection with *Trichinella spiralis*. Real-time continuous assay of cytokines in the intestinal (afferent) and efferent thoracic duct lymphof rats. *J. Immunol*. 156, 4328–4337.
- Ramos Morales, Eva, 2006. Utilización de diversas leguminosas grano en la producción de leche de cabra. Análisis de su valor nutritivo y capacidad productiva. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
- Raynal-Ljutovac K., Gaborit P., Lauret A. 2005. The relationship between quality criteria of goat milk, its technological properties and the quality of the final products. *Small Ruminant Research*. 60: 167-177.
- Reddy, B.S., 1992. Dietary fat and colon cancer: Animal model studies. *Lipids*. 27: 807-813.
- Reinert P., Frabe A. 1997. Utilisation du lait de chevre chez l'enfant. Experience de Creteil. En : *Proceedings de Colloque Interets Nutritionnel*

- et Dietetique du Lait de chevre. Vol 81. INRA. Paris, Francia. pp: 119-121.
- Remeuf F. 1993. Influence du polymorphisme génétique de la caséin  $\alpha_{s1}$  caprine sur les caractéristiques physico-chimiques et technologiques du lait. *Lait*. 73 : 549-557.
- Remond B. 1985. Influence de l'alimentation sur la composition du lait de vache. 2-Taux protéique, facteurs généraux (Effect of feeding on cow milk composition. 2-Protein percentage, main factors). *Bull. Tech. CRZV, Theix, INRA*. 62: 53-67.
- Renon, P, Malandra, R, Biondi PA, Ronchi, S, 1994. Orate selvagge e d'allevamento: ricerca di lipidi totale, colesterolo e acidi grassi. *Ingenieria alimentare*. 4: 21-28.
- Renon, P, Morta, A, Mortarino, M, Biondi, PA, 1991. Contenuto di acidi grassi polinsaturi in pesci marini consumati in italia. *Industrie alimentari*. Xxx: 1065-1071.
- Report of the British Nutrition Foundation's Task Force. Unsaturated fatty acids: Nutritional and physiological significance. Chapman & Hall. Londres, 1992.
- Ring, J., Seifert, J., Mertin, J., Brendel, W. 1974. Letter: Prolongation of skin allografts in rats by treatment with linoleic acid. *The Lancet*. 2: 1331.
- Roder, J.C. and Klein, M. 1979. Target-effector interaction in the natural killer cell system. IV. Modulation by cyclic nucleotides. *Journal of Immunology*. 123: 2785-2790.
- Robertson D.M., Paganelli R., Dinwiddie R., Levinsky R.J. 1982. Milk antigen absorption in the preterm and term neonate. *Archives of Disease. Childhood*. 57: 369-372.

## *Bibliografía*

---

- Robinson, J.J., McDonald, I., Fraser, C. And Crof, Ts, R.M. J., 1977. Journal of Agricultural Science 88: 539-552.
- Rodríguez Osorio, M., Martín Alonso, J.J., Sanz Sampelayo, M.R., Gil Extremera, F. and Gómez García, V. 2001. N-3 polyunsaturated fatty acids and parasitism: effect of a diet supplemented with fish oil on the course of the rat trichinellosis. Annals of Nutrition and Metabolism 45: 95-96.
- Rola-Plaszczynski, M. 1985. Immunoregulation by leukotrienes and other lipoxygenase metabolites. Immunology Today. 6: 302-307.
- Romo, G. A., D. P. Casper, R. A. Erdman, and B. B. Teter., 1996. Abomasal infusion of *cis* or *trans* fatty acid isomers and energy metabolism of lactating dairy cows. J. Dairy Sci. 79: 2005–2015.
- Rook J.A.F. 1976. Nutritional influence on milk quality. En: Principles of cattle production. pp: 216-232. (Swan H., Broster W.H., eds). Butterworths. Londres. Reino Unido.
- Rooke JA; Sinclair AG and Ewen M, 2001. Changes in piglet composition at birth in response to increasing maternal intake of long-chain polyunsaturated fatty acids are non-linear. British Journal of Nutrition. 86: 461-470.
- Rosenblum A.H., Rosenblum P. 1952. Gastrointestinal allergy in infancy. Significance of eosinophiles in the stools. Pediatrics. 9: 311-319.
- Roudbaraki MM; Drolhault R; Bacquarty T and Vacher P, 1996. Arachidonic acid-induced hormone release in somatotropes: involvement of calcium. Neuroendocrinology. 63: 244-256.
- Ruiz-Gutierrez V, Perez-Espinosa A, Vazquez CM, Santa-Maria C., 1999. Effects of dietary fats (fish, olive and high-oleic-acid sunflower oils) on

- lipid composition and antioxidant enzymes in rat liver. *Br J Nutr*; 82(3):233-41.
- Ruxton, C.H.S.; S.C. Reed; M.J.A. Simpson and Millington, 2004. The health benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids: a review of the evidence. *J. Hum. Nutr. Dietet*: 17, 449-459.
- Saini A.L., Gill R.S. 1991. Goat milk: An attractive alternate. *Indian Dairyman*. 42: 562-564.
- Salisbury, G.W. and Vandemark, L.N.,1964. Fisiología de la reproducción e inseminación artificial de los bóvidos. Ed. Acribia. Zaragoza, 635-683.
- SanGiovanni, JP; Parra-Cabrera, S; Colditz, GA y col., 2000. Meta-analysis of dietary essential fatty acids and long-chain polyunsaturated fatty acids as they relate to visual resolution acuity in healthy preterm infants. *Pediatrics*, 105 (6): 1292-1298.
- Sanders TAB, Naismith DJ, 1979. A Comparison of the influence of breast-feeding and bottle-feeding on the fatty acid composition of the erythrocytes. *Br J Nutr*. 41:619-23.
- Sanders, T.A., Roshanai, F., 1983. The influence of different types of omega 3 polyunsaturated fatty acids on blood lipids and platelet function in healthy volunteers. *Clin. Sci*. 64, 91-99.
- Sanders, TA, 2000. Polyunsaturated fatty acids in the food chain in Europe. *Am J Clin Nutr*, 71:176S-180S.
- Sanderson, P., 1986. A new method of analysis of feedingstuffs for the determination of crude oils and fats. In *Recent advances in animal nutrition* (ed. W. Haresign and D. J. A. Cole), pp. 77-86. Butterworths, London.

## *Bibliografía*

---

- Santini F.J., Lu C.D., Potchoiba M.J., Coleman S.W. 1991. Effects of acid detergent fiber intake on early postpartum milk production and chewing activities goats fed alfalfa hay. *Small Ruminant Research*. 6: 63-71
- Sanz Sampelayo, M.R., Ruiz Mariscal, I., Gil Extremera, F. and Boza, J. 1997. The effect of different concentrations of protein and fat in milk replacers on protein utilization in kid goats. *Animal Science* 64: 485-492.
- Sanz Sampelayo M.R., Amigo L., Ares J.L., Sanz B., Boza J. 1998a. The use of diets with different protein sources in lactating goats: composition of milk and its suitability for cheese production. *Small Ruminant Research*. 31:37-43.
- Sanz Sampelayo M.R., Pérez L., Boza J., Amigo L. 1998b. Forage of different physical forms in the diets of lactating Granadina goats: nutrient digestibility and milk production and composition. *Journal of Dairy Science*. 81: 492-498.
- Sanz Sampelayo M.R., Pérez L., Gil Extremera F., Boza J.J., Boza J. 1999. Use of different dietary protein sources for lactating goats: milk production and composition as functions of protein degradability and amino acid composition. *Journal of Dairy Science*. 82: 555-565.
- Sanz Sampelayo M.R., Martín Alonso J.J., Morón D., Boza J. 2000. Production of healthier goat milk. Use of a concentrate supplemented with a "protected" fat rich in PUFA. *Journal of Physiology and Biochemistry*. 3: 231-236.
- Sanz Sampelayo, MR, Pérez, L, Martín Alonso, JJ, Gil Extremera, F, Boza, J, 2002a. Effects of concentrates with different contents of protected fat rich in PUFAs on the performance of lactating Granadina goats. Part I. Feed intake, nutrient digestibility, N and energy utilisation for milk production. *Small Rumin. Res.*, 43: 133-139.

- Sanz Sampelayo M.R., Pérez L., Martín Alonso J.J., Amigo L., Boza J. 2002b. Effects of concentrates with different contents of protected fat rich in PUFAs on the performance lactating Granadina goats. Part II. Milk production and composition. *Small Ruminant Research*. 43:141-148.
- Sanz Sampelayo M.R., Fernández J.R., De la Torre G., Ramos E., Carmona F.D., Boza J. 2003. Calidad de la leche de los pequeños rumiantes. *Anales de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental*. 16: 155-166.
- Sanz Sampelayo M.R., Martín Alonso J.J., Pérez L., Gil Extremera F., Boza J. 2004. Dietary supplements for lactating goats by polyunsaturated fatty acid-rich protected fat. Effects after supplement withdrawal. *Journal of Dairy Science*. 87: 1796-1802.
- Sanz Sampelayo M.R., Boza J. 2005. Influencia del tipo de dieta sobre la composición de la grasa de la leche de cabra y oveja. *Anales de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental*. 18: 1-30.
- Sañudo, C., Enser, M.E., Campo, M.M., Nute, G.R., Maria, G., Sierra, I., Wood, J.D., 2000. Fatty acid composition and sensory characteristics of lamb carcasses from Britain and Spain. *Meat Sci*. 54, 339–346.
- SAS. 1989. SAS/STAT® User's Guide Int. (Version 6,4th Edn.) Statistical Analysis Systems Institute Inc., Cary, NC (Estados Unidos).
- Sauvant D., Hervieu J., Giger S., Ternois F., Mandran N., Morand-Fehr P. 1987. Influence of dietary organic matter digestibility on goat nutrition and production at onset of lactation. *Annales de Zootechnie*. 36: 335-336.
- Schauff, D.J., Clark, J.H., 1989. Effect of prilled fatty acids and calcium salts os fatty acids on rumen fermentation, nutrient digestibilities, milk production and milk composition. *J. Dairy sci*. 72: 917-927.

- Schingoethe D. 1996. Dietary influence on protein level in milk and milk yield in dairy cows. *Animal Feed Science and Technology*. 60:181-190.
- Schmidt, EB; Christensen, JH; Aardestrup, I; Madsen, T; Riahi, S; Hansen, VE; Skou, HA, 2001. Marine n-3 fatty acids: basic features and background. *Lipids*, 36: 65-80.
- Schneider, P., Sklan, D., Chalupa, W. and Kronfeld, D.S., 1988. Feeding calcium salts of fatty acids to lactating cows. *Journal of Dairy Science* 71: 2143-2150.
- Schwartz RS, Ravussin E, Massari M, O'Connell M, Robins DC: The thermic effect of carbohydrate versus fat feeding man. *Metabolism* 1985; 34: 285–293.
- Scollan, N.D., Choi, N.J., Kurt, E., Fisher, A.V., Enser, M., Wood, J.D., 2001. Manipulating the fatty acid composition of muscle and adipose tissue in beef cattle. *Br. J. Nutr.* 85, 115–124.
- Scollan, N.D., Gulati, S., Wood, J.D., Enser, M., 2002. The effects of including ruminally protected lipid in the diete of Charolais steers on animal performance, carcass quality and the fatty acid composition of longissimus dorsi muscle. In: *Proceedings of the BSAS*. New York, UK, pp. 9.
- Scollan, N. D., Enser, M., Gulati, S. K., Richardson, I. And Wood, J. D. 2003. Effects of including a ruminally protected lipid supplement in the diet on the fatty acid composition of beef muscle. *British Journal of Nutrition* 90: 709-716
- Scott, T.W., Cook, L.J. Mills, S.C., 1971. Protection of dietary polyunsaturated fatty acids against microbial hidrigenation in ruminants. *J. Am. Oils Chem. Soc.* 48: 358-364.

- Scott T.A., R. Shaver, L. Zepeda, B. Yandell, and T.R. Smith, 1995 Effects of Rumen-Inert Fat on Lactation, Reproduction, and Health of High Producing Holstein Herds. *J. Dairy Science*, 78: 2435-2451.
- Selner D.R., Schultz L.H. 1980. Effects of feeding oleic acid or hydrogenated vegetable oils to lactating cows. *Journal of Dairy Science*. 63: 1235-1241.
- Sharma, H.R., Ingalls, J.R. and McKirdy, J.A., 1978. Replacing barley with protected tallow in ration of lactating Holstein cows. *J. Dairy Sci.*, 61: 574-583.
- Shell, L.A., Dryden, F.D., Mata-Hernández, A. and Hale, W.H. 1978. Protein protected fat for ruminants. III. Digestion and performance of lambs. *Journal of Animal Science* 46: 1332-1337.
- Sherrington EJ, Jeffery MN, Calder PC: Time course of the effect of diets rich in n-6 or n-3 polyunsaturated fatty acids on serum cholesterol levels, liver weights and adipose deposition in the rats. *Proc Nutr Soc* 1995; 54: 45A.
- Shimomura Y, Tamura T, Suzuki M: Less body fat accumulation in rats fed a safflower oil diet than in rats fed a beef tallow diet. *J Nutr* 1990; 120: 1291-1296.
- Simas, J.M., J.T. Huber, Z. Wu, K.H. Chen, S.C. Chan, C.B. Theurer, and R.S. Swingle, 1995. Influence of steam-flaked sorghum grain and supplemental fat on performance of dairy cows in early lactation. *J. Dairy Sci.* 78: 1526-1533.
- Simopoulos AP, Leaf A, Salem N Jr, 1999. Essentiality of and recommended dietary intakes for omega-6 and omega-3 fatty acids. *Am Nutr Metab*, 43:127-130.

## *Bibliografía*

---

- Simopoulos, AP, 2002a. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 56 (8): 365-379.
- Simopoulos, AP, 2002b. Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases *Journal of the American College of Nutrition*, 21 (6): 495-505 DEC 2002.
- Sinclair K. D., S. Yildiz, G. Quintans, F. E. Gebbie and P. J. Broadbent, 1998. Annual energy intake and the metabolic and reproductive performance of beef cows differing in body side and milk potential. *Animal Science* 66: 657-666.
- Sklan, D., Moallen, V. y Folman, Y., 1991. Effect of feeding calcium soaps of fatty acids on production and reproductive responses in high producing lactating cows. *Journal of Dairy Science* 74:510-517
- Sklan, D, 1989. In vitro and in vivo protection of proteins coated with calcium soaps of long chain fatty acids. *J. Agric. Sci.* 112: 79-83.
- Smet, S., Raes, K., Demeyer, D., 2003. Meat fatty acid composition as affected by genetics. *Anim. Res.*, in press.
- Smith EN, 2002. Essential fatty acid deficiency in malnourished children: erythrocyte and breastmilk fatty acid compositions in different populations. Groningen: University Library Groningen. Host.
- Smith, M.F., 1986. The reproductive anatomy and physiology of the male goat. *Current therapy in theriogenology*. Ed. Morrow y Saunders Comp. Philadelphia, 616-624.
- Smith, W.L., and L.J. Marnett., 1991. Prostaglandin endoperoxide synthase: structure and catalysis. *Biochim. Biophys. Acta* 1083: 1-17.
- Spicer, L.J., E. Alpizar and S.E. Echterkamp, 1993. Effectsof insulin, insulin-like growth factor I, and gonadotropins onbovine granulosa cell

- proliferation, progesterone production, estradiol production, and (or) insulin-like growth factor I production in vitro. *J. Anim. Sci.* 71:1232–1241.
- Spicer, L. J., W. B. Tucker and G. D. Adams. 1990. Insulin-like growth factor-1 in dairy cows: relationships among energy balance, body condition, ovarian activity, and estrous behavior. *J. Dairy Sci.* 73: 929-937.
- Staples, C.R., W.W. Thatcher, and J.M. Burke, 1997. Influences of dietary energy, fat, and protein on reproductive performance of lactating dairy cows. Páginas: 204-221. En: Proc. IX Int. Conf. on Prod. Dis. Farm Anim. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, Germany.
- Staples, C.R., Burke, J.M. y Thatcher, W.W., 1998. Influence of supplemental fat on reproductive tissues and performance of lactating cows. *Journal of Dairy Science*, 81: 856-871.
- Stark B.A. 1988. Improving the quality of goat milk. *Dairy Industries International*. 53: 23-25.
- Statgraphics, 2001. User manual: Statistical Graphics System by Statistical Graphics Corporation. Rock-Wille, MD.
- Steel, R.G.D. and Torrie, J.H., 1984. Principles and procedures of statistics: a biometrical approach, fourth edition. McGraw-Hill, Singapore.
- Stevens, C.E., Argenzio, R.A. and Clemens, E.T., 1980. Microbial digestion: rumen versus large intestine. In: Y. Ruckebusch and P. Thivend (Editors), *Digestive Physiology and Metabolism in Ruminants*. MTP Press, Lancaster, UK, pp. 685-706.

*Bibliografía*

---

- Storry, J.E., Hall, A.J., Tuckley, B., Millard, D., 1969. The effects of intravenous infusions of cod-liver and soya-bean oils on the secretion of milk fat in cow. *Br. J. Nutr.* 23, 173–181.
- Stewart, G.L., Na, H., Smart, L., Seeling Jr., L.L., 1999. The temporal relationship among anti-parasite immune elements expressed during the early phase of infection of the rat with *Trichinella spiralis*. *Parasitol. Res.* 85, 672–677.
- Stubbs, C.D. and Smith, A.D. 1984. The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty acid composition in relation to membrane fluidity and function. *Biochimica et Biophysica Acta.* 779: 89-137.
- Su, W. and Jones, P. J. H. 1993. Dietary fatty acid composition influences energy accretion in rats. *Journal of Nutrition* 123: 2109-2114.
- Sukhija P.S., Palmquist D.L., 1988. Rapid method for determination of total fatty acid content and composition of feedstuffs and feces. *Journal of Agriculture and Food Chemistry.* 36: 1202-1206.
- Sukhija, P.S. and Palmquist, D.L., 1990. Dissociation of calcium soaps of long-chain fatty acids in rumen fluid. *J. Dairy Sci.*, 73: 1784-1787.
- Sutton J.D., Morant S.V. 1989. A review of the potential of nutrition to modify milk fat and protein. *Livestock Production Science.* 23: 219-237.
- Swinburn, B.A., Boyce, V.L., Bergman, R.N., Howard, B.V., Bogardus, C. 1991. Deterioration in carbohydrate metabolism and lipoprotein changes is induced by modern, high fat diet in Pima Indians and Caucasians. *Journal Clin. Endocrin. Metab.* 1991. 73, 1 156-165.
- Taitz L.S., Armitage B.L. 1984. Goat's milk for infants and children. *British Medical Journal.* 288: 428-429.

- Takahashi Y, Ide T, 2000. Dietary n-3 fatty acids affect mRNA level of brown adipose tissue uncoupling protein-1, and white adipose tissue leptin and glucose transporter 4 in rat. *Br J Nutr*; 84: 175-184.
- Tannenbaum A., Silverstone H., 1953. Nutrition in relation to cancer In: *Advances in Cancer Research*. New York: Academic Press. 1:451-501.
- Taylor S.L. 1986. Immunologic and allergic properties of cow's milk proteins in humans. *Journal of Food Protection*. 49: 239-250.
- Tenhagen B. A., M. Drillich, R. Surholt, and W. Heuwisier, 2004. Comparison of timed AI after synchronized ovulation to AI estrus: reproductive and economic considerations. *J. Dairy Science* 87: 85-94.
- Terpstra AH, Beynen AC, Everts H, Kocsis S, Katan MB, Zock PL., 2002. The decrease in body fat in mice fed conjugated linoleic acid is due to increases in energy expenditure and energy loss in the excreta. *J Nutr*;132(5):940-5.
- Thatcher, W.W., C.R. Staples, G. Danet-Desnoyers, B. Oldick, and E.P. Schmitt. 1994. Embryo health and mortality in sheep and cattle. *J. Anim. Sci.* 72(Suppl. 3):16.
- Thatcher, W.W., M. Binelli, D. Arnold, R. Mattos, L. Badinga, F. Moreira, C.R. Staples and A. Guzeloglu. 2001. Endocrine and physiological events from ovulation to establishment of pregnancy in cattle. *Occ. Publ. Br. Soc. Anim. Sci. No. 26 (vol. 1):81-92.*
- Thatcher, W.W., M.D. Meyer, and G. Danet-Desnoyers. 1995. Maternal recognition of pregnancy. *J. Reprod. Fert.* 49 (Suppl.):15-28.
- The British Nutrition Foundation, 1997. *Diet and heart disease, a round table of factors*. 2th Ed., Chapman & Hall, Londres.

## *Bibliografía*

---

- The European Heart Network (EHN), 2002. Food, nutrition and cardiovascular disease prevention in the European region: challenges for the new millenium.
- Thomas M.G., B. Bao, and G.L. Williams, 1997. Dietary fats varing their fatty acids composition differentially influence follicular growth in cows fed isoenergetic diets. *J. Animal Science*, 75:2512-2519.
- Thompson M.P., Tarassuk N.P., Jenness R., Lillevik H.A., Ashworth V.S., Rose D. 1965. Nomenclature of the protein of cow's milk. Second revision. *Journal of Dairy Science*. 48: 159-169.
- Tolonen, Matti, 1995. *Vitaminas y Minerales en la salud y la nutrición*. Ed. Acribia, S.A. Zaragoza.
- Trautwein, EA, 2001. n-3 fatty acids-physiological and technical aspects for their use in food. *Eur J Lipid Sci Technol*, 103:45-55.
- Treen M., Uauy R.D., Jameson D.M., Thomas V.L., Hoffman D.R., 1992. Effect of docosahexaenoic acid on membrane fluidity and function in intact cultured Y-79 retinoblastoma cells. *Arch. Biochem. Biophys*. May 1; 294(2): 564-570.
- Trujillo A.J., Guamis B., Carretero C. 1997. Las proteínas mayoritarias de la leche de cabra. *Alimentaria*. 19-28.
- Tsimikas, S; Philis-taimikas, A; Alexopoulos, S; Sigari, F; Lee ,C, Reaven, PO, 1999. LDL isolated from Greek subjects on a typical diet or from American subjects on an oleate-supplemented diet induces less monocyte chemotaxis and adhesión when exposed to oxidative stress. *Arteriocler Thromb Vasc Biol*: 19, 122-130.
- Uauy R; Mena P; Rojas C, 2000. Essential fatty acids in early life: structural and funcional role. *Proceedings of the Nutrition Society*. 59: 3-15.

- Uauy, R., Birch, E. and Birch, D. 1992. Visual and brain function measurements in study of n-3 fatty acid requirements of infants. *Journal of Pediatrics*. 120: 168-180.
- Uauy, R.D., Birch, D.G., Birch, E.E., Tyson, J.E. and Hoffman, D.R. 1990. Effect of dietary omega-3 fatty acids on retinol function of very low-birthweight neonates. *Pediatric Research*. 28: 485-492.
- Uauy, R; Castillo, C, 2003. Lipid Requirements of Infants: Implications for Nutrient Composition of Fortified Complementary Foods. *J Nutr* 133: 2962-2972.
- Ueda, K., Ferlay, A., Chabrot J., Loor , J.J., Chilliard, Y. and Doreau, M., 2003. Effect of linseed oil supplementation on ruminal digestio in dairy cows fed diets with different forage: concentrate ratios. *J. Dairy Sci.*, 86: 3999-4007.
- Ulberth, F, Henninger, M, 1995. Determination of the fatty acid profile of fish by a one-step extraction-methylation method. *Fat sci. Technol.* 2: 77-80.
- Valenzuela A, Sanhueza J, Garrido A, 1999. Long chain n-3 polyunsaturated fatty acids: when and why it is necessary to supplement with these fatty acids. *A&G* 1999; 50: 294-299.
- Van Den Hoogen, P; Feskens, E; Nagelkerke, N; Menotti, A; Nissinen, A, 2000. The relation between blood pressure and mortality due to coronary heart disease among men in different part of the world. *N Engl J Med*: 342:1-8.
- Van der Horst R.L. 1976. Foods of infants allegic properties of cow's milk. *South African Medical Journal*. 5: 927-928.

## *Bibliografía*

---

- Van Nevel C.J., Demeyer D.I. 1995. Lipolysis and biohydrogenation of soybean oil in the rumen in vitro: inhibition by antimicrobials. *Journal of Dairy Science*. 78: 2797-2806.
- Van Nevel C.J., Demeyer D.I. 1996. Influence of pH on lipolysis and biohydrogenation of soybean oil by rumen contents in vitro. *Reproduction Nutrition Development*. 36: 53-63.
- Van Soest, P.J., Robertson, J.B. and Lewis, B.A., 1991. Methods for dietary fibre, neutral detergent fibre and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science* 74: 3583-3597.
- Vassal L., Delacroix-Buchet A., Bouillon J. 1994. Influence des variants AA, EE y FF de la caséine  $\alpha_{s1}$  caprine sur le redement fromager et les caractéristiques sensorielles de fromages traditionnels : premières observations. *Lait*. 74: 89-103.
- Velzing-Aarts FV, van der Klis FRM, van der Dijs FPL, 2001. Effect of three low-dose fish oil supplements, administered during pregnancy, on neonatal long-chain polyunsaturated fatty acid status at birth. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 65:51-57.
- Viñoles C., M. Forsberg, G. Banchero and E. Rubianes, 2002. Ovarian follicular dynamics and endocrine profiles in Polwarth ewes with high and low body condition. *Animal Science* 74: 539-545.
- Visioli F, Rise P, Plasmati E, Pazzucconi F, Sirtori CR, Galli C, 2000. Very low intakes of n-3 fatty acids incorporated into bovine milk reduce plasma triacylglycerol and increase HDL-cholesterol concentrations in healthy subjects. *Pharmacol Res*, 41:571-576.
- Viviani, R., 1970. Metabolism of long-chain fatty acids in the rumen. *Adv. Lipid Res.*, 8: 267-346.

- Von Schacky C, 2000. n-3 fatty acids and the prevention of coronary atherosclerosis. *Am J Clin Nutr*, 71:224S-7S.
- Von Schacky C, Baumann K, Angerer P, 2001. The effect of n-3 fatty acids on coronary atherosclerosis: results from SCIMO, an angiographic study, background and implications. *Lipids*, 36:99S-102S.
- Wachira, A. M., Sinclair, L. A., Wilkinson, R. G., Enser, M., Wood, J. D. and Fisher, A. V. 2002. Effects of dietary fat source and breed on the carcass composition, n-3 polyunsaturated fatty acid and conjugated linoleic acid content of sheep meat and adipose tissue. *British Journal of Nutrition* 88: 697-709.
- Wainwright PE, 2002. Dietary essential fatty acids and brain function: a developmental perspective on mechanisms. *Proceedings of the Nutrition Society*. 61: 61-69.
- Ward GR; Huang Y-S; Bobik E; Xing H-C, Mutsaers L, Auestad N, Montalto M and Wainwright PE, 1998. Long-chain polyunsaturated fatty acid levels in formulae influence deposition of docosahexaenoic acid and arachidonic acid in brain and red blood cells of artificially reared neonatal rats. *J. of Nutrition*. 128: 2473-2487.
- Ward, P.F.V., Scott, T.W., Dawson, R.M.C., 1964. The hydrogenation of unsaturated fatty acids in the ovine digestive tract. *Biochem. J.* 92, 60-68.
- Walker V.B. 1965. Therapeutic uses of goat's milk in modern medicine. *Br. Goat Society's Yearbook*. 24-26. pp: 23-26.
- Webb R., R.G. Gosden, E.E.Telfer and R.M. Moor, 1999. Factors affecting folliculosis in ruminants. *Animal Science*, 68: 257-284.
- Weisbjerg, M.R., Hvelplund, T. and Borsting, C.F., 1992. Digestibility of fatty acids in the gastrointestinal tract of dairy cows fed with tallow or

## *Bibliografía*

---

- saturated fats rich in stearic acid or palmitic acid. *Acta Agric. Scand., Sect. A, Anim. Sci.*, 42:115-120.
- Welsch, C.W., 1987. Enhancement of mammary tumourogenesis by dietary fat: Review of potential mechanisms. *American Journal of Clinical Nutrition*. 45: 192-202.
- Welsch, C.W., 1992. Relationship between dietary fat and experimental mammary tumourigenesis: A review and critique. *Cancer Research*. 52: (Suppl.): 2040s-2048s.
- West DB, Blohm FY, Truett AA, DeLany JP, 2000. Conjugated linoleic acid persistently increases total energy expenditure in AKR/J mice without increasing uncoupling protein gene expression. *J Nutr* 130(10):2471-7
- Wheeler, T.G., Benolken, R.M. and Anderson, R.E. 1975. Visual membranes: Specificity of fatty acid precursors for the electrical response to illumination. *Science*. 188: 1312.
- White, B.G., Ingalls, J.R. Sharma, H.R., McKirdy, J.A., 1987. The effect of whole sunflower seeds on the flow of fat and fatty acids though the gatrointestinal tract of cannulated holstein steers. *J. Anim. Sci.*, 67: 447-459.
- Williams CM, Moore F, Morgan L, Wright J, 1992. Effects of n-3 fatty acids on postprandial triacylglycerol and hormone concentrations in normal subjects. *Br J Nutr*, 68: 655-666.
- Witztum, JL; Steinberg, D, 1991. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest*, 88: 1785-1792.
- Woltil HA; van Beussekom CM; Schaafsma A; Muskiet FAJ; Okken A, 1998. Long chain polyunsaturated fatty acid status and early growth of low birth weight infants. *Eur. J. Pediatr*. 157: 146-152.

- Wood, J.D.; Richardson, R.I.; Nute, G.R.; Fisher, A.V.; Campo, M.M.; Kasapidou, E.; Sheard, P.R.; Enser, M., 2003. Effects of fatty acids on meat quality: a review. *Meat Science* 66: 21-32.
- Woods SC, Seeley RJ, Rushing PA, D'Alessio D, Tso P, 2003. A controlled high-fat diet induces an obese syndrome in rats. *J Nutr*; 133: 1081–1087.
- Working group of the Canadian Pediatric Society and Health Canada, 1993. Nutrition recommendations update; dietary fat and children. Ottawa: Health Canada.
- Wren, T.R., Weyant, J.R., Wood, D.L., Bitman, J., Rawlings, R.M., Lyon, E., 1976. Increasing polyunsaturation of milk fats by feeding formaldehyde protected sunflower-soyabean supplement. *J. Dairy sci.* 59: 627-635.
- Xu ZZ and Burton LJ., 2000. Estrus synchronization of lactating dairy cows with GnRH, progesterone and prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$ . *Journal of Dairy Science* 83: 471-476.
- Yamamoto, N., Saitoh, M., Moriuchi, A., Nomura, M., and Okuyama, H., 1987. Effect of dietary alpha-linolenate/linoleate balance on brain lipid composition and learning ability in rats. *Journal of Lipid Research.* 28: 144-151.
- Yamaouchi, R, Kato, K, Ueno, Y, 1981. Reaction of 8 $\alpha$ -hidroxy tocopheronas wirh ascorbic acid. *Agric. Biol. Chem.* 45: 2855-2861.
- Yang, Y.T., R.L. Baldwin, and W.N. Garrett., 1978. Effects of dietary lipid supplementation on adipose tissue metabolism in lambs and steers. *J. Anim. Sci.* 47:686–690.

## *Bibliografía*

---

- Yang, A., Lanari, M.C., Brewster, M., Tume, R.K., 2002. Lipid stability and meat colour of beef from pasture and grain-fed cattle with or without vitamin E supplement. *Meat Sci.* 60, 41–50.
- Yeom KH; Schonewille JTh; Van Thierum G; Kappert HJ; Hoveiner R; Lee K-W; Beynen, 2004. Growth performance and fatty acid status of goat kids fed milk replacers with different contents of linoleic and  $\alpha$ -linolenic acid. *Livestock Production Science*.
- Yeom KH; Van Thierum G; Hoveiner R; Shellingerhout AB; Lee K-W; Beynen, 2002. Fatty acid composition of adipose tissue in goat kids fed milk replacers with different contents of  $\alpha$ -linolenic and linoleic acid. *Small Ruminant Research* 43: 15-22.
- Yeom KH; Van Thierum G; Lee KL-W; Beynen AC, 2003. Influence of feeding a milk replacer deficient in  $\alpha$ -linolenic acid on fatty acid composition of various tissues in goat kids. *Small Ruminant Research* 48: 141-148.
- Zampelas A, Roche H, Knapper JM y col., 1998. Differences in postprandial lipemic response between Northern and Southern Europeans. *Atherosclerosis*, 139:83-93.
- Zampelas A, Roche H, Knapper JME y col., 1994. Polyunsaturated fatty acids of the n-6 and n-3 series: effects on postprandial lipid and apoprotein levels in healthy men. *Eur J Clin Nutr*, 48:842-848.
- Zeng, S., Lawton, D.E.B., Przemec, S.M.C., Sincock, D.C., Simpson, H.V., 2001. Reduced *Ostertagia circumcincta* burdens in milk-fed lamb. *NZ Vet. J.* 49, 2–7.
- Zhao QX, Jorgensen H, Jakobsen K: Retention and oxidation of nutrients in broilers chickens fed different levels of rapeseed oil during growth period; in Chwalibog A, Jakobsen K (eds): *Energy Metabolism in Animals*. Wageningen, Academic Publishers, 2001, pp 265–268.

Zimmer L; Delion-Vancassel S; Durand G; Guilloteau D, Bodard S; Besnard JC; Chalon S, 2000. Modification of dopamine neurotransmission in the nucleus accumbens of rats deficient in n-3 polyunsaturated fatty acids. *J. Lipid Res.* 41(1): 32-40.

Zinn, R.A., Gulati, S.K., Plascencia, A. and Salinas, A., 2000. Influence of ruminal biohydrogenation on the feeding value of fat in finishing diets for feedlot cattle. *Journal of Animal Science* 78: 1738-1746.