

UNIVERSIDAD PÚBLICA DE NAVARRA

Escuela Superior de Ingenieros Agrónomos

Departamento de Producción Agraria

TESIS DOCTORAL



***EFFECTO DE LA UTILIZACIÓN DE PIENSO ENRIQUECIDO EN
ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS EN CORDEROS EN
CRECIMIENTO SOBRE EL DESARROLLO, LA COMPOSICIÓN
DE LA GRASA DE LA CARNE Y LA EXPRESIÓN DE LOS
PRINCIPALES GENES LIPOGÉNICOS DEL TEJIDO ADIPOSO***

Memoria para optar al grado de Doctora del programa de Doctorado en
Biotecnología presentada por

OLAIA URRUTIA VERA

Directoras:

Ana Arana Navarro

Beatriz Soret Lafraya

Pamplona, 2016

La Tesis Doctoral titulada “Efecto de la utilización de pienso enriquecido en ácidos grasos poliinsaturados en corderos en crecimiento sobre el desarrollo, la composición de la grasa de la carne y la expresión de los principales genes lipogénicos del tejido adiposo”, realizada por la Ingeniera Agrónoma **OLAIA URRUTIA VERA**, ha sido realizada en la modalidad de “**Compendio de publicaciones**”. Las referencias completas de los artículos que constituyen el cuerpo de la Tesis son las siguientes:

1. Urrutia, O., Mendizabal, J.A., Insausti, K., Soret, B., Purroy, A., y Arana, A. 2015. Effect of linseed dietary supplementation on adipose tissue development, fatty acid composition, and lipogenic gene expression in lambs. *Livestock Science*, 178: 345-356. doi:10.1016/j.livsci.2015.05.006.
2. Urrutia, O., Soret, B., Insausti, K., Mendizabal, J.A., Purroy, A., y Arana, A. 2015. The effects of linseed or chia seed dietary supplementation on adipose tissue development, fatty acid composition, and lipogenic gene expression in lambs. *Small Ruminant Research*, 123: 204-211. doi:10.1016/j.smallrumres.2014.12.008.
3. Urrutia, O., Mendizabal, J.A., Insausti, K., Soret B., Purroy A., Arana A., 2016. Effects of addition of linseed and marine algae to the diet on adipose tissue development, fatty acid profile, lipogenic gene expression, and meat quality in lambs. *PLoS ONE* 11(6): e0156765. doi:10.1371/journal.pone.0156765.

Dña. **ANA ARANA NAVARRO**, Catedrática de Universidad del Área de Producción Animal del Departamento de Producción Agraria de la Universidad Pública de Navarra, y

Dña. **BEATRIZ SORET LAFRAYA**, Profesora Titular del Área de Producción Animal del Departamento de Producción Agraria de la Universidad Pública de Navarra, CERTIFICAN que:

la presente memoria de Tesis Doctoral titulada “Efecto de la utilización de pienso enriquecido en ácidos grasos poliinsaturados en corderos en crecimiento sobre el desarrollo, la composición de la grasa de la carne y la expresión de los principales genes lipogénicos del tejido adiposo” elaborada por Dña. **OLAIA URRUTIA VERA** ha sido realizada bajo nuestra dirección, y que cumple las condiciones exigidas por la legislación vigente para optar al grado de Doctora.

Y para que así conste, firman la presente en Pamplona a 29 de julio de 2016.

Fdo.: Ana Arana Navarro

Fdo.: Beatriz Soret Lafraya

*A mis padres,
A Unai y Miguel Mari,
A Berna*

**“Que tu medicina sea tu alimento,
y el alimento tu medicina”**

Hipócrates

AGRADECIMIENTOS

Al terminar esta Tesis Doctoral, es importante para mí expresar la gratitud que siento por todas las personas que han hecho posible la realización de este trabajo.

En primer lugar, quiero agradecer de manera especial a mis directoras de tesis, Ana Arana y Beatriz Soret, por su comprensión, dedicación, sus consejos y dirección durante esta etapa y por haberme iniciado en el camino de la investigación.

A José Antonio Mendizabal, por su gran ayuda en todo momento. También quisiera agradecer al grupo de Producción animal, calidad y tecnología de la carne, por su cálida acogida desde el comienzo y por la ayuda brindada. Gracias a Antonio Durroy, Xiskitza Insausti, Leo Alfonso, M^{te} José Seriatin y Vicky Barriés.

Agradezco a Isabel Maquirriain su disposición a ayudarme en todo momento y resolverme las dudas surgidas en el laboratorio.

A todos los compañer@s de carrera y laboratorio de la primera etapa, Areta, Maite, Oihana Naia, Paula... y de esta segunda etapa, especialmente a Lara, María y Marta. Por las horas de laboratorio, de café, las charlas y las confidencias.

Quisiera expresar mi agradecimiento a Tonchi y Melchor, por acogerme en su casa como a una hija más y por cuidarme tanto siempre.

Esker berezi bat eman nahi nieke nire gurasoei, emandako irakaskuntzagatik, aholkuengatik eta ona ailegatu izana zor dietelako. Amateko, eskerrik asko momentu guztietan nirekin egoteagatik eta zure laguntzagatik. Atxa, beti nire dudak edozein unetan argitzeko prest egoteagatik. Nire bizitzako bi mutilei, Miguel Mari eta Unai, bidaiak honetan nirekin egoteagatik, zuen aholku eta maitasunagatik. Aitautzi eta izeba Joxepiri. Mila esker nire familia guztiari. Izeba Bena, lan hau zuri ere eskeintzen dizut, zauden tokian zaudela badakit beti bezala nitaz arro egongo zarela. Eskurrako familiar, bereziki nere ilobei, eskerrik asko zuekin pasa eta pasako ditudan momentu guztiengatik.

Nire lagun guztiei, aipamen berezi bat eginez Maider, Pili eta Estitxuri, beti nola noan galdetzeagatik, sostenguagatik eta pasatzen ditugun momentuengatik.

A todos, muchas gracias de corazón.

Bihotz-bihotzez eskerrik asko guztioi.

ÍNDICE

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	1
ABSTRACT	5
LABURPENA	8
1. INTRODUCCIÓN	11
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	
2.1. Producción de carne de ovino.....	14
2.1.1. Importancia y situación del sector ovino de carne	14
2.1.2. Estrategias alimentarias para mejorar el perfil de ácidos grasos de la carne y grasa en rumiantes	18
2.1.3. Descripción de las fuentes de ácidos grasos poliinsaturados empleadas: el lino, la chía y las microalgas marinas	20
2.2. La carne de cordero.....	22
2.2.1. Calidad de la carne.....	22
2.2.2. Composición en ácidos grasos.....	23
2.2.2.1. Características generales de los ácidos grasos	23
2.2.2.2. Composición en ácidos grasos de la carne de rumiante	26
2.2.2.3. Efectos beneficiosos de los <i>n</i> -3 PUFA sobre la salud humana	27
2.3. Tejido adiposo.....	31
2.3.1. Características generales	31
2.3.2. Importancia del tejido adiposo en la producción animal.....	32
2.3.3. Desarrollo del tejido adiposo.....	34
2.3.4. Adipogénesis	36
2.3.5. Principales factores de transcripción reguladores de la adipogénesis y del metabolismo lipídico.....	39
2.4. Metabolismo lipídico en los rumiantes.....	42

2.4.1. Metabolismo lipídico en el rumen.....	42
2.4.2. Resíntesis, absorción, transporte y captación de lípidos por los tejidos periféricos	45
2.4.3. Lipogénesis y formación de triglicéridos.....	47
2.4.4. Síntesis de ácidos grasos <i>de novo</i>	48
2.4.5. Elongación y desaturación de los ácidos grasos.....	54
2.4.6. Metabolismo de los ácidos grasos esenciales.....	57
3. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL.....	61
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
4.1. Publicación 1: <i>Effect of linseed dietary supplementation on adipose tissue development, fatty acid composition, and lipogenic gene expression in lambs</i>	63
4.2. Publicación 2: <i>The effects of linseed or chia seed dietary supplementation adipose tissue development, fatty acid composition, and lipogenic gene expression in lambs</i>	76
4.3. Publicación 3: <i>Effects of addition of linseed and marine algae to the diet on adipose tissue development, fatty acid profile, lipogenic gene expression, and meat quality in lambs</i>	85
4.4. Discusión general.....	109
5. CONCLUSIONES	118
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	121
PREMIO OTORGADO POR LA FEDERACIÓN EUROPEA DE LA CIENCIA ANIMAL (EAAP):	
<i>Effect of linseed or algae on lamb meat quality, fatty acid profile, and FADS1 and FADS2 expression.</i>	
65 th Annual Meeting of the European Federation of Animal Science (2014). Copenhagen. Dinamarca.	
	138

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Evolución del censo, del número de explotaciones y de la producción de ganado ovino en España entre el año 2004 y el 2015	15
Figura 2.	Evolución del consumo de carne fresca de ovino y caprino en los hogares españoles.....	16
Figura 3.	Ovino de raza Navarra.....	17
Figura 4.	La flor de lino y semillas de lino marrón.....	20
Figura 5.	La flor y semillas de chía.....	21
Figura 6.	Microalgas marinas <i>Schizochytrium</i> spp.	21
Figura 7.	Estructura química del ácido linoleico (9 <i>cis</i> – 12 <i>cis</i>) y de uno de los isómeros del ácido linoleico conjugado (9 <i>cis</i> – 11 <i>trans</i>)	26
Figura 8.	Productos metabólicos proinflamatorios y antiinflamatorios derivados de los eicosanoides y de los docosanoides	29
Figura 9.	Diagrama del proceso de diferenciación del adipocito	37
Figura 10.	Principales factores de transcripción implicados en la cascada de eventos moleculares que desencadenan el inicio de la adipogénesis	38
Figura 11.	Representación esquemática de la activación del <i>receptor gamma activado por proliferador de peroxisomas (PPARG)</i>	40
Figura 12.	Descripción de la ruta del ácido linoleico (LA) y del ácido α -linolénico (ALA) en el rumen.....	44
Figura 13.	Digestión y absorción de los lípidos e incorporación de los ácidos grasos a las células por medio de la lipoprotein lipasa (LPL)	46
Figura 14.	Representación esquemática de las rutas metabólicas implicadas en la síntesis de ácidos grasos	49
Figura 15.	Reacción catalizada por la enzima acetil-CoA carboxilasa	51
Figura 16.	Proceso general de síntesis de ácido palmítico (C16:0).....	53
Figura 17.	Transferencia de electrones en el proceso de desaturación de los ácidos grasos...	55

Figura 18. Síntesis de ácido palmitoleico (C16:1 <i>n</i> -7), de ácido oleico (C18:1 <i>n</i> -7) y de ácido ruménico (C18:2 <i>n</i> -7/11)	55
Figura 19. Ruta de síntesis de ácidos grasos de cadena larga a partir del ácido linoleico (LA) y ácido α -linolénico (ALA)	58
Figura 20. Planteamiento experimental.....	62
Figura 21. Estimaciones de $-\text{Log}_2$ del “Fold Change” para diferentes grupos en el tejido subcutáneo e intramuscular de los genes <i>acetil-CoA carboxilasa (ACACA)</i> , <i>lipoprotein lipasa (LPL)</i> , <i>stearoil-CoA desaturasa (SCD)</i> , <i>desaturasa 1 de ácidos grasos (FADS1)</i> , <i>desaturasa 2 de ácidos grasos (FADS2)</i> y <i>elongasa 5 de ácidos grasos (ELOVL5)</i>	115

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Composición de ácidos grasos del músculo <i>longissimus dorsi</i> y del tejido adiposo de cordero, ternera y cerdo (% ácidos grasos totales).....	27
-----------------	---	----

ABREVIATURAS

AA	Ácido araquidónico
ACC	Acetil-CoA carboxilasa
ACACA	<i>Acetil-CoA carboxilasa Alfa</i>
ACACB	<i>Acetil-CoA carboxilasa Beta</i>
ACL	ATP-citrato liasa
ACP	Proteína portadora de acilos
ACS	Acil-CoA sintetasa
ADD1 / SREBF1	<i>Factor 1 de diferenciación y determinación del adipocito / Factor 1 de unión a elementos reguladores del esteroil</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AGNE	Ácidos grasos no esterificados
AGV	Ácidos grasos volátiles
ALA	Ácido α -linolénico
AMP	Adenosin monofosfato
AMPK	Proteína kinasa activada por AMP
aP2 / FABP4	<i>Proteína del adipocito 2 / Proteína de unión a ácidos grasos 4</i>
ApoC-II	Apoproteína C2
ApoE	Apoproteína E
ATP	Adenosin trifosfato
bZIP	<i>Basic leucine zipper</i>
CbREBP	<i>Proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos</i>
CEBPA	<i>Proteína de unión a la secuencia CCAAT alfa</i>
CEBPB	<i>Proteína de unión a la secuencia CCAAT beta</i>
CEBPD	<i>Proteína de unión a la secuencia CCAAT delta</i>
CLA	Ácido linoleico conjugado
DHA	Ácido docosahexaenoico
DHAP	Dihidroxiacetona fostafo
DPA	Ácido docosapentaenoico
ELOVL	<i>Elongasa de ácidos grasos</i>
EPA	Ácido eicosapentaenoico
FADS1	<i>Desaturasa de ácidos grasos 1</i>
FADS2	<i>Desaturasa de ácidos grasos 2</i>
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FAS	Sintasa de ácidos grasos
FASN	<i>Sintasa de ácidos grasos</i>
G3PDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
G6PDH	Gliceraldehído 6-fosfafo deshidrogenasa
GLUT4	Transportados de glucosa tipo 4
HSPG	Heparan sulphate-proteoglycans
ICDH	NADP-isocitrato deshidrogenasa

IDL	Lipoproteínas de densidad intermedia
IGP	Indicación Geográfica Protegida
IM	Intramuscular
IRE	Elemento respuesta a la insulina
IUPAC	La Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
LA	Ácido linoleico
LCPUFA	Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LPL	Lipoprotein lipasa
LXR	Receptor X del hígado
MAGRAMA	Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente
ME	Enzima mítica
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
MUFA	Ácidos grasos monoinsaturados
NADH	Nicotinamida-adenina-dinucleótido
NADPH	Nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato
NCBI	Centro Nacional de Información Biotecnológica
PAC	Política Agraria Común
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxilkinasa
PPARA	<i>Receptor alfa activado por proliferador de peroxisomas</i>
PPARD	<i>Receptor delta activado por proliferador de peroxisomas</i>
PPARG	<i>Receptor gamma activado por proliferador de peroxisomas</i>
PPRE	Elemento de respuesta a proliferador de peroxisomas
Pref-1	<i>Factor de preadipocito-1</i>
PUFA	Ácidos grasos poliinsaturados
RXR	Receptor 9- <i>cis</i> retinoico
SC	Subcutáneo
SCD	<i>Esteroil-CoA desaturasa</i>
SFA	Ácidos grasos saturados
SRE	Elemento respuesta a esteroides
Spot-14	<i>Elemento de respuesta a la hormona tiroidea</i>
TBARS	Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
TCA	Ciclo del ácido cítrico
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
UE	Unión Europea
UTR	Región no traducida
VA	Ácido <i>trans</i> -vaccénico
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad
WHO	Organización mundial de la salud
Wnt	<i>Wingless-Int</i>

RESUMEN

En los últimos años, el aporte de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) de tipo *n*-3 en la alimentación animal es una vía que está siendo estudiada para mejorar el perfil lipídico de la carne, debido a que es un alimento con una proporción considerable de ácidos grasos saturados que se asocian a ciertas enfermedades crónicas y además existe un interés creciente por consumir alimentos más saludables. Sin embargo, algunos estudios muestran que el aumento de ácidos grasos saludables como el ácido α -linolénico (ALA), el ácido eicosapentaenoico (EPA), el ácido docosahexaenoico (DHA) y el isómero C18:2 *n*-7 del ácido linoleico conjugado (CLA) en la carne tras la adición de fuentes de PUFA en las dietas de los animales no es muy significativo. Las hipótesis planteadas para esta discordancia apuntan a la regulación de la expresión de genes implicados en el metabolismo lipídico.

Por lo tanto, el objetivo del presente estudio ha sido valorar el efecto de la incorporación materias primas ricas en PUFA (semilla de lino y chía ricas en ALA y microalgas marinas con un alto contenido en DHA) en la alimentación de corderos de raza Navarra durante el cebo de sobre las características de crecimiento y de la canal, el desarrollo del tejido graso y la composición en ácidos grasos de la carne y de la grasa, además de analizar varios parámetros relacionados con la calidad de la carne y valorar su aceptabilidad por parte de los consumidores. Por último, con objeto de profundizar en la comprensión de los mecanismos moleculares por medio de los cuales los PUFA pueden ejercer su acción en el tejido adiposo, se ha estudiado la expresión de varios genes lipogénicos y adipogénicos.

En el primer ensayo se emplearon 36 corderos machos destetados con $15,2 \pm 0,18$ kg de peso vivo y asignados al azar a uno de los siguientes grupos (dietas isoenergéticas e isoproteicas): control (C; pienso comercial con cebada y soja); L5 (cebada y soja con un 5% de semilla de lino); L10 (cebada y soja con un 10% de semilla de lino). Los corderos fueron sacrificados con $26,5 \pm 0,28$ kg. Los resultados indicaron que los corderos alimentados con lino no presentaron diferencias significativas en los parámetros de crecimiento y de la canal con respecto a los corderos alimentados con la dieta convencional ($P > 0,05$). En relación a la composición de ácidos grasos, la adición de lino incrementó significativamente el contenido total de ALA (C18:3 *n*-3), C18:1 *n*-7 + C18:1 *n*-7 y PUFA *n*-3 en los tejidos subcutáneo (SC) e intramuscular (IM) ($P < 0,001$). Igualmente, la ratio *n*-6/*n*-3 disminuyó con la inclusión del lino ($P < 0,05$). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas

en la proporción de C18:2 *n*-7, EPA (C20:5 *n*-3), ácido docosapentaenoico (DPA; C22:5 *n*-3) y DHA (C22:6 *n*-3) en los tejidos SC e IM entre los tres grupos de corderos. Respecto a la expresión génica, en el tejido SC, la expresión de los genes *acetil-CoA carboxilasa alfa* (*ACACA*) y *estearoil-CoA desaturasa* (*SCD*) disminuyó en el lote L10 en relación con al lote C ($P < 0,001$) e incrementó la expresión del gen *LPL* en el L5 respecto al lote C ($P < 0,01$), aunque no se observaron diferencias significativas en la expresión de la *desaturasa de ácidos grasos 1* (*FADS1*) y 2 (*FADS2*) y de la *elongasa de ácidos grasos 5* (*ELOVL5*) entre los corderos alimentados con las diferentes dietas. En el tejido IM, se observó una inhibición de la expresión de los genes *ACACA* en los lotes L5 y L10, *SCD* en el lote L10, *FADS1* en los lote L5 y L10 y *FADS2* en el lote L5 ($P < 0,001$). Además, los corderos alimentados con un 5% de lino mostraron una mayor expresión del gen *lipoprotein lipasa* (*LPL*) en comparación a los alimentados con la dieta control ($P < 0,01$).

En el segundo ensayo se utilizaron 31 corderos machos que fueron destetados con $16,8 \pm 0,3$ kg, distribuidos al azar en tres lotes y alimentados con los diferentes piensos isoenergéticos e isoproteicos: control (C; cebada y soja); L (cebada, soja, 10,5% semilla de lino); Chia (cebada, soja, 10% semilla de chía). Cuando los corderos alcanzaron un peso vivo de $26,6 \pm 0,2$ kg fueron sacrificados. Los resultados mostraron que no hubo diferencias significativas en las características de crecimiento y de la canal entre los corderos alimentados con lino o chía y los alimentados con la dieta control ($P > 0,05$). Los estudios del perfil de ácidos grasos mostraron que la adición de lino como de chía a la dieta causaron un incremento significativo en ALA, C18:1 *n*-7, EPA y PUFA *n*-3 totales ($P < 0,01$) y una disminución en la ratio *n*-6/*n*-3 en el tejido adiposo SC e IM ($P < 0,001$). Los resultados de expresión génica indicaron una menor expresión de los genes *ACACA*, *SCD* y *FADS2* en el tejido IM de corderos alimentados con lino o chía ($P < 0,05$). Además, los corderos alimentados con lino no presentaron diferencias significativas en la expresión de los genes *LPL* y *FADS1* con respecto a los corderos alimentados con la dieta control ($P > 0,05$); en cambio, la inclusión de chía disminuyó la expresión de estos genes ($P < 0,01$). Por el contrario, en el tejido SC, la incorporación de lino y chía a la dieta no mostró un efecto sobre la expresión de los genes *ACACA*, *SCD* y *LPL*. En relación a los genes implicados en la síntesis de PUFA de cadena larga, en el tejido SC, la expresión de los genes *FADS1*, *FADS2* y *ELOVL5* se vio disminuida significativamente al incluir lino en la dieta ($P < 0,01$) y el gen *ELOVL5* al incluir chía ($P < 0,001$).

En el tercer ensayo, 33 corderos machos fueron destetados con $16,3 \pm 0,3$ kg de peso vivo y fueron alimentados con una de las siguientes dietas hasta alcanzar un peso de

sacrificio de $26,7 \pm 0,3$ kg: control (C; pienso comercial con cebada y soja); L (cebada, soja y 10% de semilla de lino); L-A (cebada, soja, 5% de semilla de lino y 3,89% de microalgas marinas). Los resultados productivos indicaron que los corderos alimentados con lino y algas presentaron una menor ganancia media diaria y una mayor edad a un mismo peso de sacrificio en comparación a los corderos de los lotes C y L ($P < 0,001$). No se observaron diferencias significativas en parámetros de la canal entre los tres lotes de corderos ($P > 0,05$). El análisis de la composición de ácidos grasos, en los tejidos SC e IM, mostró un incremento significativo en el contenido de ALA, C18:1 $n-7$ + C18:1 $n-7$, EPA y DPA en los lotes L y L-A con respecto al lote C ($P < 0,001$), mientras que la proporción de DHA solamente aumentó en el lote L-A ($P < 0,001$). La ratio $n-6/n-3$ disminuyó de forma significativa en los lotes L y L-A ($P < 0,001$). En relación a la calidad de la carne, la inclusión de algas en la dieta de los corderos causó una mayor oxidación lipídica, presencia de olores y sabores extraños y una menor aceptabilidad de la carne. El análisis de la expresión génica señaló una disminución de los siguientes genes en el tejido SC ($P < 0,05$): *ACACA* en los lotes L y L-A, y *LPL* y *SCD* en el lote L-A. En cambio, no se observó un efecto de la dieta sobre la expresión de los genes *FADS1*, *FADS2* y *ELOVL5* ($P > 0,05$). La adición de lino y lino y algas a la dieta tuvo como resultado el incremento en la expresión de los factores de transcripción *PPARG* y *CEBPA* en el tejido SC ($P < 0,05$), aunque el *SREBF1* no presentó diferencias significativas entre los tres lotes de corderos. En el tejido IM, la expresión de los genes *ACACA*, *SCD*, *FADS1* y *FADS2* se redujo en los lotes L y L-A ($P < 0,001$) y *LPL* en el lote L ($P < 0,01$), en cambio, el *PPARG*, *CEBPA* y *SREBF1* no variaron significativamente ($P > 0,05$).

En conclusión, la adición de lino y chía en la dieta de los corderos no ha originado variaciones en los rendimientos productivos ni en la calidad sensorial y estabilidad oxidativa de la carne. Sin embargo, la adición de algas marinas (3,89%) ha influido adversamente en los parámetros anteriores. La adición de lino, chía y algas ha promovido un perfil de ácidos grasos más saludable en la carne, debido fundamentalmente al mayor contenido en ALA y PUFA $n-3$ y una menor ratio PUFA $n-6/n-3$, siendo la inclusión de algas la estrategia que mejores resultados ha dado en este sentido. Por otro lado, la incorporación de PUFA en las raciones de los corderos ha modulado la expresión de varios genes relacionados con el metabolismo lipídico en los tejidos SC e IM, lo que podría ser una de las causas del aumento poco significativo de algunos ácidos grasos en la carne. Por consiguiente, en el planteamiento de estrategias prácticas futuras para obtener un mayor enriquecimiento en

estos ácidos grasos saludables de la carne, los citados aspectos ayudarían a la elección tanto de las fuentes de PUFA como de su nivel óptimo de inclusión.

ABSTRACT

Over the last years, the inclusion of *n*-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) in animal feeds is a strategy that is being studied to improve the lipid profile of meat, as ruminant meat possess significant proportions of saturated fatty acids which have been associated with certain chronic diseases and awareness of the importance of healthy food consumption has increased. Nevertheless, the results of some studies show a limited increase in meat contents of α -linolenic acid (ALA), eicosapentaenoic acid (EPA), docosahexaenoic acid (DHA) and C18:2 Δ 11 (a isomer of conjugated linoleic acid; CLA) after the inclusion of PUFA in animal feeds, suggesting a regulation of genes involved in lipid metabolism by dietary PUFA.

Thus, the aim of the present study was to analyse the effect of addition of sources high in PUFA (linseed and chia seed, both rich in ALA, and marine microalgae rich in DHA) in Raza Navarra breed lambs during fattening on growth and carcass parameters, adipose tissue development and fatty acid composition of meat and fat. In addition, several parameters related to meat quality and the consumer acceptability of meat were assessed. Finally, the expression of some lipogenic and adipogenic genes has studied in order to achieve a better understanding of molecular mechanisms associated with fatty acid metabolism in the adipose tissue.

In the first trial, 36 male lambs were allocated after weaning (15.2 ± 0.18 kg live weight -LW-) into three experimental groups and fed a control diet (containing barley and soya) and two experimental diets (5% and 10% linseed, L5 and L10 respectively), being all the diets isoenergetic and isoproteic. Lambs were slaughtered at 26.5 ± 0.28 kg LW. Addition of linseed, rich ALA, had no effect on growth and carcass parameters. Linseed supplementation increased ALA (C18:3 *n*-3), C18:1 Δ 10 + C18:1 Δ 11 and total *n*-3 PUFA contents of subcutaneous (SC) and intramuscular (IM) fat ($P < 0.001$). The *n*-6/*n*-3 ratio was decreased by linseed addition ($P < 0.05$). There were no significant effects of linseed on C18:2 Δ 11, EPA, docosapentaenoic acid (DPA; C22:5 *n*-3) and DHA contents of SC and IM depots. In the SC fat, expression of *acetyl-CoA carboxylase alpha* (*ACACA*) and *stearoyl-CoA desaturase* (*SCD*) was downregulated in L10 compared to C group ($P < 0.001$) and *lipoprotein lipase* (*LPL*) was upregulated in L5 group ($P < 0.001$); however, there were no effects of diet on *fatty acid desaturase 1* (*FADS1*) and 2 (*FADS2*) and *fatty acid elongase 5* (*ELOVL5*) mRNA levels. In the IM fat, downregulation of *ACACA* (L5 and L10), *SCD* (L10), *FADS1* (L5 and L10) and *FADS2* (L5) was observed ($P < 0.001$). Expression of *LPL* was upregulated in L5 compared to C group ($P < 0.01$).

In the second assay, thirty-one male lambs were weaned at 16.8 ± 0.3 kg LW and assigned randomly into three dietary groups: a control group diet of barley and soybean (C); the barley and soybean based diet with 10.5% linseed (L) and the barley and soybean based diet with 10% chia seed (Chia). The lambs were slaughtered at an average LW of 26.6 ± 0.2 kg. The results indicated that supplementing lambs' diet with either linseed or chia seed, both rich in ALA, had no effect on the growth parameters. Supplementation of either linseed or chia seed increased the ALA, C18:1 n -7, EPA, and total n -3 PUFA contents ($P < 0.01$), and decreased the n -6/ n -3 ratio in the IM and SC adipose tissues ($P < 0.001$). Downregulation of *ACACA*, *SCD* and *FADS2* was observed in the IM adipose tissue in the linseed and chia seed-supplemented lambs ($P < 0.05$). The linseed-containing diet did not change *LPL* or *FADS1* gene expression in the IM adipose tissue, whereas chia seed downregulated the expression of those genes ($P < 0.01$). On the contrary, supplementing either linseed or chia seed had no effect on *ACACA*, *SCD*, or *LPL* gene expression in the SC adipose tissue. Supplementing linseed decreased *FADS1*, *FADS2*, and *ELOVL5* mRNA in the SC adipose tissue ($P < 0.01$), whereas supplemented chia seed decreased *ELOVL5* expression ($P < 0.001$).

In the third trial, 33 lambs were fed three diets from weaning (16.3 ± 0.3 kg of LW) up to 26.7 ± 0.3 kg LW: Control diet (barley and soybean); L diet (barley, soybean and 10% linseed) and L-A diet (barley, soybean, 5% linseed and 3.89% algae). Lambs fed L-A diet showed lower average daily gain and greater slaughter age compared to Control and L ($P < 0.001$). Carcass traits were not affected by L and L-A diets. Adding either linseed or linseed and algae increased ALA, C18:1 n -7 + C18:1 n -7, EPA, and DPA contents in both adipose tissues ($P < 0.001$); however, DHA only was increased by L-A ($P < 0.001$). The n -6/ n -3 ratio decreased in L and L-A ($P < 0.001$). Algae had adverse effects on meat quality, with greater lipid oxidation and reduced ratings for odor and flavor. The expression of lipogenic genes was downregulated in the SC adipose tissue ($P < 0.05$): *ACACA* in L and L-A and *LPL* and *SCD* in L-A. *FADS1*, *FADS2* and *ELOVL5* were unaffected. In the SC adipose tissue, supplementing either L or L-A increased *PPARG* and *CEBPA* ($P < 0.05$), although it had no effect on *SREBF1*. In the IM adipose tissue, expression of *ACACA*, *SCD*, *FADS1* and *FADS2* decreased in L and L-A ($P < 0.001$) and *LPL* in L ($P < 0.01$), but *PPARG*, *CEBPA* and *SREBF1* were unaffected ($P > 0.05$).

In conclusion, the addition of linseed and chia seed to the lambs' diet did not cause changes neither in lambs' performance nor in sensory quality and oxidative stability of meat. Nonetheless, the inclusion of marine algae (3.89%) had adverse effects on the former

parameters. Linseed, chia seed and algae inclusion in the diet promoted a healthier fatty acid profile, mainly as a result of ALA and *n*-3 PUFA increase and a decreased *n*-6/*n*-3 ratio, being algae addition more effective. Moreover, the limited enrichment of some fatty acids in meat could be explained, partly, by the modulation of the expression of some genes involved in lipid metabolism by dietary PUFA in the SC and IM adipose tissues. Thus, the consideration of these results could provide guidance on the source and optimum level of PUFA inclusion in future nutritional strategies to obtain higher enrichments in healthy fatty acids of meat.

LABURPENA

Azken urteetan, kontsumitzaileek elikagai osasuntsuak dietan sartzeko duten ardura handitu da, hori dela eta, eta hausnarkarien haragian gantz-azido aseak (zenbait gaixotasun kronikorekin erlazionatuak) proportzio nabarmena hartzen dutela kontutan izanik, haragiaren gantz-azidoen profila hobetzeko ikerketak egiten ari dira $n-3$ motako gantz-azido poliasegabeak (PUFA) animalien elikaduran sartuz. Hala eta guztiz ere, zenbait ikerlanek adierazi dutenez, osasunarentzat onuragarriak diren zenbait gantz-azidoetan lortutako aberastasuna ez da oso adierazgarria izan, esate baterako, azido alfa linolenikoa (ALA), azido eikosapentaenoikoa (EPA), azido dokosahexaenoikoa (DHA) eta azido linoleiko konjugatuaren isomeroa den C18:2 $n-7$. Proposatutako hipotesiek lipidoen metabolismoarekin erlazionatutako geneen espresioaren erregulazioa adierazten dute aurretik aipatutakoaren arrazoitzat. Beraz, aurkezten den lanaren helburua gantz-azido poliasegabeetan aberatsak diren lehengaiak (lihoa eta txia haziak, ALA gantz-azidoan oparoak direnak eta itsas mikroalgak, DHA-n aberatsak) Nafarroako arrazako bildotsen hazkuntza eta kanal ezaugarrietan, ehun adiposoaren garapenean, haragiaren eta koipearen gantz-azidoen konposizioan, eta modu berean, haragiaren kalitatearekin zerikusia duten zenbait parametrotan eta kontsumitzaileen onargarritasunean duten efektua aztertzea da. Azkenik, lipogenesiarekin eta adipogenesiarekin erlazionatutako zenbait generen espresioa analizatu da, gantz-azidoen metabolismoan parte hartzen duten mekanismo molekularren ulermen sakonago bat lortzeko.

Lehenengo entseguan 36 bildots ar erabili ziren, titia kentzea $15,2 \pm 0,18$ kg-rekin egin ondoren, zoriz esleitu ziren honako hiru taldeetan, dietak isoenergetikoak eta isoproteikoak izanik: kontrola (C; garagarra eta soja); L5 (garagarra, soja eta liho hazia %5ean); L10 (garagarra, soja eta liho hazia %10ean). Bildotsak $26,5 \pm 0,28$ kg-ko pisura iritsi zirenean hil ziren. Emaitzek adierazten zuten liho hazia zuen dieta jan zuten bildotsek ez zutela hazkuntza eta kanal parametroetan desberdintasun adierazgarririk adierazi kontrol dieta jan zutenekin alderatuz ($P > 0,05$). Gantz-azido profilari dagokionez, lihoaren eransketak ALA (C18:3 $n-3$), C18:1 $n-7$ + C18:1 $n-7$ eta PUFA $n-3$ edukien handitzea ekarri zuen larruazalpeko eta muskulu barneko gantzetan ($P < 0,001$). Gainera, $n-6/n-3$ ratioa ere txikitu zen lihoaren adizioarekin ($P < 0,05$). Hala ere, C18:2 $n-7$, EPA (C20:5 $n-3$), azido dokosapentaenoiko (DPA; C22:5 $n-3$) eta DHA (C22:6 $n-3$) gantz-azidoetan ez zen desberdintasun adierazgarririk ikusi bildotsen larruazalpeko eta muskulu barneko gantzetan. Espresio genikoaren emaitzek nabarmentzen dutenez larruazalpeko bildotsen gantzetan *acetyl-coA karboxilasa alfa (ACACA)* eta *stearoil-coA desaturasa (SCD)* geneen espresioa estatistikoki modu adierazgarrian jaitsi zen

L10 taldean C taldearekin alderatuz ($P < 0,001$) eta baita *LPL* genea L5 taldean ($P < 0,01$). Haatik, *gantz-azidoen desaturasa 1 (FADS1)* eta *2 (FADS2)* eta *gantz-azidoen elongasa 5 (ELOVL5)* geneen espresioan ez zen desberdintasun adierazgarririk ikusi hiru taldeen artean. Muskulu barneko gantzean, *ACACA* (L5 eta L10 taldeetan), *SCD* (L10 taldean), *FADS1* (L5 eta L10 taldeetan) eta *FADS2* (L5 taldean) geneak inhibititu ziren ($P < 0,001$). Bestalde, %5eko proportzioan liho hazia jan zuten bildotsek *LPL* genearen espresio handiagoa izan zuten kontrol dieta kontsumitu zutenekin alderatuz ($P < 0,01$).

Bigarren entseguan 36 bildots ar erabili ziren eta $16,8 \pm 0,3$ kg-rekin titia kendu ondoren hiru taldetan zoriz banatu ziren: kontrola (C; garagarra eta soja); L (garagarra, soja eta liho hazia %10,5ean); Chia (garagarra, soja eta txia hazia %10ean). Bildotsak $26,6 \pm 0,2$ kg-ko pisura iritsi zirenean hil ziren. Emaitzek aditzera eman zutenek liho eta txia hazia zuten dietaz elikatu ziren bildotsek ez zuten hazkuntza eta kanal parametroetan desberdintasun adierazgarririk adierazi kontrol dietaz elikatu zirenekin konparatuta ($P > 0,05$). Beste alde batetik, liho eta txia hazien gehikuntzak ALA, C18:1 $\Delta 10$ + C18:1 $\Delta 11$, EPA eta PUFA *n*-3-en kantitatea adierazgarriki handitu ($P < 0,01$) eta *n*-6/*n*-3 ratioa txikitu zuten larruazalpeko eta muskulu barneko gantzetan ($P < 0,001$). Bestalde, liho eta txiaren erabilerak *ACACA*, *SCD* eta *FADS2*-aren inhibizioa eragin zuen muskulu barneko gantzean ($P < 0,05$). Lihoa dietan sartzeak ez zuen *LPL* eta *FADS1* geneen espresioan eragin adierazgarririk izan, txiak ordea, aipatutako geneen espresioaren gutxitzea eragin zuen ($P < 0,01$). Aitzitik, larruazalpeko gantzean, bildotsen dietan liho eta txia hazien erabilerak ez zuen *ACACA*, *SCD* eta *LPL* geneen espresioan efekturik izan. Azkenik, *FADS1*, *FADS2* eta *ELOVL5* geneek espresio txikiagoa azaldu zuten lihoa zuen dietaz elikatu ziren bildotsetan ($P < 0,01$) eta *ELOVL5* geneak txia zuen dieta jan zutenetan ($P < 0,001$).

Hirugarren entseguan 33 bildots ar erabili ziren, titia kendu ondoren ($16,8 \pm 0,3$ kg) hiru taldetan zoriz banatu eta $26,7 \pm 0,3$ kg-ko pisuarekin hil ziren: kontrola (C; garagarra eta soja); L (garagarra, soja eta liho hazia %10ean); L-A (garagarra, soja, liho hazia %5ean eta itsas algak %3,89an). Bildotsen dietan lihoa sartzeak ez zuen hauen hazkuntzan eraginik izan, algen gehikuntzak, aldiz, bildotsen eguneroko batezbesteko irabazia txikitu zuten, hiltzeko pisu jakin baterako adina handituz, C eta L taldeko bildotsekin alderatuz ($P < 0,001$). Kanalaren parametroen hiru bildots taldeen artean ez zen desberdintasun adierazgarririk antzeman ($P > 0,05$). Gantz-azidoen profilarik dagokionez, ALA, C18:1 $\Delta 10$ + C18:1 $\Delta 11$, EPA eta DPA proportzioak handitu ziren L eta L-A taldeko bildotsen larruazalpeko eta muskulu barneko gantzetan C taldekoekin alderatuz ($P < 0,001$), DHA-ren proportzioak, ordea, L-A taldeko animalietan soilik igo ziren modu adierazgarrian ($P < 0,001$). *n*-6/*n*-3 ratioa adierazgarriki

txikitu zen L eta L-A multzoen kasuan ($P < 0,001$). Beste alde batetik, algen erabilerak haragiaren oxidazio lipidikoa handiagotzeaz gainera, usain eta zapore arraroak eta haragiaren onargarritasunaren txikiagotzea eragin zuen. Larruazalpeko gantzean L eta L-A multzoetan *ACACA* eta L-A multzoan *LPL* eta *SCD* geneen espresio txikiagoa ikusi zen ($P < 0,05$). Baina, *FADS1*, *FADS2* eta *ELOVL5* geneen espresioan ez zen dietaren eraginik antzeman ($P > 0,05$). Bestalde, liho eta liho eta algen gehikuntzak *PPARG* eta *CEBPA* transkripzio faktoreen espresioan handitze adierazgarria eragin zuten larruazalpeko gantzean ($P < 0,05$), halere, *SREBF1*-aren espresioan ez zen desberdintasun nabarmenik izan bildotsen hiru taldeen artean. Muskulu barneko gantzean berriz, *ACACA*, *SCD*, *FADS1* eta *FADS2*-aren espresioa L eta L-A taldeetan ($P < 0,001$) eta *LPL*-rena L taldean txikitu ziren arren ($P < 0,01$), *PPARG*, *CEBPA* eta *SREBF1* geneen espresioa ez zen modu adierazgarrian aldatu C taldearekin konparaketa egitean ($P > 0,05$).

Konklusioz, liho eta txia haziak bildotsen dietan barneratzeak ez du hauen hazkuntzan, haragiaren kalitate sentsozialean eta lipidoen oxidazioan aldaketa nabarmenik izan. Hala ere, algen adizioak (3,89%) era negatiboan eragin dio aipatutako parametroei. Gainera, liho, txia eta algen erabilerak osasungarriagoak diren haragiaren gantz-azidoen hobekuntza eragin du, batez ere, ALA eta PUFA *n*-3-en proportzioak handitzearen eta *n*-6/*n*-3 ratioa txikiagotzearen eraginez, algak dietan sartzeko estrategiak emaitzarik hoberenak erakutsiz. Bestalde, emaitzek adierazten duten zenbait gantz-azidoren aberastasun ez oso adierazgarria bildotsen elikagaian PUFA-k sartzeko metabolismo lipidikoarekin erlazionatutako zenbait generen modulazioen ondorio izan daiteke. Beraz, aipatutako aspektuak etorkizunean egingo diren nutrizio estrategietan kontutan hartzeak, gantz-azido poliasegabeen iturri eta inklusio mailaren aukeraketan lagunduko luke, modu honetan, osasuntsuak diren gantz-azidoen aberastasun hobe lortuz.

1. INTRODUCCIÓN

La carne y los productos cárnicos son componentes importantes en la dieta de los países desarrollados, alcanzando valores de hasta el 40% del aporte proteico. Aunque la carne de ovino ha tenido tradicionalmente un consumo considerable, en la última década, el sector de ovino de carne español se ha caracterizado por un descenso continuado en el consumo de carne de cordero. Entre las causas para este descenso se encuentra la asociación del consumo de carne roja con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y la mayor preocupación por una dieta más saludable, baja en ácidos grasos saturados, entre otras características (Howes et al., 2015). Asimismo, la reciente aparición en 2015 del informe sobre la carne roja emitido por la WHO puede contribuir a la imagen de “poco saludable” de la carne de cordero.

La carne de cordero, pese a ser una excelente fuente de proteínas de alto valor biológico y contener micronutrientes como minerales (hierro, selenio o cinc, entre otros), vitaminas (B₆, B₁₂, A, D) y lípidos bioactivos, presenta una proporción considerable de ácidos grasos saturados (SFA) y concentraciones variables de ácidos grasos *trans*, los cuales son resultado de la biohidrogenación ruminal de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) de la dieta (Francisco et al., 2016; Shingfield et al., 2013). No obstante, es una de las fuentes con mayor concentración de ácido linoleico conjugado (CLA), especialmente el isómero C18:2 *n-7*, ácido graso que ha mostrado beneficios potenciales para la salud por sus propiedades anticarcinógenas y antiinflamatorias, entre otras (Shingfield y Wallace, 2014).

Las autoridades sanitarias recomiendan que los SFA sean sustituidos por los PUFA, de manera que la ratio PUFA/SFA sea superior a 0,4, y aumentar la ingesta de PUFA *n-3* y así disminuir la relación *n-6/n-3* (FAO/WHO, 2008; Simopoulos, 2008). Por ello, se presta gran atención a los PUFA *n-3*, especialmente los de cadena larga como el ácido docosahexaenoico (DHA) y el ácido eicosapentaenoico (EPA), ya que presentan efectos beneficiosos como mejoras del sistema cardiovascular, antiinflamatorios o la reducción a la resistencia a la insulina (Anderson y Ma, 2009).

Por consiguiente, con el objetivo de producir una carne que se ajuste más a las recomendaciones nutricionales, se han intensificado las investigaciones encaminadas a conseguir la modificación del perfil de ácidos grasos a través de diferentes estrategias de alimentación animal. Son varias las materias primas que se emplean para enriquecer la carne en PUFA *n-3*, desde diferentes tipos de forrajes, semillas oleaginosas tales como el lino, la colza o la chía hasta aceites de pescado y algas marinas (Nieto y Ros, 2012). El lino es una de las semillas más estudiadas por su alto contenido en ácido α -linolénico (ALA) y su empleo tiene como fin enriquecer la carne en PUFA *n-3* y promover la biosíntesis de los PUFA de

cadena larga (LCPUFA) como el EPA y DHA, dado que el ALA es el precursor para la síntesis endógena de estos ácidos grasos. Los resultados de varios trabajos indican que la adición de lino a la ración de corderos incrementa el contenido de ALA y PUFA *n*-3; en cambio, no se observa, o es limitado, el enriquecimiento en EPA, en ácido docosapentaenoico (DPA) o DHA (Atti et al., 2013; de la Fuente-Vázquez et al., 2014; Giannico et al., 2009). En consecuencia, resulta de interés analizar el efecto de la incorporación de otras materias primas que contengan elevadas proporciones de LCPUFA, como las microalgas marinas.

A pesar de la utilización de fuentes alimentarias ricas en PUFA *n*-3, el enriquecimiento obtenido en ácidos grasos poliinsaturados en la carne no ha sido el esperado (Bas et al., 2007; Demirel et al., 2004; Radunz et al., 2009). En este sentido, Dervishi et al. (2011) indicaron que la variación en el perfil de ácidos grasos causado por un cambio en el sistema de alimentación en corderos implica la expresión diferencial de algunos genes relacionados con el metabolismo lipídico. Conte et al. (2012) señalaron que una mayor cantidad de PUFA *n*-3 en la dieta de corderos disminuyó la expresión del gen *stearoil-CoA desaturasa (SCD)*, que codifica la enzima Δ^9 desaturasa implicada en la síntesis de C18:2 *n*-7 (CLA). Además, Alvarenga et al. (2016) han observado en corderos alimentados con algas que la expresión del gen *desaturasa de ácidos grasos 1 (FADS1)*, que codifica una de las enzimas responsables de la formación de LCPUFA, se correlaciona negativamente con la concentración de EPA y DHA. Por ello, es de interés estudiar el efecto de los PUFA sobre los mecanismos moleculares relacionados con el metabolismo de ácidos grasos en el tejido adiposo de rumiantes, de forma que se pueda obtener una mayor comprensión de estos mecanismos que permita plantear estrategias prácticas en un futuro.

Además de la composición en ácidos grasos del tejido adiposo, la cantidad en que se encuentra también presenta un papel importante en la calidad de la carne. El desarrollo del tejido graso tiene lugar por la combinación de dos mecanismos: la hipertrofia o incremento del volumen celular y la hiperplasia o aumento en el número de células, siendo ambos procesos dependientes de la edad del animal y de la localización anatómica del depósito adiposo, entre otros factores (Flint y Vernon, 1993). Las características celulares del tejido adiposo pueden estar relacionadas con la expresión de genes lipogénicos y adipogénicos. Los factores de transcripción denominados *receptor gamma activado por proliferador de peroxisomas (PPARG)* y *proteína de unión a la secuencia CCAAT (CEBPA)* son los reguladores centrales de la adipogénesis de manera que inducen la expresión de varios genes relacionados con el

metabolismo lipídico, aunque la activación del *PPARG* también promueve la síntesis de triglicéridos (Feige et al., 2006; Graugnard et al., 2009).

La variación en la composición de ácidos grasos de la carne puede afectar a la calidad de la carne, ya que los ácidos grasos determinan su estabilidad oxidativa, afectando esta al flavor, color y valor nutricional de la carne. En este sentido, es conocido que niveles altos de PUFA, por su susceptibilidad a la oxidación, pueden producir olores y sabores extraños (Scollan et al., 2014). Por ello, es importante estudiar las implicaciones que pueda tener la modificación del perfil de ácidos grasos sobre la calidad de la carne.

En el presente trabajo se pretende abordar el estudio del efecto de la inclusión de PUFA provenientes de diferentes fuentes alimenticias (semilla de lino, chía y microalgas marinas) sobre la expresión de varios genes relacionados con el metabolismo lipídico, así como sobre el crecimiento y características de la canal, el desarrollo del tejido adiposo, comprobando también su influencia sobre la composición lipídica y calidad de la carne de cordero.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Producción de carne de ovino

2.1.1. Importancia y situación del sector ovino de carne

El sector ovino español se presenta como uno de los más relevantes dentro de los países comunitarios por su importancia censal, con una cabaña ovina en 2014 del 18% del total de la UE-28, únicamente superado por el Reino Unido con el 27%. En cuanto a la producción de carne de ovino y caprino, España también se situaba en segundo lugar en 2014 (UE-28), con un 16% del total de la producción por detrás del Reino Unido (40%) (Eurostat, 2016). Según un informe de Eurostat, entre los años 2005 y 2014 la cabaña ovina Europea disminuyó en 11,4 millones de animales, siendo España uno de los países que más censo perdió.

A nivel estatal, alrededor del 80% del ganado ovino se concentra en cinco regiones: Extremadura (20,7%), Castilla y León (18,7%), Castilla-La Mancha (15,2%), Andalucía (13,1%) y Aragón (11,0%) (MAGRAMA, 2014). Cabe destacar el retroceso del sector ovino-caprino español dentro de la Producción Final Ganadera, ya que se estima que en la última década el sector ha disminuido su participación desde el 12,6% en 2004 hasta el 5,2% en 2014, siendo el valor estimado de la producción de ovino-caprino en ese año de 845,8 millones de euros. La evolución del censo de ganado ovino en España permaneció prácticamente estable desde 1992 hasta el año 2000, invirtiendo su tendencia a partir de la Reforma de la PAC de ese año, momento desde el que muestra un declive progresivo. Las medidas introducidas a consecuencia de la Reforma, junto con otras razones coyunturales (aparición de lengua azul en 2007 o el incremento de los costes de alimentación debido al encarecimiento de la materia prima) pueden ser algunas de las razones de ese descenso. En la última década, el censo de ovino ha sufrido una disminución de más de 7 millones de cabezas (Figura 1), siendo 16.522.956 el total de animales censados a fecha de noviembre de 2015 (MAGRAMA, 2016a).

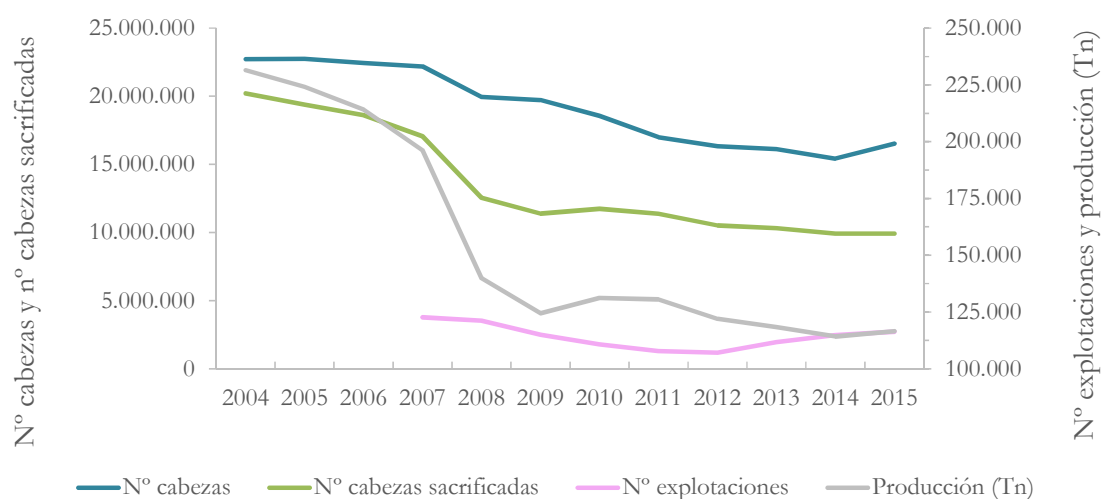


Figura 1. Evolución del censo, el número de explotaciones y de la producción de ganado ovino en España entre el año 2004 y el 2015. Fuente: MAGRAMA (2016a).

En cuanto al número de explotaciones, los datos disponibles desde el año 2007 apuntan a un notable declive en los últimos años (de las 122.694 explotaciones registradas en 2007 a un total de 116.319 explotaciones en enero de 2015), aunque parece que desde el año 2012 ha tenido lugar un ligero aumento. La situación de descenso continuado tanto del censo como del número de explotaciones ha ido acompañado de la disminución en la producción de carne de cordero. Desde el año 2004, el número de animales sacrificados ha disminuido, pasando de 20.214.117 animales sacrificados en 2004 a 10.794.026 cabezas en 2015 (Interovic, 2015).

Por otro lado, el consumo medio de carne de ovino en los hogares españoles también ha ido disminuyendo en los últimos años y supone uno de los problemas importantes del sector. El consumo total de carne de ovino y caprino en el periodo 2004/2015 ha caído desde 117.960 a 75.147 toneladas, como se muestra en la Figura 2 (MAGRAMA, 2016b). Asimismo, el consumo medio de carne de ovino y caprino se situaba en 2,81 kg per cápita en 2004, cifra que ha decrecido paulatinamente hasta los 1,69 kg per cápita en 2015.

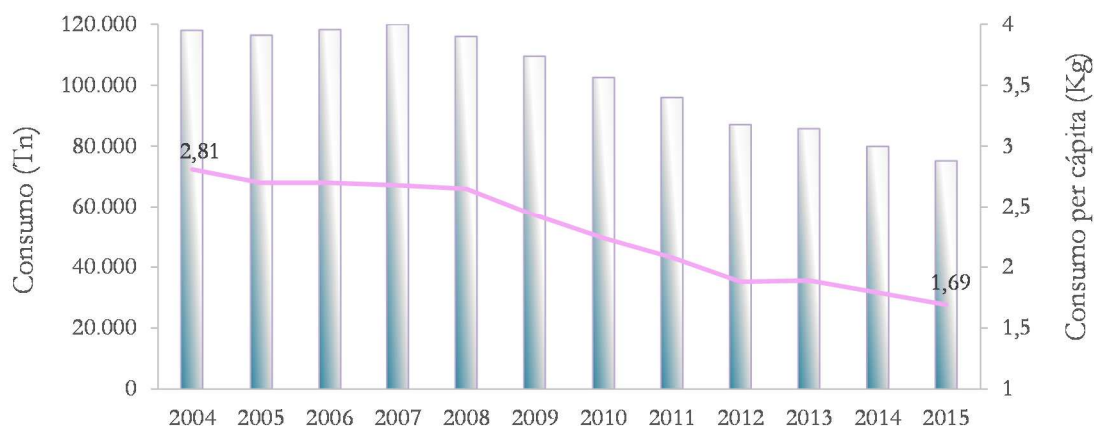


Figura 2. Evolución del consumo de carne fresca de ovino y caprino en los hogares españoles.

Fuente: MAGRAMA (2016b).

El sector ovino en la Comunidad Foral de Navarra posee una gran tradición histórica y es la Comunidad Autónoma española con mayor densidad ovina: 52 ovejas/km². El censo de ganado ovino se sitúa en 516.469 animales y el número de explotaciones es de 2.293 (Gobierno de Navarra, 2016). La mayoría de las explotaciones están dedicadas a la producción de carne siendo la raza Navarra la raza más empleada, seguida de la raza Latxa (dedicada a la producción de leche).

Así como ocurre a nivel estatal, la ganadería ovina en Navarra ha sufrido un declive en la última década. El número de animales y el número de explotaciones han descendido un 40% y un 9%, respectivamente. Por otro lado, el número de animales sacrificados también ha mostrado una disminución desde 506.826 hasta 342.930 animales en el periodo 2004/2015 (lo que supone en toneladas de carne un descenso de 5.439 a 3.482) (Gobierno de Navarra, 2016).

Como se ha mencionado, en la Comunidad Foral de Navarra, la raza más empleada para la producción de carne es la raza Navarra. Esta raza fue reconocida dentro del Catálogo Oficial de Razas de Ganado de España por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación en el año 1997 (BOE N° 279, 1997). La oveja de raza Navarra posee un vellón monocolor blanco, pelo de cobertura, corto, fino y brillante y algunos animales pueden presentar manchas marrones en los extremos (morro, orejas y patas). Respecto a formato y peso, los machos presentan una alzada de 75 cm y 95 kg de peso y las hembras alcanzan 60 cm de alzada y 57 kg de peso, aproximadamente (Figura 3).



Figura 3. Ovino de raza Navarra. Fuente: Feagas (2016).

En Navarra, esta raza cuenta con un censo de 339.297 ovejas en 541 explotaciones (Ochoa et al., 2010). Además, existen algunos rebaños en las provincias limítrofes de Álava, Burgos, Soria, La Rioja y en algunas zonas de Aragón.

La raza Navarra es una raza destinada principalmente a la producción de carne y los corderos comercializados son de diferentes tipos. El cordero lechal es un animal joven, que se comercializa con una edad inferior a los 40 días y con un peso vivo de 10 a 12 Kg, criado con leche materna y con canales de pesos comprendidos entre 6 y 8 kg. A su vez, el ternasco es un cordero más desarrollado y con más sabor, criado con leche materna y con una aportación suplementaria de paja y concentrados hasta los 22 - 26 Kg de peso vivo, generalmente en un periodo de tiempo inferior a los 90 días, con canales entre 9 y 12 kg. Además, cabe destacar que el cordero lechal y el ternasco de raza Navarra están amparados por la Indicación Geográfica Protegida “Cordero de Navarra” (BOE N° 140, 2002).

Una característica del sector ovino, tanto a nivel de comunidad como estatal, es su estacionalidad en el consumo, ya que, en la gastronomía tradicional española el consumo de carne de cordero se concentra en Navidades y Semana Santa. A esto se suma el hecho, íntimamente relacionado, de que en esas fechas el precio es superior al de la mayor parte de las carnes restantes. Estos rasgos del consumo constituyen una parte importante de la problemática del sector e impiden que este producto pase a formar parte de la cesta de la compra habitual, así como de los menús, pasando a ser una comida de “celebración” que, además, tiene una gastronomía tradicional que se adapta mal al estilo de vida actual. La mayor demanda de comodidad en la sociedad actual y la imagen de alimento “poco saludable”, coincidiendo con objetivos nutricionales que recomiendan moderar la ingesta de grasa total, grasa saturada y colesterol, se encuentran entre los factores más importantes que han contribuido a la disminución de su consumo (Alvarenga et al., 2015).

2.1.2. Estrategias alimentarias para mejorar el perfil de ácidos grasos de la carne y grasa en rumiantes

En la última década, el empleo de materias primas ricas en ácidos grasos insaturados en la alimentación de corderos es tema de interés, en especial por ser uno de los medios por el cual se puede modificar la composición de ácidos grasos de la carne (Howes et al., 2015; Ponnampalam et al., 2016; Sinclair, 2007) y de esta forma obtener un producto con un perfil lipídico más acorde a las recomendaciones nutricionales actuales dando respuesta a las actuales tendencias en alimentación humana. Esto implica incluir en la dieta una mayor cantidad de ácidos grasos omega-3, lo que conlleva una baja ratio entre ácidos grasos omega-6 y omega-3 (ratio $n-6/n-3$), ya que se ha demostrado que éstos son beneficiosos desde el punto de vista de la salud (Simopoulos, 2008).

Son varios los ingredientes que se emplean para variar la composición de ácidos grasos de la carne y grasa de corderos, desde diferentes tipos de forrajes y modos de conservación de los mismos, hasta el empleo de aceites vegetales (de girasol, soja, colza, etc.), semillas oleaginosas (el lino o la colza) y aceites de pescado y algas marinas (Shingfield et al., 2013).

En líneas generales, la dieta basal de los corderos en España incluye granos de cereal con un alto contenido en carbohidratos, como son la cebada, el maíz, la avena, el trigo y sus subproductos, los cuales tienen un alto contenido en LA. Por otro lado, la hierba fresca contiene entre 1 - 3% de ácidos grasos (en países con clima templado), de los cuales alrededor del 55 - 65% es ALA. Así, los corderos alimentados con pasto en general muestran una cantidad de ALA de 1 a 3 veces mayor en músculo y una menor cantidad de LA respecto a los corderos alimentados con concentrado (Alvarenga et al., 2015; Arousseau et al., 2004; Sinclair, 2007). Ponnampalam et al. (2014) observaron que una alimentación a base de pasto de alta calidad aumentó los niveles de EPA y DHA en músculo de corderos, conteniendo valores de estos dos ácidos grasos por encima de 30 mg/100 g músculo, en comparación con corderos alimentados con pasto seco suplementados con grano, los cuales mostraron concentraciones de EPA y DHA conjuntamente de 10 mg/100 g músculo.

Una de las semillas que ha sido más ampliamente estudiada como fuente de ácidos grasos omega-3 es el lino, ya que tiene un alto contenido en ALA y por ello una baja ratio $n-6/n-3$. No obstante, los trabajos realizados en ovino son menos numerosos que en otras especies (Raes et al., 2004). Los resultados de varios trabajos indican que la inclusión de lino en la ración de corderos, en general, incrementa de forma significativa el contenido de

ALA y PUFA $n-3$ y reduce la ratio $n-6/n-3$, tanto en el tejido subcutáneo (SC) como en el intramuscular (IM) (Atti et al., 2013; Bas et al., 2007; de la Fuente-Vázquez et al., 2014; Demirel et al., 2004; Noci et al., 2011; Wachira et al., 2002).

Recientemente, con objeto de aumentar los niveles de ácidos grasos insaturados en los productos animales se están investigando varias fuentes potenciales, como el altramuz, la avena negra, la camelina, el cáñamo y la chía. La chía tiene un alto contenido de aceite (32 - 39%) y es rica en ALA (Coates y Ayerza, 1996). Ayerza and Coates (2001) y Ayerza et al. (2002) utilizaron con éxito la semilla de chía en la dieta de gallinas ponedoras y pollos de engorde con el fin de aumentar el contenido en PUFA $n-3$ de huevos y carne. En conejos, Peiretti y Meineri (2008) observaron que la inclusión de hasta un 15% de chía en la dieta tuvo como resultado el aumento significativo de ALA, PUFA $n-3$ y la reducción de la ratio $n-6/n-3$ en el músculo y la grasa perirenal. Por otro lado, Coates y Ayerza (2009) en la especie porcina también observaron un aumento en ALA en el músculo *longissimus dorsi* al incluir un 10% o un 20% de chía. Por último, el único trabajo realizado en rumiantes hasta la fecha fue llevado a cabo por Ayerza et al. (2006) en vacas lecheras de la raza Holstein. Los resultados del estudio mostraron que la utilización de la chía como suplemento de la dieta aumentó los niveles de PUFA y redujo las ratios SFA/PUFA y $n-6/n-3$ en la leche.

Los aceites o grasas de origen marino (aceite de pescado y algas) son fuentes con un alto contenido en ácidos grasos de cadena larga, de los que el EPA y DHA son los más importantes. La composición de los aceites de pescado es muy variable y en función de la especie, estación o situación geográfica puede variar desde el 2 al 25% de DHA. En este aspecto, Shingfield et al. (2013) pusieron de manifiesto que en rumiantes en función de la fuente y la cantidad de aceite de pescado empleada, la concentración de EPA y DHA en el depósito IM puede aumentar hasta 2,33 y 2,55 g/100 g ácidos grasos, respectivamente. Por otro lado, una de las familias más empleadas de microalgas marinas (*Schizochytrium* spp.) destaca por su alta concentración de DHA y C22:5 $n-3$, aunque presenta menores niveles de EPA (Chilliard et al., 2001). Hopkins et al. (2014) observaron que, a pesar de la biohidrogenación ruminal, la suplementación de la dieta de corderos con algas incrementó el DHA hasta 6,5 veces en el tejido IM en comparación con la dieta control a base de avena y altramuz. En la misma línea, Meale et al. (2014) indicaron que este ácido graso incrementó su concentración de forma lineal en el tejido SC y en el músculo al aumentar la inclusión de algas (0%, 1%, 2% y 3%) en la dieta de corderos.

2.1.3. Descripción de las fuentes de ácidos grasos poliinsaturados empleadas: el lino, la chía y las microalgas marinas

Las fuentes ricas en ácidos grasos poliinsaturados empleadas en la presente tesis son la semilla de lino o linaza, la semilla de chía y las microalgas marinas:

El lino

El lino (*Linum usitatissimum* L.) se ha utilizado como alimento desde tiempos prehistóricos en Asia, norte de África y Europa y su cultivo, destinado a la obtención de alimentos y fibra, es muy antiguo.

Esta semilla presenta propiedades nutricionales interesantes y efectos potencialmente beneficiosos para la salud, los cuales se deben a su composición química. Aunque la composición varía considerablemente entre las variedades y de acuerdo a las condiciones ambientales en las que se produce, esta semilla tiene alrededor de 41% de lípidos, 28% de fibra y 20% de proteína (Maddock et al., 2005).

En referencia a su composición en ácidos grasos, el lino es una de las principales fuentes de ácido α -linolénico (55% del total de ácidos grasos). Además, contiene ácido linoleico y ácido oleico, aproximadamente un 16% de cada uno, y el contenido en ácidos grasos saturados es del 9,5% (Jiménez et al., 2013).



Figura 4. La flor de lino y semillas de lino marrón.

La chía

La *Salvia hispanica* L. es comúnmente conocida como chía y es una especie anual herbácea, nativa de las áreas montañosas del oeste y centro de México y norte de Guatemala. Existen evidencias que demuestran que la semilla de chía ya se utilizaba como alimento hacia el año 3500 a.C., siendo cultivada en el Valle de México entre los años 2600 y 900 a.C. por las civilizaciones teotihuacanas y toltecas. Asimismo, fue uno de los principales componentes de la dieta de los aztecas junto con otras semillas como la quinoa o el maíz (Rodríguez Vallejo, 1992). Sin embargo, estuvo al borde de la desaparición

durante 500 años por su estrecha asociación con los cultos religiosos (Ayerza y Coates, 2004).

La semilla de chía, de aproximadamente 2 mm de longitud y ovalada, presenta un contenido en proteína del 19 - 20%, un 28 - 30% de lípidos y alrededor del 30% de fibra (Ayerza y Coates, 2004; Jiménez et al., 2013). Presenta el mayor contenido de ácido α -linolénico de las plantas conocidas (hasta un 64%) y, así como el lino, también incluye ácido linoleico (alrededor del 19%) y oleico (9% aproximadamente) (Ayerza y Coates, 2004).



Figura 5. La flor y semillas de chía.

Las microalgas marinas

En las pasadas décadas se han realizado avances en la investigación básica sobre la producción y utilización de algas como complemento alimenticio en la nutrición humana o animal.

La biomasa de microalgas posee en general cualidades para su empleo en la alimentación animal debido principalmente a su alto contenido en LCPUFA $n-3$ (Sefer et al., 2011). Uno de los productos comerciales más empleados como fuente de DHA es el DHA-Gold, también utilizado en esta tesis, que se produce a partir de las microalgas *Schizochytrium* spp. El DHA-Gold tiene un contenido proteico de aproximadamente el 17%, 56% de lípidos, 4,5% de fibra y alrededor de 12,5% de carbohidratos. Su composición de ácidos grasos es la siguiente: 42,3% de DHA, 17,7% de DPA, 1,9% de EPA, 23,2% de ácido palmítico y 8,5% de ácido mirístico.

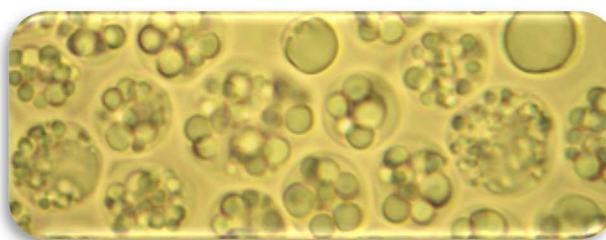


Figura 6. Microalgas marinas *Schizochytrium* spp.

2.2. La carne de cordero

2.2.1. Calidad de la carne

El término calidad es complejo de definir, subjetivo, relativo y dinámico y tiene diversas acepciones según la perspectiva de los distintos eslabones de la cadena de valor, que va desde la explotación ganadera hasta el consumidor. (Hammond, 1952) definió la calidad como “Aquello por lo cual el consumidor está dispuesto a pagar un precio superior de forma regular y consistente”.

En el caso de un alimento, la calidad se puede considerar bajo diferentes ópticas (Dalle Zotte, 2002): la calidad nutricional (referida a la composición química y al valor nutritivo), la calidad higiénico-sanitaria (ausencia de agentes biológicos y de residuos), la calidad tecnológica (aptitud para la transformación y la conservación), la calidad organoléptica o sensorial (conjunto de características percibidas por los sentidos en el momento de la compra o del consumo e influyen en la satisfacción sensorial), la calidad de servicio (poseer ciertas cualidades culinarias o cierto formato de presentación que permita prepararlo y/o consumirlo con facilidad) y la calidad simbólica (ciertas características valoradas por el consumidor como crianza en campo, prohibiciones religiosas, cuestiones éticas de bienestar animal, etc.).

La composición química de la carne y de la grasa determinará, en términos generales, su valor nutritivo, aspecto importante que en los últimos años ha suscitado un interés creciente puesto que la carne es la mayor fuente de grasa de la dieta. Además, la composición química está relacionada con las características tecnológicas, higiénicas y organolépticas finales de la carne. Los componentes mayoritarios de la carne de cordero son: el agua, cuyo porcentaje se encuentra entre un 65% y un 80%; las proteínas en un porcentaje que varía entre un 16% y un 22%; la grasa, el cual es el componente más variable; las cenizas (1% - 3%); los minerales (zinc, sodio, potasio y magnesio) y las vitaminas (A, B y D) (Rodríguez, 2005).

Como se ha indicado, generalmente la fracción lipídica es el componente más variable de la carne y su contenido y composición dependen principalmente de la edad del animal al sacrificio, la alimentación que haya recibido y la pieza comercial. Por ejemplo, Campo (2016) observó valores en torno al 2,4% en el músculo *longissimus dorsi* para ternascos alimentados con concentrado y sacrificados con 80 días de edad, 4,2% para corderos en pastoreo suplementados con concentrado y sacrificados con 5 meses de edad o 5,9% para corderos castrados en pastoreo sacrificados con más de 10 meses de edad.

La cantidad y la composición de la grasa de la carne, principalmente el veteadado, influye en muchos de los atributos determinan la calidad de la carne, desde la jugosidad, el flavor o la textura hasta el color, la oxidación lipídica o la firmeza (Hocquette et al., 2010; Muchenje et al., 2009). La cantidad total de lípidos de la carne afecta directamente a la jugosidad, ya que lubrica las fibras musculares durante el cocinado y estimula las glándulas salivares durante la masticación. Asimismo, la terneza tiende a incrementar cuando la cantidad de grasa IM en la carne es mayor (Pannier et al., 2014).

El flavor de un alimento abarca el conjunto de impresiones olfativas y gustativas que se presentan en el momento de su consumo. El término incluye el olor del alimento, ligado a compuestos volátiles, y el sabor, cuyo origen está en las sustancias solubles que se perciben en la boca durante o tras la masticación. Los compuestos solubles en agua, principalmente los aminoácidos sulfurados y azúcares reductores, y los lípidos son los responsables del flavor de la carne cocinada y del aroma característico a carne (Van Ba et al., 2012). En cambio, es la grasa IM, de la cual derivan cientos de componentes volátiles (aldehidos, cetonas, alcoholes, etc.), la que además contribuye a la formación de sabores característicos de cada especie (Beriaín et al., 2000; Young et al., 1997). Los PUFA, presentes principalmente en la fracción fosfolipídica, son realmente los responsables de la formación del sabor debido a su tendencia a la oxidación, aunque a partir de ciertos niveles pueden producir aromas y sabores indeseables y llegar a reducir la aceptabilidad del producto (Nute et al., 2007).

La oxidación de la grasa de la carne no solamente causa una alteración en el aroma y el sabor (enranciamiento), sino que también afecta al color y provoca la pérdida de determinados nutrientes (Campo et al., 2006; Wood et al., 2003). El enranciamiento dependerá del balance entre la concentración y nivel de insaturación de los ácidos grasos y la presencia de antioxidantes en los tejidos, siendo la vitamina E (α -tocoferol) el más común, de manera que su presencia reduce la oxidación (Ladikos y Lougovois, 1990; Wood et al., 2008). De forma paralela a la oxidación lipídica, generalmente se da un cambio de color en la carne debido a la oxidación de la oximioglobina de color rojo brillante a la metamioglobina de color marrón (Wood et al., 2003).

2.2.2. Composición en ácidos grasos

2.2.2.1. Características generales de los ácidos grasos

En la presente tesis, para la denominación de los ácidos grasos, se emplean los tipos de nomenclaturas más comunes, se utilizan los nombres comunes o la nomenclatura

sistemática recomendada por los de la IUPAC (IUPAC-IUB, 1976), así como las notaciones abreviadas del sistema delta y omega.

Los ácidos grasos se clasifican en función de la longitud de la cadena carbonada y su grado de insaturación (número de dobles enlaces). Atendiendo a su longitud, los ácidos grasos se dividen en los siguientes grupos: volátiles, con 2 a 4 carbonos; de cadena corta, con 6 a 10 carbonos; de cadena media, con 12 a 16 carbonos, y de cadena larga, a partir de 16 carbonos. Sin embargo, los límites de cada grupo varían dependiendo de la fuente consultada. Por otro lado, los ácidos grasos que no contienen ningún doble enlace se denominan ácidos grasos saturados. En general, predominan en los lípidos los compuestos con esqueleto lineal y número par de átomos de carbonos, aunque hay excepciones, ya que en la leche y grasa de rumiantes se encuentran ácidos grasos ramificados y de número impar procedentes del metabolismo bacteriano del rumen.

Cuando los ácidos grasos contienen dobles enlaces se denominan insaturados, distinguiéndose entre monoinsaturados (MUFA), que presentan un doble enlace, y poliinsaturados, que poseen dos o más dobles enlaces (Ratnayake y Galli, 2009). Los MUFA más comunes tienen entre 16 y 22 átomos de carbono y un doble enlace con una configuración *cis*, de los cuales destaca el ácido oleico (C18:1 *c9*) puesto que es el más común y está presente en cantidades considerables en fuentes de origen animal. Aunque los isómeros *trans* son poco comunes, se encuentran pequeñas cantidades (2% - 6%) de ácidos grasos *trans* en la leche y grasa de los rumiantes como resultado de la biohidrogenación ruminal de los PUFA procedentes de la dieta (Huth, 2007; Jenkins et al., 2008). Uno de los isómeros mayoritarios, representando el 30 - 60% del total de C18:1 *trans*, en las grasas animales es el ácido *trans*-vaccénico (VA; C18:1 *t11*).

Respecto a los ácidos grasos poliinsaturados, las familias *n*-6 y la *n*-3 son las más importantes y los ácidos grasos fundamentales dentro de cada familia son el ácido linoleico y el ácido α -linolénico, respectivamente. Estos dos ácidos grasos son esenciales, es decir, no pueden ser sintetizados por el organismo, y deben obtenerse de la dieta (Anderson y Ma, 2009).

El ácido linoleico o C18:2 *n*-6, es el ácido graso esencial primario o generador de la familia *n*-6. El LA puede ser desaturado y elongado para formar los PUFA de cadena larga de la serie *n*-6, entre los que se encuentra el ácido araquidónico (AA; C20:4 *n*-6).

Por otro lado, el ácido α -linolénico o C18:3 *n*-3, es el ácido graso esencial generador de la familia *n*-3. Al igual que el LA, el ALA también puede ser desaturado y elongado para

formar los derivados de la serie $n-3$ como el EPA (C20:5 $n-3$), el DPA (C22:5 $n-3$) o DHA (C22:6 $n-3$).

El LA y el ALA se encuentran en todas las grasas de la dieta y presentan mayores proporciones en la mayoría de los aceites vegetales (White, 2008). Respecto a las fuentes de ALA, este ácido graso está presente sobre todo en las plantas (verduras de hoja verde) y aparece en concentraciones elevadas en algunas semillas y frutos secos, como la semilla de lino o colza y las nueces, y en algunos aceites vegetales (Stark et al., 2008).

El AA es el PUFA $n-6$ más importante de todos los ácidos grasos $n-6$ puesto que es el precursor principal de los eicosanoides derivados de la familia $n-6$ y posee también una función estructural importante (este aspecto se abordará más adelante). Este ácido graso se encuentra en mayor cantidad en peces de agua dulce, carnes, huevos, algas y otras plantas acuáticas. El EPA y el DHA son los ácidos grasos $n-3$ más importantes desde el punto de vista de la nutrición humana, son componentes de los lípidos marinos y se encuentran en altas proporciones en la caballa, el salmón, la sardina, el arenque y el eperlano (Ratnayake y Galli, 2009).

La estructura de dobles enlaces de la mayoría de los ácidos grasos en su forma natural obedece a un patrón muy característico y conservado. Por ejemplo, si el ácido graso tiene dos dobles enlaces, éstos se sitúan de forma que estarán separados por un carbono intermedio que no participa de la insaturación, formando una estructura “no conjugada” (Figura 7). Sin embargo, es posible que un doble enlace cambie de posición y desaparezca el carbono intermedio, formando una estructura “conjugada” como consecuencia de la metabolización de ciertos ácidos grasos a nivel celular o por la manipulación tecnológica de las grasas y aceites.

En los últimos años, los investigadores han centrado su atención en los ácidos grasos de la dieta secundarios y poco comunes tales como los isómeros del CLA debido a sus propiedades anticarcinógenas y antiinflamatorias, entre otras (Shingfield y Wallace, 2014). La denominación CLA corresponde a una mezcla de isómeros geométricos y posicionales del LA; poseen dos dobles enlaces conjugados y están presentes en los lácteos y grasa de rumiantes. El isómero mayoritario del CLA es el ácido ruménico (C18:2 $\omega/11$), pero se han identificado más de 20 isómeros en la grasa de rumiante (Ratnayake y Galli, 2009). En la Figura 7 se muestran las estructuras del ácido linoleico y del ácido ruménico.

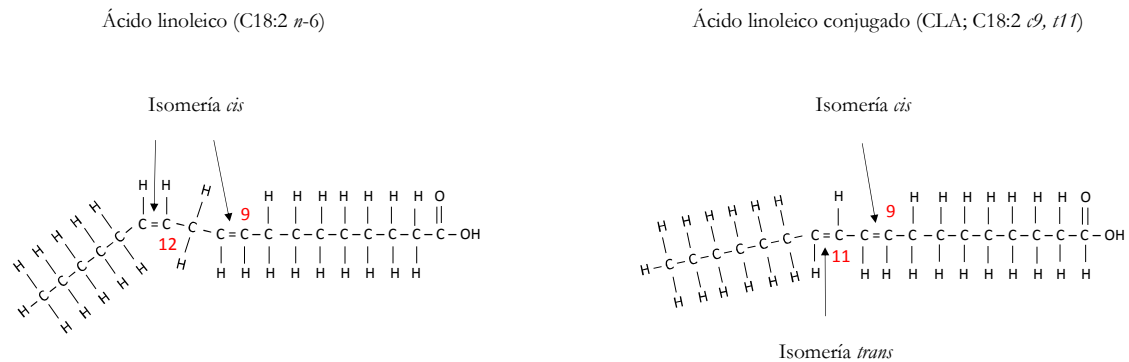


Figura 7. Estructura química del ácido linoleico (9*cis* – 12*cis*) y de uno de los isómeros del ácido linoleico conjugado (9*cis* – 11*trans*).

2.2.2.2. Composición en ácidos grasos de la carne de rumiante

Respecto a otras especies la grasa ovina se asemeja más a la de otros rumiantes como el vacuno que a la de porcino, como se observa en la Tabla 1. La grasa de los diferentes depósitos de animales rumiantes es predominantemente saturada y monoinsaturada, en la que los ácidos palmítico (C16:0), esteárico (C18:0) y oleico (C18:1 *c*9) suponen alrededor del 80% del total de ácidos grasos. Los ácidos grasos saturados que se encuentran en los tejidos y productos animales son reflejo de los procesos que tienen lugar en el rumen, particularmente el proceso de la biohidrogenación ruminal (Lawrence y Fowler, 2002). El ácido oleico, del que se conocen numerosos efectos beneficiosos para la salud humana, es mayoritario en todos los depósitos grasos y presenta proporciones en torno a 35 - 40% en la grasa subcutánea y muscular.

Los PUFA alcanzan valores de hasta el 11% en la grasa IM y del 3% en el resto de depósitos adiposos (Banskalieva et al., 2000). Como se observa en la Tabla 1, dentro de los ácidos grasos poliinsaturados de la carne de rumiante, el LA (C18:2 *n*-6) y el ALA (C18:3 *n*-3) son los mayoritarios. Aunque los ácidos grasos de cadena larga EPA (C20:5 *n*-3) y DHA (C22:6 *n*-3) se encuentran en pequeñas cantidades en la carne, destacan por su efecto positivo sobre la salud. La menor incorporación de ácidos grasos de la serie *n*-6 en ovino y vacuno en comparación al porcino produce una ratio *n*-6/*n*-3 menor en rumiantes, aunque este hecho variará enormemente en función de la dieta. Recientemente, Campo (2016) indicaba que ternascos alimentados con concentrado y sacrificados con 80 días de edad presentaron valores de *n*-6/*n*-3 de 8,4 en músculo, mientras que corderos en pastoreo suplementados con concentrado y sacrificados con 5 meses de edad o corderos castrados en pastoreo sacrificados con más de 10 meses de edad mostraron valores de 2,5 y 1,1, respectivamente.

En referencia al ácido graso CLA, la carne de ovino presenta las mayores concentraciones de dicho ácido graso con valores entre 4,3 - 19,0 mg/g de lípidos, mientras que la carne de vacuno contiene entre 1,2 - 10,0 mg/g de CLA (Schmid et al., 2006).

Tabla 1. Composición de ácidos grasos del músculo *longissimus dorsi* y del tejido adiposo de cordero, ternera y cerdo (% ácidos grasos totales).

Ácido graso	Músculo			Tejido adiposo		
	Cordero	Ternera	Cerdo	Cordero	Ternera	Cerdo
C14:0	3,30 ^c	2,66 ^b	1,33 ^a	4,11 ^b	3,72 ^b	1,57 ^b
C16:0	22,2 ^a	25,0 ^c	23,2 ^b	21,9 ^a	26,1 ^c	23,9 ^b
C16:1 <i>l9</i>	2,20 ^a	4,54 ^c	2,71 ^b	2,40 ^a	6,22 ^b	2,42 ^a
C18:0	18,1 ^c	13,4 ^b	12,2 ^a	22,6 ^b	12,2 ^a	12,8 ^a
C18:1 <i>l9</i> (oleico)	32,5 ^a	36,1 ^b	32,8 ^a	28,7 ^a	35,3 ^b	35,8 ^b
C18:1 <i>l11</i> (VA)	1,45 ^a	2,33 ^b	3,99 ^c	0,98 ^a	1,60 ^b	3,31 ^c
C18:2 <i>n-6</i> (LA)	2,70 ^a	2,42 ^a	14,2 ^b	1,31 ^a	1,10 ^a	14,3 ^b
C18:3 <i>n-3</i> (ALA)	1,37 ^c	0,70 ^a	0,95 ^b	0,97 ^b	0,48 ^a	1,43 ^c
C20:3 <i>n-6</i>	0,05 ^a	0,21 ^b	0,34 ^c	ND	ND	0,08
C20:4 <i>n-6</i>	0,64 ^a	0,63 ^a	2,21 ^b	ND ¹	ND	0,18
C20:5 <i>n-3</i>	0,45 ^c	0,28 ^a	0,31 ^b	ND	ND	ND
C22:4 <i>n-6</i>	ND	0,04 ^a	0,23 ^b	ND	ND	0,06
C22:5 <i>n-3</i> (EPA)	0,52 ^b	0,45 ^a	0,62 ^c	ND	ND	0,22
C22:6 <i>n-3</i> (DHA)	0,15 ^b	0,05 ^a	0,39 ^c	ND	ND	0,16
PUFA/SFA	0,15	0,11	0,58	0,09	0,05	0,61
<i>n-6/n-3</i>	1,32	2,11	7,22	1,37	2,30	7,64

VA: ácido *trans*-vaccénico; LA: ácido linoleico, ALA: ácido α -linolénico, EPA: ácido eicosapentaenoico, DHA: ácido docosahexaenoico, PUFA: ácido graso poliinsaturado, SFA: ácido graso saturado.

^{a, b, c} Medias con diferente superíndice difieren significativamente ($P < 0,05$).

¹ ND: no detectado.

Fuente: Adaptado de Enser et al. (1996).

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

En las últimas décadas, nuestra dieta ha sufrido cambios significativos en cuanto a la cantidad y tipo de ácidos grasos ingeridos. Las sociedades industrializadas, en la actualidad, se caracterizan por un incremento en la ingestión de ácidos grasos saturados, PUFA *n-6* y

ácidos grasos *trans*, así como un descenso en PUFA de la serie *n-3* (Patterson et al., 2012). En este sentido, los lípidos representan entre un 28% y un 42% del total de la energía consumida por la población europea, cuando en la alimentación ancestral estos porcentajes oscilaban entre 20 - 30%. Este cambio en los hábitos dietéticos hace que la relación *n-6/n-3* sea de 10:1, llegando hasta 20:1 en algunos casos, cuando se recomienda que sea de 1:1 - 4:1 (Molendi-Coste et al., 2011). Los cambios ocurridos en los últimos 100 años son potentes promotores de las enfermedades crónicas de mayor prevalencia en la actualidad como las enfermedades cardiovasculares, la diabetes mellitus, la obesidad, las enfermedades inflamatorias y determinados tipos de cánceres (Simopoulos, 2008, 1999).

El fundamento del interés actual por los ácidos grasos *n-3* de cadena larga (EPA y DHA) estriba en el descubrimiento de una menor mortalidad por enfermedades cardiovasculares en poblaciones que consumen cantidades significativas de EPA y DHA (Simopoulos, 2008). A principios de los 70 se pudo comprobar que la incidencia de mortalidad por infarto de miocardio en los esquimales de Groenlandia, que consumían una dieta rica en grasas del tipo *n-3* y baja en carbohidratos, era significativamente menor (10 - 30%) en comparación con los daneses (dieta rica en grasas saturadas y ácidos grasos *n-6*), a pesar de que las concentraciones de colesterol en sangre no eran tan dispares entre ambas poblaciones. Desde entonces, se han publicado muchos trabajos científicos sobre los efectos que pueden ejercer los omega-3 en la enfermedad cardiovascular (Anderson y Ma, 2009; Jump, 2002; Lee et al., 2009; Simopoulos, 2008). Jakobsen et al. (2009) mostraban el análisis conjunto de 11 estudios de cohorte y el principal hallazgo fue que hay un riesgo menor de accidentes cardiovasculares y mortalidad por enfermedad coronaria cuando se sustituyen los SFA por PUFA. El estudio indicaba que por cada 5% de sustitución de SFA por PUFA, el riesgo de sufrir enfermedad coronaria se reducía en un 13% (ratio de riesgo = 0,87; intervalo de confianza al 95%: 0,77 - 0,97) y el riesgo para casos de muertes coronarias en un 26% (ratio de riesgo = 0,74; intervalo del confianza al 95%: 0,61 - 0,89).

Los PUFA juegan un papel importante en la composición de las membranas de todas las células, se encargan de mantener la homeostasis para una correcta función de las proteínas de la membrana e influyen en la fluidez de la misma, regulando así los procesos de señalización celular, las funciones celulares y la expresión génica (Patterson et al., 2012). Por otro lado, es destacable la función de los ácidos grasos esenciales durante el embarazo y la lactancia y la función de los LCPUFA *n-3* como componentes estructurales importantes en el desarrollo del cerebro, el sistema nervioso central y la retina (FAO/WHO, 2008).

Otra de las funciones biológicas importantes de los LCPUFA de 20 carbonos de las familias *n*-6 y *n*-3 es la formación de eicosanoides, moléculas que regulan la inflamación y el funcionamiento del sistema inmunitario (Figura 8). El ácido dihomo- γ -linolénico (C20:3 *n*-6), el AA y el EPA son los tres ácidos grasos más importantes que participan en la producción de eicosanoides, siendo los originados a partir del AA y del EPA biológicamente más activos e importantes. Estos ácidos grasos se liberan de los fosfolípidos de la membrana celular por la acción de la fosfolipasa-A2 y posteriormente, mediante la acción de enzimas específicas, son transformados en eicosanoides. En este sentido, los ácidos grasos C20:3 *n*-6, AA y EPA compiten por las mismas enzimas y, por tanto, los niveles relativos de los productos formados dependen de las concentraciones de estos ácidos grasos de la membrana celular (Lord y Bralley, 2008).

Posteriormente, se han identificado un nuevo grupo de eicosanoides formados a partir del EPA denominados resolvinas de serie E (Serhan et al., 2000), además de otro grupo sintetizado a partir del DHA (resolvinas de la serie D y protectinas) los cuales reciben el término genérico de docosanoides (Bazan, 2007). A continuación se muestran los eicosanoides y docosanoides derivados del AA, EPA y DHA.

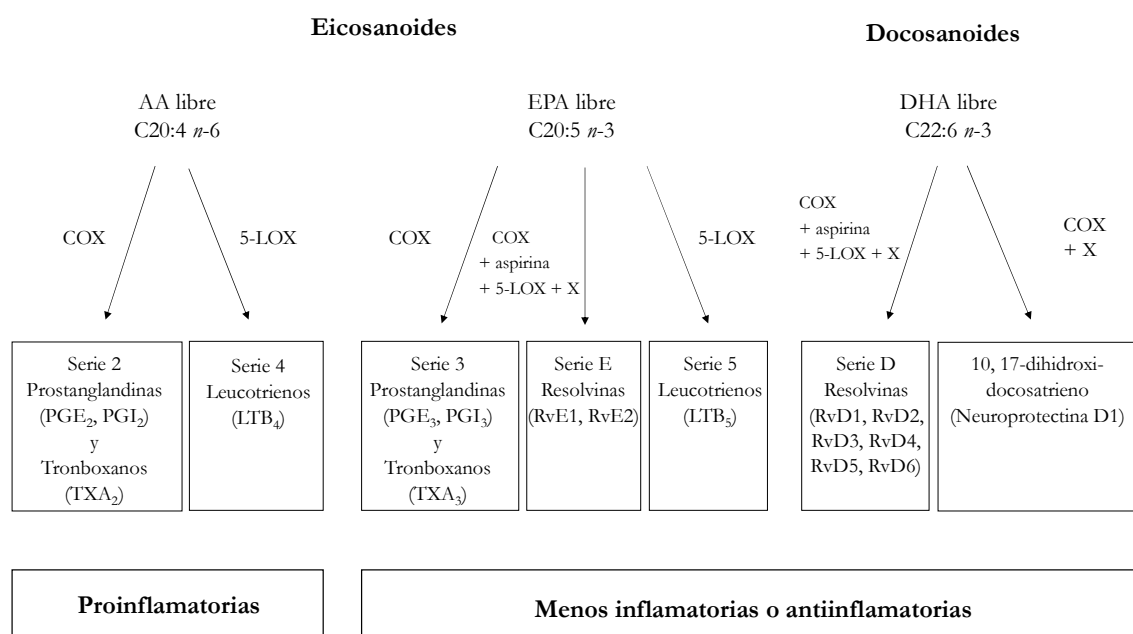


Figura 8. Productos metabólicos proinflamatorios y antiinflamatorios derivados de los eicosanoides y de los docosanoides. Adaptado de Valenzuela et al. (2014).

La bibliografía indica que es posible que el riesgo de enfermedades crónicas pueda reducirse al modular la formación de eicosanoides a través de cambios en la composición de los ácidos grasos de la dieta, considerando que los eicosanoides y docosanoides

derivados del EPA y DHA tienen efectos antiinflamatorios mientras que los derivados del AA presentan en general efectos proinflamatorios. Así, el aumento de los PUFA *n*-3, especialmente el EPA y el DHA, reduciría los niveles de AA en los lípidos de los tejidos y, en consecuencia, disminuiría la formación de los eicosanoides proagregantes e inflamatorios derivados del AA (Carrero et al., 2005; FAO/WHO, 2008).

Otro papel biológico importante de los PUFA *n*-3 y *n*-6 es la regulación de las enzimas implicadas en el metabolismo lipídico. Los PUFA activan la expresión de los genes implicados en el transporte y oxidación de ácidos grasos y reducen la expresión de genes que regulan la síntesis *de novo* de los ácidos grasos (Jump, 2009, 2002; Sampath y Ntambi, 2005). De esta manera, los PUFA promueven un cambio en el metabolismo hacia la oxidación de los ácidos grasos y no hacia su síntesis y almacenamiento. El resultado de esta doble acción es un balance negativo de grasas, de ahí que los PUFA sean buenos candidatos para el tratamiento dietético de la hiperlipidemia.

Así como los LCPUFA, el CLA es otro de los ácidos grasos que ha mostrado potenciales beneficios para la salud. Numerosos trabajos científicos indican que este ácido graso podría tener propiedades antiadipogénicas, anticarcinógenas, antidiabetogénicas y antiaterogénicas, entre otras (Belury, 2002; Koba y Yanagita, 2014; Pariza, 2004). Una de sus propiedades que despierta interés desde el punto de vista de la alimentación humana es el efecto reductor de la grasa corporal en animales. Parece que este efecto del CLA es resultado de múltiples mecanismos: el aumento del gasto energético, la reducción de la acumulación de los lípidos en el tejido adiposo y/o la diferenciación de los adipocitos, una apoptosis más intensa de los adipocitos, la modulación de adipoquinas y citoquinas, como la leptina, TNF- α , la adiponectina y las interleuquinas, y el aumento de la β -oxidación de los ácidos grasos en el músculo esquelético (Belury, 2002).

Por último, respecto a las recomendaciones nutricionales sobre el consumo de ácidos grasos, el informe realizado por la FAO/WHO en 2008 junto con los documentos presentados por diferentes Organizaciones, como la Asociación Americana del Corazón o la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria, indican que es recomendable sustituir los SFA por PUFA en la dieta, así, mientras el consumo total de SFA no debe superar el 10% de energía, el consumo recomendable de PUFA se encuentra entre el 6 y 11% de energía (Aranceta y Pérez-Rodrigo, 2012; FAO/WHO, 2008). Por ello, la ratio PUFA/SFA debe ser mayor que 0,4. Conforme a lo indicado por la FAO/WHO en el 2008, la ingesta mínima de LA y ALA para prevenir síntomas de deficiencia es de un 2,5% y un 0,5% de la energía, aunque los valores recomendados son de 2,5% - 9% y 0,5 - 2%, respectivamente.

Los valores indicados de EPA y DHA para una dieta saludable son de 0,250 g/día de EPA y 2,0 g/día de DHA.

En referencia a la ratio $n-6/n-3$, desde hace dos décadas numerosos trabajos han recomendado su reducción hasta un valor de 4:1 (British Department of Health, 1994; Gómez Candela et al., 2011; Simopoulos, 2008), aunque según lo indicado por la FAO/WHO (2008) y otros autores (Stanley et al., 2007), no es necesario establecer un valor para esta ratio si la ingesta de ácidos grasos $n-6$ y $n-3$ es la recomendada.

Por otro lado, las recomendaciones para la ingesta de ácidos grasos *trans* aconsejan limitar su consumo por debajo del 1% de la energía (Aranceta y Pérez-Rodrigo, 2012). Respecto al CLA, no hay un acuerdo sobre la dosis recomendada de este ácido graso aunque la evidencias sugieren que una dosis de 3 g/día sería la más deseable (Mirzaei et al., 2016; Schmid et al., 2006).

2.3. Tejido adiposo

2.3.1. Características generales

El tejido adiposo es un tejido conectivo especializado de origen mesenquimal conformado por la asociación de células denominadas adipocitos, las cuales son células especializadas en la acumulación de lípidos. El tejido adiposo juega un papel fundamental en el mantenimiento del balance energético de los animales, que implica el almacenamiento de energía en forma de grasa (triglicéridos) en periodos de alta ingesta energética y su liberación de energía a través de la lipólisis en periodos de restricción calórica. Sin embargo, hace ya más de dos décadas algunos descubrimientos pusieron de manifiesto que, además, es un tejido endocrino muy activo que secreta importantes moléculas, como por ejemplo las citoquinas (leptina, adiponectina, $TNF\alpha$, etc.), que le permiten la comunicación con diferentes órganos, demostrándose su implicación en procesos biológicos como la función neuroendocrina y la función inmune (Kershaw y Flier, 2004).

Se distinguen dos grandes tipos de tejido adiposo, el tejido adiposo blanco y el tejido adiposo pardo o marrón, formados principalmente por adipocitos blancos y marrones, respectivamente. Estos tejidos no presentan diferencias únicas y exclusivamente en cuanto a coloración, sino también en cuanto a morfología, distribución, genes y función (Bonnet et al., 2010). Recientemente, se ha descrito la existencia de un tercer tipo de adipocitos llamados “beige/brite”, en ratones y humanos (Harms y Seale, 2013) así como en ganado bovino (Asano et al., 2013) y ovino (Pope et al., 2014), que se desarrollan en el tejido adiposo blanco como respuesta a hormonas y al frío.

El tejido adiposo marrón posee adipocitos pequeños (25 - 40 μm de diámetro) y multiloculares, esto es, presencia de varias gotas lipídicas, rodeadas de un gran número de mitocondrias y su principal función es la termogénesis o la producción de calor y la homeostasis térmica (Rosen y Spiegelman, 2006). Este tipo de tejido adiposo es característico de animales recién nacidos de la mayoría de las especies, y en adultos de los mamíferos hibernantes (Rosen y MacDougald, 2006).

El tejido adiposo blanco es la forma predominante en animales adultos y es el principal objeto de las consideraciones apuntadas en la presente revisión bibliográfica. El tejido adiposo blanco está compuesto principalmente por adipocitos y por una fracción estromovascular que comprende macrófagos, células endoteliales de los capilares, preadipocitos no diferenciados, células madre pluripotentes y fibroblastos. Este estroma es responsable de la homeostasis del tejido (Trujillo y Scherer, 2006). Los adipocitos que conforman el tejido adiposo blanco son en general grandes (en rumiantes pueden alcanzar un diámetro de hasta 120 μm y volumen de 1 - 3 nl), el citoplasma está ocupado casi en su totalidad por una única vesícula de grasa y tienen pocas mitocondrias (Lawrence y Fowler, 2002). Este subtipo de tejido graso también presenta un papel estructural, actuando de soporte mecánico y protección de determinadas partes del organismo, además de presentar una función endocrina (Kershaw y Flier, 2004; Louveau et al., 2016; Vigouroux et al., 2011).

El tejido adiposo se localiza en depósitos específicos similares en todos los mamíferos, aunque la proporción y composición de ellos varía en función de la especie, la edad, el sexo, el régimen alimenticio, etc. (Kempster, 1981). Los depósitos principales son el visceral, que comprende la grasa pélvico-renal (recubre los riñones y cavidad pélvica), mesentérica (se localiza alrededor del intestino) y omental (recubre los preestómagos), el SC (recubre la parte externa de la canal), el intermuscular (se localiza entre los músculos), y el IM (infiltrada en los músculos) (Robelin, 1986). Por ejemplo, en corderos de raza Churra Tensina de 23 Kg de peso vivo alimentados con concentrado, Joy et al. (2008) observaron que el depósito omental suponía un 10%, un 8,13% el pélvico-renal, un 8,01% el depósito mesentérico y un 25,3% el SC mientras que el intermuscular comprendía un 42,6%. Por tanto, la importancia cuantitativa del depósito IM frente a otros depósitos es pequeña.

2.3.2. Importancia del tejido adiposo en la producción animal

El tejido graso presenta importancia puesto que las proporciones y composición de cada depósito afectan a la eficiencia productiva, el valor nutricional y la calidad de la carne y

canal. Así por ejemplo, los principales sistemas de clasificación de canales se basan en estimaciones del estado de engrasamiento o adiposidad (Reglamento CEE N° 1278, 1994).

La grasa en la carne está presente en forma de grasa intermuscular, fosfolípidos de las membranas, grasa IM y SC (Scollan et al., 2006). Desde el punto de vista productivo, no todos los depósitos presentan la misma importancia, de forma que la deposición de la grasa IM o veteadado es deseable ya que, como se ha dicho anteriormente, tiene un papel determinante en la calidad de la carne por los beneficios sobre las propiedades sensoriales de la misma. Sin embargo, un exceso de grasa acumulada en algunos de los depósitos tiene un efecto negativo, debido a que conlleva un aumento de los costes de producción y una depreciación del producto (Eguinoa et al., 2003). Por un lado, la grasa visceral, es en su mayor parte desechada durante el sacrificio de los animales y, por otro lado, un exceso de grasa subcutánea reduce el valor comercial de la canal. Asimismo, esta última también preocupa a los consumidores debido a que un exceso de grasa subcutánea y un alto contenido en SFA se consideran perjudiciales para la salud humana (Hocquette et al., 2010; Louveau et al., 2016).

Por lo tanto, la tendencia actual es producir carnes magras, pero con un óptimo engrasamiento, particularmente con la presencia de una adecuada cantidad de grasa IM. Además, se requiere un mínimo de grasa de cobertura o subcutánea, necesaria para minimizar las pérdidas de humedad de la canal y protegerla de la desecación y de las posibles contaminaciones bacterianas (Delfa y Teixeira, 1998).

La composición de la grasa IM es de especial relevancia por su repercusión en las cualidades de la carne desde el punto de vista de la salud humana. Dicha grasa está formada principalmente por fosfolípidos, los cuales presentan un alto contenido en PUFA, y por triglicéridos, formados mayoritariamente por SFA y MUFA. Dada su función como componente estructural de las células, el contenido de fosfolípidos en el músculo es relativamente constante y no está directamente relacionado con el engrasamiento. Además, no se encuentra muy influenciado por la especie, raza, nutrición y edad, aunque la proporción PUFA $n-6/n-3$ puede mostrar cierta variación en función del tipo de alimentación (Enser et al., 1998). A diferencia de los fosfolípidos, los triglicéridos del tejido IM pueden variar notablemente, entre un 0,2% y un 5%, y dependen del nivel de grasa acumulada, localización del músculo y raza (Raes et al., 2004). En el tejido adiposo SC, la mayor parte de los lípidos son triglicéridos (aproximadamente el 90%) y el contenido en PUFA, especialmente en EPA y DHA, es reducido debido a que los fosfolípidos

representan una pequeña proporción (Ashes et al., 1992; Duckett et al., 1993; Howes et al., 2015).

Como se ha mencionado, los PUFA se depositan selectivamente en los fosfolípidos asociados a las membranas de las células constituyentes del músculo, lo que puede dar la oportunidad de modificar el contenido de PUFA en el músculo en un sentido favorable para la salud humana, sin que se produzca un aumento en el contenido de grasa IM (Scollan et al., 2006; Shingfield et al., 2013).

2.3.3. Desarrollo del tejido adiposo

El tejido adiposo presenta una elevada plasticidad y su desarrollo se produce por la combinación de dos mecanismos: la hiperplasia, o aumento en el número de células, y la hipertrofia, es decir, el incremento del volumen celular. La hiperplasia ocurre por la proliferación de los preadipocitos y su posterior diferenciación y se da principalmente en el feto y periodo post-natal de los animales. Durante este periodo también tiene lugar el proceso de la hipertrofia, de manera que los adipocitos formados aumentan su volumen mediante la acumulación de lípidos en forma de triglicéridos, los cuales se forman como resultado de la esterificación de glicerol-3-fosfato, sintetizado a partir de glucosa, y ácidos grasos (provenientes de la alimentación o sintetizados *de novo*) (Bonnet et al., 2010; Lawrence y Fowler, 2002; Mendizabal et al., 2004; Vernon et al., 2001).

Tras el nacimiento y el periodo post-natal, el incremento de tejido adiposo es consecuencia predominantemente de la hipertrofia de los adipocitos existentes y de la actividad de las enzimas lipogénicas. Sin embargo, el tamaño del tejido adiposo no está necesariamente limitado por la hiperplasia en la edad temprana del animal, ya que, cuando un porcentaje de adipocitos alcanzan su tamaño límite, éstos pueden estimular la adipogénesis causando un aumento de la hiperplasia y/o promover que los preadipocitos quiescentes comiencen a acumular lípidos (Dodson et al., 2010; Lawrence y Fowler, 2002; Mersmann y Smith, 2005).

Tanto la hiperplasia como la hipertrofia pueden estar influenciadas por varios factores como el sexo, la raza, la edad, la condición fisiológica, el tipo y nivel de alimentación, la localización anatómica de los depósitos adiposos, etc. (Mendizabal et al., 1997). En general, la deposición de la grasa incrementa en relación al peso y edad del animal, aunque no existe una homogeneidad cuantitativa ni cronológica en el desarrollo de los diferentes depósitos grasos (Arana et al., 2006). En líneas generales, el depósito que más precozmente se desarrolla es el pélvico-renal, a continuación se desarrollan el intermuscular y el SC y

finalmente el IM (Lawrence y Fowler, 2002; Louveau et al., 2016). En ovino, en el depósito pélvico-renal la hiperplasia se ve completada para aproximadamente los 60 días desde el nacimiento y a continuación su desarrollo es atribuido a la hipertrofia. En el depósito intermuscular, ambos procesos contribuyen al desarrollo del depósito, aunque la hiperplasia se manifiesta hasta alrededor de los 100 días post-concepción. En cambio, en el depósito SC la hiperplasia, junto con la hipertrofia, puede contribuir a su crecimiento hasta que los corderos alcanzan los 12 meses de edad (Lawrence y Fowler, 2002; Mendizabal et al., 2004).

La grasa IM es un depósito de desarrollo tardío y parece que la deposición de grasa en este depósito es más dependiente de la hiperplasia (Baik et al., 2014; Hocquette et al., 2010; Yang et al., 2006). La grasa se acumula a un ritmo mayor que el músculo a edades más avanzadas (a diferencia de lo que ocurre a edades tempranas) y por lo tanto, la grasa acumulada dentro del músculo se depositará inevitablemente más tarde (Hocquette et al., 2010). En los animales jóvenes, los lípidos intramusculares están formados principalmente por fosfolípidos asociados a las membranas celulares presentes en el tejido muscular. Los fosfolípidos son un componente esencial de las membranas celulares y su contenido se mantiene prácticamente constante o aumenta muy poco a medida que incrementa el engrasamiento (Wood et al., 2008).

Como se ha indicado, los depósitos adiposos no se desarrollan al mismo tiempo y ritmo y consecuentemente, el tamaño de los adipocitos varía entre depósitos (Eguinoa et al., 2003). En general, el tamaño medio de los adipocitos en ganado ovino (Arana et al., 2008; Baik et al., 2014; Soret et al., 1998) y vacuno (Allen, 1976; Hood y Allen, 1973; Mendizabal et al., 1999; Schiavetta et al., 1990) presenta la siguiente jerarquía: omental > pélvico-renal > SC > intermuscular > IM. Además, existe una actividad lipogénica diferencial entre los diferentes depósitos grasos, lo cual parece estar en relación con el tamaño de los adipocitos y generalmente sigue una jerarquía similar (Eguinoa et al., 2003).

El tejido adiposo IM representa un depósito único puesto que se puede distinguir de otros depósitos de grasa por su ubicación dentro del tejido conectivo perimisial junto a las miofibrillas, además su metabolismo muestra algunas diferencias con otros depósitos. Los adipocitos intramusculares muestran tasas de síntesis de ácidos grasos que representan entre un 5% a un 10% de las observadas en el depósito SC, de manera que el depósito IM posee una baja capacidad de síntesis de ácidos grasos así como de degradación de los mismos (Hausman et al., 2009). Gondret et al. (2008) observaron mediante el análisis proteómico que varios indicadores de la lipogénesis, lipólisis, oxidación de ácidos grasos y el metabolismo energético basal fueron menores en el tejido IM en comparación al SC.

Asimismo, mientras los adipocitos intramusculares utilizan preferiblemente glucosa y/o lactato como fuente de carbono para la lipogénesis, los adipocitos del tejido SC emplean el acetato (Smith et al., 2009).

Por tanto, como indicaron Hausman et al. (2009) hay evidencias que muestran que los tejidos IM y SC son metabólicamente distintos y estas diferencias se manifiestan a nivel celular (preadipocitos y adipocitos), de manera que, por ejemplo, el potencial de proliferación y diferenciación de los preadipocitos intramusculares es menor en comparación a los preadipocitos subcutáneos en bovino (Grant et al., 2015; Wan et al., 2009).

2.3.4. Adipogénesis

La adipogénesis es el proceso de diferenciación mediante el cual las células mesenquimales precursoras multipotenciales dan origen a células adiposas maduras (Hausman et al., 2001; Kokta et al., 2004). Las células madre mesenquimales se definen como células de tipo fibroblastoide y origen mesodérmico y tienen capacidad precursora, no solo del tejido adiposo, sino también del músculo, hueso, cartílago y tendón (Chen et al., 2008).

En el proceso de diferenciación del tejido adiposo se distinguen dos fases: la determinación y la diferenciación terminal. La primera abarca los mecanismos por los cuales la célula madre pluripotente adquiere las características del linaje de los adipocitos e implica la transformación de la célula madre a preadipocito, que morfológicamente aún será igual a su precursora. Este hecho conlleva la pérdida de la capacidad de la célula para convertirse en otros tipos celulares. En la segunda fase, los preadipocitos adquieren la dotación proteica necesaria para el transporte y síntesis de lípidos, la sensibilidad a la insulina y la capacidad de secretar adipoquinas, convirtiéndose en adipocitos maduros (Lefterova y Lazar, 2009; Rosen y MacDougald, 2006).

El proceso de adipogénesis sigue una secuencia de eventos altamente ordenados y caracterizados (Figura 9). En primer lugar se produce una parada de la proliferación celular, saliendo los preadipocitos del ciclo celular que conduce a la división de los mismos (Gregoire et al., 1998). Los inductores de la adipogénesis promueven a los preadipocitos a llevar a cabo una o dos rondas de división celular (expansión clonal) antes de iniciarse los procesos de activación transcripcional de genes marcadores y la adquisición del fenotipo de adipocito (Otto y Lane, 2005).

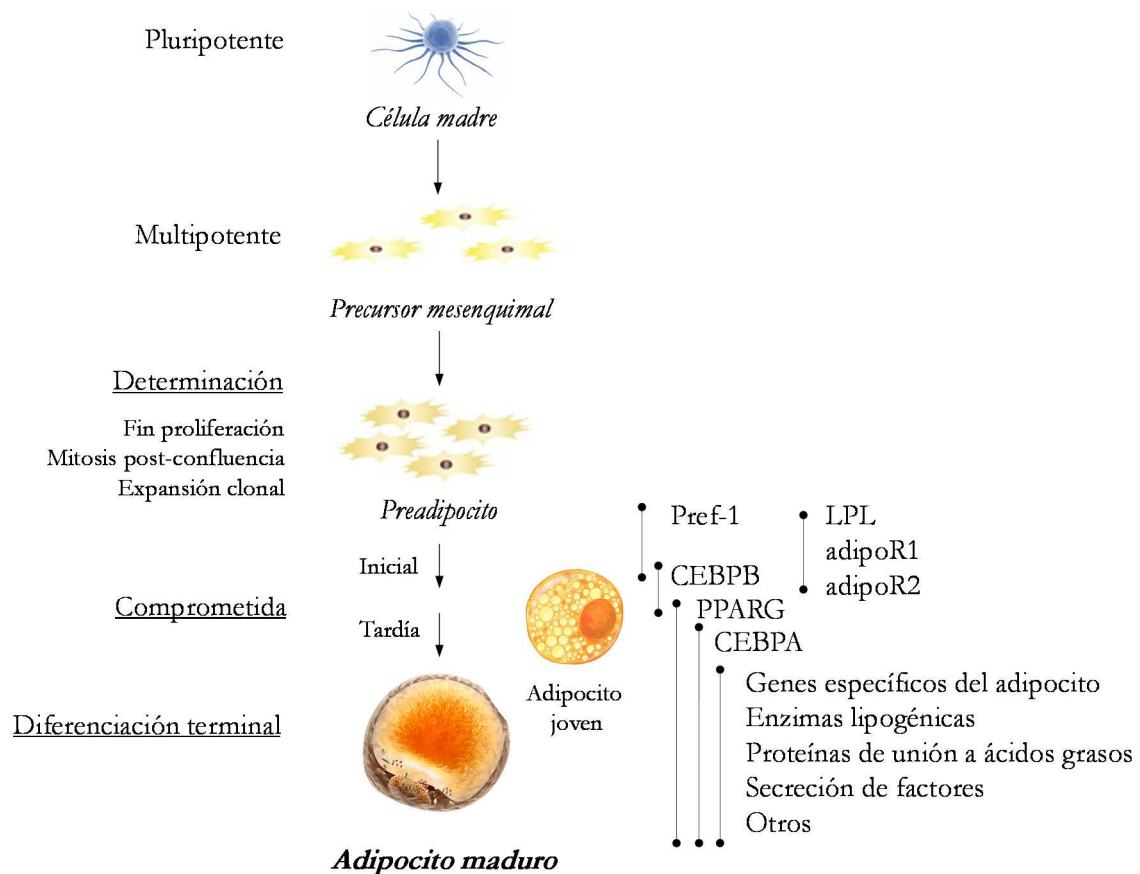


Figura 9. Diagrama del proceso de diferenciación del adipocito. Adaptado de Gregoire et al. (1998).

Los procesos que tienen lugar en este punto, considerados como una cascada de eventos genéticos, se dan en dos fases (Figura 10). Durante la primera fase tiene lugar la inducción de dos factores de transcripción de la familia *CEBPs*: el *CEBPB* (*Beta*) y el *CEBPD* (*Delta*). Estos factores de transcripción a su vez inducen la segunda fase de la diferenciación puesto que activan la expresión del *PPARG* uniéndose directamente a su promotor (Wu et al., 1996, 1995). Por su parte, el *PPARG* estimula la expresión de genes involucrados en la lipogénesis y adipogénesis como la *proteína de unión a ácidos grasos* (*FABP4*)/la *proteína de adipocito 2* (*aP2*), *lipoprotein lipasa* (*LPL*) o el *transportador de glucosa tipo 4* (*GLUT4*). Esta activación de *PPARG* produce, adicionalmente, la activación de *CEBPA* y éste, a su vez, es capaz de unirse a un receptor en el promotor del *PPARG* generando así un bucle estable de retroactivación (MacDougald y Mandrup, 2002). Igualmente, ambos factores de transcripción son capaces de autoinducirse. El *PPARG* juega un papel crucial en el proceso de diferenciación y es necesario para el mantenimiento del estado diferenciado del adipocito (Nakamura et al., 2014). El *PPARG* es suficiente para inducir la expresión de diversos genes relacionados con el metabolismo lipídico, aunque el *CEBPA* es indispensable para conferir al adipocito sensibilidad a la insulina (Wu et al., 1999). La

importancia del *CEBPA* para la activación de otros genes ha sido constatada por la identificación de lugares de unión para este factor de transcripción en los promotores de varios genes, tales como *FABP4*, *GLUT4* o receptor de la insulina entre otros. Lefterova et al. (2008) observaron que el 60% de los genes cuya expresión se promueve en el proceso de la diferenciación se unían a ambos factores.

Es en la primera fase cuando comienzan a actuar algunos de los marcadores tempranos de la diferenciación como la *LPL* y la célula adopta una morfología esférica más acorde con el fenotipo de los adipocitos maduros. A lo largo del proceso de diferenciación se van formando en el citoplasma gotas lipídicas pequeñas que irán aumentando de volumen para después fusionarse hasta formar una o dos grandes gotas lipídicas que ocupan gran parte del citoplasma celular.

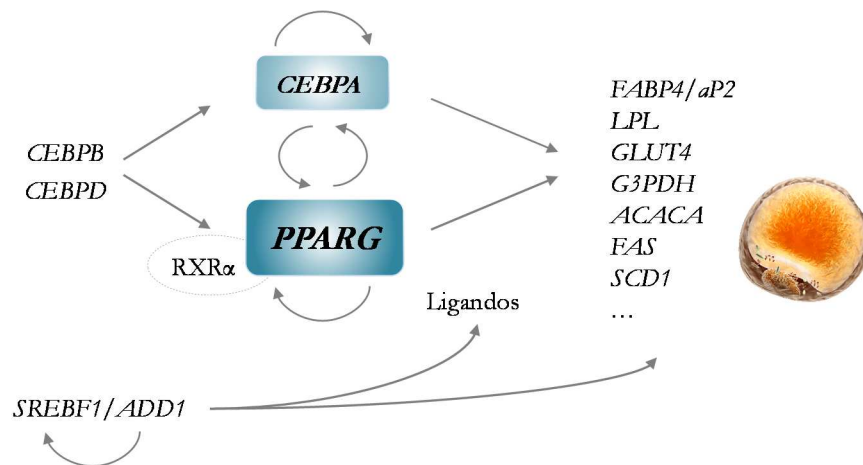


Figura 10. Principales factores de transcripción implicados en la cascada de eventos moleculares que desencadenan el inicio de la adipogénesis. Adaptado de MacDougald y Mandrup (2002).

Como se ha mencionado previamente, otro de los factores de transcripción involucrados en la adipogénesis es el *factor 1 de unión a elementos reguladores del estero* (*SREBF1*) o *factor 1 de diferenciación y determinación del adipocito* (*ADD1*), el cual se induce en las etapas tempranas de la diferenciación y está implicado en la síntesis de ácidos grasos y triglicéridos y en el control de la homeostasis del colesterol (Gregoire et al., 1998).

Finalmente, en la diferenciación terminal, en los adipocitos se mantiene la expresión de *PPARG* y *CEBPA* y se activa la del conjunto de genes que intervienen en el programa adipogénico celular, que incluye la *ATP-citrato liasa*, la *SCD*, la *gliceroldehído-3P-aciltransferasa*, la *gliceroldehído 3-fosfato deshidrogenasa* (*G3PDH*) y *sintasa de ácidos grasos* (*FASN*), entre otros (Gregoire et al., 1998). Esto va acompañado de la acumulación de grasa en el interior celular y un cambio de morfología hacia una conformación más globular (Lefterova et al., 2008).

Diversos son los factores extracelulares capaces de activar o inhibir las vías de señalización que regulan los factores de transcripción anteriormente citados. Por lo tanto, estos factores determinarán que los preadipocitos inicien el proceso de diferenciación o se mantengan quiescentes. Entre los factores activadores se encuentra la insulina, glucocorticoides, ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados (parece que inducen al *PPARG*) y las prostaglandinas. Por otro lado, los inhibidores de la adipogénesis incluyen el ácido retinoico, *pref-1* (*factor de preadipocito-1*) o las glicoproteínas de la familia *Wnt* (Gregoire et al., 1998).

2.3.5. Principales factores de transcripción reguladores de la adipogénesis y del metabolismo lipídico

PPARs

La familia de los *PPARs* está constituida por *PPARA*, *PPARD* y ***PPARG*** y pertenecen a una superfamilia de receptores de esteroides nucleares. Estos factores de transcripción están implicados en la regulación del metabolismo lipídico y la homeostasis, pero también modulan la proliferación y la diferenciación celular, entre otras funciones (Kersten et al., 2000).

El *PPARA* modula la expresión de los genes que codifican enzimas mitocondriales del catabolismo de ácidos grasos y β -oxidación mitocondrial y peroxisomal (Aoyama et al., 1998). Regula también la expresión de genes de la síntesis y transporte de colesterol (Schoonjans et al., 1996), además de estar involucrado en el metabolismo de las lipoproteínas (Tyagi et al., 2011).

El *PPARD* incrementa el catabolismo de los lípidos y desacoplamiento de la energía en el tejido adiposo y músculo y suprime la inflamación causada por los macrófagos (Barish et al., 2006; Tyagi et al., 2011).

En la Figura 11 se representa el mecanismo de acción de los *PPARG*, uno de los factores estudiados en la presente tesis. En primer lugar, mediante la unión del ligando el *PPARG* se activa para, posteriormente, unirse con el receptor del *9-cis retinoico* (*RXR*) y formar un heterodímero. Este complejo heterodimérico es el factor de transcripción funcional que se une a los elementos de unión *PPRE* presentes en los promotores de los genes diana. Además, se han identificado una gran variedad de proteínas, denominadas co-activadores o co-represores, que se asocian a los receptores nucleares y pueden actuar sobre el proceso de la transcripción (Houseknecht et al., 2002).

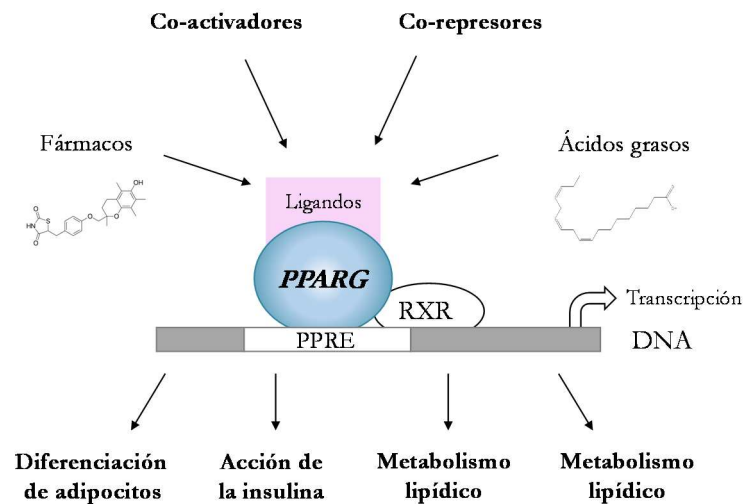


Figura 11. Representación esquemática de la activación del *receptor gamma activado por proliferador de peroxisomas (PPARG)*. Adaptado de Houseknecht et al. (2002).

El *PPARG* está involucrado en la diferenciación de las células adiposas, acumulación de triglicéridos y en la sensibilidad a la insulina y metabolismo de la glucosa. El gen que codifica para *PPARG* en la especie humana se localiza en el cromosoma 3 y contiene 9 exones (Fajas et al., 1997). La secuencia de nucleótidos ha sido bien conservada entre el humano, ratón, cerdo y bovino (96 - 98% de igualdad).

El *PPARG* presenta dos isoformas: el *PPARG1*, que se caracteriza por tener niveles bajos de expresión tanto en el tejido adiposo como en una amplia variedad de tipos celulares, y el *PPARG2* que se expresa primordialmente en el tejido adiposo blanco (Rosen et al., 2000). El *PPARG2* es un regulador crucial de la adipogénesis. Este factor de transcripción regula la expresión de varias proteínas responsables de la acumulación de lípidos (triglicéridos) en los adipocitos, por ejemplo, la *proteína de unión a ácidos grasos (FABP4 o aP2)*, la *acil-CoA sintetasa*, la *LPL* y la *enzima málica (ME)*, *fosfoenolpiruvato carboxikinasa (PEPCK)* o *leptina* (Houseknecht et al., 2002). Por otra parte, modula también la expresión de la *acetil-CoA carboxilasa alfa (ACACA)*, la *FASN*, la *SCD*, la *gliceraldehido 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH)* o *SREBF1*, entre otros (Grauagnard et al., 2009).

El *PPARG2* puede ser activado por ligandos naturales tales como las prostaglandinas o los ácidos grasos (EPA, DHA o AA) y por ligandos sintéticos como los fármacos antidiabéticos llamados tiazolidinedionas (troglitazona, la pioglitazona y la rosiglitazona) (Houseknecht et al., 2002; Xu et al., 1999).

CEBPs

El grupo de factores de transcripción *CEBPs* pertenecen a la familia *bZIP* (*basic leucine zipper*) y está compuesta por seis miembros (α , β , δ , γ , ϵ y ξ). El **CEBPA**, el **CEBPB** y el **CEBPD** se expresan principalmente en el hígado, tejido adiposo, intestino y pulmón (Lekstrom-Himes y Xanthopoulos, 1998) y participan en procesos como la proliferación y diferenciación celular o el control del metabolismo. Asimismo, estos factores de transcripción se encuentran implicados en los procesos inflamatorios (Shi et al., 2010).

La proteína *C/EBP* está constituida por dos dominios de activación, un dominio de unión al DNA y un dominio C-terminal altamente conservado rico en leucinas denominado *leucine zipper* (Lekstrom-Himes y Xanthopoulos, 1998). Forman homo y heterodímeros con miembros de la misma familia o con otros factores de transcripción, ya que la dimerización es un requisito para que puedan unirse específicamente al ADN (Landschulz et al., 1989; Lekstrom-Himes y Xanthopoulos, 1998). Su principal sitio de expresión es el tejido adiposo, donde los miembros **CEBPA**, **CEBPB** y **CEBPD** participan en la regulación de la adipogénesis (Hu et al., 1995).

SREBPs

La familia de factores de transcripción denominada *SREBFs* está implicada en el control de la homeostasis del colesterol y síntesis de ácidos grasos y triglicéridos. A pesar de que la síntesis de colesterol y ácidos grasos presenten mecanismos de regulación diferentes, ambas rutas están sometidas a un control nutricional a nivel transcripcional que está mediado por los factores de transcripción *SREBFs* (Shimano, 2001). Se han descrito tres isoformas dentro de la familia *SREBFs*: el *SREBF1a* y el **SREBF1c**, codificadas por el mismo gen mediante la utilización de promotores alternativos, y el *SREBF2*, el cual proviene de un gen diferente (Horton et al., 2002). El *SREBF1c* activa los genes lipogénicos y, además, es un factor de transcripción involucrado en la adipogénesis. Así, algunos de los genes diana del *SREBF1c* son la *ATP citrate lyase*, la *ACACA*, la *FASN* (Horton et al., 2002), la *SCD*, la *G3PDH* (Horton et al., 2002; Kim et al., 2002), la *FADS1* y la *desaturasa de ácidos grasos 2* (*FADS2*) (Nakamura et al., 2001) o el *PPARG* (Shimano, 2001). En cambio, el *SREBF1a* y *SREBP2* modulan la expresión de los genes relacionados con el metabolismo del colesterol (Shimano, 2001). Por último, el *SREBF1c* y *SREBF2* también activan tres de los genes implicados en la generación de NADPH: la *ME*, *G6PDH* y *6-P-Gluconato* (Horton et al., 2002).

El *SREBF* es otro de los factores de transcripción regulado por los PUFA. La inhibición del *SREBF* causada por los PUFA es dependiente de la longitud de la cadena y

grado de insaturación de los ácidos grasos. De esta manera, por ejemplo, el EPA y el AA son represores más potentes que el LA o el ácido oleico. Sin embargo, el mecanismo de regulación no se conoce con exactitud (Sampath y Ntambi, 2005).

Por otro lado, teniendo en cuenta lo indicado por Worgall et al. (1998), los PUFA provocarían la liberación del colesterol presente en las membranas, incrementando así el colesterol intracelular. El colesterol actuaría como una señal que causa la inhibición de la maduración de *SREBF* y la expresión de los genes dependiente de este factor de transcripción. Además, Horton et al. (2002) sugirieron que la regulación mediada por el LXR (Receptor X del hígado) podría ser uno de los mecanismos por el que los PUFA suprimen la transcripción del *SREBF1c*.

2.4. Metabolismo lipídico en los rumiantes

2.4.1. Metabolismo lipídico en el rumen

Los rumiantes se caracterizan por su capacidad para alimentarse de forraje. La fermentación microbiana en el rumen permite la degradación de los hidratos de carbono estructurales del forraje, como la celulosa, hemicelulosa y pectina, muy poco digestibles para los monogástricos. Como resultado del proceso fermentativo los nutrientes de la dieta son modificados, incluyendo los lípidos y sustratos lipogénicos (Harfoot, 1981).

La población microbiana del rumen está compuesta por bacterias anaerobias (10^{10} /mL de contenido ruminal), protozoos ciliados (10^7 /mL), hongos anaerobios (10^6 /mL) y levaduras (Buccioni et al., 2012). Los principales productos de la fermentación microbiana de los carbohidratos en el rumen son el anhídrido carbónico, metano y ácidos grasos volátiles o de cadena corta ($C_2 - C_5$; acético, propionato y butírico), siendo estos últimos la principal fuente de energía para el animal (Grenet y Besle, 1991). Por otro lado, las proteínas son degradadas en el rumen hasta péptidos y aminoácidos, que son las fuentes de nitrógeno utilizadas por los microorganismos para la síntesis de la proteína microbiana. Una fracción de la proteína de la dieta pasa intacta por el rumen y sufre un proceso de digestión química en el tracto digestivo posterior antes de ser absorbida en el intestino delgado junto con la proteína microbiana (Wallace, 1991).

Los lípidos provenientes de la alimentación son transformados en el rumen a través de dos procesos: la lipólisis y la biohidrogenación. El proceso de la lipólisis es considerado un proceso importante debido a que es un prerrequisito para la posterior biohidrogenación de los PUFA. En este proceso las lipasas, fosfolipasas y galactolipasas microbianas, hidrolizan los enlaces éster de los lípidos complejos (triglicéridos, fosfolípidos y galactolípidos) dando

lugar principalmente a ácidos grasos libres y glicerol, además de los alcoholes aminados derivados de los fosfolípidos y la galactosa de los galactolípidos. Estos últimos junto con el glicerol son metabolizados y convertidos en ácidos grasos volátiles (AGV), que se absorben por difusión simple a través de la pared ruminal o son utilizados por las bacterias para sintetizar los fosfolípidos de las membranas celulares (Garton et al., 1961). En la mayoría de los casos, la hidrólisis de los lípidos de la dieta es muy alta, mostrando valores de 85 - 95% (Bauchart et al., 1990), sin embargo, este proceso puede verse afectado por varios factores. La lipólisis puede ser reducida por la adición de antibióticos (Van Nevel y Demeyer, 1995) o por un descenso en el pH ruminal ($\text{pH} \leq 6,0$) (Van Nevel y Demeyer, 1996). Otros factores que provocan la disminución de la lipólisis son el incremento en la cantidad de grasa incluida en la dieta y el número de dobles enlaces de los ácidos grasos.

Una vez que los lípidos son hidrolizados, parte de los ácidos grasos poliinsaturados resultantes (70 - 90%) sufren el proceso de la biohidrogenación microbiana, de manera que estos PUFA son transformados a ácidos grasos saturados. En primer lugar, ocurre una isomerización, mediante la cual se forman productos intermediarios *trans*, seguida de la hidrogenación de los dobles enlaces, de modo que el metabolismo de los PUFA en el rumen tiene como consecuencia la formación de ácido esteárico (C18:0), siendo el ácido graso mayoritario que llega al duodeno (Jenkins et al., 2008).

El metabolismo del ácido linoleico (C18:2 *n*-7) en el rumen consiste en una primera isomerización del enlace *cis*-12 a *trans*-11 que resulta en la formación de varios isómeros del CLA (C18:2 *n*-7; C18:2 *n*-6; C18:2 *n*-5; etc.), de los cuales el ácido ruménico (C18:2 *n*-7) es el mayoritario (Figura 12). Posteriormente, el enlace *cis*-9 es hidrogenado para formar VA (C18:1 *n*-7) y tras ello, mediante una segunda hidrogenación, se forma el ácido esteárico (C18:0).

La biohidrogenación del α -linolénico (C18:3 *n*-3) comienza también con la isomerización del enlace *cis*-12 a *trans*-11 siendo el C18:3 *n*-3 el producto más abundante, aunque también se forman otros productos intermedios como el C18:3 *n*-4 o C18:3 *n*-5. Sin embargo, en este proceso no tiene lugar la formación de ácido ruménico. En una segunda fase, se hidrogenan los enlaces *cis*-9 y *cis*-15 mediante dos pasos consecutivos formando el VA, y por último, este se hidrogena a ácido esteárico (Jenkins et al., 2008).

En 1999, Griinari y Bauman propusieron la hipótesis de que cuando el animal rumiante es alimentado con concentrados ricos en almidón y dietas con un bajo contenido en fibra, se produce un cambio en la población microbiana y se alteran los patrones de

fermentación ruminal. Como consecuencia, el LA y el ALA son metabolizados a través de una ruta alternativa, de forma que el LA es transformado a C18:2 n 12 mediante una isomerización y posteriormente reducido a C18:1 n 10, mientras que el ALA parece que se transforma a C18:3 n 12 n 15 y C18:3 n 10 n 15, consecutivamente, y por último en C18:1 n 10 (Figura 12). Esta teoría fue corroborada posteriormente en varios estudios (Bessa et al., 2007; Loor et al., 2005; Piperova et al., 2000; Shingfield et al., 2010).

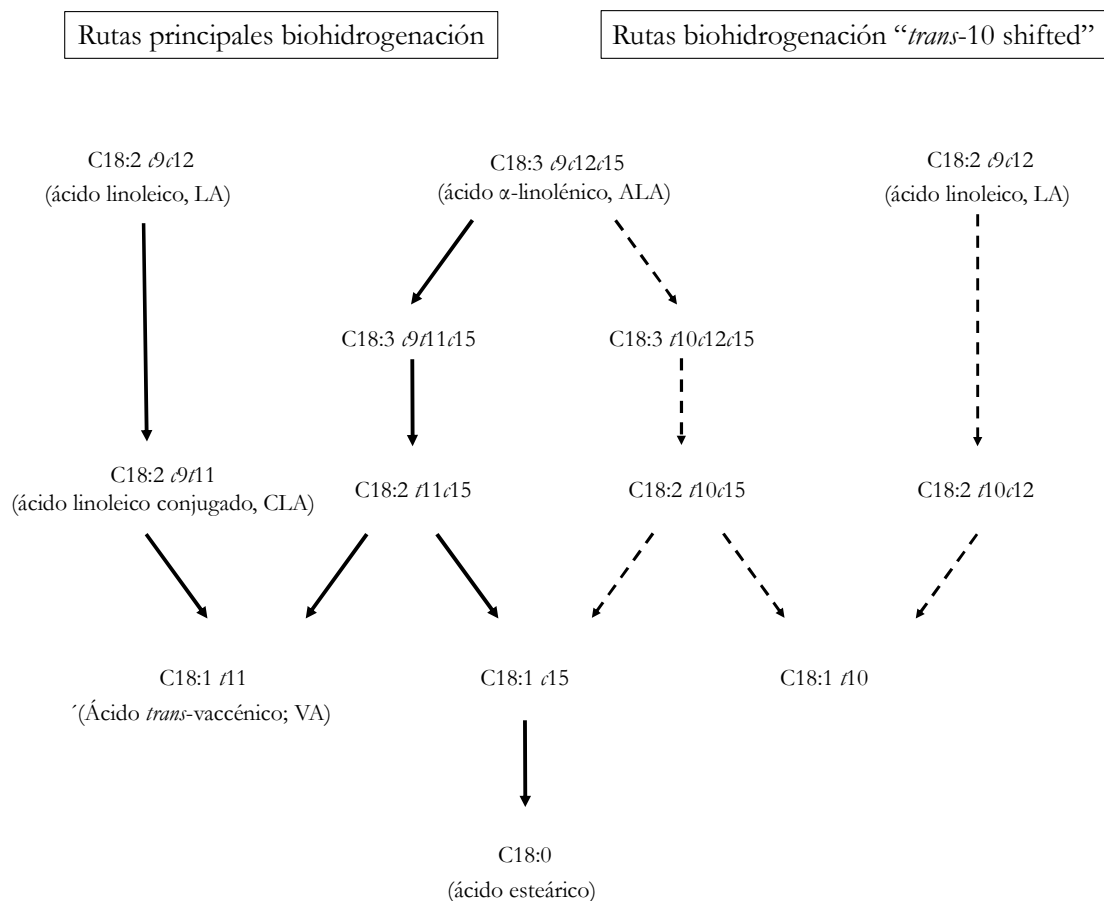


Figura 12. Descripción de la ruta del ácido linoleico (LA) y del ácido α -linolénico (ALA) en el rumen. Las flechas con línea continua describen las rutas conocidas y las líneas discontinuas indican las posibles rutas propuestas por Grünari y Bauman (1999). Adaptado de Alves y Bessa (2014).

Los factores que determinan la eficacia de la biohidrogenación son diversos. Por un lado, todos los factores que repercuten sobre la lipólisis, previamente indicados, también afectan a la biohidrogenación. Además, afectan de forma negativa a este proceso otros factores como el exceso de almidón degradable en el rumen, la abundancia de concentrados, el reducido tamaño de partícula de la ración o una elevada concentración de ácidos grasos, que incluyen el LA, el ALA, el EPA y el DHA, entre otros (Bauman et al., 2003).

2.4.2. Resíntesis, absorción, transporte y captación de lípidos por los tejidos periféricos

Los lípidos que llegan al intestino, mayoritariamente el ácido palmítico (C16:0) y ácido esteárico (C18:0), son muy similares a los que provienen del rumen dado que no hay una absorción o modificación significativa de los ácidos grasos de cadena media y larga en el omaso y abomaso (Noble, 1981). Aproximadamente el 80 - 90% de los lípidos son ácidos grasos libres adheridos a partículas alimenticias (Davis, 1990; Doreau y Chilliard, 1997) y los restantes son fosfolípidos microbianos y triglicéridos y glicolípidos provenientes de los restos del alimento.

Para que la absorción de los lípidos tenga lugar es necesario que estos puedan ser solubilizados en un ambiente acuoso; para ello, la formación de las micelas es indispensable, proceso en el que intervienen las sales biliares y las enzimas pancreáticas (Davis, 1990; Demeyer y Doreau, 1999; Figura 13). Una vez que se forman las micelas, éstas son absorbidas por las células epiteliales del yeyuno o enterocitos. Por un lado, los ácidos grasos de 12 o más carbonos son esterificados para dar lugar a triglicéridos y fosfolípidos, que unidos a apoproteínas forman quilomicrones y lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) son drenados por los conductos linfáticos para ser incorporados al torrente sanguíneo, aunque también pueden ser drenados por la vena porta. Por otro lado, los ácidos grasos de cadena media (C₆ hasta C₁₂) no son esterificados y son drenados directamente por la vena porta hacia el hígado o tejidos periféricos (Hocquette y Bauchart, 1999).

Los ácidos grasos transportados por los quilomicrones y las VLDL son liberados en los diferentes tejidos por la acción de la enzima LPL, aunque la captación tisular tiene lugar principalmente en el músculo esquelético, tejido adiposo y mamario. La LPL juega un papel crucial en el metabolismo de los lípidos ya que cataliza el paso limitante en la hidrólisis de los triglicéridos presentes en los quilomicrones y las VLDL, de forma que da lugar a ácidos grasos no esterificados (AGNE) y 2-monoacilglicérido para ser utilizados por los tejidos (Mead et al., 2002).

La enzima LPL se localiza en la superficie del lumen del endotelio de las células capilares y está anclada a los proteoglicanos (HSPG; del inglés heparan sulphate-proteoglycans) de la superficie de las células endoteliales. Las lipoproteínas circulantes presentan en su superficie un tipo de proteína denominada ApoC-II y su presencia es indispensable para la activación de la LPL, debido a que la unión inicial de los

quilomicrones y VLDL con la superficie luminal está mediada por una interacción específica entre la ApoC-II y la enzima (Miller y Smith, 1973). Tras la hidrólisis, los quilomicrones más pequeños son transportados hacia el hígado donde su apoproteína E (ApoE) es reconocida por un receptor específico y captado por este órgano. En cambio, las lipoproteínas de muy baja densidad son sometidas a hidrólisis sucesivas de manera que en una primera ellas se forman las lipoproteínas de densidad intermedia (IDL) y en la segunda las denominadas lipoproteínas de baja densidad (LDL) (Mead et al., 2002).

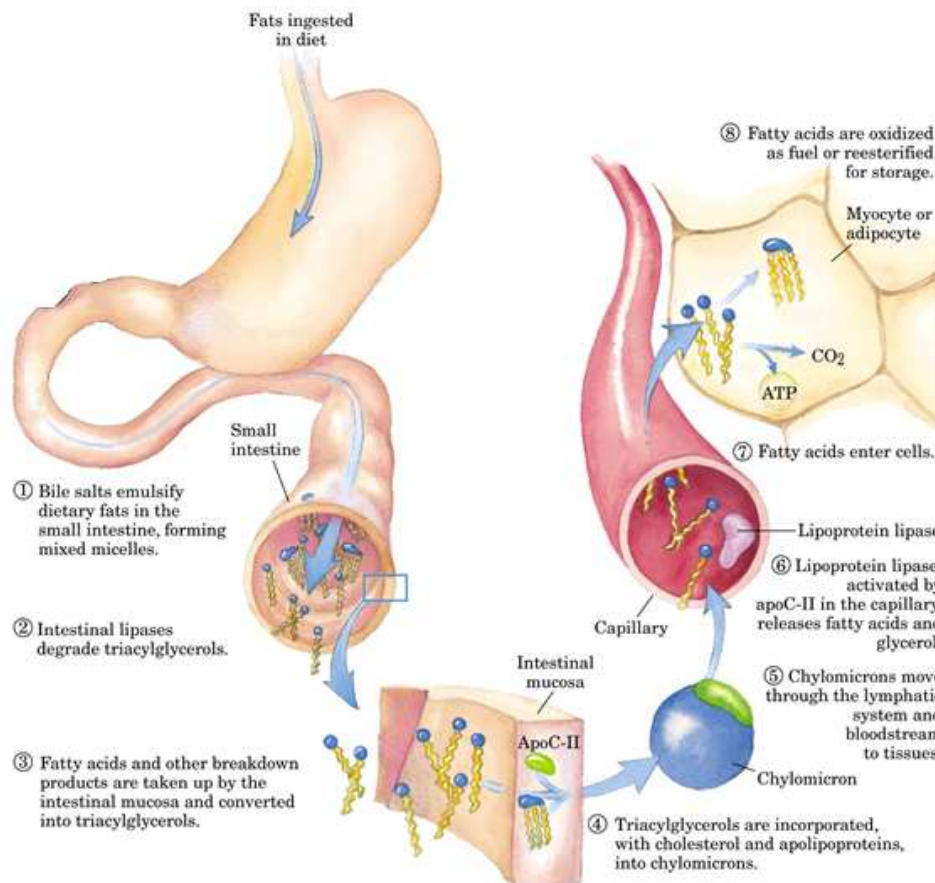


Figura 13. Digestión y absorción de los lípidos e incorporación de los ácidos grasos a las células por medio de la lipoprotein lipasa (LPL). Adaptado de Nelson y Cox (2008).

El gen **LPL** de la especie ovina está localizado en el cromosoma 2 y está compuesto por 10 exones y 9 intrones (23.974 pb). Nueve de los 10 exones codifican una proteína madura de 450 aminoácidos (56 kDa). Además, el exón 1 incluye la región 5' UTR (del inglés untranslated region) mientras que el exón 10, notablemente más grande que el resto, codifica la totalidad de la región 3' UTR (Enerbäck y Gimble, 1993; Raisonier et al., 1995).

La regulación de la **LPL** es compleja y se lleva a cabo mediante diferentes mecanismos y su regulación depende del tejido y el tipo de célula. La insulina actúa como regulador de la expresión en el tejido adiposo, de manera que en la zona 3' UTR de **LPL** tiene un elemento

IRE (elemento respuesta a la insulina), además de un elemento de respuesta a proliferador de peroxisomas (PPRE) (Schoonjans et al., 1996) o un sitio de unión al elemento respuesta a los esteroides (SRE) (Schoonjans et al., 2000). Varios trabajos han indicado que la expresión del gen *LPL* es inducida por la acción del *PPARG* y el *PPARA* como respuesta a ciertos ácidos grasos o a la administración de fibratos, antidiuréticos y tiazolidinedionas en el hígado, tejido adiposo y macrófagos (Michaud y Renier, 2001; Sartippour y Renier, 2000; Schoonjans et al., 1996). Sin embargo, el aumento en la expresión del gen no siempre va acompañado por un aumento en la actividad de la enzima, incluso hay autores que indican un efecto contrario (Gbaguidi et al., 2002; Ranganathan y Kern, 1998).

Asimismo, Mead et al. (2002) pusieron de manifiesto que la regulación de la *LPL* puede realizarse actuando sobre la estabilidad del mRNA, la traducción, la degradación proteica, el procesamiento, la secreción y la translocación al sitio de acción e inhibición competitiva, como respuesta al estado nutricional, insulina, adrenalina y hormona tiroidea. Por ejemplo, altas concentraciones de AGNE compiten con el complejo HSPG/LPL de forma que la enzima es desplazada del capilar, lo cual sería un mecanismo de retroalimentación negativa para evitar una excesiva incorporación de estos ácidos grasos en condiciones extremas de lipólisis (Saxena et al., 1989).

2.4.3. Lipogénesis y formación de triglicéridos

La lipogénesis comprende los procesos de síntesis de ácidos grasos y formación de triglicéridos y se lleva a cabo principalmente en el hígado, tejido adiposo blanco y, en el caso de hembras en periodo de lactación, en la glándula mamaria. Los mecanismos bioquímicos que tienen lugar en estos tejidos son similares; sin embargo, la importancia de cada uno de esos procesos varía de acuerdo con la especie animal. El tejido adiposo es el principal tejido donde tiene lugar la síntesis de ácidos grasos en rumiantes, concretamente en ovino este tejido es el responsable de más del 90% de la biosíntesis (Ingle et al., 1972). En cerdos, así como en los rumiantes, el tejido adiposo es el lugar de síntesis de ácidos grasos más importante (Vernon, 1980). En cambio, en aves el hígado es órgano donde la lipogénesis *de novo* es más intensa, mientras que en ratas, ratones y conejos ambos tejidos muestran una actividad similar.

Los ácidos grasos formados pueden incorporarse a los fosfolípidos que construyen las membranas celulares, pueden ser precursores de metabolitos biológicamente activos o ser empleados en la síntesis de los triglicéridos para el almacenamiento de energía metabólica. Este último proceso tiene lugar en el retículo endoplásmico de los adipocitos y se da a

partir de la esterificación de ácidos grasos activados (moléculas de acil-CoA) por la acción de la acil-CoA sintetasa (ACS) y el glicerol-3-fostato proveniente del catabolismo de la glucosa.

Como se ha mencionado, los ácidos grasos sintetizados *de novo* son una fuente de acil-CoA, pero además también se emplean los provenientes de la dieta incorporados por la LPL o los liberados en la lipólisis. El glicerol-3-fostato proviene de la dihidroxiacetona fostafo (DHAP) formado por la acción de la enzima **G3PDH**, aunque una pequeña cantidad puede proceder del glicerol bajo la acción de la glicerol quinasa (Mersmann y Smith, 2005).

2.4.4. Síntesis de ácidos grasos *de novo*

La síntesis *de novo* de ácidos grasos se lleva a cabo a partir de una fuente de carbono, el acetil coenzima A (acetil-CoA), y también requiere de poder reductor (NADPH) y de energía (ATP). Los carbonos necesarios esta síntesis pueden provenir del acetato, glucosa, lactato, propionato, butirato y de ciertos aminoácidos, pero únicamente el acetato, la glucosa, y en menor medida el lactato, parecen ser los precursores principales (Vernon, 1980).

Las vías de producción de acetil-CoA son utilizadas de forma más o menos intensa por los animales rumiantes adultos con actividad ruminal desarrollada y animales monogástricos o rumiantes no adultos. En rumiantes adultos, el acetato proveniente de la actividad microbiana del rumen es la fuente principal de acetil-CoA; por otro lado, el poder reductor (NADPH) se obtiene tanto a partir del acetato como de la glucosa. Sin embargo, en monogástricos y rumiantes no adultos la glucosa es la principal fuente de carbono y de poder reductor (Hanson y Ballard, 1967; Ingle et al., 1972). Igualmente, estas diferencias metabólicas pueden encontrarse a nivel del tejido y así, Smith y Crouse (1984) demostraron que en el tejido IM de rumiantes la glucosa aporta una mayor cantidad de carbonos (aproximadamente el 70%) con respecto al acetato y lactato, los cuales aportan menos del 20% del total de unidades de acetil-CoA. En el tejido adiposo SC, el acetato y el lactato aportan el 70 - 80% y el 15 - 30% de acetil-CoA, respectivamente, mientras que la contribución de la glucosa es menor al 5%.

Como se ha indicado previamente, la formación de acetil-CoA puede realizarse por medio de dos vías metabólicas diferentes, como viene reflejado en la Figura 14. Por un lado, los carbonos provenientes del acetato son activados y convertidos en acetil-CoA en el citoplasma celular por medio de la enzima ACS. Por otro lado, la glucosa es catalizada hasta

formar piruvato en el citoplasma por la vía glucolítica. Seguidamente, el piruvato atraviesa la mitocondria y se incorpora al ciclo del ácido cítrico (TCA) para ser transformado a acetil-CoA y mediante la conversión de acetil-CoA en citrato se da el paso de este hacia el citoplasma. Una vez allí, la enzima ATP-citrato liasa (ACL) convierte el citrato en acetil-CoA (Spencer y Lowenstein, 1966).

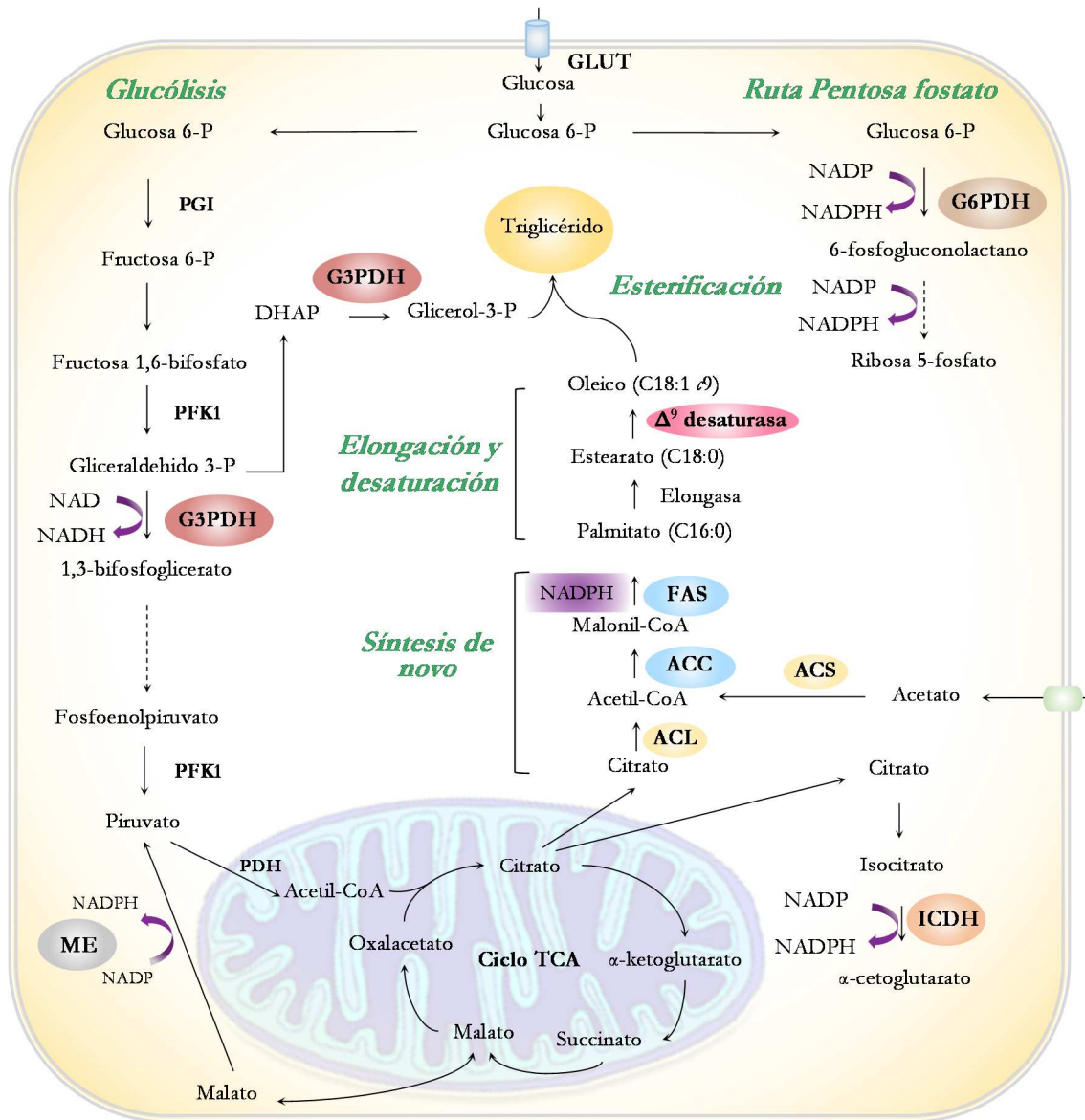


Figura 14. Representación esquemática de las rutas metabólicas implicadas en la síntesis de ácidos grasos. Adaptado de Vander Heiben et al. (2009)

Las fuentes de hidrógeno necesarias para la síntesis de ácidos grasos pueden formarse por medio de diferentes vías metabólicas. La vía de las pentosas fosfato, por la cual tiene lugar la oxidación de la glucosa, es la principal fuente de NADPH, de forma que aporta el 50 - 80% de poder reductor necesario (Vernon, 1980). Las enzimas responsables dentro de la vía son la **G6PDH** y la 6-fosfogluconato deshidrogenasa, cuya actividad se incrementa

cuando los animales son alimentados con dietas ricas en concentrados (Young et al., 1969) pero disminuye con el ayuno (Pothoven y Beitz, 1975). La segunda vía importante la constituye la enzima **NADP-isocitrato deshidrogenasa (ICDH)**, encargada de la conversión de isocitrato a α -cetoglutarato, aporta el resto de NADPH que no son producidos por la vía de la pentosas fostato (Laliois et al., 2010). Por último, la tercera fuente de poder reductor la proporciona la enzima NADP-malato deshidrogenasa o enzima málica, responsable de la conversión de malato (formado a partir de oxalacetato) en piruvato; sin embargo, la contribución de esta ruta en rumiantes es muy baja (Laliois et al., 2010).

La segunda etapa de la síntesis de ácidos grasos consiste en la carboxilación del acetil-CoA para la obtención de malonil-CoA, el cual es el sustrato esencial para la síntesis y elongación de ácidos grasos además de ser un inhibidor de la oxidación de los ácidos grasos (Brownsey et al., 2006). Dicha reacción irreversible está catalizada por la enzima acetil-CoA carboxilasa (ACC), clave en la regulación de la síntesis y degradación de los ácidos grasos. La ACC pertenece a la familia de las enzimas dependientes de la biotina (vitamina B) que presentan propiedades estructurales y catalíticas comunes (Jitrapakdee y Wallace, 2003). Como se observa en la Figura 15, la biotina se une a la enzima de manera que esta sólo es activa cuando se encuentra unida a la biotina (forma polimérica). La carboxilación del acetil-CoA se efectúa en dos pasos sucesivos: la primera reacción parcial, mediada por un dominio llamado biotín carboxilasa, activa el bicarbonato mediante la unión a la biotina para formar carboxibiotina. A continuación, por medio del dominio transcarboxilasa el grupo carboxilo activado (CO_2) de la biotina es transferido al acetil-CoA para formar malonil-CoA (Brownsey et al., 2006).

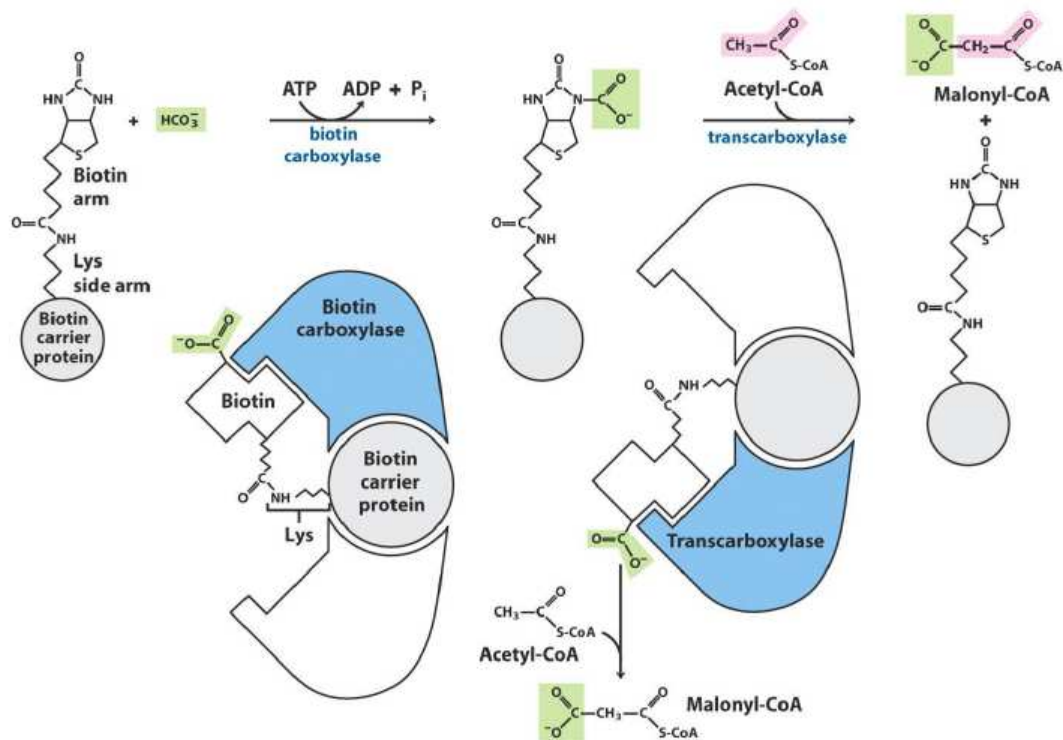


Figura 15. Reacción catalizada por la enzima acetil-CoA carboxilasa. Fuente: Nelson y Cox (2008).

La enzima ACC presenta dos isoformas, la ACC1 (ACC α) y la ACC2 (ACC β) codificadas por los genes *ACACA* y *ACACB*, respectivamente. La isoforma ACC1 se expresa mayoritariamente en los tejidos lipogénicos como el adiposo, hígado y glándula mamaria de animales en el periodo de lactación y cataliza el paso limitante para la formación de ácidos grasos saturados de cadena larga (ácido palmítico, C16:0). El gen *ACACB* se expresa principalmente en el corazón y en el músculo esquelético (Tong, 2005). La secuencia del gen *ACACA* en ovino está localizada en el cromosoma 11, contiene 54 exones y la secuencia codificante resulta en una proteína de 2.346 aminoácidos de 265 kDa (Barber et al., 2005). El gen contiene cuatro promotores, PI, PIA, PII y PIII, los cuales producen, junto con el splicing alternativo, una población heterogénea de transcritos que difieren principalmente en la región 5' UTR. La expresión de los transcritos a partir del promotor PIA está restringida al tejido adiposo e hígado (Travers et al., 2001).

Respecto a la regulación transcripcional del gen *ACACA*, su expresión está controlada por varios factores de transcripción, principalmente por el *SREBF1a* y *SREBF1c* y proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos (*ChREBP*). Una dieta alta en carbohidratos (glucosa) puede activar la expresión del *SREBF1c* a través de la insulina e incrementar la expresión del gen *ACACA*. En cambio, los PUFA (dieta rica en grasa) pueden actuar sobre el factor de transcripción inhibiendo la expresión del gen. Por otro lado, el *ChREBP* puede

ser activado por una dieta rica en carbohidratos de modo que también activaría a la *ACACA* (Ishii et al., 2004).

La regulación transcripcional del gen *ACACA* y la que se da a nivel de estabilidad del mRNA son mecanismos de regulación a largo plazo (horas-días). Sin embargo, la enzima ACC también está sujeta a una fina regulación a corto plazo (minutos-horas) mediante el control de su actividad por vía alostérica y fosforilación reversible. El citrato, el glutamato y otros ácidos carboxílicos activan alostéricamente la ACC incrementando su polimerización. En cambio, el malonil-CoA, los CoA libres y los acil-CoAs de cadena larga disminuyen la actividad de la enzima (Tong, 2005). Además, la enzima es inactivada mediante la fosforilación mediada por la proteína kinasa activada por AMP (AMPK) como respuesta a la presencia de adrenalina o glucagón (Brownsey et al., 2006).

Las etapas finales de la síntesis de los ácidos grasos saturados se desarrollan en el citoplasma de las células, donde se encuentra un complejo enzimático denominado **sintasa de ácidos grasos (FAS)**. Sintetiza primordialmente el ácido graso palmítico (C16:0) a partir de acetil-CoA y malonil-CoA en presencia de NADPH, en un proceso que involucra siete reacciones enzimáticas, para lo que la enzima presenta siete centros catalíticos y requiere la presencia de una proteína portadora de acilos (ACP), que transporta el sustrato entre los diferentes centros catalíticos de la enzima. En la Figura 16 se muestra el proceso general de síntesis de ácido palmítico. La actividad de dichos centros catalíticos se realiza a través de tres etapas: inicio de la síntesis y primer ciclo de elongación de los ácidos grasos (obtención de un ácido graso de cuatro ácidos grasos), elongación de la cadena (ácidos grasos de 16 átomos de carbono) y terminación de la síntesis y separación del palmítico (liberación al medio citoplasmático) (Nelson y Cox, 2011).

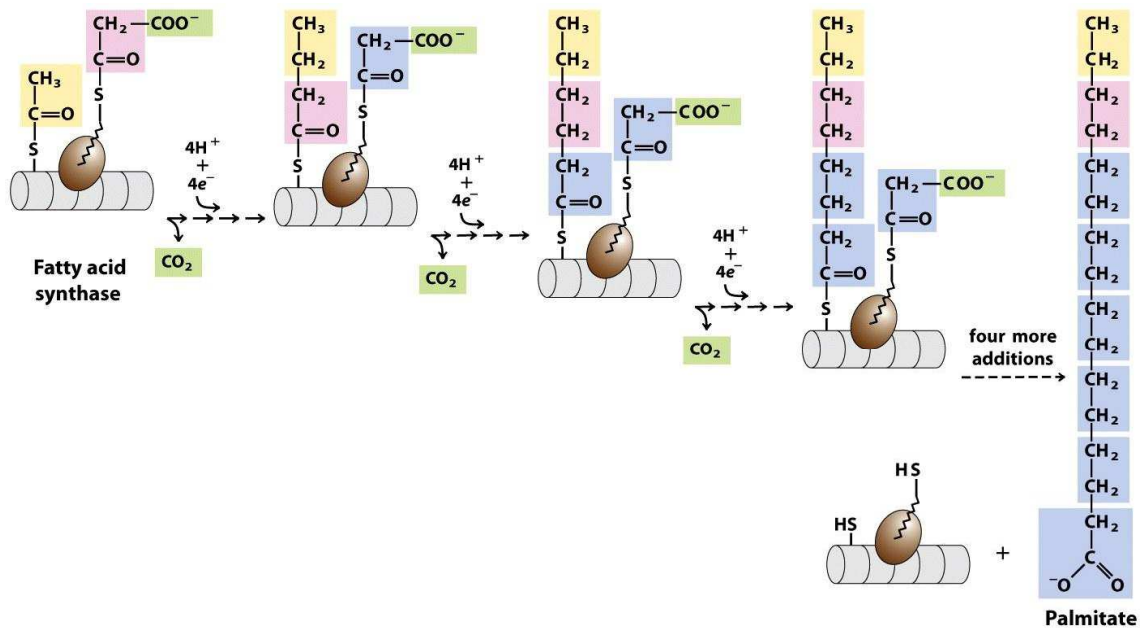
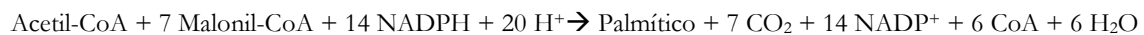


Figure 21-4
 Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
 © 2008 W. H. Freeman and Company

Figura 16. Proceso general de síntesis de ácido palmítico (C₁₆:0). Los grupos acetil se presentan sombreados en amarillo, los grupos malonil en rosa, el CO₂ liberado en verde. Fuente: Nelson y Cox (2008).

El balance global de la síntesis de ácido palmítico será:

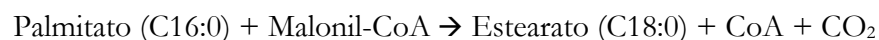


La enzima FAS es codificada por el gen *FASN*, cuya secuencia se sitúa en el cromosoma 11 y está formada por 38 exones. Bonnet et al. (1998) observaron un único transcrito del gen *FASN* de aproximadamente 8,7 kb en el tejido adiposo de ovejas y vacas. La transcripción del gen está sujeta a un control nutricional y hormonal estricto en los tejidos que sintetizan lípidos, principalmente el adiposo y el hepático. Una dieta rica en carbohidratos induce la expresión del gen *FASN*, regulación en la que participa el factor de transcripción *ChREBP* (Ishii et al., 2004). Por otro lado, la expresión del gen es reprimida por una dieta rica en grasa, efecto mediado por el glucagón, los glucocorticoides, la hormona de crecimiento y la leptina (Latasa et al., 2003). Otros represores de la transcripción incluyen los PUFA y los esteroides (Bennett et al., 1995; Jump et al., 1996). El factor de transcripción *SREBF1* es un regulador central de la transcripción del gen *FASN* (Latasa et al., 2003).

2.4.5. Elongación y desaturación de los ácidos grasos

El ácido palmítico formado en la síntesis citoplasmática de ácidos grasos es un ácido graso de 16 átomos de carbono. Los ácidos grasos de cadena más larga se obtienen por procesos de elongación, catalizados por enzimas situadas en la cara citoplasmática del retículo endoplásmico liso (sistema microsomal) y en las mitocondrias, pero el mecanismo de elongación en ambos sitios es diferente. El ácido palmítico puede ser elongado en la mitocondria hasta ácidos grasos de 22 carbonos, mientras que los microsomas pueden elongar y desaturar ácidos grasos desde 18 carbonos (Demeyer y Doreau, 1999).

En el retículo endoplásmico, a pesar de que el sistema enzimático es diferente y en este caso el transporte de acilos lo realiza la coenzima A en lugar de la ACP, la elongación se realiza de forma básicamente análoga a la llevada a cabo por el complejo ácido graso sintetasa. El donante de los dos átomos de carbono es la molécula malonil-CoA y el NADPH actúa como reductor; la descarboxilación proporciona la energía para la condensación, pasando a continuación por las correspondientes reacciones de reducción, deshidratación y reducción para dar lugar a un ácido graso más largo. La actuación de las elongasas sobre el ácido palmítico origina esteárico (C18:0) y homólogos superiores menos abundantes (Nelson y Cox, 2011). La reacción de elongación se muestra a continuación:



En las mitocondrias, la elongación (proceso independiente de la vía de síntesis de ácidos grasos) se produce por el agregado sucesivo de unidades de acetilo (aceil-CoA) y es esencialmente un proceso inverso a la β -oxidación.

La desaturación implica sistemas enzimáticos complejos que introducen el doble enlace en posiciones específicas y parecen estar sometidos a una regulación muy compleja. Por tanto, constituyen un punto importante para el estudio y el conocimiento de la biosíntesis de los ácidos grasos insaturados, debido a sus importantes repercusiones fisiológicas y nutricionales.

La desaturación es catalizada por las acil-CoA desaturasas en el retículo endoplásmico liso. Estas enzimas actúan en conjunto con una flavoproteína denominada citocromo b5 reductasa, y tienen un mecanismo de reacción que involucra la participación del citocromo b5, O₂, NADH (o NADPH). El complejo enzimático retira dos átomos de hidrógeno del resto acil del ácido graso y los transfiere al oxígeno molecular. Al mismo tiempo se transfieren, mediante una cadena de transporte, dos electrones y dos protones desde el NADH, que reducen el O₂ a dos H₂O (Figura 17).

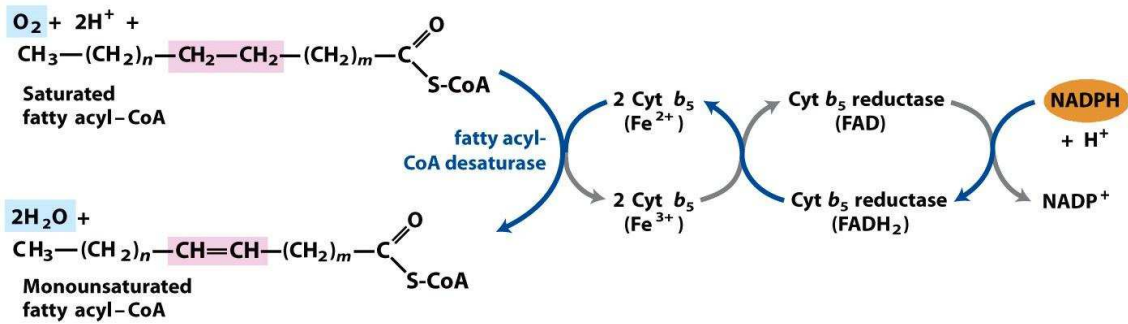


Figure 21-13
 Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition
 © 2008 W. H. Freeman and Company

Figura 17. Transferencia de electrones en el proceso de desaturación de los ácidos grasos. Fuente: Nelson y Cox (2008).

El ácido palmítoleico (C16:1 ω) y el ácido oleico (C18:1 ω) son los ácidos grasos mayoritarios en las células, sintetizados a partir de ácido palmítico y ácido esteárico, respectivamente, por medio de la enzima esteroil-CoA desaturasa o Δ^9 desaturasa (gen *SCD*), enzima que introduce un doble enlace *cis* entre los carbonos 9 y 10 y es limitante en la síntesis de ácidos grasos monoinsaturados. Asimismo, dicha enzima es responsable de la formación en el tejido adiposo de ácido ruménico (C18:2 ω 11) a partir del ácido VA (C18:1 ω 11) de origen ruminal (Barber et al., 2000; Bauman et al., 2000), como se muestra en la Figura 18. Los ácidos grasos sintetizados por la enzima Δ^9 desaturasa representan la mayoría de los ácidos grasos monoinsaturados presentes en los fosfolípidos de membrana, los triglicéridos y colesterol ésteres. Es por ello que la expresión y actividad de la enzima es de gran importancia en la composición de ácidos grasos de tejido adiposo, produciendo alteraciones en la fluidez de las membranas y el metabolismo lipídico (Ntambi y Miyazaki, 2004).

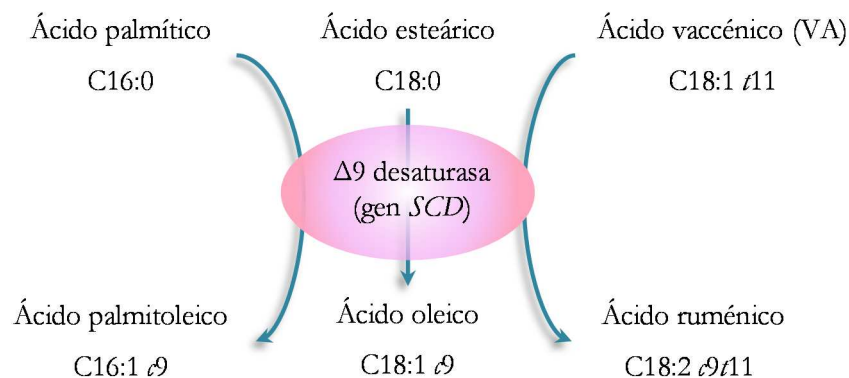


Figura 18. Síntesis de ácido palmítoleico (C16:1 ω), de ácido oleico (C18:1 ω) y de ácido ruménico (C18:2 ω 11).

En ovino el gen *SCD* presenta dos isoformas: la *SCD1*, que se expresa predominantemente en el tejido adiposo (aunque también en el hígado y glándula mamaria), y la *SCD5* que se expresa en el cerebro (Lengi y Corl, 2008). El gen *SCD1*, localizado en el cromosoma 22, contiene 6 exones y 5 intrones distribuidos a lo largo de 23 kb y codifica una proteína de 359 aminoácidos (Ward et al., 1998).

La expresión del gen *SCD* está regulada por la dieta, hormonas y factores ambientales (Ntambi y Miyazaki, 2004), sin embargo, a pesar de que los mecanismos implicados en la regulación de la expresión del gen *SCD* por los factores dietéticos son ampliamente conocidos en roedores, en rumiantes estos mecanismos no se conocen en profundidad (Kalupahana et al., 2013). En ovino, Zulkifli et al. (2010) caracterizaron el promotor del gen *SCD* y observaron la presencia de un sitio de respuesta a los PUFA, que contenía también un elemento respuesta a los esteroides, región donde se une el factor de transcripción *SREBF1*. Así, los PUFA disminuyen la activación del promotor del gen *SCD* actuando sobre el *SREBF1*, tanto a nivel de mRNA como sobre la unión con la *SCD* (Heinemann y Ozols, 2003). En cambio, Kim et al. (2002) sugirieron que el mecanismo principal de la supresión de los genes lipogénicos causada por los PUFA es la inhibición de la maduración de *SREBF1*. Además del *SREBF1*, el *PPARG*, *CbBRBP* y *LXR* son otros factores de transcripción también implicados en la regulación de la *SCD* (Nakamura y Nara, 2004).

El efecto de los PUFA fue estudiado en bovino por Waters et al. (2009), quienes observaron que una dieta suplementada con ácido oleico y ácido linoleico no alteraba el nivel de mRNA del gen *SCD* en el tejido adiposo, mientras que el ácido linolénico causaba una represión del mismo. En vacuno también se ha observado que durante el síndrome de baja grasa en la leche causado por dietas ricas en almidón y PUFA se produce una represión coordinada de varios genes de la lipogénesis mamaria, que incluye la *SCD*. Dicha respuesta parece estar relacionada, a su vez, con la menor expresión de determinados factores de transcripción (el *SREBF1* y el elemento de respuesta a la hormona tiroidea *Spot-14*; Bauman et al., 2011).

La actividad de la enzima Δ^9 desaturasa es regulada por los carbohidratos ingeridos y la insulina, de forma que una dieta rica en carbohidratos incrementa la actividad de la enzima. Igualmente, los ácidos grasos también intervienen en la regulación de actividad de la Δ^9 desaturasa en función de su longitud y grado de insaturación. Así, mientras los SFA y MUFA pueden incrementar la actividad de la enzima, los PUFA como el LA y ALA la disminuyen (Bernard et al., 2005; Heinemann y Ozols, 2003; Jayan y Herbein, 2000).

Por último, otro de los mecanismos por el cual los PUFA regulan la *SCD* consiste en la desestabilización del mRNA. Sessler et al. (1996) indicaron que en células 3T3-L1 incubadas con AA (C20:4 *n*-6) el mRNA del gen *SCD* redujo su vida media de 8 horas a 4 horas.

2.4.6. Metabolismo de los ácidos grasos esenciales

Los mamíferos carecen de las enzimas necesarias para insertar dobles enlaces en los átomos de carbono que están más allá del carbono 9 (a partir del carboxilo terminal), por lo que no pueden sintetizar el ácido linoleico ni el ácido α -linolénico. Como consecuencia, estos ácidos grasos se consideran esenciales y deben ser ingeridos en la dieta. El ácido linoleico y linolénico sufren, durante su metabolismo en la fracción microsomal del retículo endoplásmico, procesos sucesivos de elongación y desaturación que llevan a la formación de cadenas de hasta 24 carbonos y hasta 6 enlaces dobles.

El primer paso en el metabolismo del LA y ALA es la desaturación, catalizada por la enzima Δ^6 desaturasa, de modo que estos ácidos grasos son convertidos en ácido γ -linolénico (C18:3 *n*-6) y ácido estearidónico (C18:4 *n*-3), como se observa en la Figura 19.

La Δ^6 desaturasa es la enzima limitante en la síntesis de LCPUFA. Tanto los ácidos grasos de la serie *n*-3 así como los de la serie *n*-6 son metabolizados por esta enzima, aunque existe mayor afinidad por la familia *n*-3 (la afinidad es 2-3 veces mayor por el ALA que por el LA) (Brenner, 1989; Pender-Cudlip et al., 2013). En cambio, la presencia de niveles elevados de LA debido a una alta ingestión de este ácido graso, puede cambiar la acción de la enzima hacia la ruta de la familia *n*-6 (Ruxton et al., 2004).

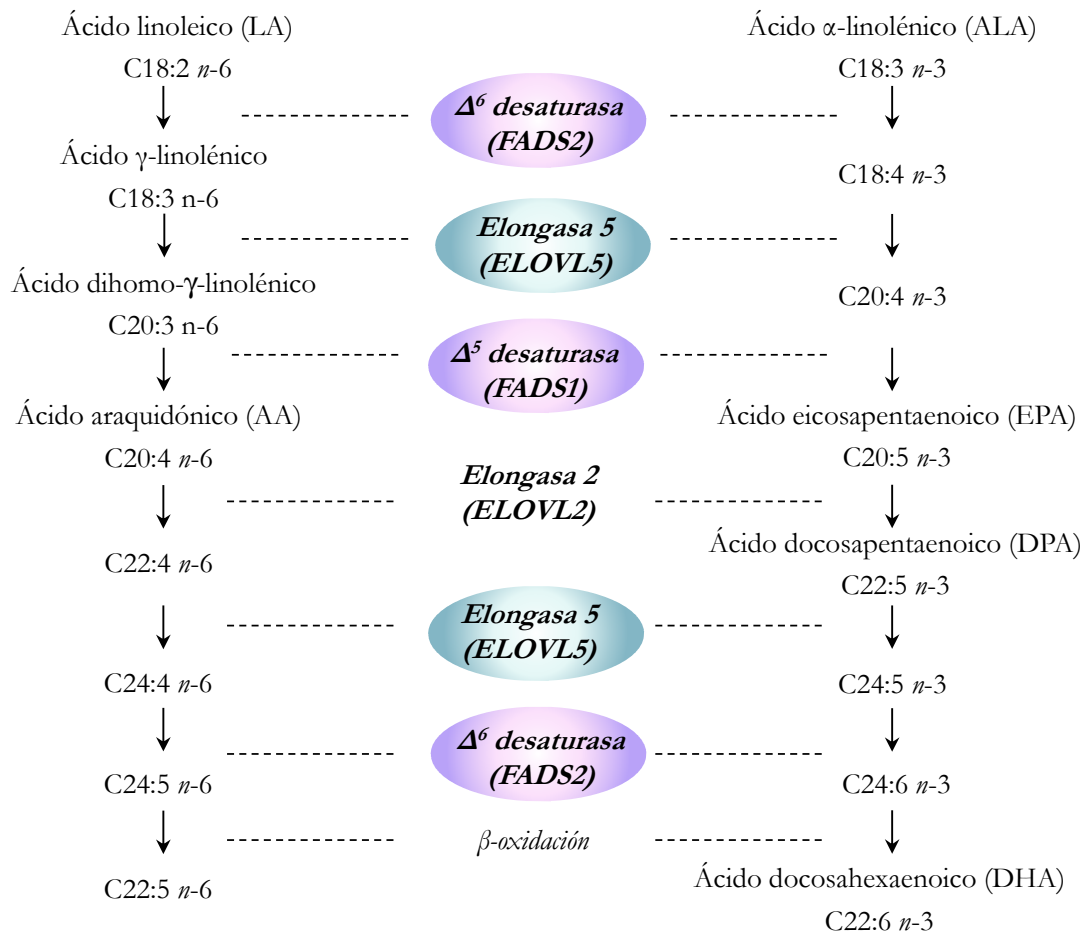


Figura 19. Ruta de síntesis de ácidos grasos de cadena larga a partir del ácido linoleico (LA) y ácido α-linolénico (ALA). Adaptado de Pereira et al. (2003).

A continuación, estos ácidos grasos son elongados por acción de la elongasa 5 y posteriormente la enzima Δ^5 desaturasa introduce un doble enlace en el carbono 20 de los ácidos grasos C20:3 n-6 y C20:4 n-3 para sintetizar AA y EPA, respectivamente (Figura 19). La etapa final del proceso de elongación-desaturación microsomal, donde actúan la elongasa 2 y Δ^6 desaturasa, produce un ácido graso de 24 átomos de carbono y cinco dobles enlaces (C24:5 n-6) a partir del LA y un ácido graso de 24 carbonos y 6 dobles enlaces (C24:6 n-3) a partir del ALA. Tanto el C24:5 n-6 como el C24:6 n-3 son transportados al interior de los peroxisomas donde son sometidos a una única oxidación que los transforma en los ácidos DPA (C22:5 n-6) y DHA, en un proceso denominado retroconversión (Pereira et al., 2003; Poisson y Cunnane, 1991).

El gen **FADS2**, que codifica la enzima Δ^6 desaturasa, y el gen **FADS1**, que codifica la enzimas Δ^5 desaturasa, han sido identificados y caracterizados en varios mamíferos incluyendo humanos, ratas y ratones (Pereira et al., 2003). Sin embargo, debido a su

inestabilidad, la estructura de estos genes no ha sido analizada en muchas especies. La búsqueda en la base de datos del NCBI revela que en ovino tanto el gen *FADS2* como el *FADS1* se encuentran en el cromosoma 21 y presentan 13 y 15 exones, respectivamente. Los estudios en humanos indican que estos genes están localizados en el cromosoma 11 (11q12-q13.1), y ambos contienen 12 exones y 11 intrones. Estos genes están dispuestos en una orientación cabeza a cabeza y construyen un clúster (*FADS*) con un tercer gen *FADS3*, cuya función no está totalmente clara (Marquardt et al., 2000).

Los genes *FADS2* y *FADS1* codifican dos proteínas que están unidas a las membranas y constan de 444 aminoácidos con dominios animo-terminal del citocromo b5, dos regiones que abarcan la membrana y tres motivos “His-box”. Así como ocurre en otras desaturasas unidas a las membranas, estas regiones ricas en histidinas son necesarias para la actividad catalítica de las enzimas. Aunque la Δ^6 desaturasa y Δ^5 desaturasa presentan la peculiaridad de que el primer residuo de histidina de la tercera caja “His-box” es reemplazada por una glutamina, siendo este hecho esencial para la correcta actividad catalítica de dichas enzimas (Pereira et al., 2003).

Los PUFA son el componente de la dieta que mayor importancia presenta en la regulación de las desaturasas Δ^6 y Δ^5 . En este sentido, Nakamura et al. (2001) observaron que el LA y sus productos de cadena más larga suprimían la actividad de la Δ^6 desaturasa y su mRNA en comparación con el ácido oleico. Asimismo, estos autores indicaron que la regulación por producto final o *feedback* ocurre principalmente a nivel transcripcional. Son dos los principales factores de transcripción implicados en la regulación de las desaturasas por los PUFA: el *SREBF1* y el *PPARA*.

El *SREBF1* activa la mayoría de los genes responsables de la síntesis de ácidos grasos, incluyendo las tres desaturasas Δ^6 , Δ^5 y Δ^9 (Nakamura y Nara, 2004) y el *PPARA* parece estar también implicado en la regulación del *FADS2*. Por otra parte, el *SREBF1* también es un mediador en la inhibición de las desaturasas por los PUFA, de manera que estos ácidos grasos reprimen la expresión de los genes lipogénicos actuando sobre el procesamiento de este factor de transcripción y la estabilidad del mRNA, como se ha indicado previamente en el caso del gen *SCD* (Nakamura y Nara, 2004).

En referencia al factor de transcripción *PPARA*, los PUFA se unen a él causando su activación (Nakamura et al., 2001). Los estudios de cultivos celulares han descrito la presencia de un elemento de unión al PPPE en el promotor del gen *FADS2* (Tang et al., 2003).

La activación de las desaturasas tanto por el *SREBF1* como por el *PPARA* resulta paradójica, debido a que estos factores de transcripción son antagónicos e inducen un conjunto de genes específicos, excepto en el caso de las desaturasas. El *PPARA* está involucrado en la oxidación de los ácidos grasos a través de la inducción de las enzimas implicadas en dicho proceso, mientras que el *SREBF1* activa los genes relacionados en la síntesis de ácidos grasos. Como sugirieron Nakamura y Nara (2004) estos factores de transcripción podrían actuar como un sensor de los niveles de lípidos dentro del mecanismo de regulación *feedback* de la síntesis de los LCPUFA.

Las enzimas elongasa 5 y 2 codificadas respectivamente por los genes *ELOVL5* y *ELOVL2* pertenecen a la familia de genes *elongasas de ácidos grasos (ELOVL)* que está formada por 7 genes. A pesar de que los genes han sido identificados, a causa de la dificultad en la purificación provocada por la alta hidrofobia de estos complejos enzimáticos, estas enzimas no han sido caracterizadas en detalle. Se ha observado que los genes de la familia *ELOVL* poseen 5 o 6 regiones transmembrana, un motivo de histidinas altamente conservado y una señal de retención al retículo endoplásmico (Matsumoto et al., 2013). Los genes *ELOVL5* y *ELOVL2* están ubicados en el cromosoma 20 del genoma ovino y presentan 12 y 8 exones, respectivamente (Base de datos del NCBI).

Los PUFA están también involucrados en la regulación de estas desaturasas, principalmente a través de la unión a factores de transcripción *PPARA* y *SREBF1* (Wang et al., 2008). En este sentido, Wang et al. (2005) observaron que en el hígado de ratas alimentadas con aceite de pescado la expresión del gen *ELOVL5* disminuía (\geq al 50%), en cambio, no causaba efecto sobre la expresión del gen *ELOVL2*.

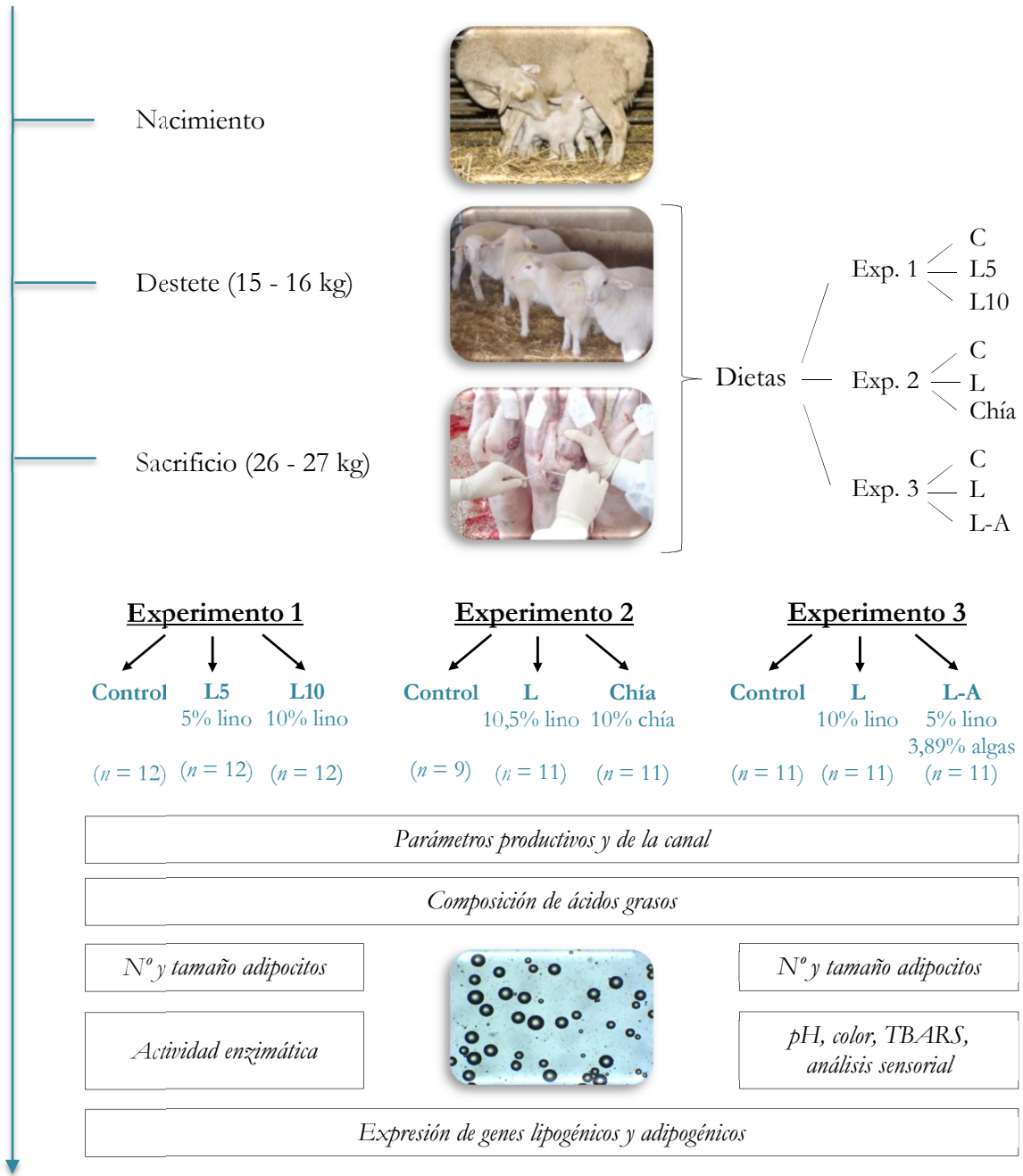
3. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL

El *objetivo general* de la presente tesis doctoral ha sido estudiar el efecto de la inclusión en las raciones de corderos en cebo de ácidos grasos poliinsaturados provenientes de diferentes fuentes alimenticias (semilla de lino, chía y microalgas marinas) sobre la expresión de varios genes relacionados con el metabolismo lipídico, así como sobre el crecimiento y características de la canal, desarrollo del tejido adiposo, comprobando también su influencia sobre la composición lipídica y calidad de la carne. Este objetivo general se pretende abordar a través de los siguientes *objetivos específicos*:

1. Estudio del efecto de la adición de semilla de lino a la dieta de corderos de raza Navarra sobre los parámetros de crecimiento y parámetros de la canal y sobre las siguientes características de los tejidos subcutáneo (SC) e intramuscular (IM):
 - el número y tamaño de los adipocitos,
 - la actividad de la enzima FAS implicada en la síntesis *de novo* de ácidos grasos, la G3PDH como indicador de la esterificación de ácidos grasos y la G6PDH e ICDH implicadas en la generación de poder reductor en la síntesis *de novo*,
 - la composición de ácidos grasos,
 - la expresión de los genes relacionados con la captación de ácidos grasos (*LPL*), síntesis *de novo* (*ACACA*) y desaturación (*SCD*, *FADS1*, *FADS2*) y elongación (*ELOVL5*).
2. Análisis de la influencia de la inclusión de la semilla de lino o semilla de chía a la dieta de corderos sobre los parámetros de crecimiento y parámetros de la canal y sobre las siguientes características de los tejidos subcutáneo e intramuscular:
 - la composición de ácidos grasos,
 - la expresión de los genes *LPL*, *ACACA*, *SCD*, *FADS1*, *FADS2* y *ELOVL5*.
3. Estudio del efecto de la ingestión de dietas enriquecidas con lino o lino y algas de corderos sobre los parámetros de crecimiento y de la canal, sobre el pH, el color, la oxidación lipídica y la calidad sensorial de la carne y sobre las siguientes características de los tejidos adiposos subcutáneo e intramuscular:
 - el número y la distribución del tamaño de los adipocitos,
 - la composición de ácidos grasos,
 - la expresión de los genes *LPL*, *ACACA*, *SCD*, *FADS1*, *FADS2* y *ELOVL5* y sus elementos reguladores y factores de transcripción adipogénicos: *PPARG*, *CEBPA* y *SREBF1*.

Para llevar a cabo dichos objetivos se realizó un planteamiento experimental que consta de tres experimentos: 1) se incluye un 5% o y 10% de semilla extrusionada de lino, 2) se adiciona un 10,5% de semilla extrusionada de lino o un 10% de semilla de chía, 3) incluye un 10% de semilla extrusionada de lino o un 3,89% de microalgas marinas y un 5% de semilla extrusionada de lino. En la Figura 20 se presenta una visión general del planteamiento experimental.

Explotación



Consumidor

Figura 20. Planteamiento experimental.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Este artículo ha sido eliminado por restricciones de derechos de autor.

4.1. PUBLICACIÓN 1

Urrutia, O., Mendizabal, J.A., Insausti, K., Soret, B., Purroy, A., y Arana, A.

Effect of linseed dietary supplementation on adipose tissue development, fatty acid composition, and lipogenic gene expression in lambs

Livestock Science. 2015. 178: 345-356.

"Reprinted from Livestock Science, 178, Urrutia, O., Mendizabal, J.A., Insausti, K., Soret, B., Purroy, A., y Arana, A., Effect of linseed dietary supplementation on adipose tissue development, fatty acid composition, and lipogenic gene expression in lambs, 345-356, 1871-1413 (2015), with permission from Elsevier."

<http://dx.doi.org/10.1016/j.livsci.2015.05.006>

Este artículo ha sido eliminado por restricciones de derechos de autor.

4.2. PUBLICACIÓN 2

Urrutia, O., Soret, B., Insausti, K., Mendizabal, J.A., Purroy, A., y Arana, A.

The effects of linseed or chia seed dietary supplementation on adipose tissue development, fatty acid composition, and lipogenic gene expression in lambs.

Small Ruminant Research. 2015. 123: 204-211.

"Reprinted from Small Ruminant Research, 123, O. Urrutia, B. Soret, K. Insausti, J.A. Mendizabal, A. Purroy, A. Arana, The effects of linseed or chia seed dietary supplementation on adipose tissue development, fatty acid composition, and lipogenic gene expression in lambs, 204-211, 0921-4488 (2015), with permission from Elsevier."

<http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2014.12.008>

4.3. PUBLICACIÓN 3

Urrutia, O., Mendizabal, J.A., Insausti, K., Soret B., Purroy A., Arana A.

Effects of addition of linseed and marine algae to the diet on adipose tissue development, fatty acid profile, lipogenic gene expression, and meat quality in lambs.

PLoS ONE. 2016. 11(6): e0156765.

RESEARCH ARTICLE

Effects of Addition of Linseed and Marine Algae to the Diet on Adipose Tissue Development, Fatty Acid Profile, Lipogenic Gene Expression, and Meat Quality in Lambs

Olaia Urrutia, José Antonio Mendizabal, Kizkitza Insausti, Beatriz Soret, Antonio Purroy, Ana Arana*

Escuela Superior de Ingenieros Agrónomos, Departamento de Producción Agraria, Universidad Pública de Navarra, Pamplona, Spain

* aarana@unavarra.es



OPEN ACCESS

Citation: Urrutia O, Mendizabal JA, Insausti K, Soret B, Purroy A, Arana A (2016) Effects of Addition of Linseed and Marine Algae to the Diet on Adipose Tissue Development, Fatty Acid Profile, Lipogenic Gene Expression, and Meat Quality in Lambs. PLoS ONE 11(6): e0156765. doi:10.1371/journal.pone.0156765

Editor: Marinus F.W. te Pas, Wageningen UR Livestock Research, NETHERLANDS

Received: January 15, 2016

Accepted: May 19, 2016

Published: June 2, 2016

Copyright: © 2016 Urrutia et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: The authors acknowledge the assistance provided by INTIA (Navarra, Spain) and Piensos Unzue S.A. (Navarra, Spain). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

This study examined the effect of linseed and algae on growth and carcass parameters, adipocyte cellularity, fatty acid profile and meat quality and gene expression in subcutaneous and intramuscular adipose tissues (AT) in lambs. After weaning, 33 lambs were fed three diets up to 26.7 ± 0.3 kg: Control diet (barley and soybean); L diet (barley, soybean and 10% linseed) and L-A diet (barley, soybean, 5% linseed and 3.89% algae). Lambs fed L-A diet showed lower average daily gain and greater slaughter age compared to Control and L ($P < 0.001$). Carcass traits were not affected by L and L-A diets, but a trend towards greater adipocyte diameter was observed in L and L-A in the subcutaneous AT ($P = 0.057$). Adding either linseed or linseed and algae increased α -linolenic acid and eicosapentaenoic acid contents in both AT ($P < 0.001$); however, docosahexaenoic acid was increased by L-A ($P < 0.001$). The $n-6/n-3$ ratio decreased in L and L-A ($P < 0.001$). Algae had adverse effects on meat quality, with greater lipid oxidation and reduced ratings for odor and flavor. The expression of lipogenic genes was downregulated in the subcutaneous AT ($P < 0.05$): *acetyl-CoA carboxylase 1 (ACACA)* in L and L-A and *lipoprotein lipase (LPL)* and *stearoyl-CoA desaturase (SCD)* in L-A. *Fatty acid desaturase 1 (FADS1)*, *fatty acid desaturase 2 (FADS2)* and *fatty acid elongase 5 (ELOVL5)* were unaffected. In the subcutaneous AT, supplementing either L or L-A increased *peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARG)* and *CAAT-enhancer binding protein alpha (CEBPA)* ($P < 0.05$), although it had no effect on *sterol regulatory element-binding factor 1 (SREBF1)*. In the intramuscular AT, expression of *ACACA*, *SCD*, *FADS1* and *FADS2* decreased in L and L-A ($P < 0.001$) and *LPL* in L ($P < 0.01$), but *PPARG*, *CEBPA* and *SREBF1* were unaffected.

Introduction

Adipose tissue (AT) amount and fatty acid (FA) composition play major roles in meat quality in terms of sensory properties and health considerations [1]. Adipose tissue growth involves adipocyte hypertrophy and hyperplasia and the intensity of each process is age-dependent and depot-specific [2]. Adipogenesis is regulated by a complex network of transcription factors being *peroxisome proliferator-activated receptor gamma* (PPARG) and *CAAT-enhancer binding protein alpha* (CEBPA) the central regulators of this process, which is regulated by PUFA [3]. Long-chain *n*-3 PUFA (LCPUFA), particularly docosahexaenoic acid (DHA, C22:6 *n*-3) and eicosapentaenoic acid (EPA, C20:5 *n*-3), and the C18:2 *c*-9, *t*-11 isomer of CLA are known to be beneficial for human health [4]. Thus, vegetable oils or seeds containing α -linolenic acid (ALA, C18:3 *n*-3) have been studied to enrich meat with *n*-3 PUFA and enhance the endogenous synthesis of *n*-3 LCPUFA. Linseed addition has been found to be effective in increasing the ALA content of meat, however, there was no or was minor, effect on EPA, DHA and CLA [5,6] probably due to dietary PUFA inhibiting the expression of lipogenic genes and proteins involved in their synthesis [7,8]. Then, supplementary sources of EPA and DHA, such as marine algae, are being examined. Moreover, addition of PUFA to animal diets may affect AT growth and have adverse effects on meat quality due to its greater potential for oxidation and generation of off-flavors [9]. Following the hypothesis that addition of PUFA to the diet in lamb feeds could alter FA composition, AT development and lipogenic gene expression, this work aimed to study the effect of linseed or the effect of partial substitution of linseed with marine algae on AT development, FA profile, adipogenic and lipogenic genes expression in subcutaneous (SC) and intramuscular (IM) AT and meat quality in lambs.

Material and Methods

Ethics statement

Animal care, handling and experimental procedures were in compliance with relevant international guidelines (European Union procedures on animal experimentation—Directive 2010/63/EU) that regulate the protection of animals used for scientific purposes [10]. These define that in the case of experiments carried out under standard production conditions, no approval from an ethics committee is required. The slaughtering was performed at the commercial abattoir “La Protectora S.A.” in Pamplona (Spain, 42°49′13.07″N, 1° 40′ 51.65″ W) following the European Union regulations (Council Regulation, EC, No 1099/2009) [11] that regulate the protection of animals at the time of killing. Therefore, animals included in this experiment were subjected to the same welfare conditions as production animals in farms and abattoir, and all efforts were made to minimize suffering.

Animals, diets and tissue sampling

Thirty-three unrelated male Navarra breed lambs (11 lambs per group) were weaned at 16.3 ± 0.3 kg of body weight and 55.1 ± 1.5 d of age and allocated randomly to one of the three treatment groups: control group (C), concentrate composed of barley and soybean; linseed group (L), barley and soybean with 10% linseed (DM basis) supplied by Valomega 160 (Pinallet S.A., Cardona, Spain) consisting of 70% Tradi-LIN extruded linseed and 30% wheat bran; linseed and algae group (L-A), barley and soybean with 5% linseed (DM basis) and 3.89% marine microalgae (DM basis; Market DHA Gold, *Schizochytrium* spp.; Market Biosciences Corp., Columbia, MD, USA). Both linseed and marine algae in LA diet supplied the same amount of crude fat. The three diets were isoproteic and isoenergetic (Table 1).

Table 1. Ingredients, chemical composition and fatty acid composition of experimental diets.

Item ²	Treatment ¹		
	C	L	L-A
Ingredient, % DM			
Barley	74.03	65.17	66.19
Soybean meal	22.37	16.94	19.20
Extruded linseed (Valomega 160) ³	-	14.29	7.15
Marine microalgae (DHA-Gold) ⁴	-	-	3.89
CaCO ₃	1.76	1.76	1.76
NaHCO ₃	1.00	1.00	1.00
NaCl	0.50	0.50	0.50
Mineral vitamin supplement ⁵	0.30	0.30	0.30
Flavorings	0.04	0.04	0.04
Chemical composition, % DM			
CP	16.87	16.63	16.54
Crude fat	2.93	6.10	6.68
Crude fiber	4.35	4.63	4.30
Ash	5.23	5.54	5.77
Metabolizable energy, Mcal/kg	2.70	2.75	2.80
Fatty acid composition, g/100 g of total FAME			
C16:0	24.0	13.2	19.9
C18:0	3.29	3.20	2.60
C20:0	0.11	0.13	0.15
C18:1 <i>c</i> -9	12.1	15.8	11.1
C18:2 <i>c</i> -9, <i>t</i> -11 (CLA)	0.24	0.25	0.08
C18:2 <i>n</i> -6 (LA)	48.5	30.5	28.3
C18:3 <i>n</i> -6	0.05	0.17	0.16
C18:3 <i>n</i> -3 (ALA)	4.43	33.5	22.6
C20:5 <i>n</i> -3 (EPA)	0.08	0.04	0.34
C22:6 <i>n</i> -3 (DHA)	0.01	0.01	6.61

¹Treatments: C = control; L = 10% linseed; L-A = 5% linseed with 3.89% marine algae.

²CP = crude protein; FAME = fatty acid methyl esters; LA = linoleic acid; ALA = α-linolenic acid; EPA = eicosapentaenoic acid; DHA = docosahexaenoic acid.

³Valomega 160 (Pinallet S.A., Cardona, Spain). Product consisted of 70% Tradi-LIN extruded linseed and 30% wheat bran.

⁴DHA-Gold (Market Biosciences Corp., Columbia, MD, USA). Algal meal high in DHA derived from *Schizochytrium* spp.

⁵Composition, content per kilogram: vitamin A (2,000,000 IU), vitamin D3 (550,000 IU), vitamin E (2000 mg), vitamin B2 (125 mg), vitamin B1 (125 mg), Mg (12,500 mg), Mn (6125 mg), Zn (9900 mg), I (100 mg), Fe (3300 mg), Cu (1100 mg), Co (150 mg), Se (25 mg), anti-rust (62.5 mg).

doi:10.1371/journal.pone.0156765.t001

The lambs were reared in adjacent pens under the same environmental conditions and were given *ad libitum* access to concentrate feed throughout the experimental period. Lambs were weighed twice weekly in the morning before feeding and were slaughtered at common targeted body weight of 26.7 ± 0.3 kg, which is the commercial slaughter weight (24–28 kg LW) for this type of lambs. Animals were transported to the abattoir “La Protectora S.A.” (42°49’13.07”N, 1° 40’ 51.65” W) and immediately after slaughter, carcasses were weighed (hot carcass weight). Samples (5 g) of SC AT and IM AT of *Longissimus dorsi* for RNA analysis were taken at the

10th rib of the right carcass side with a scalpel blade, collected in hermetically sealed bags, snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. Samples of SC and IM AT (1 g) for adipocyte size determination were taken at the 10th rib of the right carcass side and placed in glass vials containing 10 mL of Tyrode's solution (0.15 M NaCl; 6 mM KCl; 2 mM CaCl₂; 6 mM glucose; 2 mM NaHCO₃, pH 7.62) at 39°C. Samples were transported (approximately 20 min) to the Animal Production Laboratory at the Public University of Navarre in thermos containers filled with water warmed to that same temperature.

After chilling for 24 h at 4°C, carcasses were weighed (cold carcass weight) and back fat thickness was measured using a calibre on both half-carcasses at a point located 4 cm from the spinal column laterally behind the last rib. The 10th rib from the left carcass side was removed, weighed and stored at 4°C for analysis. Bone, muscle and adipose tissue (SC and intermuscular) were determined gravimetrically after dissection using the methodology of Colomer-Rocher et al. [12]. The *Longissimus dorsi* area at the 10th rib and its content of IM fat was determined by image analysis technique [13]. Samples of SC and IM AT for FA analysis were taken from the 11th to 13th thoracic rib section from the left carcass side and frozen at -20°C. Samples for thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and sensory analysis were aged under vacuum in pouches of polyamide/polyethylene (120 µm and 1 cc/m²/24h O₂ permeability, 3 cc/m²/24h CO₂ permeability and 0.5 cc/m²/24h N₂ permeability, measured at 5°C and 75% relative humidity; Vaeseen Schoemarket Ind. Spain) for 4 d postmortem in the dark and then frozen at -20°C until analysis.

Adipocyte cellularity

The samples used to determine adipocyte size were digested with collagenase to dissolve the matrix of connective tissue surrounding the adipocytes [14]. The diameter of the adipocytes from each depot (200 approximately) was measured using an image analysis software (Image-Pro Plus 5.1) as described by Mendizabal et al. [15]. The number of adipocytes in the SC and IM AT were calculated based on the amount of adipose tissue, the mean adipocyte volume, the lipid content of the adipose tissue, and a lipid density value of 0.915 g/mL, assuming the cells are of spherical shape (lipid weight × chemical lipid content / 0.915 × mean adipocyte volume).

Fatty acid composition

For FA determination, duplicate 1–2 g *Longissimus dorsi* muscle and 0.2–0.3 g SC AT was saponified in 6 ml of 5 M KOH in methanol/water (50:50, v/v) at 60°C for 60 min, and the extracted FA were methylated using 2 M trimethylsilyl-diazomethane in methanol:toluene (2:1, v/v) at 40°C for 20 min based on the method of Whittington et al. [16] as described in Urrutia et al. [5]. Analysis was performed by gas chromatography using a BPX-70 (SGE U.K. Ltd.) fused-silica capillary column (120 m × 0.22 mm i.d. × 0.2 µm film thickness). The fatty acid methyl esters were separated by gas chromatography (Agilent model 7890) using a flame ionization detector and hydrogen as the carrier gas. The oven temperature was initially set at 50°C, gradually ramped up to 240°C, and held there until the end of the cycle (15 min approximately). Fatty acid methyl esters were identified based on similar peak retention times using standards when available (Sigma Chemical Co. Ltd., Poole, UK). Fatty acids were quantified using tricosanoic acid methyl ester (C23:0), added prior to saponification, as an internal standard. The results were expressed as grams per 100 grams of total identified fatty acid methyl esters. Column response and linearity were checked using a mixture of fatty acids (C16:0, C18:0, C18:1 *n*-9, C18:2 *n*-6, relative to internal standard C23:0, Sigma Chemical Co. Ltd., Poole, UK). In these chromatographic conditions, separation of the isomers C18:1 *t*-10 and C18:1 *t*-11 was not possible in all samples, and thus, C18:1 *t*-10 + C18:1 *t*-11 was reported.

Gene expression

Total RNA was isolated from 100 mg of SC AT using the RNasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) and from 200 mg of *Longissimus dorsi* using the GenElute Mammalian total RNA Miniprep Kit (Sigma–Aldrich Química, Madrid, Spain) according to the manufacturers' instructions. Concentration and purity of the total RNA were calculated using a Nanodrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Madrid, Spain). The RNA was treated with DNase to remove genomic DNA using RQ1 RNases-Free DNase (Promega Corporation, Madison, WI, USA) and single-stranded cDNA was synthesized from 1.5 µg of total RNA using M-MLV Reverse Transcriptase (Promega Corporation, Madison, USA) according to the manufacturer's instructions.

Four reference genes, including β -actin (*ACTB*), cyclophilin (*PPIA*), 18S ribosomal RNA (*18S RNA*) and glyceraldehyde phosphate dehydrogenase (*GAPDH*), were analyzed by using the GeNorm program [17] to determine the suitable reference gene to express accurately the relative gene expression of the selected markers. The overall stability of the tested reference genes was measured by calculating the gene expression stability (M-value): β -actin showed the best M-value (0.16), below the 1.5 cut-off value specified by the GeNorm program. Adding additional reference genes did not decrease the M-value, indicating there was no increase in stability by using extra reference genes. Therefore, β -actin was selected as reference gene for normalization. Acetyl-CoA carboxylase 1 (*ACACA*), lipoprotein lipase (*LPL*), stearoyl-CoA desaturase (*SCD*), peroxisome proliferator-activated receptor gamma (*PPARG*) and CAAT-enhancer binding protein alpha (*CEBPA*), sterol regulatory element-binding factor 1 (*SREBF1*), fatty acid desaturase 1 (*FADS1*), fatty acid desaturase 2 (*FADS2*) and fatty acid elongase 5 (*ELOVL5*) expression was quantified by real-time qPCR. Oligonucleotides for the real time qPCR (S1 Table) were designed using Primer3 Software (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>). Relative transcript quantification of samples was performed using an ABI PRISM 7900 Sequence Detector (Applied Biosystems, Madrid, Spain). PCR products were cloned into pGEM-T Easy vector (Promega Corporation, Madison, USA) and chemically transformed into NEB 10-beta *E. coli* (New England Biolabs Inc., UK). qPCR efficiency was estimated by standard curve calculation using a 10-fold dilution series of plasmid DNA and confirmed using a 10-fold dilution series of pooled cDNA. Real-time qPCR reactions to compare variability among groups and standard curves were performed in a total volume of 25 µl containing 5 µl pooled cDNA template, 6 µl SYBR Premix Ex Taq (Takara, Japan), 0.6 µl forward and reverse primers (5 µM each), and 12.8 µl DNase/RNase free water. Real-time qPCR conditions were: 50°C/2 min, 95°C/10 min, 45 cycles of 95°C/15 s and 60°C/1 min, followed by amplicon dissociation (95°C/15 s, 60°C/15 s, 95°C/15 s). Dissociation curves were examined for the presence of a single PCR product. Efficiency of PCR amplification for each gene was calculated using the standard curve method ($E = 10^{-1/slope}$) [18] and relative gene expression was calculated with the comparative, efficiency-corrected $\Delta\Delta C_T$ method [19], using β -actin for gene expression normalization.

Meat quality and sensory analysis

Carcass color [20] of the *Lattisimus dorsi* muscle and SC AT (12th rib) was measured at 24 h postmortem using a Minolta CM2002 spectrophotometer (D65 illuminant, 8-mm diameter aperture, 10° standard observer, 8° viewing angle; Minolta Inc., Osaka, Japan) and lightness (L^*), redness (a^*) and yellowness (b^*) were recorded.

The pH value of the *Longissimus dorsi* (6th and 12th rib) was determined at 24 h postmortem with an Orion Research Potentiometer (Orion Research Inc., Barcelona, Spain) for solid samples. Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) were analysed in meat aged 4 d

postmortem by the method of Tarladgis et al. [21]. Absorbancies at 532 nm, measured with a spectrophotometer (model UV-2101 PC; Shimadzu, Japan), were converted to milligrams of malonaldehyde per kilogram meat and reported as TBARS values.

The sensory evaluation of the meat aged 4 d postmortem was conducted by an 88-member consumer panel. Consumers were recruited through a specialized company by gender (46.6% male and 53.41% female) and age (18–30 years, 30–45 years, > 45 years) with the restriction that selected panelists had to be consumers of lamb meat. *Longissimus dorsi* meat samples were thawed at 4°C for 24 h and were evaluated after grilled (model BBC-842 Grill 230 V-2,000 W, Fagor Inc., Spain) at 200°C until reaching an internal temperature of 70°C. Immediately, the samples were cut into portions of 1.5 cm long, wrapped in an aluminium foil, and kept warm for 5 min maximum in a sand bath until sensory evaluation. There were 11 testing sessions (8 panelists per session). Panelists were offered three samples (one sample per treatment) in a random order and the 8 panelists evaluated the same combination of three samples. The only information given to each panelist prior to tasting was that the sample was of lamb meat. Each panelist was supplied with unsalted saltine crackers and mineral water for palate cleansing between samples. The consumers were asked to evaluate each sample based on odor, flavor, tenderness, juiciness and a global acceptability using an 8-point hedonic scale, which ranged from “dislike very much” to “like very much”. Panelists were also asked to record comments on atypical flavors.

Statistical methods

Results were analysed statistically using one-way ANOVA (IBM SPSS Statistics 21.0) to determine the main effect of diet. Previously, adipose tissue weight and adipocyte number and diameter and sensory data were logarithmically (\log_{10}) transformed to satisfy the conditions of normality. Adipocyte size frequency distributions was studied by grouping according to adipocyte diameter (> 30 μm , 30–60 μm , 60–90 μm , 90–120 μm , and > 120 μm). The model used was:

$$y_{ij} = \mu + G_i + e_{ij}$$

where y_{ij} = growth and carcass parameters, adipocyte cellularity, FA composition, color, pH, TBARS and sensory variables; μ = mean value, G_i = fixed effect of group ($i = 1$: C; $i = 2$: L; $i = 3$: L-A); e_{ij} = random residual effect.

Differences among means were tested by Tukey's HSD Test. Statistical significance was accepted at $P < 0.05$ and statistical trends at $P < 0.10$.

Differences in gene expression among diets were tested for statistical significance using REST algorithm (REST 2009; Relative Expression Software Tool, Version V2.0.13) [22].

Results

Growth and carcass parameters

Growth and carcass parameters are presented in Table 2. No differences in average daily gain (ADG) and slaughter age of lambs were observed in linseed fed lambs compared to the C group lambs ($P > 0.05$). By contrast, lambs fed L-A diet showed lower ADG, and therefore, greater slaughter age compared to C and L fed diets ($P < 0.001$). Feed intake of lambs in C, L and LA groups were 1,020, 1,002 and 790 $\text{g}\cdot\text{lamb}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$, respectively. Moreover, hot carcass weight and cold carcass weight of the three groups of lambs were not different ($P > 0.05$).

Table 2. Effects of addition of linseed or linseed and marine algae to the diet on growth and carcass parameters of Navarra breed lambs.

Item	Treatment ¹			SEM	P-value
	C	L	L-A		
Weaning weight, kg	16.2	16.3	16.4	0.32	0.955
Weaning age, d	52.6	55.6	57.1	1.54	0.137
ADG ² , g/d	382 ^A	350 ^A	234 ^B	15.7	<0.001
Slaughter age, d	80.6 ^B	85.9 ^B	99.0 ^A	2.48	<0.001
Slaughter weight, kg	26.9	26.9	26.2	0.31	0.241
Hot carcass weight, kg	11.8	12.0	11.6	0.17	0.174
Cold carcass weight, kg	11.4	11.6	11.2	0.20	0.121

^{A,B}Means with different uppercase superscripts within a row are different ($P < 0.01$).

¹Treatments: C = control; L = 10% linseed; L-A = 5% linseed with 3.89% marine algae.

²Weaning to slaughter.

doi:10.1371/journal.pone.0156765.t002

Adipose tissue development

The composition of the 10th rib and adipocyte cellularity of SC and IM AT are shown in [Table 3](#). There were no significant differences in 10th rib weight, back fat thickness, muscle and bone weights, SC and intermuscular fat content, and *Longissimus dorsi* area and fat content among three groups of lambs ($P > 0.05$).

The number of adipocytes of IM and SC AT did not differ among three groups of lambs ($P > 0.05$). Mean IM adipocyte diameter was not different among dietary treatments ($P > 0.05$) whilst L and L-A group lambs adipocyte diameter showed a tendency to increase in SC AT compared to those fed control diet ($P = 0.057$). The adipocyte size distribution in SC AT revealed that the relative frequency of < 30 μm adipocyte class was lower in L-A group ($P < 0.05$) and 30–60 μm adipocyte class in L group lambs compared to C group lambs ($P < 0.05$). Moreover, the frequency of fat cells was significantly greater in 90–120 μm class in L-A group lambs ($P < 0.05$). [Fig 1A](#) illustrates the SC adipocyte diameter size bimodal distribution for the three groups of lambs, with peaks at 20–30 μm and 90–100 μm . On the other hand, [Fig 1B](#) shows IM adipocyte size asymmetrical distribution in lambs of the three dietary treatments. The largest proportion of the adipose cells were those with a 20–30 μm . The adipocyte size frequency distributions revealed no differences for < 30 μm , 30–60 μm and > 60 μm adipocyte classes among three groups of lambs in IM AT ($P > 0.05$).

Fatty acid composition

Regarding some of the FA derived from ruminal biohydrogenation, the inclusion of linseed or linseed with algae in the diet increased the contents of C18:1 *t*-10 + C18:1 *t*-11 in both SC and IM AT compared to C group lambs ($P < 0.001$; [Tables 4](#) and [5](#)). Moreover, the content of C18:0 decreased in L-A group lambs compared to L group lambs in both SC and IM AT ($P < 0.05$). Additionally, C16:1 *c*-9 and oleic acid (C18:1 *c*-9) contents decreased in L and L-A group lambs in both AT ($P \leq 0.001$). There were no differences in C18:2 *c*-9, *t*-11 (CLA) content in L group lambs in SC AT and L and L-A in IM AT compared to C group ($P > 0.05$), but decreased in L-A group lambs in SC AT compared to C and L groups ($P < 0.001$).

Both linseed and linseed and algae addition increased ALA levels in both SC (418.9% and 127.0% for L and L-A, respectively; $P < 0.001$) and IM AT (360.0% and 122.5% for L and L-A, respectively; $P < 0.001$). Moreover, the inclusion of linseed in the diet increased concentrations of ALA derivatives EPA in IM AT and DPA in both AT compared to C group ($P < 0.01$).

Table 3. Effects of addition of linseed or linseed and marine algae to the diet on carcass traits of the 10th rib, number and diameter of adipocytes in subcutaneous and intramuscular adipose tissue of Navarra breed lambs.

Item	Treatment ¹			SEM	P-value	
	C	L	L-A			
Carcass characteristics of the 10 th rib						
10 th rib weight, g	74.2	77.2	75.9	2.85	0.753	
Back fat thickness, mm	2.58	3.34	2.49	0.32	0.141	
Muscle weight, g	36.0	34.8	33.7	1.43	0.527	
Bone weight, g	18.8	18.4	18.2	1.16	0.928	
Subcutaneous fat, g	11.5	13.5	12.5	1.04	0.419	
Intermuscular fat, g	6.38	5.86	7.38	0.59	0.208	
<i>Longissimus dorsi</i> area, cm ²	14.9	15.4	14.7	0.44	0.555	
<i>Longissimus dorsi</i> intramuscular fat, %	3.12	2.75	3.59	0.33	0.224	
Adipocyte number, 10 ⁶						
Subcutaneous ²	55.9	55.5	43.9	11.1	0.696	
Intramuscular ³	69.0	96.5	73.6	20.9	0.680	
Adipocyte diameter						
Subcutaneous ²	Mean, μm	55.2	64.5	67.6	3.01	0.057
	Relative frequency, %					
	< 30 μm	40.6 ^a	33.6 ^{ab}	27.8 ^b	3.17	0.030
	30–60 μm	19.9 ^a	13.0 ^b	14.2 ^{ab}	1.72	0.018
	60–90 μm	19.6	21.8	24.1	2.60	0.500
	90–120 μm	15.8 ^b	23.6 ^{ab}	28.2 ^a	2.86	0.022
	> 120 μm	4.22	8.01	5.71	1.65	0.308
Intramuscular ³	Mean, μm	32.7	31.4	32.6	1.44	0.777
	Relative frequency, %					
	< 30 μm	56.3	62.4	61.3	3.97	0.522
	30–60 μm	37.4	31.1	28.2	3.22	0.141
	> 60 μm	6.37	6.60	10.54	1.57	0.158

^{a,b}Means with different lowercase supercripts within a row are different ($P < 0.05$).

¹Treatments: C = control; L = 10% linseed; L-A = 5% linseed with 3.89% marine algae.

²Obtained from the subcutaneous fat at the 10th rib.

³Obtained from the *Longissimus dorsi* at the 10th rib.

doi:10.1371/journal.pone.0156765.t003

However, tissue levels of DHA did not increase ($P > 0.05$). The proportions of EPA, DPA and also DHA increased in L-A group lambs compared to C in both AT ($P < 0.01$).

Linoleic acid (LA) content decreased in SC AT of L and L-A group lambs compared to C group ($P < 0.001$), but in the IM AT this FA content was similar among three groups of lambs ($P > 0.05$). Addition of linseed had no effect on the content of LA derivatives C20:3 *n*-6 and AA in SC AT and C18:3 *n*-6, C20:3 *n*-6 and AA of IM AT of lambs. On the contrary, the partial substitution of linseed with algae increased C20:3 *n*-6 and AA in L-A group lambs compared to L group lambs in both studied tissues ($P < 0.001$). Compared to C group lambs, L-A group lambs presented greater content of C20:3 *n*-6 and AA in the SC AT ($P < 0.001$), but these FA content were similar to C group in the IM AT.

The inclusion of either linseed or linseed in combination with algae resulted in a reduction of the *n*-6/*n*-3 ratio in the muscle of lambs ($P < 0.001$); however, only linseed addition reduced the *n*-6/*n*-3 ratio to a value lower than the recommended value of 4.0 due to the greater content

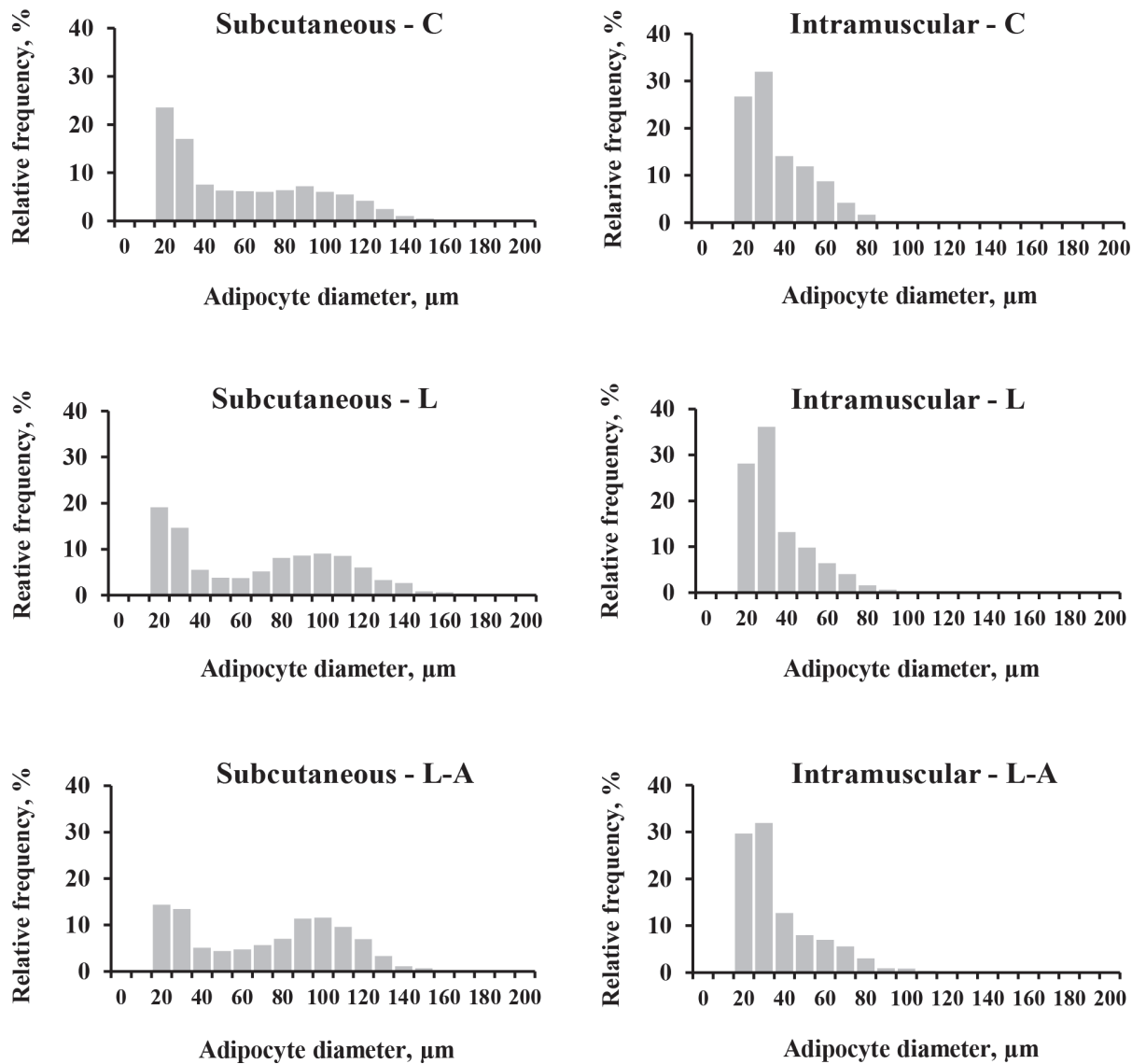


Fig 1. Effects of addition of linseed or linseed and algae to the diet on adipocyte size distribution of lambs. A, analysis of subcutaneous adipocyte size distribution of Navarra breed lambs. B, analysis of intramuscular adipocyte size distribution of Navarra breed lambs. C = control; L = 10% linseed; L-A = 5% linseed with 3.89% algae.

doi:10.1371/journal.pone.0156765.g001

of *n*-3 PUFA in the linseed diet. Additionally, feeding linseed increased PUFA/SFA ratio to a value close to the recommended 0.45 [23].

Gene expression

The expression of *PPARG* and *CEBPA* in linseed or linseed with algae groups was greater than in control diet fed lambs in SC AT ($P < 0.05$; Table 6). By contrast, the expression of these transcription factors in IM AT of lambs was not affected by diet ($P > 0.05$). The expression of *SREBF1* was not affected by added linseed or linseed with algae in both SC and IM AT compared to C group lambs ($P > 0.05$). Furthermore, in the present work, the partial substitution of linseed with algae decreased the expression of *SREBF1* in the IM AT of L-A group lambs

Table 4. Effects of addition of linseed or linseed and marine algae to the diet on fatty acid composition (g/100 g of total identified fatty acid methyl esters) in subcutaneous adipose tissue of Navarra breed lambs.

Item ²	Treatment ¹			SEM	P-value
	C	L	L-A		
SFA					
C12:0	0.86 ^{Aa}	0.51 ^{Bb}	0.71 ^a	0.05	<0.001
C14:0	6.31 ^A	5.05 ^B	6.35 ^A	0.22	<0.001
C16:0	27.5 ^C	26.0 ^B	32.0 ^A	0.38	<0.001
C18:0	11.9 ^{ab}	12.8 ^A	11.5 ^B	0.30	0.028
C20:0	0.09 ^a	0.08 ^b	0.08 ^b	0.00	0.030
Total SFA ³	49.9 ^B	49.9 ^B	54.8 ^A	0.80	<0.001
MUFA					
C16:1 <i>c</i> -9	1.86 ^A	1.34 ^B	1.37 ^B	0.07	<0.001
C18:1 <i>t</i> -10 + C18:1 <i>t</i> -11	6.66 ^C	13.41 ^A	11.53 ^B	0.50	<0.001
C18:1 <i>c</i> -9 (oleic acid)	28.4 ^A	22.2 ^B	21.4 ^B	0.60	<0.001
C18:1 <i>c</i> -11	1.73 ^A	1.13 ^B	1.27 ^B	0.05	<0.001
C20:1 <i>c</i> -11	0.04 ^b	0.05 ^{Aa}	0.03 ^{Bb}	0.00	0.001
Total MUFA ³	42.2 ^{Aa}	41.0 ^a	38.1 ^{Bb}	0.70	0.001
C18:2 <i>c</i> -9, <i>t</i> -11 (CLA)	0.16 ^A	0.15 ^A	0.11 ^B	0.01	<0.001
∑CLA ⁴	0.40 ^B	0.48 ^A	0.31 ^C	0.02	<0.001
<i>n</i>-3 PUFA					
C18:3 <i>n</i> -3 (ALA)	0.37 ^C	1.92 ^A	0.84 ^B	0.05	<0.001
C20:5 <i>n</i> -3 (EPA)	0.07 ^B	0.10 ^B	0.21 ^A	0.01	<0.001
C22:5 <i>n</i> -3 (DPA)	0.05 ^C	0.08 ^B	0.12 ^A	0.01	<0.001
C22:6 <i>n</i> -3 (DHA)	0.02 ^B	0.04 ^B	0.58 ^A	0.03	<0.001
Total <i>n</i> -3 PUFA	0.51 ^C	2.14 ^A	1.75 ^B	0.05	<0.001
<i>n</i>-6 PUFA					
C18:2 <i>n</i> -6 <i>t</i> -9, <i>t</i> -12	0.10 ^C	1.18 ^A	0.50 ^B	0.04	<0.001
C18:2 <i>n</i> -6 (LA)	3.93 ^A	2.46 ^{Bc}	1.89 ^{Bd}	0.14	<0.001
C20:3 <i>n</i> -6	0.04 ^B	0.05 ^B	0.08 ^A	0.05	<0.001
C20:4 <i>n</i> -6 (AA)	0.17 ^B	0.15 ^B	0.28 ^A	0.01	<0.001
Total <i>n</i> -6 PUFA ³	4.24 ^a	3.84 ^{ab}	3.25 ^a	0.19	0.035
Total PUFA	4.57 ^B	5.84 ^A	4.51 ^B	0.23	<0.001
<i>n</i> -6 PUFA/ <i>n</i> -3 PUFA	8.32 ^A	1.78 ^B	2.82 ^C	0.10	<0.001
PUFA/SFA	0.10 ^{AB}	0.12 ^A	0.08 ^B	0.01	0.006

^{a,b,c}Means with different lowercase supercripts within a row are different ($P < 0.05$).

^{A,B,C}Means with different uppercase supercripts within a row are different ($P < 0.01$).

¹Treatments: C = control; L = 10% linseed; L-A = 5% linseed with 3.89% marine algae.

²ALA = α -linolenic acid; EPA = eicosapentaenoic acid; DPA = docosapentaenoic acid; DHA = docosahexaenoic acid; LA = linoleic acid; AA = arachidonic acid.

³Total SFA, MUFA and *n*-6 PUFA is the sum of all SFA, MUFA and *n*-6 PUFA.

⁴∑CLA = C18:2 *c*-9, *t*-11 + C18:2 *t*-10, *c*-12 + C18:2 *c*-9, *c*-11 + C18:2 *t*-9, *t*-11.

doi:10.1371/journal.pone.0156765.t004

compared to L group lambs (the fold change value was 0.39 in L-A group relative to L group; $P = 0.021$).

There were no differences in the abundance *SCD* mRNA in linseed fed lambs in SC AT whereas feeding linseed with algae decreased the expression of *SCD* ($P < 0.01$). In the IM AT, the expression of *SCD* was downregulated in both L and L-A group lambs ($P < 0.001$). The

Table 5. Effects of addition of linseed or linseed and marine algae to the diet on fatty acid composition (g/100 g of total identified fatty acid methyl esters) in intramuscular adipose tissue of Navarra breed lambs.

Item ²	Treatment ¹			SEM	P-value
	C	L	L-A		
Total fatty acids (mg/100 g muscle)	3,125	2,943	3,158	196	0.726
SFA					
C12:0	0.57 ^A	0.37 ^B	0.38 ^B	0.03	<0.001
C14:0	4.28 ^a	3.67 ^b	4.02 ^{ab}	0.14	0.021
C16:0	27.3 ^C	26.8 ^B	31.5 ^A	0.40	<0.001
C18:0	13.7 ^A	13.5 ^A	12.5 ^B	0.20	0.001
C20:0	0.03	0.13	0.03	0.04	0.413
Total SFA ³	48.9 ^b	47.5 ^{Bb}	50.7 ^{Aa}	0.50	<0.001
MUFA					
C16:1 c9	1.64 ^{Aa}	1.42 ^b	1.28 ^{Bb}	0.06	0.001
C18:1 t-10 + C18:1 t-11	2.88 ^B	7.04 ^A	7.93 ^A	0.50	<0.001
C18:1 c-9 (oleic acid)	28.9 ^A	24.9 ^{Ba}	21.3 ^{Bb}	0.80	<0.001
C18:1 c-11	1.84	1.68	1.63	0.10	0.369
C20:1 c-11	0.10 ^b	0.40 ^a	0.07 ^b	0.06	0.040
Total MUFA ³	37.1 ^{Aa}	36.3 ^a	33.8 ^{Bb}	0.70	0.004
C18:2 c-9, t-11 (CLA)	0.12	0.11	0.16	0.02	0.450
∑ CLA ⁴	0.26	0.30	0.29	0.02	0.652
n-3 PUFA					
C18:3 n-3 (ALA)	0.40 ^C	1.84 ^A	0.89 ^B	0.09	<0.001
C20:5 n-3 (EPA)	0.19 ^B	0.74 ^A	1.01 ^A	0.09	<0.001
C22:5 n-3 (DPA)	0.23 ^{Bb}	0.31 ^a	0.32 ^{Aa}	0.02	0.002
C22:6 n-3 (DHA)	0.05 ^B	0.08 ^B	0.99 ^A	0.02	<0.001
Total n-3 PUFA ³	1.04 ^{Bb}	4.32 ^A	3.21 ^a	0.37	<0.001
n-6 PUFA					
C18:2 n-6 t-9, t-12	0.09 ^C	0.45 ^A	0.29 ^B	0.03	<0.001
C18:2 n-6 (LA)	7.77	6.78	5.97	0.53	0.072
C18:3 n-6	0.08	0.08	0.07	0.04	0.295
C20:2 n-6	0.07 ^B	0.07 ^B	0.11 ^A	0.01	<0.001
C20:3 n-6	0.19 ^a	0.15 ^{Bb}	0.22 ^{Aa}	0.01	<0.001
C20:4 n-6 (AA)	2.71 ^b	2.16 ^{Cc}	3.35 ^{Aa}	0.19	<0.001
C22:4 n-6	0.18 ^A	0.13 ^B	0.06 ^C	0.01	<0.001
Total n-6 PUFA ³	11.09	9.82	10.86	0.69	0.401
Total PUFA	12.2	14.2	13.9	0.60	0.051
n-6 PUFA/n-3 PUFA	10.46 ^A	3.76 ^B	4.44 ^B	0.54	<0.001
PUFA/SFA	0.25 ^b	0.30 ^a	0.27 ^{ab}	0.01	0.050

^{a,b,c}Means with different lowercase supercripts within a row are different ($P < 0.05$).

^{A,B,C}Means with different uppercase supercripts within a row are different ($P < 0.01$).

¹Treatments: C = control; L = 10% linseed; L-A = 5% linseed with 3.89% marine algae.

²ALA = α -linolenic acid; EPA = eicosapentaenoic acid; DPA = docosapentaenoic acid; DHA = docosahexaenoic acid LA = linoleic acid; AA = arachidonic acid.

³Total SFA, MUFA, n-3 PUFA and n-6 PUFA is the sum of all SFA, MUFA, n-3 PUFA and n-6 PUFA.

⁴∑CLA = C18:2 c-9, t-11 + C18:2 t-10, c-12 + C18:2 c-9, c-11 + C18:2 t-9, t-11.

doi:10.1371/journal.pone.0156765.t005

Table 6. Effects of addition of linseed or linseed and marine algae to the diet on relative mRNA expression of lipid metabolism genes in subcutaneous and intramuscular adipose tissues of Navarra breed lambs.

Gene ¹	Tissue	Treatment ²	FC ³	Std. Error ⁴	P-value	Result
PPARG	SC	L	7.42	2.99–17.29	0.012	UP
		L-A	10.6	1.57–50.19	0.032	UP
	IM	L	0.98	0.38–2.61	0.961	NR ⁵
		L-A	0.87	0.27–2.39	0.771	NR
CEBPA	SC	L	1.94	1.29–2.80	0.024	UP
		L-A	8.13	1.48–23.80	0.040	UP
	IM	L	0.54	0.27–1.15	0.119	NR
		L-A	0.54	0.27–1.15	0.099	NR
SREBF1	SC	L	1.01	0.60–1.92	0.977	NR
		L-A	1.70	0.18–6.12	0.518	NR
	IM	L	1.12	0.43–3.11	0.813	NR
		L-A	0.44	0.14–1.18	0.110	NR
SCD	SC	L	0.83	0.49–1.43	0.213	NR
		L-A	0.51	0.37–0.88	0.003	DOWN
	IM	C/L	0.07	0.04–0.13	<0.001	DOWN
		L-A	0.53	0.29–0.95	<0.001	DOWN
ACACA	SC	L	0.74	0.53–1.25	0.044	DOWN
		L-A	0.09	0.05–0.13	<0.001	DOWN
	IM	L	0.61	0.37–0.98	<0.001	DOWN
		L-A	0.24	0.15–0.41	<0.001	DOWN
LPL	SC	L	1.18	0.73–1.77	0.169	NR
		L-A	0.52	0.34–0.78	0.002	DOWN
	IM	L	1.83	1.09–3.16	0.095	NR
		L-A	0.41	0.23–0.73	0.032	DOWN
FASD1	SC	L	2.13	0.49–16.33	0.609	NR
		L-A	0.26	0.08–0.92	0.086	NR
	IM	L	0.11	0.04–0.30	0.001	DOWN
		L-A	0.11	0.04–0.32	0.001	DOWN
FASD2	SC	L	3.15	0.48–14.22	0.236	NR
		L-A	0.42	0.14–1.54	0.293	NR
	IM	L	0.31	0.18–0.52	<0.001	DOWN
		L-A	0.13	0.06–0.22	<0.001	DOWN
ELOVL5 ⁶	SC	L	3.50	1.69–8.08	0.101	NR
		L-A	0.30	0.16–0.59	0.203	NR

¹PPARG = peroxisome proliferator-activated receptor gamma; CEBPA = CAAT-enhancer binding protein alpha; SREBF1 = sterol regulatory element-binding factor 1; SCD = stearyl-CoA desaturase; ACACA = acetyl-CoA carboxylase 1; LPL = lipoprotein lipase; FASD1 = fatty acid desaturase 1; FASD2 = fatty acid desaturase 2; ELOVL5 = fatty acid elongase 5.

²Treatments: L = 10% linseed; L-A = 5% linseed with 3.89% marine algae.

³FC = Fold change. The values reported represent the fold change relative to control group that has the value of 1.

⁴Std. Error. A range for Standard Error calculated by REST software.

⁵NR = not regulated.

⁶The relative gene expression of ELOVL5 in IM AT was not detected.

doi:10.1371/journal.pone.0156765.t006

expression of ACACA gene was significantly reduced by adding linseed and more intensively by linseed with algae in both SC ($P < 0.05$) and IM AT ($P < 0.001$). Furthermore, ACACA expression decreased in L-A group lambs compared to L group ($P \leq 0.01$). No differences in

LPL gene expression ($P > 0.05$) were observed in linseed fed lambs, whereas linseed with algae-enriched diets decreased *LPL* mRNA levels in both SC ($P < 0.01$) and IM ($P < 0.05$) AT of lambs compared to C group lambs.

Adding either linseed or linseed with algae to the diet did not affect the expression of *FADS1*, *FADS2* and *ELOVL5* in the SC AT ($P > 0.05$). Conversely, in the IM AT, the expression of *FADS1* and *FADS2* genes in L and L-A group lambs was significantly downregulated ($P < 0.001$). Moreover, *FADS2* expression decreased in L-A group lambs compared to L group ($P < 0.01$).

Meat quality and sensory analysis

Carcass pH did not differ among different treatments ($P > 0.05$; Table 7). Additionally, TBARS concentration was significantly greater in *Longissimus dorsi* samples from lambs fed linseed with algae compared to samples from lambs fed the C diet ($P < 0.05$). Regarding carcass color, the samples from SC AT of linseed fed lambs presented an increase in L^* (lightness) and b^* (yellowness) values ($P < 0.01$) and the SC AT of lambs fed linseed with algae showed a greater L^* value and lower a^* value than lambs fed the control diet ($P < 0.001$). In muscle samples, there were no differences in a^* value (redness) among three dietary groups ($P > 0.05$). The b^* value of L and L-A groups meat increased compared to C group meat and also L^* value in L-A group meat ($P < 0.001$).

Sensory attributes of meat (odor, flavor, tenderness, juiciness and overall acceptability) did not differ in L group meat compared to C group (Table 8). Conversely, L-A group meat presented reduced ratings for odor, flavor and overall acceptability compared to C and L groups ($P < 0.01$). Furthermore, off-flavors were detected by 48.9% of the panelists, from which 13.6% of the consumers identified this off-flavor as “fishy flavor”.

Table 7. Effects of addition of linseed or linseed and marine algae to the diet on meat quality traits of Navarra breed lambs.

Item	Treatment ¹			SEM	P-value
	C	L	L-A		
pH					
<i>Longissimus dorsi</i> at the 6 th rib	5.80	5.77	5.81	0.04	0.401
<i>Longissimus dorsi</i> at the 12 th rib	5.85	5.85	5.92	0.03	0.818
Carcass color ²					
Subcutaneous adipose tissue ³					
L^*	64.4 ^B	66.8 ^A	67.6 ^A	0.5	<0.001
a^*	4.14 ^A	4.26 ^A	2.07 ^B	0.21	<0.001
b^*	10.5 ^b	12.1 ^a	10.7 ^b	0.4	0.006
<i>Latissimus dorsi</i> muscle					
L^*	52.6 ^B	53.0 ^B	56.9 ^A	0.4	<0.001
a^*	14.9	15.1	14.1	0.3	0.137
b^*	13.1 ^B	15.4 ^A	16.5 ^A	0.4	<0.001
<i>Longissimus dorsi</i> TBARS ⁴	0.41 ^b	0.53 ^{ab}	0.74 ^a	0.08	0.017

^{a,b}Means with different lowercase supercripts within a row are different ($P < 0.05$).

^{A,B}Means with different uppercase supercripts within a row are different ($P < 0.01$).

¹Treatments: C = control; L = 10% linseed; L-A = 5% linseed with 3.89% marine algae.

²Objective color measurements; L^* , a^* , and b^* , represents lightness, redness, and yellowness, respectively.

³Obtained from the SC AT at the 12th rib.

⁴TBARS = thiobarbituric acid reactive substance (mg of malonaldehyde per kg of meat).

doi:10.1371/journal.pone.0156765.t007

Table 8. Effects of addition of linseed or linseed and marine algae to the diet on sensory evaluation of *longissimus dorsi* muscle.

Item ²	Treatment ¹			SEM	P-value
	C	L	L-A		
Odor	6.14 ^A	5.84 ^A	5.18 ^B	0.13	<0.001
Flavor	5.98 ^A	5.82 ^A	4.94 ^B	0.14	<0.001
Tenderness	5.99	6.11	5.67	0.14	0.075
Juiciness	5.91 ^{ab}	6.06 ^a	5.56 ^b	0.14	0.034
Overall acceptability	6.07 ^A	5.93 ^A	5.14 ^B	0.13	0.001

^{a,b}Means with different lowercase supercripts within a row are different ($P < 0.05$).

^{A,B}Means with different uppercase supercripts within a row are different ($P < 0.01$).

¹Treatments: C = control; L = 10% linseed; L-A = 5% linseed with 3.89% marine algae.

²Scored using an 8-point hedonic scale: 0 = "dislike very much"; 8 = "like very much".

doi:10.1371/journal.pone.0156765.t008

Discussion

The absence of differences in ADG of L group lambs compared to the C group lambs are in agreement with previous results for Navarra breed lambs fed a diet with the same level of linseed [5]. The results are consistent with those published by Wachira et al. [24] and de la Fuente-Vázquez et al. [25], who reported no differences in these parameters in lambs fed 10.5% and 12.5% of linseed, respectively.

By contrast, the inclusion of algae in combination with linseed (3.89% and 5% DM, respectively) in the diet reduced ADG and hence the slaughter age of lambs increased. The reduction of ADG could be attributed to decreased feed intake, which might be caused by reduced palatability of diets with algae. Moreover, as indicated by works studying the inclusion of fish oil, ADG decrease might also be related to a decrease in microbial growth in the rumen [26] and fibre degradation [27]. In previous studies in which the percentage of algae was lower compared with the levels used in the present study, e.g. 1.92% DM of algae addition [28] and up to 3% DM [29], there was not a reduction in feed intake of lambs. Thus, from these results it could be drawn that levels higher than 3% DM of algae in the diet of lambs could cause a decrease in feed ingestion. Nevertheless, further research is necessary to understand effects of algae inclusion on DMI. Pair-feeding studies may be an useful tool to exclude effects in the animals by differences of feed intake.

The similarity among treatments in carcass characteristics, such as tisular composition of the 10th rib or back fat thickness, is consistent with the results of other authors. De la Fuente-Vázquez et al. [25] did not observe differences in dorsal fat thickness, fat score and the percentage of fat in muscle in lambs fed algae (*Isochrysis* sp.; 4%) and linseed (10.7%) diet. Similarly, Atti et al. [30] fed up to 10% fish meal to lambs and observed no differences in carcass characteristics.

The adipocyte size frequency distributions of SC and IM adipocytes were analysed to gain knowledge of hypertrophy and hyperplasia. Bimodality in frequency histograms of adipose cell diameters may indicate the simultaneous occurrence of both hyperplasia, represented by the population of small cells, and the hypertrophy, represented by the large adipocyte population, during the early development stage of the SC AT in C, L and L-A groups of lambs. These results are in agreement with previous reports showing that the period around 4 months of age is a stage of an important hyperplasic component in the development of the SC AT, followed by a more rapid hypertrophy of these small adipocytes [31,32]. With reference to dietary treatment effect, the adipocyte size frequency distributions of SC AT revealed significantly greater relative

frequency of 90–120 μm adipocytes from L-A lambs compared to C group lambs. Furthermore, the frequency of this adipocyte class for L group was 23.64% vs. 15.76% for C group lambs, although the difference was not statistically significant. When mean adipocyte diameter was compared among three lamb groups, there was also a tendency for adipocyte diameter to increase in L and L-A group lambs in SC AT. These results suggest that the hypertrophy process seemed to be stimulated in L and L-A treatments. Furthermore, the high frequency of 90–120 μm adipocytes observed in lambs fed linseed in combination with algae could be related to the fact that these lambs were slaughtered at significantly greater age than C and L lambs to reach the final slaughter weight. On the other hand, the lower frequency of small adipocytes in L (30–60 μm diameter class) and L-A groups (< 30 μm diameter class) may be due to the conversion of small adipocytes into large adipocytes probably caused by the higher fat content of L and L-A diets compared to C diet. In this sense, Boque et al. [33] reported that rats fed with high-fat diet developed adipocyte hypertrophy in the SC AT without changes in adipocyte number. Fig 1B shows the unimodal IM adipocyte size distribution in the three dietary treatments. In all the groups, the largest proportion of adipocyte cells were those with a 20–30 μm diameter. This is consistent with the fact that the IM AT is a late-developing fat depot compared with SC AT [34,35]. Lack of differences among all adipocyte classes of IM AT were consistent with the similar mean adipocyte diameter and the similar percentage of IM fat among three dietary groups.

A relationship between adipogenic/lipogenic genes and adipocyte cellularity may exist [36,37]. The transcription factors *PPARG* and *CEBPA* are central regulators of adipogenesis, through an induction of the expression of many downstream target genes involved in lipid metabolism [38,3]. *PPARG* is expressed during the late stage of adipocyte differentiation and remains abundantly expressed in differentiated adipocytes [39]. In the SC AT, greater expression of *PPARG* and *CEBPA* in L and L-A group lambs agree with the results reported by Ebrahimi et al. [40], who observed that supplementing linseed oil (0.4 or 1.3% DM) increased the *PPARG* expression in SC AT of growing goats, and by Kronberg et al. [41], who demonstrated a significant increase in *PPARG* mRNA level as a result of an increased *n*-3 FA levels in bovine muscle. Furthermore, Nakamura et al. [39] stated that when PUFA are included in the diet, the profile of *PPARG* targets indicates that the main effect of *PPARG* on glucose metabolism is to increase the activity of G3PDH involved in triglyceride synthesis rather than the induction of *de novo* lipogenesis. Thus, the increase in *PPARG* and *CEBPA* expression of SC AT in the present study may be consistent with the trend towards greater adipocyte diameter of L and L-A group lambs. By contrast, in the IM AT, there were no differences among treatment groups in the expression of *PPARG* and *CEBPA*, which concurs with the lack of differences in adipocyte diameter and adipocyte size frequency distributions among three groups of lambs. These results suggest the differences in the regulation of *PPARG* and *CEBPA* expression by dietary PUFA between both AT could be related to metabolic specificities of each depot [35,42].

The transcription factor *SREBF1* is involved in adipocyte differentiation and cholesterol and FA synthesis, activating genes required for lipid metabolism [43,44]. In this study, the expression of the transcription factor *SREBF1* was not affected by adding linseed or linseed with algae in both SC and IM AT compared to C group lambs. These results are in agreement with the results of Dervishi et al. [45] who reported the *SREBF1* mRNA level in IM AT of lambs was not affected by dietary PUFA (alfalfa grazing). Furthermore, in the present work, the partial substitution of linseed with algae decreased the expression of *SREBF1* in the muscle of L-A group lambs compared to L group lambs. This is consistent with the results of Waters et al. [46] who observed *SREBF1* decreased in bovine muscle when animals were fed a high LCPUFA diet (soybean and fish oil).

It is well known that rumen microbial population transforms unsaturated 18-carbon FA such as ALA and LA through ruminal biohydrogenation; however, it is not well documented if the same processes occur for LCPUFA, such as DHA [47]. *Trans* FA are produced as intermediates during the ruminal biohydrogenation of ALA and LA yielding stearic acid (C18:0) as the final product [48]. On the other hand, it has also been observed PUFA addition modifies the biohydrogenation of PUFA resulting in an accumulation of intermediates, including C18:1 *t*-10 or C18:1 *t*-11 [49]. The results of the present study could suggest a shift in the ruminal biohydrogenation caused by dietary PUFA, which resulted in an increase in the contents of C18:1 *t*-10 + C18:1 *t*-11 in both SC and IM AT in lambs fed either linseed or linseed with algae compared to C group lambs. Moreover, the partial substitution of linseed with algae reduced C18:0 content in both SC and IM AT compared to L group, suggesting algae exerted more inhibitory effects than linseed in the final biohydrogenation step in the rumen. The inhibitory effect of algae on PUFA biohydrogenation was also reported by Boeckaert et al. [50] and Meale et al. [29] in dairy cows and in growing lambs, respectively. Lourenço et al. [51] stated microalgae or fish oil, both rich in EPA and DHA, directly inhibit biohydrogenation and also the growth of ruminal bacteria.

Unlike the ruminant, dietary fatty acids in the non-ruminant are absorbed unchanged before incorporation into the tissue lipids and therefore, dietary lipid sources have a direct and generally predictable effect of fatty acid composition of non-ruminant products [52]. In pigs, Huang et al. [53] fed animals with 10% of linseed 30 d before slaughter and observed higher ALA contents in *longissimus dorsi* muscle (2.46 g/100 of total FA) and SC fat (4.54 of g/100 g of total FA) compared to the results of this study (1.92 g/100 g of total FA in IM AT and 1.84 g/100 g of total FA in SC AT). Similarly, Juárez et al. [54] observed higher percentages of ALA in back fat (5.52 g/100 g of total FA) of pigs fed 10% of linseed for 4 weeks. Moreover, Mourot et al. [55] also observed a higher enrichment in ALA and DHA in tissues than the present study when linseed, linseed-microalgae mixture or microalgae was included in pig's diets and Sardi et al. [56] reported DHA values of 0.23 g/100 g of total FA in *longissimus dorsi* muscle and 0.13 g/100 g of total FA in SC fat in pigs fed a diet containing lower percentage of marine algae (0.5%) than the inclusion level in the present work.

In this study, although the content of C18:1 *t*-10 + C18:1 *t*-11 increased in both SC and IM AT, the beneficial fatty acid C18:2 *c*-9, *t*-11 (CLA) synthesized from C18:1 *t*-11 was unaffected in L group lambs in SC AT and L and L-A in IM AT; even it decreased in L-A in SC AT. Therefore, a high dietary ALA does not necessarily lead to an increased C18:2 *c*-9, *t*-11 (CLA) content in AT, even if it increases C18:1 *t*-11 in both SC and IM AT [24].

$\Delta 9$ desaturase (codified by *SCD* gene) plays an important role in conversion of C18:1 *t*-11 into C18:2 *c*-9, *t*-11 (CLA) and it is also responsible for converting SFA to MUFA, primarily stearic acid (C18:0) into oleic acid (C18:1 *c*-9). It is plausible that as a result of the inhibition of *SCD* by dietary PUFA the content of C18:2 *c*-9, *t*-11 (CLA) did not increase in L and even decreased in L-A group in SC AT, despite the fact that its precursor C18:1 *t*-11 was available. Also, the content of C16:1 *c*-9 and oleic acid, synthesized by $\Delta 9$ desaturase, decreased in SC and IM AT compared to C group.

The expression of *ACACA* gene, which encodes the enzyme responsible for *de novo* FA synthesis (acetyl-CoA carboxylase), was significantly reduced by adding linseed and more intensively by linseed with algae in both SC and IM AT. These results suggest that adding PUFA may decrease the *de novo* FA synthesis, at least at the transcriptional level. These results concur with those published by Hiller et al. [8], who reported *ACACA* gene expression was negatively affected by *n*-3 FA (grass-silage based diet) of steers in both SC AT and IM AT, and by Dervishi et al. [57] who found alfalfa grazing lambs had lower levels of *ACACA* and consequently lower levels of FA synthesized *de novo*. It is noteworthy that acetyl-CoA carboxylase determines the

rate of FA synthesis and, among other regulatory mechanisms, it is regulated not only at the transcriptional level but also allosterically and by phosphorylation, thereby permitting the rate of FA synthesis to fluctuate in response to physiological and development conditions [58]. However, the data of the present study revealed that dietary PUFA led to transcriptional regulation of *ACACA* gene.

Lipoprotein lipase, which is encoded by *LPL* gene, is a rate-limiting enzyme involved in the uptake of triacylglyceride-derived FA. Adding linseed to lamb diets did not affect *LPL* gene expression, whereas linseed with algae-enriched diets caused a decrease in *LPL* mRNA levels in both SC and IM AT compared to C diet. This fact suggests that the inclusion in the diet of algae led to a transcriptional regulation of FA uptake, probably due to the high proportion of more unsaturated and longer chain FA (EPA and DHA). Duckett et al. [59] allowed steers to graze pasture rich in ALA and observed *LPL* mRNA level was not affected whilst Corazzin et al. [7] fed 8% linseed to bulls and observed a reduction in *LPL* expression in SC AT. Thus, the results of the present study and of papers published by other researchers suggest PUFA levels in the diet and the degree of unsaturation of FA could affect the expression of this gene in a different manner.

As expected, the inclusion of linseed increased ALA levels in both SC and IM AT and the proportion of ALA in L-A treatment lambs was intermediate between L and C groups, reflecting the dietary concentration of this FA. In respect to the *n*-3 LCPUFA, the synthesis of *n*-3 LCPUFA (C18:4 *n*-3, C20:4 *n*-3, EPA, docosapentaenoic acid [DPA, C22:5 *n*-3], C24:5 *n*-3, C24:6 *n*-3 and DHA) from ALA is performed in the endoplasmic reticulum through a series of alternating desaturations and elongations [60]. When linseed was included in the diet of lambs there were evidences that elongation and desaturation of ALA had occurred, with increased concentrations of EPA in IM AT and DPA in both AT compared to C group. However, tissue levels of DHA did not increase, which could be the result of the limited conversion of ALA to their LCPUFA products [29,61,62]. Conversely, the partial substitution of linseed with algae increased the proportions of EPA, DPA and also DHA in both AT, indicating the deposition of DHA can more easily be obtained by including algae in the diet rather than by desaturation and elongation of ALA.

Linoleic acid (LA, C18:2 *n*-6) is the precursor of the *n*-6 LCPUFA series formed by elongation and desaturation (C18:3 *n*-6, C20:3 *n*-6, arachidonic acid [AA, C20:4 *n*-6], C22:4 *n*-6, C24:4 *n*-6, C24:5 *n*-6 and C22:5 *n*-6) [63]. The decreased LA content in SC AT of L and L-A group lambs could be the result of the lower dietary LA and its ruminal biohydrogenation. On the other hand, the results regarding the effect of dietary PUFA on the contents of *n*-6 LCPUFA are not clear. Berthelot et al. [64] reported the proportions of C18:3 *n*-6, C20:3 *n*-6, AA, C22:4 *n*-6 decreased in the muscle of lambs fed high levels of ALA (linseed diet). Wachira et al. [24] also observed linseed-rich diet lowered both C20:3 *n*-6 and AA in muscle, but diets rich in fish oil (lower content of ALA in the diet) increased C20:3 *n*-6. Moreover, Ashes et al. [65] indicated that fish oil did not affect AA in muscle phospholipids, which the authors attributed to adequate $\Delta 6$ desaturase activity ensuring the conversion of LA to AA. Therefore, the results of the present study and those of other studies suggest the high levels of ALA in linseed diet and hence, high ALA/LA ratio, decreased the conversion of LA to *n*-6 LCPUFA, as the enzymes have a preference for *n*-3 PUFA [60]. In contrast, the FA sources that led to lower ALA/LA ratio in the diet, such as algae or fish oil, did not inhibit the LA elongation.

$\Delta 5$ desaturase, $\Delta 6$ desaturase (codified by the genes *FADS1* and *FADS2*, respectively) and elongase 5 (*ELOVL5*) enzymes are involved in the synthesis of *n*-6 and *n*-3 LCPUFA. The results showed that dietary PUFA affected the expression of these genes in a tissue specific-manner. Herdmann et al. [66] and Hiller et al. [8] also reported dietary *n*-3 PUFA decreased $\Delta 6$ desaturase protein expression in IM AT of bulls, but not in SC AT. The reason for a tissue-

specific response of genes involved in FA polyunsaturation is not clear. Phospholipids are a major component of membrane lipids and hence are found in higher level in the IM lipid fraction [52]. Additionally, Raes et al. [62] reported a large change in the FA profile of the cell membranes could alter their properties and other physiological functions. Thus, the PUFA proportions of the phospholipids have to be strictly regulated, especially in the IM AT which was characterized by smaller adipocyte size than the SC AT, as it was reported by Schoonmaker et al. [67] and observed in the present study (Fig 1A and 1B). On the other hand, the LCPUFA added to L-A diet led to a more pronounced downregulation of *FADS2*, a key rate-limiting gene in the synthesis of LCPUFA, in the IM AT compared to L group. These results indicate, once more, that the type of dietary FA is one of the factors influencing the regulation of the endogenous synthesis of FA.

The observed increase in EPA, DPA and DHA was not consistent with decreased expression of genes involved in LCPUFA formation in IM AT, which is in agreement with previous studies in lambs [5] and steers [8]. The regulation of FA synthesis enzymes may occur through several potential mechanisms including transcriptional, posttranscriptional, and posttranslational processes [68]. Hence, it seems plausible that the mRNA levels of these genes are not necessarily correlated with their protein concentrations or enzyme activities, and the transcriptional regulation of the LCPUFA synthesis could be a more long-term regulation.

Overall, compared with the linseed diet, feeding linseed in combination with algae resulted more effective in reducing the expression of lipogenic genes, such as *ACACA* or *LPL*, in both SC and IM AT in addition to *FADS2* gene mentioned above. Nevertheless, the response to the linseed with algae diet of adipogenic transcription factors was similar to the effect observed in lambs fed the linseed diet.

With reference to meat quality, carcass pH did not differ among different treatments. This result confirms the lack of significant differences previously observed in meat pH due to linseed addition in lambs [69]. Regarding carcass color, there was a slight effect of feeding linseed or linseed with algae on *Latissimus dorsi* and SC AT color parameters. Subcutaneous fat from L-A treatment showed less red color than those of C and L treatments. This may be due to the lipid oxidation of this depot, as Yin and Faustman [70] reported that the oxidation of fat is related to the formation of precursors of oxymyoglobin oxidation and thus to the formation of metamyoglobin and the decrease in a^* . However, in muscle samples the redness value was not affected by dietary treatments. The more yellow fat in L diets fed lambs and muscle in L and L-A could be related to the presence of carotenes and xanthophylls in linseed and marine products. The lipid oxidation results showed significantly greater TBARS concentration in IM AT from lambs fed linseed with algae compared to samples from lambs fed the C diet. The greater proportion of the longer chain PUFA (EPA, DPA and DHA) in IM AT of L-A group lambs could be the reason for the lower oxidative stability. By contrast, although linseed diet was high in PUFA, it did not affect IM AT oxidative stability. Kouba and Mourot [71] reported linseed presents a high content of ALA, which is susceptible to oxidation, even if it is less than the susceptibility of EPA and DHA. In accordance with the results of the present study, Nute et al. [72] observed the use of fish oil alone or mixed with marine algae containing diets showed greater oxidation and lower color stability in lamb meat. Vatansver et al. [73] reported when linseed oil, fish oil or combination of the two were fed to beef animals, the fish oil diet produced meat with a reduced vitamin E concentration and greater TBARS than other diets.

The most important criterion for consumer acceptability of *n*-3 PUFA-supplemented foods is sensory quality, which seems to be inversely related to the *n*-3 PUFA content [72]. The inclusion in the diet of linseed did not affect the organoleptic quality of the meat, which is consistent with the lack of effect of linseed on lipid oxidation. Nevertheless, the increase in the proportions of the LCPUFA in IM AT and a reduction in the ratings for odor and flavor acceptability was observed

in meat from lambs fed linseed with algae. Off-flavors were detected, identified by consumers as “fishy flavor”, and resulted in its lower overall acceptability in L-A group lambs compared to C and L groups, which may be associated with the greater TBARS in IM AT of L-A group lambs. The proportion of DHA in L-A group lambs was higher than C and L group lambs and hence, the greatest number of double bonds were available for oxidation. These results are consistent with the finding of Nute et al. [72] who reported that linseed oil fed lambs were rated significantly better for overall acceptability than protected lipid supplement and marine algae fed lambs. Regarding the DHA level in meat and its effects on off-flavor detection, previous studies reported unacceptably high flavor and odor associated with muscle DHA levels of 5.35 g/100 g of total FA in lambs [72] and 1.5 g/100 g in pigs [74]. The result of this study showed that off-flavors were detected at lower DHA levels (0.99 g/100 g). However, it is difficult to value the limiting point at which meat fishy flavor could be detected due to an increase in DHA and future studies must be performed to define the optimum level and duration of n-3 PUFA supplementation in order to limit the risk of lipid oxidation and adverse effects on product quality.

Conclusions

The results indicate that feeding linseed did not affect growth parameters of Navarra breed lambs; nevertheless, the partial substitution of linseed with marine algae reduced ADG and increased slaughter age of lambs. Dietary linseed or linseed and algae decreased the expression of *ACACA* and *SCD* in both SC and IM AT and *FADS1*, *FADS2* and *ELOVL5* in the IM AT, suggesting a regulation in *the novo* FA synthesis and a shift in monounsaturated FA formation.

With reference to adipose tissue development, differences in cellularity as well as in expression of genes related to differentiation and lipogenesis and LCPUFA synthesis, indicate that SC and IM adipose tissues may possess distinct regulation, which results in different fat accretion and varied fatty acid distribution. Supplementing diets with linseed or linseed in combination with algae led to an enrichment of C18:3 n-3 and reduced n-6/n-3 ratio in both SC and IM adipose tissues. Algae addition seemed to be more effective than linseed addition in increasing the physiologically important EPA and DHA content in the studied tissues, but it had adverse effects on meat quality, as the meat from lambs fed linseed with algae presented greater lipid oxidation and reduced ratings for odor, flavor and overall acceptability. The content of ALA, LA and LCPUFA in the diet of lambs is an important factor in the nutritional regulation of lipid metabolism, especially in the LCPUFA synthesis, and further work is needed to elucidate the molecular and biochemical mechanisms controlling the synthesis and deposition of these fatty acids.

Supporting Information

S1 Table. Primes used for the quantification of the mRNA expression by real-time PCR.

¹*ACACA* = acetyl-CoA carboxylase 1; *LPL* = lipoprotein lipase; *SCD* = stearoyl-CoA desaturase; *PPARG* = peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2; *CEBPA* = CAAT-enhancer binding protein alpha; *SREBF1* = sterol regulatory element binding factor 1; *FADS1* = fatty acid desaturase 1; *FADS2* = fatty acid desaturase 2; *ELOVL5* = fatty acid elongase 5; β -actin = beta actin. ² R^2 stands for the multiple coefficient of determination of the standard curve. ³Efficiency (E) is calculated as $[10^{-1/slope}]$.

(DOCX)

Acknowledgments

The authors acknowledge the assistance provided by INTIA (Navarra, Spain) and Piensos Unzue S.A. (Navarra, Spain).

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: AA AP JAM. Performed the experiments: OU KI JAM. Analyzed the data: OU BS JAM. Contributed reagents/materials/analysis tools: BS KI. Wrote the paper: OU AA AP.

References

- Juárez M, Horcada A, Alcalde MJ, Valera M, Mullen AM, Molina A. Estimation of factors influencing fatty acid profiles in light lambs. *Meat Sci.* 2008; 79(2):203–210. doi: [10.1016/j.meatsci.2007.08.014](https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.08.014) PMID: [22062747](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22062747/)
- Flint D, Vernon R. Hormones and adipose tissue growth. In: Schreibman MP, Scanes CG, Pang PKT, editors. *Vertebrate Endocrinology: Fundamentals and Biomedical Implications* Orlando: Academic Press; 1993. p. 469–494.
- Feige JN, Gelman L, Michalik L, Desvergne B, Wahli W. From molecular action to physiological outputs: peroxisome proliferator-activated receptors are nuclear receptors at the crossroads of key cellular functions. *Prog Lipid Res.* 2006; 45(2):120–159. doi: [10.1016/j.plipres.2005.12.002](https://doi.org/10.1016/j.plipres.2005.12.002) PMID: [16476485](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16476485/)
- Anderson BM, Ma D. Are all n-3 polyunsaturated fatty acids created equal. *Lipids Health Dis.* 2009; 8(1):33. doi: [10.1186/1476-511X-8-33](https://doi.org/10.1186/1476-511X-8-33)
- Urrutia O, Soret B, Insausti K, Mendizabal JA, Purroy A, Arana A. The effects of linseed or chia seed dietary supplementation on adipose tissue development, fatty acid composition, and lipogenic gene expression in lambs. *Small Rum Res.* 2015 2; 123(2–3):204–211. doi: [10.1016/j.smallrumres.2014.12.008](https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2014.12.008)
- Noci F, French P, Monahan F, Moloney A. The fatty acid composition of muscle fat and subcutaneous adipose tissue of grazing heifers supplemented with plant oil-enriched concentrates. *J Anim Sci.* 2007; 85(4):1062–1073. doi: [10.2527/jas.2006-105](https://doi.org/10.2527/jas.2006-105) PMID: [17121969](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17121969/)
- Corazzin M, Bovolenta S, Sacca E, Bianchi G, Piasentier E. Effect of linseed addition on the expression of some lipid metabolism genes in the adipose tissue of young Italian Simmental and Holstein bulls. *J Anim Sci.* 2013; 91(1):405–412. doi: [10.2527/jas.2011-5057](https://doi.org/10.2527/jas.2011-5057) PMID: [23048135](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23048135/)
- Hiller B, Herdmann A, Nuernberg K. Dietary n-3 fatty acids significantly suppress lipogenesis in bovine muscle and adipose tissue: a functional genomics approach. *Lipids.* 2011; 46(7):557–567. doi: [10.1007/s11745-011-3571-z](https://doi.org/10.1007/s11745-011-3571-z) PMID: [21614646](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21614646/)
- Hausman G, Dodson M, Ajuwon K, Azain M, Barnes K, Guan L, et al. Board-invited review: the biology and regulation of preadipocytes and adipocytes in meat animals. *J Anim Sci.* 2009; 87(4):1218–1246. doi: [10.2527/jas.2008-1427](https://doi.org/10.2527/jas.2008-1427) PMID: [18849378](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18849378/)
- European Union. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. *Off J Eur Union.* 2010; 279:33–79.
- European Union. Council Regulation (EC) No 1099/2009 of 24 September 2009 on the protection of animals at the time of killing. *Off J Eur Union.* 2009; 53:1–30.
- Colomer-Rocher F, Delfa R, Sierra I. Métodos normalizados para el estudio de los caracteres cuantitativos y cualitativos de las canales ovinas producidas en el área mediterránea, según los sistemas de producción. In: Colomer-Rocher F, Morand-Fehr P, Kirton AH, Delfa R, Sierra I, editors. *Métodos normalizados para el estudio de los caracteres cuantitativos y cualitativos de las canales caprinas y ovinas.* Cuadernos INIA Madrid, Spain; 1988. p. 19–41.
- Mendizabal JA, Purroy A, Indurain G, Insausti K. Medida del grado de veteado de la carne mediante análisis de imagen. In: Cañeque V, Sañudo C, editors. *Estandarización de las metodologías para evaluar la calidad del producto (animal vivo, canal, carne y grasa) en rumiantes.* 3rd ed. Madrid, Spain: INIA Serie Ganadera; 2005. p. 251–256.
- Rodbell M. The metabolism of isolated fat cells. I. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. *J Biol Chem.* 1964; 239:375–380. doi: [10.1002/cphy.cp050147](https://doi.org/10.1002/cphy.cp050147) PMID: [14169133](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14169133/)
- Mendizabal JA, Soret B, Purroy A, Arana A, Horcada A. Influence of sex on cellularity and lipogenic enzymes of Spanish lamb breeds (Lacha and Rasa Aragonesa). *Animal Sci.* 1997; 64(02):283–289. doi: [10.1017/S135772980001585X](https://doi.org/10.1017/S135772980001585X)
- Whittington FM, Prescott NJ, Wood JD, Enser M. The effect of dietary linoleic acid on the firmness of backfat in pigs of 85 kg live weight. *J Sci Food Agric.* 1986; 37(8):753–761. doi: [10.1002/jsfa.2740370807](https://doi.org/10.1002/jsfa.2740370807)
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paep A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002; 3(7):34. doi: [10.1186/gb-2002-3-7-research0034](https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-7-research0034)

18. Rasmussen R. Quantification on the LightCycler. In: Meuer S, Wittwer C, Nakagawara K, editors. Rapid cycle real-time PCR: Methods and Applications Heidelberg, Germany: Springer; 2001. p. 21–34.
19. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001; 29(9):e45. PMID: [11328886](#)
20. CIE. Recommendations on uniform colour spaces, colour difference equations and psychometric colour terms. Supplement no. 2 to CIE Publication no. 15 (E.1.3.1.) 1978, 1971/(TC-1-3). Commission Internationale de l'Éclairage, Paris.
21. Tarladgis BG, Watts BM, Younathan MT, Dugan L Jr. A distillation method for the quantitative determination of malonaldehyde in rancid foods. *Journal of the American Oil Chemists Society.* 1960; 37(1):44–48.
22. Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 2002; 30(9):e36. doi: [10.1093/nar/30.9.e36](#) PMID: [11972351](#)
23. British Department of Health. Nutritional aspects of cardiovascular disease. Report on health and social subjects. HMSO, London; 1994.
24. Wachira AM, Sinclair LA, Wilkinson RG, Enser M, Wood JD, Fisher A. 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. *Br J Nutr.* 2002; 88(06):697–709. doi: [10.1079/BJN2002727](#)
25. De la Fuente-Vázquez J, Díaz-Díaz-Chirón MT, Pérez-Marcos C, Cañeque V, Sánchez-González CI, Alvarez-Acero I, et al. Linseed, microalgae or fish oil dietary supplementation affects performance and quality characteristics of light lambs. *Span J Agri Res.* 2014; 12(2):436–447. doi: [10.5424/sjar/2014122-4639](#)
26. Wachira AM, Sinclair LA, Wilkinson RG, Hallett K, Enser M, Wood J. Rumen biohydrogenation of n-3 polyunsaturated fatty acids and their effects on microbial efficiency and nutrient digestibility in sheep. *J Agri Sci.* 2000; 135(4):419–428. doi: [10.1017/S0021859699008370](#)
27. Cant JP, Fredeen AH, MacIntyre T, Gunn J, Crowe N. Effect of fish oil and monensin on milk composition in dairy cows. *Can J Animal Sci.* 1997; 77(1):125–131.
28. Hopkins DL, Clayton EH, Lamb TA, van de Ven RJ, Refshauge G, Kerr MJ, et al. The impact of supplementing lambs with algae on growth, meat traits and oxidative status. *Meat Sci.* 2014; 98:135–141. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.05.016>. doi: [10.1016/j.meatsci.2014.05.016](#) PMID: [24950082](#)
29. Meale SJ, Chaves AV, He ML, McAllister TA. Dose-response of supplementing marine algae (*Schizochytrium* spp.) on production performance, fatty acid profiles, and wool parameters of growing lambs. *J Anim Sci.* 2014; 92(5):2202–2213. doi: [10.2527/jas.2013-7024](#) PMID: [24668954](#)
30. Atti N, Mahouachi M, Rouissi H. Effects of fish meal in lamb diets on growth performance, carcass characteristics and subcutaneous fatty acid composition. In: Priolo A, Biondi L, Ben Salem H, Morand-Fehr P, editors. Advanced nutrition and feeding strategies to improve sheep and goat. no. 74. Seminar of the FAO-CIHEAM Sub Network on Sheep and Goat Nutrition, 2005/09/08-10: CIHEAM, Options Méditerranéennes: Série A. Séminaires Méditerranéens; 2007. Catania, Italy. p. 57–61.
31. Mendizabal JA, Thériez M, Bas P, Normand J, Aurousseau B, Purroy A. Fat firmness of subcutaneous adipose tissue in intensively reared lambs. *Small Rum Res.* 2004; 53(1):173–180. doi: [10.1016/j.smallrumres.2003.09.004](#)
32. Smith SB, Jenkins T, Prior RL. Carcass composition and adipose tissue metabolism in growing sheep. *J Anim Sci.* 1987; 65(6):1525–1530. doi: [10.2134/jas1987.6561525x](#) PMID: [3443572](#)
33. Boque N, Campión J, Paternain L, García-Díaz D, Galarraga M, Portillo M, et al. Influence of dietary macronutrient composition on adiposity and cellularity of different fat depots in Wistar rats. *J Physiol Biochem.* 2009; 65(4):387–395. doi: [10.1007/BF0318593](#) PMID: [20358352](#)
34. Robelin J. Growth of adipose tissues in cattle; partitioning between depots, chemical composition and cellularity. A review. *Livest Prod Sci.* 1986; 14(4):349–364. doi: [10.1016/0301-6226\(86\)90014-X](#)
35. Vernon R. Lipid metabolism in the adipose tissue of ruminant animals. *Prog Lipid Res.* 1980; 19(1):23–106. doi: [10.1016/0163-7827\(80\)90007-7](#)
36. Pickworth CL, Loerch SC, Velleman SG, Pate JL, Poole DH, Fluharty FL. Adipogenic differentiation state-specific gene expression as related to bovine carcass adiposity. *J Anim Sci.* 2011; 89(2):355–366. doi: [10.2527/jas.2010-3229](#) PMID: [20952530](#)
37. Dodson MV, Hausman GJ, Guan L, Du M, Rasmussen TP, Poulos SP, et al. Lipid metabolism, adipocyte depot physiology and utilization of meat animals as experimental models for metabolic research. *Int J Biol Sci.* 2010; 6(7):691–699. doi: [10.7150/ijbs.6.691](#) PMID: [21103072](#)
38. Graugnard DE, Piantoni P, Bionaz M, Berger LL, Faulkner DB, Looor JJ. Adipogenic and energy metabolism gene networks in longissimus lumborum during rapid post-weaning growth in Angus and Angus x

- Simmental cattle fed high-starch or low-starch diets. *BMC Genomics*. 2009; 10(1):142. doi: [10.1186/1471-2164-10-142](https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-142)
39. Nakamura MT, Yudell BE, Loor JJ. Regulation of energy metabolism by long-chain fatty acids. *Prog Lipid Res*. 2014; 53:124–144. doi: [10.1016/j.plipres.2013.12.001](https://doi.org/10.1016/j.plipres.2013.12.001) PMID: [24362249](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24362249/)
 40. Ebrahimi M, Rajion MA, Goh YM, Sazili AQ, Schonewille J. Effect of linseed oil dietary supplementation on fatty acid composition and gene expression in adipose tissue of growing goats. *BioMed Res Int*. 2013; 11 pages. doi: [10.1155/2013/194625](https://doi.org/10.1155/2013/194625)
 41. Kronberg S, Barceló-Coblijn G, Shin J, Lee K, Murphy E. Bovine muscle n-3 fatty acid content is increased with flaxseed feeding. *Lipids*. 2006; 41(11):1059–1068. PMID: [17263305](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17263305/)
 42. Hocquette J, Gondret F, Baéza E, Médale F, Jurie C, Pethick D. Intramuscular fat content in meat-producing animals: development, genetic and nutritional control, and identification of putative markers. *Animal*. 2010; 4(02):303–319. doi: [10.1017/S1751731109991091](https://doi.org/10.1017/S1751731109991091)
 43. Shimano H. Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): transcriptional regulators of lipid synthetic genes. *Prog Lipid Res*. 2001; 40(6):439–452. doi: [10.1016/S0163-7827\(01\)00010-8](https://doi.org/10.1016/S0163-7827(01)00010-8) PMID: [11591434](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11591434/)
 44. Tontonoz P, Kim JB, Graves RA, Spiegelman BM. ADD1: a novel helix-loop-helix transcription factor associated with adipocyte determination and differentiation. *Mol Cell Biol*. 1993; 13(8):4753–4759. doi: [10.1128/MCB.13.8.4753](https://doi.org/10.1128/MCB.13.8.4753) PMID: [8336713](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8336713/)
 45. Dervishi E, Serrano C, Joy M, Serrano M, Rodellar C, Calvo JH. Effect of the feeding system on the fatty acid composition, expression of the $\Delta 9$ -desaturase, Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha, Gamma, and Sterol Regulatory Element Binding Protein 1 genes in the semitendinous muscle of light lambs of the Rasa Aragonesa breed. *BMC Vet Res*. 2010; 6(1):40. doi: [10.1186/1746-6148-6-40](https://doi.org/10.1186/1746-6148-6-40)
 46. Waters SM, Kelly JP, O'Boyle P, Moloney AP, Kenny DA. Effect of level and duration of dietary n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation on the transcriptional regulation of $\Delta 9$ -desaturase in muscle of beef cattle. *J Anim Sci*. 2009; 87(1):244–252. doi: [10.2527/jas.2008-1005](https://doi.org/10.2527/jas.2008-1005) PMID: [18791145](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18791145/)
 47. Klein CM, Jenkins TC. Docosahexaenoic acid elevates *trans*-18:1 isomers but is not directly converted into *trans*-18:1 isomers in ruminal batch cultures. *J Dairy Sci*. 2011; 94(9):4676–4683. doi: [10.3168/jds.2011-4344](https://doi.org/10.3168/jds.2011-4344) PMID: [21854940](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21854940/)
 48. Griinari J, Bauman D. Biosynthesis of conjugated linoleic acid and its incorporation into meat and milk in ruminants. In: Yurawecz M, Mossoba M, Kramer J, Pariza M, Nelson G, editors. *Advances in conjugated linoleic acid research*, Vol 1 Champaign: AOCS Press; 1999. p. 180–200.
 49. Jenkins TC, Wallace RJ, Moate PJ, Mosley EE. Board-invited review: Recent advances in biohydrogenation of unsaturated fatty acids within the rumen microbial ecosystem. *J Anim Sci*. 2008; 86(2):397–412. doi: [10.2527/jas.2007-0588](https://doi.org/10.2527/jas.2007-0588) PMID: [18042812](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18042812/)
 50. Boeckeaert C, Fievez V, Van Hecke D, Verstraete W, Boon N. Changes in rumen biohydrogenation intermediates and ciliate protozoa diversity after algae supplementation to dairy cattle. *Eur J Lipid Sci Technol*. 2007; 109(8):767–777. doi: [10.1002/ejlt.200700052](https://doi.org/10.1002/ejlt.200700052)
 51. Lourenço M, Ramos-Morales E, Wallace R. The role of microbes in rumen lipolysis and biohydrogenation and their manipulation. *Animal*. 2010; 4(07):1008–1023. doi: [10.1017/S175173111000042X](https://doi.org/10.1017/S175173111000042X)
 52. Woods VB, Fearon AM. Dietary sources of unsaturated fatty acids for animals and their transfer into meat, milk and eggs: A review. *Livest Sci*. 2009; 126(1):1–20. doi: [10.1016/j.livsci.2009.07.002](https://doi.org/10.1016/j.livsci.2009.07.002)
 53. Huang FR, Zhan ZP, Luo J, Liu ZX, Peng J. Duration of dietary linseed feeding affects the intramuscular fat, muscle mass and fatty acid composition in pig muscle. *Livest Sci*. 2008; 118:132–139. doi: [10.1016/j.livsci.2008.01.002](https://doi.org/10.1016/j.livsci.2008.01.002)
 54. Juárez M, Dugan MER, Aldai N, Aalhus JL, Patience JF, Zijlstra RT, et al. Feeding co-extruded flaxseed to pigs: Effects of duration and feeding level on growth performance and backfat fatty acid composition of grower–finisher pigs. *Meat Sci*. 2010; 84:578–584. doi: [10.1016/j.meatsci.2009.10.015](https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2009.10.015) PMID: [20374827](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20374827/)
 55. Mouro J, Watremez E, Azzopardi M, Le Noc JL, Robin G, Perrier C. Effect of the introduction of extruded linseed or DHA-rich micro-algae into the pig diet on the nutritional quality of pork and processed products. *Journées Recherche Porcine*. 2014; 46: 55–56.
 56. Sardi L, Martelli G, Lambertini L, Parisini P, Mordenti A. Effects of a dietary supplement of DHA-rich marine algae on Italian heavy pig production parameters. *Livest Sci*. 2006; 103:95–103. doi: [10.1016/j.livsci.2006.01.009](https://doi.org/10.1016/j.livsci.2006.01.009)
 57. Dervishi E, Serrano C, Joy M, Serrano M, Rodellar C, Calvo J. The effect of feeding system in the expression of genes related with fat metabolism in semitendinous muscle in sheep. *Meat Sci*. 2011; 89(1):91–97. doi: [10.1016/j.meatsci.2011.04.003](https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.04.003) PMID: [21543161](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21543161/)

58. Sul HS. Metabolism of fatty acid, acylglycerols and sphingolipids. In: Stipanuk MH, Caudill MA, editors. Biochemical, physiological, and molecular aspects of human nutrition. 3rd edition ed. Missouri, USA: Elsevier Health Sciences; 2013. Chapter 16, p. 357–392.
59. Duckett SK, Pratt SL, Pavan E. Corn oil or corn grain supplementation to steers grazing endophyte-free tall fescue. II. Effects on subcutaneous fatty acid content and lipogenic gene expression. J Anim Sci. 2009; 87(3):1120–1128. doi: [10.2527/jas.2008-1420](https://doi.org/10.2527/jas.2008-1420) PMID: [19028850](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19028850/)
60. Brenner R. Factors influencing fatty acid chain elongation and desaturation. In: Vergroesen AJ, Crawford M, editors. The Role of Fats in Human Nutrition California, USA: Academic Press; 1989. p. 45–80.
61. Nassu RT, Dugan MER, He ML, McAllister TA, Aalhus JL, Aldai N, et al. The effects of feeding flaxseed to beef cows given forage based diets on fatty acids of *longissimus thoracis* muscle and backfat. Meat Sci. 2011; 89(4):469–477. doi: [10.1016/j.meatsci.2011.05.016](https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.05.016) PMID: [21645974](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21645974/)
62. Raes K, De Smet S, Demeyer D. 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. Anim Feed Sci Technol. 2004; 113(1):199–221. doi: [10.1016/j.anifeedsci.2003.09.001](https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2003.09.001)
63. Arterburn LM, Hall EB, Oken H. Distribution, interconversion, and dose response of n-3 fatty acids in humans. Am J Clin Nutr. 2006; 83(6 Suppl):1467S–1476S. PMID: [16841856](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16841856/)
64. Berthelot V, Bas P, Schmidely P. Utilization of extruded linseed to modify fatty composition of intensively-reared lamb meat: Effect of associated cereals (wheat vs. corn) and linoleic acid content of the diet. Meat Sci. 2010; 84(1):114–124. doi: [10.1016/j.meatsci.2009.08.034](https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2009.08.034) PMID: [20374762](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20374762/)
65. Ashes JR, Siebert BD, Gulati SK, Cuthbertson AZ, Scott TW. Incorporation of n–3 fatty acids of fish oil into tissue and serum lipids of ruminants. Lipids. 1992; 27(8):629–631. doi: [10.1007/BF02536122](https://doi.org/10.1007/BF02536122) PMID: [1406074](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1406074/)
66. Herdmann A, Nuernberg K, Martin J, Nuernberg G, Doran O. Effect of dietary fatty acids on expression of lipogenic enzymes and fatty acid profile in tissues of bulls. Animal. 2010; 4(05):755–762. doi: [10.1017/S1751731110000431](https://doi.org/10.1017/S1751731110000431)
67. Schoonmaker J, Fluharty F, Loerch S. Effect of source and amount of energy and rate of growth in the growing phase on adipocyte cellularity and lipogenic enzyme activity in the intramuscular and subcutaneous fat depots of Holstein steers. J Anim Sci. 2004; 82(1):137–148. doi: [/2004.821137x](https://doi.org/10.2527/2004.821137x). PMID: [14753357](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14753357/)
68. Jing M, Gakhar N, Gibson RA, House JD. Dietary and ontogenic regulation of fatty acid desaturase and elongase expression in broiler chickens. Prostaglandins, Leukot Essent Fatty Acids. 2013; 89(2):107–113. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plefa.2013.05.006>.
69. Atti N, Methlouthi N, Saidi C, Mahouachi M. Effects of extruded linseed on muscle physicochemical characteristics and fatty acid composition of lambs. J Appl Anim Res. 2013; 41(4):404–409. doi: [10.1080/09712119.2013.792730](https://doi.org/10.1080/09712119.2013.792730)
70. Yin MC, Faustman C. Influence of temperature, pH, and phospholipid composition upon the stability of myoglobin and phospholipid: a liposome model. J Agric Food Chem. 1993; 41(6):853–857. doi: [10.1021/jf00030a002](https://doi.org/10.1021/jf00030a002)
71. Kouba M, Mourot J. A review of nutritional effects on fat composition of animal products with special emphasis on n-3 polyunsaturated fatty acids. Biochimie. 2011; 93(1):13–17. doi: [10.1016/j.biochi.2010.02.027](https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.02.027) PMID: [20188790](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20188790/)
72. Nute GR, Richardson RI, Wood JD, Hughes SI, Wilkinson RG, Cooper SL, et al. Effect of dietary oil source on the flavour and the colour and lipid stability of lamb meat. Meat Sci. 2007; 77(4):547–555. doi: [10.1016/j.meatsci.2007.05.003](https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.05.003) PMID: [22061940](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22061940/)
73. Vatanserver L, Kurt E, Enser M, Nute G, Scollan N, Wood J, et al. Shelf life and eating quality of beef from cattle of different breeds given diets differing in n-3 polyunsaturated fatty acid composition. Animal Sci. 2000; 71(3):471–482.
74. Overland M, Tangbol O, Haug A, Sundstol E. Effect of fish oil on growth performance, carcass characteristics, sensory parameters and fatty acid composition in pigs. Acta Agriculturae Scandinavica, 1996; 46: 11–17. doi: [10.1080/09064709609410919](https://doi.org/10.1080/09064709609410919)

4.4. DISCUSIÓN GENERAL

En la presente tesis doctoral se ha abordado el estudio de la incorporación de materias primas ricas en ácidos grasos poliinsaturados *n*-3 en las dietas de corderos de raza Navarra y se ha evaluado su efecto sobre las características de crecimiento y de la canal, el desarrollo del tejido graso, la composición de ácidos grasos de la carne y de la grasa, además de analizar varios parámetros relacionados con la calidad de la carne y valorar la aceptabilidad de la carne por parte de los consumidores. Por último, en orden a obtener una mayor comprensión de los mecanismos moleculares relacionados con el metabolismo de ácidos grasos en el tejido adiposo se ha estudiado la expresión de varios genes lipogénicos y adipogénicos en corderos.

En primer lugar, los resultados relacionados con los parámetros de crecimiento de los tres experimentos indicaron que los corderos alimentados con las dietas que incluían semilla de lino extrusionado, tanto al 5% como al 10%, así como un 10% de semilla de chía no presentaron diferencias significativas en la edad al sacrificio, la ingestión de pienso y la velocidad de crecimiento con respecto a los corderos alimentados con la dieta convencional. Los valores de ganancia media diaria obtenidos oscilaron alrededor de 300 g/d, valor que puede considerarse satisfactorio para corderos de raza Navarra (Beriain et al., 2000). En el mismo sentido, los resultados de otros autores que estudiaron la adición de lino en la dieta (con niveles de inclusión desde el 3% hasta el 30%) tampoco observaron diferencias en los parámetros de crecimiento tanto en corderos ligeros (Atti et al., 2013; Bas et al., 2007; de la Fuente-Vázquez et al., 2014; Giannico et al., 2009; Mele et al., 2014; Wachira et al., 2002) como en corderos de mayor peso al sacrificio (Berthelot et al., 2012, 2010; Cooper et al., 2004; Demirel et al., 2004; Kitessa et al., 2009; Noci et al., 2011; Wachira et al., 2002).

En lo que respecta a la semilla de chía, diversos estudios realizados con animales monogástricos mostraron cierta variabilidad en los resultados. Coates y Ayerza (2009) observaron en la especie porcina que, incluyendo un 10% o un 20% de esta semilla en la dieta, los parámetros como el peso vivo, la ganancia media diaria y el índice de conversión de pienso no mostraron diferencias significativas en comparación a los del lote control, lo que concuerda con señalado por Peiretti y Meineri (2008) en conejos y Ayerza et al. (2002) en gallinas ponedoras. En cambio, Azcona et al. (2008) en pollos de carne observaron una disminución significativa en la grasa abdominal cuando estos fueron alimentados con semilla o harina de chía (15%). Por tanto, cabe señalar que la variabilidad de los resultados mostrados podría ser mayormente debida a las diferencias entre especies.

A diferencia de lo observado con el lino y la chía, se observó (experimento 3) que los corderos alimentados simultáneamente con lino y algas presentaron una menor ganancia media diaria y una mayor edad para un mismo peso de sacrificio que los corderos alimentados

con la dieta control y los que consumieron la dieta que contenía un 10% de lino. La reducción en la ganancia media diaria podría ser debida a la disminución en la ingestión de pienso de estos corderos y a un incremento en el índice de conversión (3,38 g/g en los corderos alimentados con la dieta que contenía lino y algas y 2,63 y 2,92 g/g en los alimentados con la dieta control o lino, respectivamente). Recientemente, Burnett et al. (2016) han señalado que la incorporación de un 1,8% de algas a la dieta de corderos reduce la cantidad de pienso ingerida, aunque sin afectar a la velocidad de crecimiento. Asimismo, la disminución en la ingestión de pienso por la incorporación de algas también fue observada por Papadopoulos et al. (2002) en ovejas y por Boeckaert et al. (2008) y Franklin et al. (1999) en vacas de aptitud lechera. Por otro lado, otros autores empleando aceite de pescado indicaron que la ingestión de los corderos y su ritmo de crecimiento fueron inferiores a los corderos cuya dieta no incluía esta materia prima (Annett et al., 2011; de la Fuente-Vázquez et al., 2014; Wachira et al., 2002). Las posibles razones de estos resultados podrían estar relacionadas con una reducción en la palatabilidad de la dieta (Annett et al., 2011; Papadopoulos et al., 2002), que vendría acompañada de una disminución del crecimiento microbiano y alteración de la fermentación ruminal (Boeckaert et al., 2008), así como con la variación en la digestión de la fibra (Annett et al., 2011; Wachira et al., 2002). Por el contrario, en los experimentos llevados a cabo por Burnett et al. (2016) y de la Fuente-Vázquez et al. (2014) los corderos alimentados con algas y lino (1,8% y 10,7% y 4% y 7,5%, respectivamente) no presentaron una depresión en la ingestión de pienso ni en la ganancia media diaria. Igualmente, Hopkins et al. (2014) y Meale et al. (2014) en corderos alimentados con algas y Demirel et al. (2004) y Shingfield et al. (2011) en corderos y novillos alimentados con lino y aceite de pescado observaron resultados similares. No se han encontrado las causas que expliquen esta variabilidad, aunque como indicaron Meale et al. (2014) existiría la posibilidad de que las algas posean ciertas toxinas, de efectos antioxidantes, antibacterianos o citotóxicos variables, estando su acumulación influenciada por la etapa de crecimiento de las algas y el momento en el que son recolectadas (Scholz y Liebezeit, 2012). Así, su impacto sobre el consumo y la degradación ruminal podría ser distinta, causando efectos variables sobre los parámetros de crecimiento de los animales. En cualquier caso, se requiere de una mayor investigación para la utilización de microalgas marinas en la práctica de producción de rumiantes.

Con relación a las características de la canal, considerando que no se observó un efecto de la inclusión de la semilla de lino o semilla de chía en la velocidad de crecimiento, no se encontraron diferencias en el peso de la canales, ni en el resto de parámetros de engrasamiento como el espesor graso dorsal y la cantidad de grasa pericorrenal, estando

dichos valores comprendidos en los requerimientos de la IGP Cordero de Navarra (Eguinoa et al., 2004). Por otro lado, pese a que la dieta que contenía algas afectó significativamente a la ganancia media diaria e índice de conversión de pienso de los corderos, este hecho no se reflejó negativamente en los parámetros de la canal tales como el espesor graso dorsal o la composición tisular de la décima costilla.

A nivel celular, el número y tamaño de los adipocitos intramusculares se cuantificaron en los experimentos 1, donde se estudió la utilización de la semilla de lino (5% y 10%), y experimento 3, en el cual por un lado se analizó la inclusión del lino o la combinación de lino y algas, revelando los resultados que, en cada caso, no había diferencias en los tres grupos. Por otro lado, los histogramas de distribución de frecuencias en función del tamaño de los adipocitos del experimento 3 mostraban un predominio marcado de adipocitos de pequeño tamaño (20 - 30 μm) en los tres grupos de corderos, lo cual estaría de acuerdo con el principio de que el tejido IM es de desarrollo tardío (Baik et al., 2014; Robelin, 1986; Soret et al., 2016). Este hecho también podría ser resultado de la constricción causada por la fibras musculares sobre los adipocitos y estar asociada con una menor capacidad lipogénica, lipolítica, de oxidación y de transporte de ácidos grasos y/o capacidad de transferencia energética en comparación a adipocitos de mayor tamaño presentes en otros depósitos (Lee et al., 2013; Louveau et al., 2016). Los resultados descritos concuerdan con la ausencia de diferencias en el contenido de la grasa IM de los animales de los diferentes grupos.

En el depósito SC, cabe destacar que no se observó un efecto de la dieta sobre la cantidad de grasa SC de la décima costilla ni en el experimento 1 (lino) ni en el experimento 3 (algas). En relación al desarrollo de este depósito graso, en el experimento 1 no se observaron diferencias significativas en el número de adipocitos y tampoco entre las distintas clases definidas en función del diámetro de los adipocitos (<30, 30 - 60, 60 - 90, 90 - 120, >120 μm). Del mismo modo, no hubo diferencias en la actividad de las enzimas FAS, G3PDH, G6PDH e ICDH entre los tres grupos de corderos, lo cual podría indicar que la inclusión del lino en la dieta no causó modificación de los procesos de hiperplasia e hipertrofia. En cambio, los resultados sugieren que en los corderos alimentados con lino y algas (experimento 3) se produjo una mayor intensidad de la hipertrofia, avalada por una mayor frecuencia de los adipocitos con un diámetro comprendido entre los 90 y 120 μm en los animales de los lotes lino y algas respecto a los corderos del lote control. En el tejido SC de estos animales también se observó una mayor expresión de los factores de transcripción *PPARG* y *CEBPA*, cuya sobre-expresión ha sido relacionada con un incremento en el volumen de los adipocitos (Louveau et al., 2016). Por lo tanto, el aporte de lino de forma

conjunta con las algas parece que estimula la hipertrofia de los adipocitos aunque también podría contribuir a este efecto la diferencia de edad al sacrificio.

La dieta no afectó cuantitativamente al contenido de grasa IM y subcutánea; contrariamente, sí se observó una variación en la composición de ácidos grasos de ambos depósitos. La inclusión de un 10% de semilla de lino, fuente rica en ALA, produjo un aumento de la proporción de ALA aproximadamente de entre 1,8 y 5,2 veces mayor en los tejidos IM y SC, respectivamente, de corderos que recibieron esta dieta en comparación a los que no consumieron lino. Consecuentemente, este incremento afectó de forma positiva al contenido total de PUFA $n-3$, así como a la ratio $n-6/n-3$, de manera que esta proporción disminuyó significativamente, lo cual indicaría que la grasa SC e IM de estos corderos sería nutricionalmente más saludable debido al balance de los ácidos grasos de tipo $n-6$ y $n-3$ más favorable (FAO/WHO, 2008). En referencia a la proporción de EPA y DPA, a pesar de que en el experimento 1 las proporciones de estos ácidos grasos fueron similares entre los dos lotes de corderos, los resultados de los experimentos 2 y 3 mostraban valores 1,4 - 3,2 veces superiores en los depósitos SC e IM en los corderos alimentados con lino. Sin embargo, el contenido de DHA no varió en ninguno de los dos tejidos, lo que concuerda con el hecho de que la desaturación y elongación del ALA para la formación de los LCPUFA $n-3$ es limitada, sugiriendo además que el “bloqueo” se produjo en la reacción de formación de DPA, como ha sido señalado previamente por otros autores (Raes et al., 2004; Shingfield et al., 2013). La bibliografía indica un incremento similar en ALA, EPA y DPA en corderos criados en similares condiciones experimentales en cuanto a las características de las dietas control, los niveles de suplementación de lino y peso y edad de sacrificio de los corderos a las del presente trabajo, aunque el genotipo de los corderos fuera diferente (Bas et al., 2007; de la Fuente-Vázquez et al., 2014; Giannico et al., 2009). De igual modo, los citados autores junto con otros (Atti et al., 2013; Berthelot et al., 2012; Mele et al., 2014; Noci et al., 2011) señalaron también la ausencia de variación en el contenido en DHA a pesar de que sus precursores incrementaron su concentración como consecuencia de la adición de lino a la dieta de los animales.

Por otro lado, el efecto de la adición de un 5% de semilla de lino a la dieta sobre la proporción de ALA, EPA, DPA, DHA, PUFA $n-3$ totales y la ratio $n-6/n-3$ fue similar al observado cuando se incluyó un 10% de lino. Por ello, los resultados parecen indicar que la proporción de ALA, tanto en la grasa SC como en la IM, no aumentó de forma proporcional al aumento del porcentaje de lino en la dieta, probablemente debido a la biohidrogenación de este ácido graso en el rumen. En relación a la utilización de la chía como fuente de ALA

en la alimentación de los corderos, el perfil de ácidos grasos de la carne de estos corderos fue semejante a la de los animales a cuya dieta se adicionó semilla de lino. Es remarkable que, aunque la proporción de ALA es algo mayor en la semilla de chía que en el lino, los resultados de la composición de ácidos grasos de los dos depósitos analizados no mostraron diferencias significativas entre los animales que consumieron las dietas que incluían dichas semillas. Posiblemente, este hecho sería resultado de la biohidrogenación del ALA procedente de la semilla de chía. Por consiguiente, considerando el coste más elevado de la semilla de chía con respecto al de la semilla de lino, el uso de la chía en la alimentación de corderos parece que no sería la mejor alternativa, aunque sería necesario realizar más estudios para confirmar estos resultados.

La inclusión de un 3,89% de microalgas marinas, fuente rica principalmente en DHA, en combinación con un 5% de lino en la dieta de los corderos tuvo como resultado un incremento en los contenidos de EPA (3 veces mayor en el tejido SC y 5,3 veces mayor en el IM) y DPA (1,4 y 2,4 veces mayor en los depósitos SC e IM, respectivamente) respecto a los valores observados en los corderos del lote control. Este resultado indica que, en los tejidos estudiados, se produjo la desaturación y elongación del ALA, pero de forma limitada. Dentro de las estrategias alimentarias analizadas cuyo fin es obtener un enriquecimiento de la carne en PUFA *n*-3 y LCPUFA *n*-3, la adición de algas ricas en DHA en la dieta fue la única que condujo a un aumento significativo en la proporción de DHA en los tejidos grasos SC e IM, mostrando valores 29 y 19,8 veces mayores en dichos depósitos, respectivamente. Conforme al Reglamento nº 116/2010 de la Comisión Europea (Comisión Europea, 2010), que regula declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos, un alimento debe contener al menos 300 mg de ALA/100 g ó 40 mg de EPA y DHA/100 g para ser considerado “Fuente de” y al menos 600 mg de ALA/100 g ó 80 mg de EPA y DHA/100 g para que sea catalogado como “Alimento con alto contenido en ácidos grasos Omega 3”. Por consiguiente, estos resultados ponen de relieve que la alimentación con lino y algas promueve un perfil de ácidos grasos de la carne más favorable, alcanzando estas dietas los niveles requeridos de ácidos grasos *n*-3 poliinsaturados como para ser consideradas fuente de estos ácidos grasos, ya que su contenido conjunto en EPA y DHA alcanza valores aproximados de 56,7 mg por 100 g de carne.

Diversos trabajos han demostrado que la inclusión de algas puede ser una herramienta útil para mejorar las propiedades nutricionales de la carne con respecto a los ácidos grasos DHA y EPA (Alvarenga et al., 2015). En un experimento para determinar el efecto de la inclusión de las algas (1,92%) en corderos sobre el contenido en EPA y DHA, Hopkins et al.

(2014) mencionaron que es posible incrementar los niveles de estos ácidos grasos hasta valores de 140 mg/100 g de carne. En la misma línea, Meale et al. (2014) obtuvieron valores de EPA y DHA de 147,7 mg/100 g de carne en corderos alimentados con un 3% de algas marinas. Como se observa, el enriquecimiento obtenido en los citados trabajos es mayor que el obtenido en el presente trabajo, lo cual podría estar en relación con el hecho de que la dieta de los animales de los experimentos citados incluía, además de las algas, alfalfa, que es una materia prima con un alto contenido en ALA (Alvarenga et al., 2015). Además, se ha visto que el peso de sacrificio, la localización de la explotación y la época del año en que se ceban los corderos son factores que también afectan al contenido de PUFA *n*-3 (Ponnampalam et al., 2014). En este sentido, Ponnampalam et al. (2016) indicaron que en corderos pesados el aumento en EPA y DHA era mayor cuando la dieta incluía algas (1,8%) que cuando contenía lino y algas (10,7% y 1,8%, respectivamente), siendo los valores de contenido de estos ácidos grasos similares a los observados en esta tesis.

En lo que concierne a los parámetros de calidad organoléptica de la carne, no se observaron diferencias significativas en la estabilidad oxidativa y atributos como el olor, flavor, terneza y jugosidad de la carne de los corderos alimentados con lino respecto a los que consumieron el concentrado comercial. Por el contrario, las dietas que contenían algas y lino causaron un efecto negativo sobre la oxidación lipídica provocando olores y sabores extraños en la carne. Estos resultados coinciden con los reportados por Ponnampalam et al. (2016) y Hopkins et al. (2014) en corderos alimentados con algas. El uso de antioxidantes como el α -tocoferol o vitamina E es un método efectivo para reducir la oxidación de los lípidos en la carne (Alvarenga et al., 2015). En este sentido, González et al. (2015) indicaron que en corderos ternascos de raza Rasa Aragonesa la suplementación con 500 mg de vitamina E/kg del concentrado durante un periodo de 7 a 14 días antes del sacrificio, obteniendo un rango de 0,61-0,90 mg/kg de este antioxidante en la carne, protegería la carne de la oxidación. Considerando que en el mencionado trabajo las dietas no eran ricas en PUFA, cuando se utilicen dietas enriquecidas como en la presente tesis la suplementación de vitamina E requerida deberá ser superior de forma que se alcancen valores de 2,95 mg/kg en la carne (Hopkins et al., 2014).

Por último, se ha estudiado la expresión de varios genes lipogénicos para tratar de comprender mejor la relación entre los mecanismos moleculares implicados en el metabolismo lipídico y las modificaciones observadas en la composición en ácidos grasos de la carne de cordero. Se llevó a cabo un análisis conjunto de los resultados con el total de los valores de expresión génica obtenidos en los tres grupos control y los tres grupos que incluían

un 10% de lino. Para ello se utilizó el método propuesto por Steibel et al. (2009) empleando el procedimiento MIXED del programa SAS. Los valores de Ct fueron transformados logarítmicamente utilizando la expresión $\log_2(\text{Eficiencia gen}^{-Ct})$ y se estimaron las diferencias entre los grupos. Además, se incluyeron los resultados de los lotes L5, Chia y L-A.

En la Figura 20 se representan las estimaciones de $-\text{Log}_2$ del “Fold Change” para diferentes grupos y genes en los tejidos SC e IM, de manera que para cada gen se indica entre paréntesis el contraste realizado. Así, el C-L10 es la estimación de la diferencia entre los grupos control y L10 (lino 10%) con los valores de los tres experimentos, el C-L5 representa la diferencia entre el grupo control y L5 y el C-Chia, el L-L-A y el L10-L-A las diferencias estimadas entre el grupo control y Chia, Control y L-A y L10 y L-A, respectivamente, mostrando en cada caso los resultados más destacables.

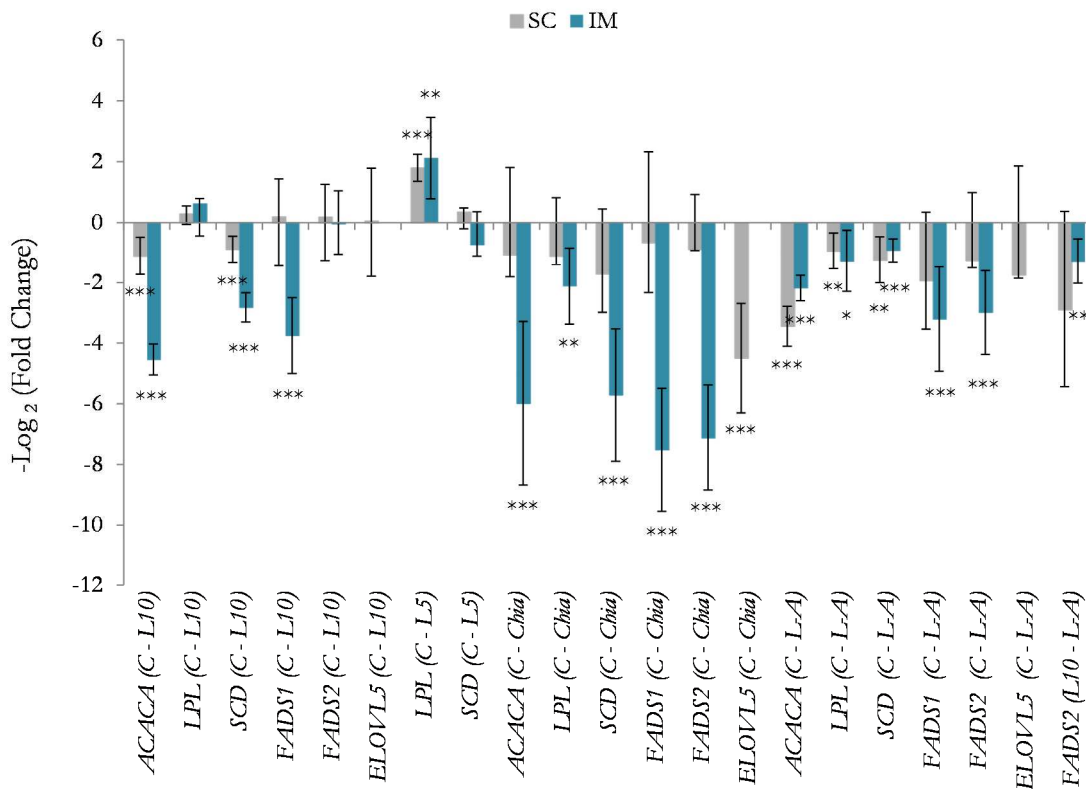


Figura 21. Estimaciones de $-\text{Log}_2$ del “Fold Change” para diferentes grupos en el tejido subcutáneo e intramuscular de los genes *acetil-CoA carboxilasa (ACACA)*, *lipoprotein lipasa (LPL)*, *estearoil-CoA desaturasa (SCD)*, *desaturasa de ácidos grasos 1 (FADS1)*, *desaturasa de ácidos grasos 2 (FADS2)* y *elongasa de ácidos grasos 5 (ELOVL5)*. Los segmentos indican el intervalo de confianza al 95%. *** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$. Las barras con valores negativos indican que la expresión del gen disminuye en el tratamiento indicado en segundo lugar.

Los resultados del análisis conjunto revelaron que la adición de un 10% de lino causaba

un efecto significativo sobre la expresión de los genes *ACACA*, *SCD* y *FADS1*, como se observa en la Figura 21. Los niveles de mRNA de los genes *ACACA* y *SCD* disminuyeron tanto en el depósito adiposo SC como en el IM. Respecto a los genes encargados de la desaturación y elongación de los PUFA, la adición de lino causó la inhibición del gen *FADS1* en el tejido IM. Por otra parte, no se observó variación de la expresión génica de la *LPL*.

El resultado más destacable observado al incluir un 5% de lino en la dieta fue la mayor expresión del gen *LPL* en ambos depósitos y la ausencia de variación en la cantidad de mRNA de la *SCD* respecto a los corderos del grupo control. La incorporación de la semilla de chía a la dieta influyó sobre la expresión de los genes *ACACA*, *SCD*, *FADS1* y *FADS2* en el depósito IM y sobre la del gen *ELOVL5* en el SC, encontrando en ambos depósitos menores niveles de expresión de estos genes respecto a los corderos alimentados con pienso convencional. Asimismo, la chía provocó la disminución de la expresión de la *LPL* en el tejido IM. De la misma manera, la adición de lino y algas inhibió la expresión del gen *LPL* tanto en el tejido SC como en el IM. Además, en general, la cantidad de mRNA transcrito de los genes *ACACA*, *SCD* en ambos tejidos y *FADS1* y *FADS2* en el tejido IM disminuyó en los animales alimentados con esta dieta.

Como se puede apreciar, la expresión del gen *LPL*, que codifica la enzima encargada de la incorporación de los ácidos grasos provenientes de la dieta a las células adiposas, mostró una respuesta diferente en función del porcentaje y la naturaleza de los ácidos grasos incluidos en la dieta, lo cual concuerda con lo constatado por otros autores (Angulo et al., 2012; Bernard et al., 2008). En el presente trabajo, la incorporación de PUFA a la dieta en menor proporción incrementó la expresión del gen; por el contrario, con el aumento de PUFA en la dieta la expresión de la *LPL* disminuyó, aumentando la expresión a medida que aumenta el número de insaturaciones de los ácidos grasos, como ocurrió en el caso de las algas, lo que podría indicar que la *LPL* es regulada a diferentes niveles y por diferentes mecanismos.

Por otra parte, los resultados indican que la incorporación de PUFA en la dieta, por medio de diferentes materias primas con un alto contenido en estos ácidos grasos, contribuyen a la reducción de la síntesis endógena de ácidos grasos, al menos a nivel transcripcional, al inhibir la expresión del gen *ACACA*, principalmente en el tejido IM. Sin embargo, el contenido en ácido palmítico (C16:0), ácido graso resultante de la formación endógena, en general no varió respecto a los animales del grupo control, lo cual pone de manifiesto que también estarían actuando en la regulación de la síntesis *de novo* de ácidos grasos otros mecanismos de regulación a nivel post-transcripcional o post-traduccionales (Sul,

2013).

Asimismo, la incorporación de lino (10%), chía y lino y algas afectaron a la formación de MUFA, como el ácido oleico o el CLA (ácido ruménico), a través de la represión de los niveles de mRNA del gen *SCD*, mostrando niveles inferiores en el tejido IM. Por otro lado, los resultados de la adición de un 5% de lino podrían indicar que un porcentaje más bajo de PUFA en la dieta posiblemente no alteraría la desaturación de ácidos grasos saturados y monoinsaturados. Uno de los mecanismos de regulación del gen *SCD* tiene lugar a través de la inhibición del elemento regulador *SREBF1* (Heinemann y Ozols, 2003). Los resultados del experimento 3 mostraban solamente una reducción de este factor de transcripción en los corderos alimentados con lino y algas en comparación a los que consumieron lino (10%). Por ello, es posible que otros mecanismos como los relacionados con la maduración del *SREBF1* o la actuación de otros factores de transcripción hubieran estado implicados en la regulación de este gen (Nakamura et al., 2014).

En referencia a los genes implicados en la formación de los LCPUFA, la mayor incorporación tanto de ALA, precursor de estos ácidos grasos, como de DHA, producto final de la cadena de formación, a través de lino y lino y algas, respectivamente, contribuyó a la reducción de la expresión de la *FADS1* y *FADS2*, ejerciendo un mayor efecto en el tejido IM. Además, los resultados muestran que la inclusión de DHA causó una mayor inhibición en los niveles de mRNA del gen *FADS2* que la adición de ALA, sugiriendo nuevamente que el número de insaturaciones de los PUFA podrían afectar de forma diferencial a la cadena de formación de los LCPUFA. A pesar de que no se observó una relación clara entre la expresión de los genes y el contenido de LCPUFA, su regulación transcripcional podría ser uno de los mecanismos responsables del limitado enriquecimiento en EPA, DPA o DHA pese a la mayor disponibilidad de su precursor ALA.

De forma general, es de destacar que la regulación de los genes implicados en el metabolismo lipídico mostró un mayor efecto en el tejido IM en comparación con el SC. Esta respuesta podría indicar que la cantidad de PUFA *n*-3 necesaria para causar una respuesta a nivel de la transcripción es menor en el depósito IM que en el SC lo que podría estar relacionado, según indicaron Raes et al. (2004), con la necesidad de mantener constante la composición de ácidos grasos de las membranas celulares, en orden a no alterar sus propiedades y por lo tanto su función.

5. CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos en las condiciones experimentales de la presente tesis se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. La inclusión de semilla de lino, en un 5% y un 10%, y de semilla de chía, en un 10%, en piensos isoenergéticos e isoproteicos durante el cebo de corderos de raza Navarra no ha tenido efecto sobre los parámetros productivos ni de calidad de la canal de los mismos. Por consiguiente, ambas materias primas ricas en PUFA *n*-3 pueden ser empleadas en las proporciones indicadas en la alimentación de corderos.
2. La adición de microalgas marinas (*Schyzochytrium* spp.) en una proporción de 3,89% junto con un 5% de semilla de lino ha disminuido el rendimiento productivo de los corderos, provocando una disminución en la ingestión de pienso y en la ganancia media diaria y un peor índice de conversión de pienso. Por ello, es necesario realizar más estudios para determinar la dosis idónea y así mantener los beneficios de la utilización de las algas sin alterar el rendimiento de los animales.
3. En el tejido intramuscular, la ingestión de las diferentes fuentes lipídicas estudiadas con un alto contenido en PUFA no ha producido variaciones en el número y tamaño de adipocitos, lo cual concuerda con la ausencia de variación de la actividad de las enzimas FAS, G3PDH, G6PDH e ICDH y la expresión de los factores de transcripción adipogénicos *PPARG*, *CEBPA* y *SREBF1*. El predominio marcado de adipocitos de pequeño tamaño (20 - 30 μ m de diámetro) estaría de acuerdo con el hecho de que el depósito intramuscular se desarrolla de forma tardía debido a su localización dentro del músculo y podría ser resultado además de la constricción causada por las fibras musculares sobre las células adiposas.
4. En el depósito subcutáneo de los corderos que fueron alimentados con algas y lino se observó una mayor frecuencia de los adipocitos de mayor tamaño, acompañada de un incremento de la expresión de los factores de transcripción *PPARG* y *CEBPA*. Por lo tanto, el aporte de lino de forma conjunta con las algas parece que estimula la hipertrofia de los adipocitos aunque también podría contribuir a este efecto la diferencia de edad al sacrificio.
5. Las dietas que incluían lino o chía han promovido un perfil de ácidos grasos más saludable en la carne, debido al mayor contenido en ALA y PUFA *n*-3 que condujo a una menor ratio PUFA *n*-6/*n*-3, sin alterar la calidad de la carne. En cambio, el

incremento de EPA y DPA ha sido limitado y no ha aumentado la concentración de DHA, por lo que esta carne no puede ser declarada como “Fuente de” o “Alimento con alto contenido de ácidos grasos Omega-3” (Reglamento nº 116/2010 de la Comisión Europea). Por lo tanto, estos resultados muestran la necesidad de incluir una fuente rica en LCPUFA *n*-3 en la dieta de los corderos para lograr un incremento en EPA, DPA y DHA, debido a que su síntesis a partir del ALA es limitada.

6. La adición de algas y lino ha resultado la estrategia más adecuada para mejorar el perfil de ácidos grasos de la carne, dado que conlleva un incremento en ALA, PUFA *n*-3, EPA, DPA y especialmente en DHA. Sin embargo, afecta adversamente a la calidad de la carne causando una mayor oxidación lipídica, la formación de olores y sabores extraños y una menor aceptabilidad por parte de los consumidores. Por ello, podría ser conveniente adicionar antioxidantes cuando se incluyan algas en la dieta de los corderos.
7. El aumento de los ácidos grasos intermediarios del proceso de la biohidrogenación ruminal C18:1 *n*-7 + C18:1 *n*-6 (ácido *trans*-vaccénico) observado en los depósitos intramuscular y subcutáneo de corderos alimentados con dietas enriquecidas con las tres fuentes lipídicas estudiadas evidencia la intensa biohidrogenación ruminal del ALA, lo que resulta en una menor deposición de este ácido graso en los tejidos adiposos.
8. El contenido del isómero C18:2 *n*-7 de los CLA, que presenta propiedades anticarcinógenas y antiinflamatorias, no ha sido modificado por la mayor ingestión de materias primas ricas en PUFA. Este resultado podría ser atribuido, entre otras causas, a la inhibición de la expresión del gen *SCD* implicado en su síntesis endógena.
9. Los PUFA de la dieta actúan sobre la lipogénesis, al menos a nivel transcripcional, inhibiendo la *ACACA* y la *SCD*. El lino y chía, fuentes de ALA, y principalmente las algas, fuente de DHA, causan un efecto inhibitor sobre la expresión de los genes *FADS1* y *FADS2*, implicados en la formación de LCPUFA *n*-3. Además, el efecto de los PUFA sobre la expresión del gen *LPL* depende del porcentaje y la naturaleza de los PUFA ingeridos. Consecuentemente, dado que la adición de estas materias primas en la dieta modula la expresión de varios genes relacionados con el metabolismo lipídico en los tejidos subcutáneo e intramuscular, un mayor conocimiento de los mecanismos moleculares y bioquímicos implicados en este proceso ayudaría a definir el nivel de inclusión de PUFA adecuado para minimizar sus efectos sobre la lipogénesis y así obtener mayores concentraciones de ALA, EPA, DHA y C18:2 *n*-7 en la carne.

10. La inhibición de los genes *ACACA*, *SCD*, *FADS1* y *FADS2* al incrementar la cantidad de PUFA en la dieta ha sido mayor en el depósito intramuscular que en el subcutáneo. Esta respuesta indicaría la cantidad de PUFA *n*-3 necesaria para causar una respuesta a nivel transcripcional es menor en el depósito intramuscular y puede tener como objetivo el mantener constante la composición de ácidos grasos de las membranas celulares, en orden a no alterar sus propiedades y, por lo tanto, su función.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allen, C.E., 1976. Cellularity of adipose tissue in meat animals. *Fed. Proc.* 35, 2302-2307.
- Alvarenga, T.I.R.C., Chen, Y., Furusho-Garcia, I.F., Perez, J.R.O., Hopkins, D.L., 2015. Manipulation of Omega-3 PUFAs in lamb: Phenotypic and genotypic views. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 14, 189-204. doi:10.1111/1541-4337.12131
- Alvarenga, T.I.R.C., Chen, Y., Lewandowski, P., Ponnampalam, E.N., Sediq, S., Clayton, E.H., van de Ven, R.J., Perez, J.R.O., Hopkins, D.L., 2016. The expression of genes encoding enzymes regulating fat metabolism is affected by maternal nutrition when lambs are fed algae high in omega-3. *Livest. Sci.* 187, 53-60. doi:10.1016/j.livsci.2016.02.013
- Alves, S.P., Bessa, R.J.B., 2014. The *trans*-10, *cis*-15 18:2: a Missing Intermediate of *trans*-10 Shifted Rumen Biohydrogenation Pathway? *Lipids* 49, 527-541.
- Anderson, B.M., Ma, D.W., 2009. Are all n-3 polyunsaturated fatty acids created equal?. *Lipids Heal. Dis.* 8, 33. doi:10.1186/1476-511X-8-33
- Angulo, J., Mahecha, L., Nuernberg, K., Nuernberg, G., Dannenberger, D., Olivera, M., Boutinaud, M., Leroux, C., Albrecht, E., Bernard, L., 2012. Effects of polyunsaturated fatty acids from plant oils and algae on milk fat yield and composition are associated with mammary lipogenic and SREBF1 gene expression. *Animal* 6, 1961-1972. doi:10.1017/S1751731112000845
- Annett, R.W., Carson, A.F., Dawson, L.E.R., Kilpatrick, D.J., 2011. Effects of dam breed and dietary source of n-3 polyunsaturated fatty acids on the growth and carcass characteristics of lambs sourced from hill sheep flocks. *Animal* 5, 1023-1035.
- Aoyama, T., Peters, J.M., Iritani, N., Nakajima, T., Furihata, K., Hashimoto, T., Gonzalez, F.J., 1998. Altered constitutive expression of fatty acid metabolizing enzymes in mice lacking the peroxisome proliferator activated receptor alpha (PPARalpha). *J. Biol. Chem.* 273, 5678-5684. doi:10.1074/jbc.273.10.5678
- Arana, A., Mendizabal, J.A., Alzón, M., Eguinoa, P., Beriain, M.J., Purroy, A., 2006. Effect of feeding lambs oleic acid calcium soaps on growth, adipose tissue development and composition. *Small Rumin. Res.* 63, 75-83.
- Arana, A., Mendizabal, J.A., Alzón, M., Soret, B., Purroy, A., 2008. The effect of vitamin A supplementation on postnatal adipose tissue development of lambs. *J. Anim. Sci.* 86, 3393-3400. doi:10.2527/jas.2008-0889
- Aranceta, J., Pérez-Rodrigo, C., 2012. Recommended dietary reference intakes, nutritional goals and dietary guidelines for fat and fatty acids: a systematic review. *Br. J. Nutr.* 107, S8-S22.
- Asano, H., Yamada, T., Hashimoto, O., Umemoto, T., Sato, R., Ohwatari, S., Kanamori, Y., Terachi, T., Funaba, M., Matsui, T., 2013. Diet-induced changes in Ucp1 expression in bovine adipose tissues. *Gen. Comp. Endocrinol.* 184, 87-92. doi:10.1016/j.ygcen.2013.01.006
- Ashes, J.R., Siebert, B.D., Gulati, S.K., Cuthbertson, A.Z., Scott, T.W., 1992. Incorporation of n-3 fatty acids of fish oil into tissue and serum lipids of ruminants. *Lipids* 27, 629-631.
- Atti, N., Methlouthi, N., Saidi, C., Mahouachi, M., 2013. Effects of extruded linseed on muscle physicochemical characteristics and fatty acid composition of lambs. *J. Appl. Anim. Res.* 41, 404-409. doi:10.1080/09712119.2013.792730
- Aurousseau, B., Bauchart, D., Calichon, E., Micol, D., Priolo, A., 2004. Effect of grass or concentrate feeding systems and rate of growth on triglyceride and phospholipid and their fatty acids in the *M. longissimus thoracis* of lambs. *Meat Sci.* 66, 531-541. doi:10.1016/S0309-1740(03)00156-6
- Ayerza, R., Coates, W., 2004. Composition of chia (*Salvia hispanica*) grown in six tropical and

- subtropical ecosystems of South America. *Trop. Sci.* 44, 131-135. doi:10.1002/ts.154
- Ayerza, R., Coates, W., 2001. Omega-3 enriched eggs: the influence of dietary α -linolenic fatty acid source on egg production and composition. *Can. J. Anim. Sci.* 81, 355-362.
- Ayerza, R., Coates, W., Lauria, M., 2006. Influence of chia on total fat, cholesterol, and fatty acid profile of Holstein cow's milk, en: Association for the Advancement of Industrial Crops Meeting. Universidad de Ciencias Empresariales y Sociales (UCES), pp. 39-48.
- Ayerza, R., Coates, W., Lauria, M., 2002. Chia seed (*Salvia hispanica* L.) as an omega-3 fatty acid source for broilers: influence on fatty acid composition, cholesterol and fat content of white and dark meats, growth performance, and sensory characteristics. *Poult. Sci.* 81, 826-837.
- Azcona, J.O., Schang, M.J., Garcia, P.T., Gallinger, C., Ayerza Jr., R., Coates, W., 2008. Omega-3 enriched broiler meat: the influence of dietary α -linolenic- ω -3 fatty acid sources on growth, performance and meat fatty acid composition. *Can. J. Anim. Sci.* 88, 257-269.
- Baik, M., Jeong, J.Y., Vu, T.-T.T., Piao, M.Y., Kang, H.J., 2014. Effects of castration on the adiposity and expression of lipid metabolism genes in various fat depots of Korean cattle. *Livest. Sci.* 168, 168-176.
- Banskalieva, V., Sahlu, T., Goetsch, A.L., 2000. Fatty acid composition of goat muscles and fat depots: a review. *Small Rumin. Res.* 37, 255-268. doi:10.1016/S0921-4488(00)00128-0
- Barber, M.C., Price, N.T., Travers, M.T., 2005. Structure and regulation of acetyl-CoA carboxylase genes of metazoa. *Biochim. Biophys. Acta* 1733, 1-28. doi:10.1016/j.bbaliip.2004.12.001
- Barber, M.C., Ward, R.J., Richards, S.E., Salter, A.M., Buttery, P.J., Vernon, R.G., Travers, M.T., 2000. Ovine adipose tissue monounsaturated fat content is correlated to depot-specific expression of the stearoyl-CoA desaturase gene. *J. Anim. Sci.* 78, 62-68. doi:/2000.78162x
- Barish, G.D., Narkar, V.A., Evans, R.M., 2006. PPAR delta: a dagger in the heart of the metabolic syndrome. *J. Clin. Invest.* 116, 590-597. doi:10.1172/JCI27955
- Bas, P., Berthelot, V., Pottier, E., Normand, J., 2007. Effect of level of linseed on fatty acid composition of muscles and adipose tissues of lambs with emphasis on trans fatty acids. *Meat Sci.* 77, 678-688.
- Bauchart, D., Legay-Carmier, F., Doreau, M., 1990. Ruminant hydrolysis of dietary triglycerides in dairy cows fed lipid-supplemented diets. *Reprod. Nutr. Dev.* 30, 187s.
- Bauman, D.E., Baumgard, L.H., Corl, B.A., Griinari, J.M., 2000. Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants, en: American Society of Animal Science. pp. 1-15. doi:10.1007/BF02664761
- Bauman, D.E., Harvatine, K.J., Lock, A.L., 2011. Nutrigenomics, rumen derived bioactive fatty acids, and the regulation of milk fat synthesis, en: The Annual Review of Nutrition. pp. 299-319.
- Bauman, D.E., Perfield, J.W., de Veth, M.J., Lock, A.L., 2003. New perspectives on lipid digestion and metabolism in ruminants, en: Proceedings of Cornell Nutrition Conference. pp. 175-189.
- Bazan, N.G., 2007. Omega-3 fatty acids, pro-inflammatory signaling and neuroprotection. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metabolic Care* 10, 136-41. doi:10.1097/MCO.0b013e32802b7030
- Belury, M.A., 2002. Dietary conjugated linoleic acid in health: physiological effects and mechanisms of action. *Annu. Rev. Nutr.* 22, 505-531. doi:10.1146/annurev.nutr.22.021302.121842
- Bennett, M.K., Lopez, J.M., Sanchez, H.B., Osborne, T.F., 1995. Sterol regulation of Fatty Acid Synthase promoter. *J. Biol. Chem.* 270, 25578-25583.

- Beriain, M.J., Purroy, A., Treacher, T., Bas, P., 2000. Effect of animal and nutritional factors and nutrition on lamb meat quality. *Cah. Options Méditerranéennes* 86, 75-86.
- Bernard, L., Leroux, C., Chilliard, Y., 2008. Expression and nutritional regulation of lipogenic genes in the ruminant lactating mammary gland, en: Bösze, Z. (Ed.), *Bioactive components of milk, advances in experimental biology and medicine*. Springer, New York, USA, pp. 67-108.
- Bernard, L., Rouel, J., Leroux, C., Ferlay, A., Faulconnier, Y., Legrand, P., Chilliard, Y., 2005. Mammary lipid metabolism and milk fatty acid secretion in alpine goats fed vegetable lipids. *J. Dairy Sci.* 88, 1478-1489. doi:10.3168/jds.S0022-0302(05)72816-2
- Berthelot, V., Bas, P., Pottier, E., Normand, J., 2012. The effect of maternal linseed supplementation and/or lamb linseed supplementation on muscle and subcutaneous adipose tissue fatty acid composition of indoor lambs. *Meat Sci.* 90, 548-557. doi:10.1016/j.meatsci.2011.09.014
- Berthelot, V., Bas, P., Schmidely, P., 2010. Utilization of extruded linseed to modify fatty composition of intensively-reared lamb meat: Effect of associated cereals (wheat vs. corn) and linoleic acid content of the diet. *Meat Sci.* 84, 114-124.
- Bessa, R.J.B., Alves, S.P., Jerónimo, E., Alfaia, C.M., Prates, J.A.M., Santos-Silva, J., 2007. Effect of lipid supplements on ruminal biohydrogenation intermediates and muscle fatty acids in lambs. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 109, 868-878.
- BOE N° 140, 2002. Orden APA/1413/2002, de 23 de mayo, por la que se ratifica el Reglamento de la Indicación Geográfica Protegida «Cordero de Navarra» o «Nafarroako Arkumea» y de su Consejo Regulador.
- BOE N° 279, 1997. Real Decreto 1682/1997 de 7 de noviembre, por el que se actualiza el Catálogo Oficial de Razas de Ganado de España. España.
- Boeckaert, C., Vlaeminck, B., Dijkstra, J., Issa-Zacharia, A., Van Nespen, T., Van Straalen, W., Fievez, V., 2008. Effect of dietary starch or micro algae supplementation on rumen fermentation and milk fatty acid composition of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 91, 4714-4727.
- Bonnet, M., Cassar-Malek, I., Chilliard, Y., Picard, B., 2010. Ontogenesis of muscle and adipose tissues and their interactions in ruminants and other species. *Animal* 4, 1093-1109.
- Bonnet, M., Faulconnier, Y., Flechet, J., Hocquette, J.F., Leroux, C., Langin, D., Martin, P., Chilliard, Y., 1998. Messenger RNAs encoding lipoprotein lipase, fatty acid synthase and hormone-sensitive lipase in the adipose tissue of underfed-refed ewes and cows. *Reprod. Nutr. Dev.* 38, 297-307. doi:S0926528798800105
- Brenner, R.R., 1989. Factors influencing fatty acid chain elongation and desaturation, en: Vergroesen, A.J., Crawford, M. (Eds.), *Role of Fats in Human Nutrition*. Academic Press, California, USA, pp. 45-79.
- British Department of Health, 1994. *Nutritional aspects of cardiovascular disease. Report on health and social subjects*. HMSO, London, UK.
- Brownsey, R.W., Boone, A.N., Elliott, J.E., Kulpa, J.E., Lee, W.M., 2006. Regulation of acetyl-CoA carboxylase. *Biochem. Soc. Trans.* 34, 223-227. doi:10.1042/BST20060223
- Buccioni, A., Decandia, M., Minieri, S., Molle, G., Cabiddu, A., 2012. Lipid metabolism in the rumen: new insights on lipolysis and biohydrogenation with an emphasis on the role of endogenous plant factors. *Anim. Feed Sci. Technol.* 174, 1-25.
- Burnett, V.F., Jacobs, J.L., D, S.N., Ponnampalam, E.N., 2016. Feed intake, liveweight gain and carcass traits of lambs offered pelleted annual pasture hay supplemented with flaxseed (*Linum*

- usitatissimum*) flakes or algae (*Schizochytrium* sp.). Anim. Prod. Sci. doi:<http://dx.doi.org/10.1071/AN15230>
- Campo, M.M., 2016. Principales características de la carne de cordero. Noticias Foro AgroGanadero. Acceso Junio 2016. Disponible en <http://foroagroganadero.com/news/new/IdNew/58/Option/3>.
- Campo, M.M., Nute, G.R., Hughes, S.I., Enser, M., Wood, J.D., Richardson, R.I., 2006. Flavour perception of oxidation in beef. Meat Sci. 72, 303-311. doi:10.1016/j.meatsci.2005.07.015
- Carrero, J.J., Martín-Bautista, E., Baró, L., Fonollá, J., Jiménez, J., Boza, J.J., López-Huertas, E., 2005. Efectos cardiovasculares de los ácidos grasos omega-3 y alternativas para incrementar su ingesta. Nutr. Hosp. 20, 63-69.
- Chen, Y., Shao, J.-Z., Xiang, L.-X., Dong, X.-J., Zhang, G.-R., 2008. Mesenchymal stem cells: a promising candidate in regenerative medicine. Int. J. Biochem. Cell Biol. 40, 815-820.
- Chilliard, Y., Ferlay, A., Doreau, M., 2001. Effect of different types of forages, animal fat or marine oils in cows diet on milk fat secretion and composition, especially conjugated linoleic acid (CLA) and polyunsaturated fatty acids. 70, 31-48.
- Coates, W., Ayerza, R., 2009. Chia (*Salvia hispanica* L.) seed as an n-3 fatty acid source for finishing pigs: Effects on fatty acid composition and fat stability of the meat and internal fat, growth performance, and meat sensory characteristics. J. Anim. Sci. 87, 3798-3804. doi:10.2527/jas.2009-1987
- Coates, W., Ayerza, R., 1996. Production potential of chia in northwestern Argentina. Ind. Crops Prod. 5, 229-233. doi:10.1007/s11746-998-0192-7
- Comisión Europea, 2010. Reglamento (UE) N° 116/2010 de la Comisión de 9 de febrero de 2010 por el que se modifica el Reglamento (CE) n° 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo relativo a la lista de declaraciones nutricionales.
- Conte, G., Jerónimo, E., Serra, A., Bessa, R.J.B., Mele, M., 2012. Effect of dietary polyunsaturated fatty acids on Stearoyl CoA-Desaturase gene expression in intramuscular lipids of lamb. Ital. J. Anim. Sci. 11, 453-458. doi:10.4081/ijas.2012.e79
- Cooper, S.L., Sinclair, L.A., Wilkinson, R.G., Hallett, K.G., Enser, M., Wood, J.D., 2004. Manipulation of the n-3 polyunsaturated fatty acid content of muscle and adipose tissue in lambs. J. Anim. Sci. 82, 1461-1470.
- Dalle Zotte, A., 2002. Perception of rabbit meat quality and major factors influencing the rabbit carcass and meat quality. Livest. Prod. Sci. 75, 11-32.
- Davis, C.L., 1990. Fat in Animals Feeds. Barnaby Inc., Sycamore, IL.
- de la Fuente-Vázquez, J., Díaz-Díaz-Chirón, M.T., Pérez-Marcos, C., Cañeque-Martínez, V., Sánchez-González, C.I., Álvarez-Acero, I., Fernández-Bermejo, C., Rivas-Cañedo, A., Lauzurica-Gómez, S., 2014. Linseed, microalgae or fish oil dietary supplementation affects performance and quality characteristics of light lambs. Spanish J. Agric. Res. 12, 436-447. doi:10.5424/sjar/2014122-4639
- Delfa, R., Teixeira, A., 1998. Calidad de la canal ovina, en: Buxadé, C. (Ed.), Ovino de Carne: aspectos claves. Mundi-Prensa, Madrid, Spain, Spain, pp. 375-418.
- Demeyer, D., Doreau, M., 1999. Targets and procedures for altering ruminant meat and milk lipids. Proc. Nutr. Soc. 58, 593-607. doi:10.1017/S0029665199000786

- Demirel, G., Wachira, A.M., Sinclair, L.A., Wilkinson, R.G., Wood, J.D., 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. *Br. J. Nutr.* 91, 551-565. doi:10.1079/BJN20031079
- Dervishi, E., Serrano, C., Joy, M., Serrano, M., Rodellar, C., Calvo, J.H., 2011. The effect of feeding system in the expression of genes related with fat metabolism in semitendinous muscle in sheep. *Meat Sci.* 89, 91-97.
- Dodson, M. V., Hausman, G.J., Guan, L., Du, M., Rasmussen, T.P., 2010. Lipid metabolism, adipocyte depot physiology and utilization of meat animals as experimental models for metabolic research. *Int. J. Biol. Sci.* 6, 691-699.
- Doreau, M., Chilliard, Y., 1997. Digestion and metabolism of dietary fat in farm animals. *Br. J. Nutr.* 78, S15-S35. doi:10.1079/BJN19970132
- Duckett, S.K., Wagner, D.G., Yates, L.D., Dolezal, H.G., May, S.G., 1993. Effects of time on feed on beef nutrient composition. *J. Anim. Sci.* 71, 2079-2088. doi:/1993.7182079x
- Eguinoa, P., Brocklehurst, S., Arana, A., Mendizabal, J.A., Vernon, R.G., Purroy, A., Brocklehurst, S., Arana, A., Mendizabal, J.A., Vernon, R.G., Purroy, A., 2003. Lipogenic enzyme activities in different adipose depots of Pirenaican and Holstein bulls and heifers taking into account adipocyte size 81, 432-440.
- Eguinoa, P., Granada, A., Lanas, S., 2004. Caracterización de las canales de cordero ternasco producido en Navarra. *Navarra Agrar.* 147, 31-37.
- Enerbäck, S., Gimble, J.M., 1993. Lipoprotein lipase gene expression: physiological regulators at the transcriptional and post-transcriptional level. *Biochim. Biophys. Acta* 1169, 107-125. doi:10.1016/0005-2760(93)90196-G
- Enser, M., Hallett, K., Hewitt, B., Fursey, G.A.J., Wood, J.D., 1996. Fatty acid content and composition of English beef, lamb and pork at retail. *Meat Sci.* 42, 443-456.
- Enser, M., Hallett, K.G., Hewitt, B., Fursey, G.A.J., Wood, J.D., Harrington, G., Hewitt, B., Fursey, G.A.J., Wood, J.D., Harrington, G., 1998. Fatty acid content and composition of UK beef and lamb muscle in relation to production system and implications for human nutrition. *Meat Sci.* 49, 329-341. doi:10.1016/S0309-1740(97)00144-7
- Eurostat, 2016. Meat production statistics. Acceso Julio 2016. Disponible en http://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Meat_production_statistics.
- Fajas, L., Auboeuf, D., Raspé, E., Schoonjans, K., Lefebvre, A.M., Saladin, R., Najib, J., Laville, M., Fruchart, J.C., Deeb, S., Vidal-Puig, A., Flier, J., Briggs, M.R., Staels, B., Vidal, H., Auwerx, J., 1997. The organization, promoter analysis, and expression of the human PPAR gamma gene. *J. Biol. Chem.* 272, 18779-89. doi:10.1074/jbc.272.30.18779
- FAO/WHO, 2008. Grasas y ácidos grasos en nutrición humana. Consulta mixta de expertos FAO/WHO. Ginebra, Noviembre 2008. Estudio FAO Alimentación y Nutrición, 91. doi:978-92-5-3067336
- Feagas, 2016. Federación Española de Asociaciones de Ganado Selecto. Acceso Enero 2016. Disponible en <http://feagas.com/index.php/es/razas/especie-ovina/navarra#.V6HO0qJy6MU>.
- Feige, J.N., Gelman, L., Michalik, L., Desvergne, B., Wahli, W., 2006. From molecular action to physiological outputs: peroxisome proliferator-activated receptors are nuclear receptors at the crossroads of key cellular functions. *Prog. Lipid Res.* 45, 120-159.

- Flint, D.J., Vernon, R.G., 1993. Hormones and adipose tissue growth, en: Schreibman, M., Scanes, G., Pang, P. (Eds.), *Vertebrate Endocrinology: Fundamentals and Biomedical Implications*. Academic Press, Orlando, pp. 469-494.
- Francisco, A., Alves, S.P., Portugal, P. V, Pires, V.M.R., Dentinho, M.T., Alfaia, C.P.M., Santos-Silva, J., Bessa, R.J.B., 2016. Effect of feeding lambs with a tanniferous shrub (rockrose) and a vegetable oil blend on fatty acid composition of meat lipids. *Animal* 1-13. doi:10.1017/S1751731116001129
- Franklin, S.T., Martin, K.R., Baer, R.J., Schingoethe, D.J., Hippen, A.R., 1999. Dietary marine algae (*Schizochytrium* sp.) increases concentrations of conjugated linoleic, docosahexaenoic and transvaccenic acids in milk of dairy cows. *J. Nutr.* 129, 2048-2054.
- Garton, G.A., Lough, A.K., Vioque, E., 1961. Glyceride hydrolysis and glycerol fermentation by sheep rumen contents. *J. Gen. Microbiol.* 25, 215-225.
- Gbaguidi, F.G., Chinetti, G., Milosavljevic, D., Teissier, E., Chapman, J., Olivecrona, G., Fruchart, J.C., Griglio, S., Fruchart-Najib, J., Staels, B., 2002. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) agonists decrease lipoprotein lipase secretion and glycated LDL uptake by human macrophages. *FEBS Lett.* 512, 85-90. doi:10.1016/S0014-5793(02)02223-8
- Giannico, F., Colonna, M.A., Coluccia, A., Crocco, D., Vonghia, G., Cocca, C., Jambrenghi, A.C., 2009. Extruded linseed and linseed oil as alternative to soybean meal and soybean oil in diets for fattening lambs. *Ital. J. Anim. Sci.* 8, 495-497.
- Gobierno de Navarra, 2016. Encuestas Ganaderas. Negociado de Estadística. Departamento de Desarrollo Rural, Medio Ambiente y Administración Local. Acceso Julio 2016. Disponible en http://www.navarra.es/home_es/Temas/Ambito+rural/Vida+rural/Observatorio+agrario/Ganadero/Informacion+estadistica/Efectivos+ganaderos.htm.
- Gómez Candela, C., Bermejo López, L.M., Loria Kohen, V., 2011. Importancia del equilibrio del índice omega-6/omega-3 en el mantenimiento de un buen estado de salud. recomendaciones nutricionales. *Nutr. Hosp.* 26, 323-329. doi:10.3305/nh.2011.26.2.5117
- Gondret, F., Guitton, N., Guillermin-Regost, C., Louveau, I., 2008. Regional differences in porcine adipocytes isolated from skeletal muscle and adipose tissues as identified by a proteomic approach. *J. Anim. Sci.* 86, 2115-2125. doi:10.2527/jas.2007-0750
- González, L., González-calvo, L., Ripoll, G., Molino, F., 2015. The relationship between muscle α -tocopherol concentration and meat oxidation in light lambs fed vitamin E supplements prior to slaughter. *J. Food Agric. Sci.* 95, 103-110. doi:10.1002/jsfa.6688
- Grant, A.C., Doumit, M.E., Tempelman, R.J., Buskirk, D.D., 2015. Differentiation of bovine intramuscular and subcutaneous stromal-vascular cells exposed to dexamethasone and troglitazone. *Am. Soc. Anim. Sci.* 86, 2531-2538. doi:10.2527/jas.2008-0860
- Graunard, D.E., Piantoni, P., Bionaz, M., Berger, L.L., Faulkner, D.B., Looor, J.J., 2009. Adipogenic and energy metabolism gene networks in *longissimus lumborum* during rapid post-weaning growth in Angus and Angus x Simmental cattle fed high-starch or low-starch diets. *BMC Genomics* 10, 142. doi: 10.1186/1471-2164-10-142
- Gregoire, F.M., Smas, C.M., Sul, H.S., 1998. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol. Rev.* 78, 783-809. doi:10.1074/jbc.272.8.5128
- Grenet, E., Besle, J.M., 1991. Microbes and fibre degradation, en: Jouany, J.-P. (Ed.), *Rumen Microbial Metabolism and Ruminant Digestion*. INRA Editions, Paris, pp. 107-129.

- Grünari, J.M., Bauman, D.E., 1999. Biosynthesis of conjugated linoleic acid and its incorporation into meat and milk in ruminants, en: Yurawecs, M., Mossoba, M., Kramer, J.K.G., Pariza, J., Nelson, G. (Eds.), *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research Vol. 1*. AOCS Press, Champaign, pp. 180-200.
- Hammond, J.A., 1952. Physiological limits to intensive production in animals. *Br. Agric. Bull.* 4, 222.
- Hanson, R.W., Ballard, F.J., 1967. The relative significance of acetate and glucose as precursors for lipid synthesis in liver and adipose tissue from ruminants. *Biochem. J.* 105, 529-36. doi:10.1042/bj1050529
- Harfoot, C.G., 1981. Lipid metabolism in the rumen, en: Christie (Ed.), *Lipid Metabolism in Ruminant Animals*. Oxford, UK, pp. 25-55.
- Harms, M., Seale, P., 2013. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nat. Med.* 19, 1252-63. doi:10.1038/nm.3361
- Hausman, D.B., DiGirolamo, M., Bartness, T.J., Hausman, G.J., Martin, R.J., 2001. The biology of white adipocyte proliferation. *Obes. Rev.* 2, 239-254.
- Hausman, G.J., Dodson, M. V., Ajuwon, K., Azain, M., Barnes, K.M., Guan, L.L., Jiang, Z., Poulos, S.P., Sainz, R.D., Smith, S., Spurlock, M., Novakofski, J., Fernyhough, M.E., Bergen, W.G., 2009. Board-invited review: the biology and regulation of preadipocytes and adipocytes in meat animals. *J. Anim. Sci.* 87, 1218-1246. doi:10.2527/jas.2008-1427
- Heinemann, F.S., Ozols, J., 2003. Stearoyl-CoA desaturase, a short-lived protein of endoplasmic reticulum with multiple control mechanisms. *Prostaglandins, Leukot. Essent. Fat. Acids* 68, 123-133. doi:10.1016/S0952-3278(02)00262-4
- Hocquette, J.-F., Bauchart, D., 1999. Intestinal absorption, blood transport and hepatic and muscle metabolism of fatty acids in preruminant and ruminant animals. *Intestinal absorption, blood transport and hepatic and muscle metabolism of fatty acids in preruminant and ruminant animals. Reprod. Nutr. Dev.* 39, 27-48.
- Hocquette, J.F., Gondret, F., Baéza, E., Médale, F., Jurie, C., Pethick, D.W., 2010. Intramuscular fat content in meat-producing animals: development, genetic and nutritional control, and identification of putative markers. *Animal* 4, 303-319. doi:10.1017/S1751731109991091
- Hood, R.L., Allen, C.E., 1973. Cellularity of bovine adipose tissue. *J. Lipid Res.* 14, 605-610.
- Hopkins, D.L., Clayton, E.H., Lamb, T.A., Ven, R.J., Van De, Refshauge, G., Kerr, M.J., Bailes, K., Lewandowski, P., Ponnampalam, E.N., 2014. The impact of supplementing lambs with algae on growth, meat traits and oxidative status. *Meat Sci.* 98, 135-141. doi:10.1016/j.meatsci.2014.05.016
- Horton, J.D., Goldstein, J.L., Brown, M.S., 2002. Critical review. *J. Clin. Invest.* 109, 1125-1131. doi:10.1172/JCI200215593.Lipid
- Houseknecht, K.L., Cole, B.M., Steele, P.J., 2002. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) and its ligands: a review. *Domest. Anim. Endocrinol.* 22, 1-23. doi:10.1016/S0739-7240(01)00117-5
- Howes, N.L., Bekhit, A.E.D.A., Burritt, D.J., Campbell, A.W., 2015. Opportunities and implications of pasture-based lamb fattening to enhance the long-chain fatty acid composition in meat. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 14, 22-36. doi:10.1111/1541-4337.12118
- Hu, E., Tontonoz, P., Spiegelman, B.M., 1995. Transdifferentiation of myoblasts by the adipogenic transcription factors PPAR gamma and C/EBP alpha. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 9856-

60. doi:10.1073/pnas.92.21.9856
- Huth, P.J., 2007. Ruminant trans fatty acids: composition and nutritional characteristic, en: List, G.R., Kristchevsky, D., Ratnayake, W. (Eds.), *Trans Fats in Foods*. AOCS Press, Urbana, pp. 97-126.
- Ingle, D.L., Bauman, D.E., Garrigus, U.S., 1972. Lipogenesis in the ruminant: in vivo site of fatty acid synthesis in sheep. *J. Nutr.* 102, 617-626.
- Interovic, 2015. Memoria de Actividades Interovic. Acceso Julio 2016. Disponible en <http://www.interovic.es/memoria-de-actividades-de-interovic-2015>.
- Ishii, S., Ilzuka, K., Miller, B.C., Uyeda, K., 2004. Carbohydrate Response Element Binding Protein directly promotes lipogenic enzyme, en: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. pp. 15597-15602.
- IUPAC-IUB, 1976. Nomenclature of Lipids. *Biochem. J.* 171, 21-35.
- Jakobsen, M.U., O'Reilly, E.J., Heitmann, B.L., Pereira, M.A., Balter, K., Fraser, G.E., Goldbourt, U., Hallmans, G., Knekt, P., Liu, S., Pietinen, P., Spiegelman, D., Stevens, J., Virtamo, J., Willett, W.C., Ascherio, A., 2009. Major types of dietary fat and risk of coronary heart disease: a pooled analysis of 11 cohort studies. *Am. J. Clin. Nutr.* 89, 1425-1432. doi:10.3945/ajcn.2008.27124
- Jayan, G.C., Herbein, J.H., 2000. «Healthier» dairy fat using trans-vaccenic acid. *Nutr. Food Sci.* 30, 304-309. doi: 10.1108/00346650010352924
- Jenkins, T.C., Wallace, R.J., Moate, P.J., Mosley, E.E., 2008. Board-invited review: recent advances in biohydrogenation of unsaturated fatty acids within the rumen microbial ecosystem. *J. Anim. Sci.* 86, 397-412. doi:10.2527/jas.2007-0588
- Jiménez, P., Masson, S., Quitral, R., 2013. Chemical composition of chia seed, flaxseed and rosehip and its contribution in fatty acids omega-3. *Rev. Chil. Nutr.* 40, 155-160.
- Jitrapakdee, S., Wallace, J.C., 2003. The biotin enzyme family: conserved structural motifs and domain rearrangements. *Curr. Protein Pept. Sci.* 4, 217-229.
- Joy, M., Ripoll, G., Delfa, R., 2008. Effects of feeding system on carcass and non-carcass composition of Churra Tensina light lambs. *Small Rumin. Res.* 78, 123-133. doi:10.1016/j.smallrumres.2008.05.011
- Jump, D.B., 2009. N-3 polyunsaturated fatty acid regulation of hepatic gene transcription. *Curr. Opin. Lipidol.* 19, 242-247. doi:10.1097/MOL.0b013e3282ffaf6a
- Jump, D.B., 2002. Dietary polyunsaturated fatty acids and regulation of gene transcription. *Curr. Opin. Lipidol.* 13, 155-164.
- Jump, D.B., Clarke, S.D., Thelen, A., Liimatta, M., Rent, B., Badint, M., 1996. Dietary polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription. *Prog. Lipid Res.* 7827, 227-241.
- Kalupahana, N.S., Jayalath, T., Wang, S., Moustaid-Moussa, N., 2013. Regulation and metabolic functions of white adipose tissue, en: Ntambi, J.M. (Ed.), *Stearoyl-CoA Desaturase Genes in Lipid Metabolism*. Springer, New York, pp. 49-60. doi:10.1007/978-1-4614-7969-7
- Kempster, A.J., 1981. Fat partition and distribution in the carcasses of cattle, sheep and pigs: A review. *Meat Sci.* 5, 83-98. doi:10.1016/0309-1740(81)90007-3
- Kershaw, E.E., Flier, J.S., 2004. Adipose tissue as an endocrine organ. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89, 2548-2556.
- Kersten, S., Desvergne, B., Wahli, W., 2000. Roles of PPARs in health and disease. *Nature* 405, 421-

424.

- Kim, H., Miyazaki, M., Man, W.C.H.I., Ntambi, J.M., 2002. Sterol Regulatory Element-Binding Proteins (SREBPs) as Regulators of Lipid Metabolism Polyunsaturated Fatty Acids Oppose Cholesterol-Mediated Induction of SREBP-1 Maturation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 967, 34-42.
- Kitessa, S.M., Williams, A., Gulati, S., Boghossian, V., Reynolds, J., Pearce, K.L., 2009. Influence of duration of supplementation with ruminally protected linseed oil on the fatty acid composition of feedlot lambs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 151, 228-239. doi:10.1016/j.anifeedsci.2009.02.001
- Koba, K., Yanagita, T., 2014. Health benefits of conjugated linoleic acid (CLA). *Obes. Res. Clin. Pract.* 8, e525-e532. doi:10.1016/j.orcp.2013.10.001
- Kokta, T.A., Dodson, M. V., Gertler, A., Hill, R.A., 2004. Intercellular signaling between adipose tissue and muscle tissue. *Domest. Anim. Endocrinol.* 27, 303-331.
- Ladikos, D., Lougovois, V., 1990. Lipid oxidation in muscle food: a review. *Food Chem.* 35, 295-314. doi:10.1016/0308-8146(90)90019-Z
- Laliotis, G.P., Bizelis, I., Rogdakis, E., 2010. Comparative approach of the de novo fatty acid synthesis (lipogenesis) between ruminant and non ruminant mammalian species: from biochemical level to the main regulatory lipogenic genes. *Curr. Genomics* 11, 168-83. doi:10.2174/138920210791110960
- Landschulz, W.H., Johnson, P.F., McKnight, S.L., 1989. The DNA binding domain of the rat liver nuclear protein C/EBP is bipartite. *Science.* 243, 1681-1688.
- Latasa, M.-J., Griffin, M.J., Moon, Y.S., Kang, C., Sul, H.S., 2003. Occupancy and function of the -150 sterol regulatory element and -65 E-box in nutritional regulation of the fatty acid synthase gene in living animals. *Mol. Cell. Biol.* 23, 5896-907. doi:10.1128/MCB.23.16.5896-5907.2003
- Lawrence, T.L.J., Fowler, V.R., 2002. Tissues: Basic Structure and Growth, en: Lawrence, T.L.J., Fowler, V.R. (Eds.), *Growth of Farm Animals*. CABI Publishing, London, UK, pp. 21-83.
- Lee, H.J., Jang, M., Kim, H., Kwak, W., Park, W.C., Hwang, J.Y., Lee, C.K., Jang, G.W., Park, M.N., Kim, H.C., Jeong, J.Y., Seo, K.S., Kim, H., Cho, S., Lee, B.Y., 2013. Comparative Transcriptome Analysis of Adipose Tissues Reveals that ECM-Receptor Interaction Is Involved in the Depot-Specific Adipogenesis in Cattle. *PLoS One* 8. doi:10.1371/journal.pone.0066267
- Lee, J.H., Keefe, J.O.H.O., Lee, J.H., Keefe, J.O.H.O., Lavie, C.J., Harris, W.S., 2009. sources and sustainability. *Nat. Rev. Cardiol.* 6, 753-758. doi:10.1038/nrcardio.2009.188
- Lefterova, M.I., Lazar, M.A., 2009. New developments in adipogenesis. *Trends Endocrinol. Metab.* 20, 107-114.
- Lefterova, M.I., Zhang, Y., Steger, D.J., Schupp, M., Schug, J., Cristancho, A., Feng, D., Zhuo, D., Stoeckert, C.J., Liu, X.S., Lazar, M.A., 2008. PPAR gamma and C/EBP factors orchestrate adipocyte biology via adjacent binding on a genome-wide scale. *Genes Dev.* 22, 2941-2952. doi:10.1101/gad.1709008
- Lekstrom-Himes, J., Xanthopoulos, K.G., 1998. Biological role of the CCAAT/enhancer-binding protein family of transcription factors. *J. Biol. Chem.* 273, 28545-28548.
- Lengi, A.J., Corl, B.A., 2008. Comparison of pig, sheep and chicken SCD5 homologs: evidence for an early gene duplication event. *Comp. Biochem. Physiol. - B* 150, 440-446. doi:10.1016/j.cbpb.2008.05.001

- Loor, J.J., Ferlay, A., Ollier, A., Ueda, K., Doreau, M., Chilliard, Y., 2005. High-concentrate diets and polyunsaturated oils alter trans and conjugated isomers in bovine rumen, blood, and milk. *J. Dairy Sci.* 88, 3986-3999.
- Lord, R.S., Bralley, J.A., 2008. Fatty acids, en: Lord, R.S., Bralley, J.A. (Eds.), *Laboratory Evaluations for Integrative and Functional Medicine*. Metametrix Institute, Duluth, Georgina, pp. 273-310.
- Louveau, I., Perruchot, M.-H., Bonnet, M., Gondret, F., 2016. Invited review: Pre- and postnatal adipose tissue development in farm animals: from stem cells to adipocyte physiology. *Animal* 1-9. doi:10.1017/S1751731116000872
- MacDougald, O.A., Mandrup, S., 2002. Adipogenesis: forces that tip the scales. *Trends Endocrinol. Metab.* 13, 5-11. doi:10.1016/S1043-2760(01)00517-3
- Maddock, T., Anderson, V., Greg, P.L., 2005. Using Flax in Livestock Diets 1-8.
- MAGRAMA, 2016a. Encuestas Ganaderas. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Acceso Julio 2016. Disponible en <http://www.magrama.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/ganaderia/encuestas-ganaderas/>.
- MAGRAMA, 2016b. Base de datos de consumo en hogares. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Acceso Julio 2016. Disponible en <http://www.magrama.gob.es/es/alimentacion/temas/consumo-y-comercializacion-y-distribucion-alimentaria/panel-de-consumo-alimentario/base-de-datos-de-consumo-en-hogares/consulta11.asp>.
- MAGRAMA, 2014. Caracterización del sector ovino y caprino en España. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Subdirección General de Productos Ganaderos. Acceso Julio 2016. Disponible en <http://www.magrama.gob.es/es/ganaderia/publicaciones/>.
- Marquardt, A., Stöhr, H., White, K., Weber, B.H., 2000. cDNA cloning, genomic structure, and chromosomal localization of three members of the human fatty acid desaturase family. *Genomics* 66, 175-183. doi:10.1006/geno.2000.6196
- Matsumoto, H., Shimizu, Y., Tanaka, A., Nogi, T., Tabuchi, I., Oyama, K., Taniguchi, M., Mannen, H., Sasazaki, S., 2013. The SNP in the promoter region of the bovine ELOVL5 gene influences economic traits including subcutaneous fat thickness. *Mol. Biol. Rep.* 40, 3231-3237. doi:10.1007/s11033-012-2398-x
- Mead, J.R., Irvine, S.A., Ramji, D.P., 2002. Lipoprotein lipase: structure, function, regulation, and role in disease. *J. Mol. Med.* 80, 753-769. doi:10.1007/s00109-002-0384-9
- Meale, S.J., Chaves, A.V., He, M.L., McAllister, T.A., 2014. Dose-response of supplementing marine algae (*Schizochytrium* spp.) on production performance, fatty acid profiles, and wool parameters of growing lambs. *J. Anim. Sci.* 92, 2202-2213. doi:10.2527/jas.2013-7024
- Mele, M., Serra, A., Pauselli, M., Luciano, G., Lanza, M., Pennisi, P., Conte, G., Taticchi, A., Esposito, S., Morbidini, L., 2014. The use of stoned olive cake and rolled linseed in the diet of intensively reared lambs: effect on the intramuscular fatty-acid composition. *Animal* 8, 152-162.
- Mendizabal, J.A., Alberti, P., Eguinoa, P., Arana, A., Soret, B., Purroy, A., 1999. Adipocyte size and lipogenic activities in different adipose tissue in steers of local Spanish breeds. *Anim. Sci.* 69, 115-121.
- Mendizabal, J.A., Soret, B., Purroy, A., Arana, A., Horcada, A., 1997. Influence of sex on cellularity and lipogenic enzymes of Spanish lamb breeds (Lacha and Rasa Aragonesa). *Anim. Sci.* 64, 283-

289. doi:10.1017/S135772980001585X
- Mendizabal, J.A., Thériez, M., Bas, P., Normand, J., Aurousseau, B., Purroy, A., 2004. Fat firmness of subcutaneous adipose tissue in intensively reared lambs. *Small Rumin. Res.* 53, 173-180.
- Mersmann, H.J., Smith, S.B., 2005. Development of white adipose tissue lipid metabolism, en: Burrin, D.G., Mersmann, H.J. (Eds.), *Biology of Metabolism in Growing Animals*. Elsevier Limited, pp. 275-302. doi:10.1016/S0376-7361(09)70018-4
- Michaud, S.É., Renier, G., 2001. Direct Regulatory Effect of Fatty Acids on Macrophage Lipoprotein Lipase. *Diabetes* 50, 660-666.
- Miller, A.L., Smith, L.C., 1973. Activation of lipoprotein lipase by apolipoprotein glutamic acid. *J. Biol. Chem.* 248, 3359-3362.
- Mirzaei, S., Mansourian, M., Derakhshandeh-Rishehri, S.-M., Kelishadi, R., Heidari-Beni, M., 2016. Association of conjugated linoleic acid consumption and liver enzymes in human studies: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled clinical trials. *Nutrition* 32, 166-73. doi:10.1016/j.nut.2015.08.013
- Molendi-Coste, O., Legry, V., Leclercq, I.A., 2011. Why and how meet n-3 PUFA dietary recommendations? *Gastroenterol. Res. Pract.* 2011, 364040. doi:10.1155/2011/364040
- Muchenje, V., Dzama, K., Chimonyo, M., Strydom, P.E., Hugo, A., Raats, J.G., 2009. Some biochemical aspects pertaining to beef eating quality and consumer health: a review. *Food Chem.* 112, 279-289. doi:10.1016/j.foodchem.2008.05.103
- Nakamura, M.T., Cho, H.P., Xu, J., Tang, Z., Clarke, S.D., 2001. Metabolism and functions of highly unsaturated fatty acids: an update. *Lipids* 36, 961-964. doi:10.1007/s11745-001-0806-5
- Nakamura, M.T., Nara, T.Y., 2004. Structure, function, and dietary regulation of $\Delta 6$, $\Delta 5$, and $\Delta 9$ desaturases. *Annu. Rev. Nutr.* 24, 345-376. doi:10.1146/annurev.nutr.24.121803.063211
- Nakamura, M.T., Yudell, B.E., Loor, J.J., 2014. Regulation of energy metabolism by long-chain fatty acids. *Prog. Lipid Res.* 53, 124-144. doi:10.1016/j.plipres.2013.12.001
- Nelson, D., Cox, M., 2008. Lipid Biosynthesis, en: *Lehninger-Principles of Biochemistry*. Freeman, W. H. & Company, New York, pp. 805-850.
- Nieto, G., Ros, G., 2012. Modification of fatty acid composition in meat through diet: effect on lipid peroxidation and relationship to nutritional quality - a review, en: Catalá, A. (Ed.), *Lipid Peroxidation*. InTech, Rijeka, Croatia, pp. 239-258. doi:10.5772/2929
- Noble, R.C., 1981. Digestion, transport and absorption of lipids, en: Christie, W.W. (Ed.), *Lipid Metabolism in Ruminant Animals*. Pergamon Press Ltd., Oxford, UK., pp. 57-93.
- Noci, F., Monahan, F.J., Moloney, A.P., 2011. The fatty acid profile of muscle and adipose tissue of lambs fed camelina or linseed as oil or seeds. *Animal* 5, 134-147.
- Ntambi, J.M., Miyazaki, M., 2004. Regulation of stearoyl-CoA desaturases and role in metabolism. *Prog. Lipid Res.* 43, 91-104. doi:10.1016/S0163-7827(03)00039-0
- Nute, G.R., Richardson, R.I., Wood, J.D., Hughes, S.I., Wilkinson, R.G., Cooper, S.L., Sinclair, L.A., 2007. Effect of dietary oil source on the flavour and the colour and lipid stability of lamb meat. *Meat Sci.* 77, 547-555.
- Ochoa, J., Sayés, J., Zamora, C., Santamaría, C., 2010. Ovino de carne. El corderico de la tierra, en: ITG Ganadero División (Ed.), *La Ganadería. Pasado y Presente en Navarra*. Huarte, Navarra, pp. 331-339.

- Otto, T.C., Lane, M.D., 2005. Adipose development: from stem cell to adipocyte. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 40, 229-242. doi:10.1080/10409230591008189
- Pannier, L., Gardner, G.E., Pearce, K.L., McDonagh, M., Ball, A.J., Jacob, R.H., Pethick, D.W., 2014. Associations of sire estimated breeding values and objective meat quality measurements with sensory scores in Australian lamb. *Meat Sci.* 96, 1076-1087. doi:10.1016/j.meatsci.2013.07.037
- Papadopoulos, G., Goulas, C., Apostolaki, E., Abril, R., 2002. Effects of dietary supplements of algae, containing polyunsaturated fatty acids, on milk yield and the composition of milk products in dairy ewes. *J. Dairy Res.* 69, 357-365.
- Pariza, M.W., 2004. Perspective on the safety and effectiveness of conjugated linoleic acid. *Am. J. Clin. Nutr.* 79, 1132S-1136S.
- Patterson, E., Wall, R., F, F.G., P, R.R., Stanton, C., 2012. Health implications of high dietary omega-6 polyunsaturated fatty acids. *J. Nutr. Metab.* 539426. doi:10.1155/2012/539426
- Peiretti, P.G., Meineri, G., 2008. Effects on growth performance, carcass characteristics, and the fat and meat fatty acid profile of rabbits fed diets with chia (*Salvia hispanica* L.) seed supplements. *Meat Sci.* 80, 1116-1121. doi:10.1016/j.meatsci.2008.05.003
- Pender-Cudlip, M.C., Krag, K.J., Martini, D., Yu, J., Guidi, A., Skinner, S.S., Zhang, Y., Qu, X., He, C., Xu, Y., Qian, S.Y., Kang, J.X., 2013. Delta-6-desaturase activity and arachidonic acid synthesis are increased in human breast cancer tissue. *Cancer Sci.* 104, 760-764. doi:10.1111/cas.12129
- Pereira, S.L., Leonard, A.E., Mukerji, P., 2003. Recent advances in the study of fatty acid desaturases from. *Prostaglandins, Leukot. Essent. Fat. Acids* 68, 97-106.
- Piperova, L.S., Teter, B.B., Bruckental, I., Sampugna, J., Mills, S.E., Yurawecz, M.P., Fritsche, J., Ku, K., Erdman, R.A., 2000. Mammary Lipogenic Enzyme Activity, trans Fatty Acids and Conjugated Linoleic Acids Are Altered in Lactating Dairy Cows Fed a Milk Fat-Depressing Diet. *J. Nutr.* 130, 2568-2574.
- Poisson, J.-P.G., Cunnane, S.C., 1991. Long-chain fatty acid metabolism in fasting and diabetes: relation between altered desaturase activity and fatty acid composition. *J. Nutr. Biochem.* 2, 60-70. doi:10.1016/0955-2863(91)90030-9
- Ponnampalam, E.N., Burnett, V.F., Norng, S., Hopkins, D.L., Plozza, T., Jacobs, J.L., 2016. Muscle antioxidant (vitamin E) and major fatty acid groups, lipid oxidation and retail colour of meat from lambs fed a roughage based diet with flaxseed or algae. *Meat Sci.* 111, 154-160. doi:10.1016/j.meatsci.2015.09.007
- Ponnampalam, E.N., Butler, K.L., Jacob, R.H., Pethick, D.W., Ball, A.J., Hocking Edwards, J.E., Geesink, G., Hopkins, D.L., 2014. Health beneficial long chain omega-3 fatty acid levels in Australian lamb managed under extensive finishing systems. *Meat Sci.* 96, 1104-1110. doi:10.1016/j.meatsci.2013.04.007
- Pope, M., Budge, H., Symonds, M.E., 2014. The developmental transition of ovine adipose tissue through early life. *Acta Physiol.* 210, 20-30. doi:10.1111/apha.12053
- Pothoven, M.A., Beitz, D.C., 1975. Changes in fatty acid synthesis and lipogenic enzymes in adipose tissue from fasted and fasted-refed steers. *J. Nutr.* 105, 1055-1061.
- Radunz, A.E., Wickersham, L.A., Loerch, S.C., Fluharty, F.L., Reynolds, C.K., Zerby, H.N., 2009. Effects of dietary polyunsaturated fatty acid supplementation on fatty acid composition in muscle and subcutaneous adipose tissue of lambs. *J. Anim. Sci.* 87, 4082-4091.

doi:10.2527/jas.2009-2059

- Raes, K., De Smet, S., Demeyer, D.I., 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. *Anim. Feed Sci. Technol.* 113, 199-221.
- Raisonnier, A., Etienne, J., Arnault, F., Brault, D., Noé, L., Chuat, J.-C., Galibert, F., 1995. Comparison of the cDNA and amino acid sequences of lipoprotein lipase in eight species. *Comp. Biochem. Physiol. Part B* 111, 385-398. doi:10.1016/0305-0491(95)00006-T
- Ranganathan, S., Kern, P. a, 1998. Thiazolidinediones inhibit lipoprotein lipase activity in adipocytes. *J. Biol. Chem.* 273, 26117-26122.
- Ratnayake, W.M., Galli, C., 2009. Fat and fatty acid terminology, methods of analysis and fat digestion and metabolism: a background review paper. *Ann. Nutr. Metab.* 55, 8-43. doi:10.1159/000228994
- Reglamento CEE N° 1278, 1994. Reglamento clasificación canales ovinas. Spain.
- Robelin, J., 1986. Growth of adipose tissues in cattle; partitioning between depots, chemical composition and cellularity. A review. *Livest. Prod. Sci.* 14, 349-364.
- Rodríguez Vallejo, J., 1992. Historia de la agricultura y de la fitopatología, con referencia especial a México. Ciudad de México, México.
- Rodríguez, A.B., 2005. Efecto de la supresión de la paja de la ración y la utilización del cereal en grano sobre la ingestión, el crecimiento y las características de la canal y de la carne (Tesis Doctoral). Universidad de León, España.
- Rosen, E.D., MacDougald, O.A., 2006. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 885-896.
- Rosen, E.D., Spiegelman, B.M., 2006. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature* 444, 847-853.
- Rosen, E.D., Walkey, C.J., Puigserver, P., Spiegelman, B.M., 2000. Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev.* 14, 1293-1307. doi:10.1101/gad.14.11.1293
- Ruxton, C.H.S., Reed, S.C., Simpson, M.J.A., Milington, K.J., 2004. The health benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids: a review of the evidence. *J. Hum. Nutr. Diet.* 17, 449-459. doi:10.1111/j.1365-277X.2004.00552.x
- Sampath, H., Ntambi, J.M., 2005. Polyunsaturated Fatty Acid Regulation of Genes of Lipid Metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* 25, 317-340. doi:10.1146/annurev.nutr.25.051804.101917
- Sartippour, M.R., Renier, G., 2000. Atherosclerosis and Lipoproteins Differential Regulation of Macrophage Peroxisome Proliferator – Activated Receptor Expression by Glucose. *Arter. Thombosis Vasc. Biol.* 20, 104-111.
- Saxena, U., Witte, L., Goldberg, I., 1989. Release of endothelial cell lipoprotein lipase by plasma lipoproteins and free fatty acids. *J. Biol. Chem.* 264, 4349-4355.
- Schiavetta, A.M., Miller, M.F., Lunt, D.K., Davis, S.K., Smith, S.B., 1990. Adipose tissue cellularity and muscle growth in young steers fed the beta-adrenergic agonist clenbuterol for 50 days and after 78 days of withdrawal. *J. Anim. Sci.* 68, 3614-3623.
- Schmid, A., Collomb, M., Sieber, R., Bee, G., 2006. Conjugated linoleic acid in meat and meat products: a review. *Meat Sci.* 73, 29-41.

- Scholz, B., Liebezeit, G., 2012. Screening for biological activities and toxicological effects of 63 phytoplankton species isolated from freshwater, marine and brackish water habitats. *Harmful Algae* 20, 58-70. doi:10.1016/j.hal.2012.07.007
- Schoonjans, K., Gelman, L., Haby, C., Briggs, M., Auwerx, J., 2000. Induction of LPL gene expression by sterols is mediated by a sterol regulatory element and is independent of the presence of multiple E boxes1 . *J. Mol. Biol.* 304, 323-334. doi: 10.1006/jmbi.2000.4218
- Schoonjans, K., Staels, B., Auwerx, J., 1996. Role of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in mediating the effects of fibrates and fatty acids on gene expression. *J. Lipid Res.* 37, 907-925.
- Scollan, N.D., Dannenberger, D., Nuernberg, K., Richardson, I., MacKintosh, S., Hocquette, J.-F., Moloney, A.P., 2014. Enhancing the nutritional and health value of beef lipids and their relationship with meat quality. *Meat Sci.* 97, 384-94. doi:10.1016/j.meatsci.2014.02.015
- Scollan, N.D., Hocquette, J.-F.F., Nuernberg, K., Dannenberger, D., Richardson, I., Moloney, A.P., 2006. Innovations in beef production systems that enhance the nutritional and health value of beef lipids and their relationship with meat quality. *Meat Sci.* 74, 17-33. doi:10.1016/j.meatsci.2006.05.002
- Sefer, D., Andonov, A., Sobajic, S., Markovic, R., Radulovic, S., Jakic-Dimic, D., Petrujkic, B., 2011. Effects of feeding laying hens diets supplemented with omega 3 fatty acids on the egg fatty acid profile. *Biotechnol. Anim. Husb.* 27, 679-686. doi:10.2298/BAH1103679S
- Serhan, C.N., Clish, C.B., Brannon, J., Colgan, S.P., Chiang, N., Gronert, K., 2000. Novel functional sets of lipid-derived mediators with antiinflammatory actions generated from omega-3 fatty acids via cyclooxygenase 2-nonsteroidal antiinflammatory drugs and transcellular processing. *J. Exp. Med.* 192, 1197-1204.
- Sessler, A.M., Kaur, N., Palta, J.P., Ntambi, J.M., 1996. Regulation of stearoyl-CoA desaturase 1 mRNA stability by polyunsaturated fatty acids in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* 271, 29854-29858.
- Shi, X., Liu, S., Metges, C.C., Seyfert, H.M., 2010. C/EBPbeta drives expression of the nutritionally regulated promoter IA of the acetyl-CoA carboxylase alpha gene in cattle. *Biochim. Biophys. Acta* 1799, 561-567. doi:10.1016/j.bbagr.2010.07.002
- Shimano, H., 2001. Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): transcriptional regulators of lipid synthetic genes. *Prog. Lipid Res.* 40, 439-452.
- Shingfield, K., Wallace, R., 2014. Synthesis of conjugated linoleic acid in ruminants and humans., en: Sels, B., Phillippaerts, A. (Eds.), *Conjugated Linoleic Acids and Conjugated Vegetable Oils*. The Royal Society of Chemistry, London, UK, pp. 1-65.
- Shingfield, K.J., Bernard, L., Leroux, C., Chilliard, Y., 2010. Role of trans fatty acids in the nutritional regulation of mammary lipogenesis in ruminants. *Animal* 4, 1140-1166. doi:10.1017/S1751731110000510
- Shingfield, K.J., Bonnet, M., Scollan, N.D., 2013. Recent developments in altering the fatty acid composition of ruminant-derived foods. *Animal* 7, 132-162. doi:10.1017/S1751731112001681
- Shingfield, K.J., Lee, M.F., Humphries, D.J., Scollan, N.D., Toivonen, V., Beever, D.E., Reynolds, C.K., 2011. Effect of linseed oil and fish oil alone or as an equal mixture on ruminal fatty acid metabolism in growing steers fed maize silage-based diets. *J. Anim. Sci.* 89, 3728-3741. doi:10.2527/jas.2011-4047

- Simopoulos, A.P., 2008. The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Exp. Biol. Med.* (Maywood). 233, 674-688. doi:10.3181/0711-MR-311
- Simopoulos, A.P., 1999. Essential fatty acids in health and chronic disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 70, 560S-569S.
- Sinclair, L.A., 2007. Nutritional manipulation of the fatty acid composition of sheep meat: a review. *J. Agric. Sci.* 145, 419-434. doi:10.1017/S0021859607007186
- Smith, S.B., Crouse, J.D., 1984. Relative contributions of acetate, lactate and glucose to lipogenesis in bovine intramuscular and subcutaneous adipose tissue. *J. Nutr.* 114, 792-800.
- Smith, S.B., Kawachi, H., Choi, C.B., Choi, C.W., Wu, G., Sawyer, J.E., 2009. Cellular regulation of bovine intramuscular adipose tissue development and composition. *J. Anim. Sci.* 87, 72-82. doi:10.2527/jas.2008-1340
- Soret, B., Mendizabal, J.A., Arana, A., Alfonso, L., 2016. Expression of genes involved in adipogenesis and lipid metabolism in subcutaneous adipose tissue and longissimus muscle in low-marbled Pirenaica beef cattle. *Animal* 1-9. doi:10.1017/S175173111600118X
- Soret, B., Mendizabal, J.A., Arana, A., Purroy, A., Eguinoa, P., 1998. Breed effects on cellularity and lipogenic enzymes in growing Spanish lambs. *Small Rumin. Res.* 29, 103-112.
- Spencer, A.F., Lowenstein, J.M., 1966. Citrate and the conversion of carbohydrate into fat. Citrate cleavage in obesity and lactation. *Biochem. J.* 99, 760-5.
- Stanley, J.C., Elsom, R.L., Calder, P.C., Griffin, B.A., Harris, W.S., Jebb, S.A., Lovegrove, J.A., Moore, C.S., Riemersma, R.A., Sanders, T.A.B., 2007. UK Food Standards Agency Workshop Report: the effects of the dietary n-6:n-3 fatty acid ratio on cardiovascular health. *Br. J. Nutr.* 98, 1305-10. doi:10.1017/S000711450784284X
- Stark, A.H., Crawford, M.A., Reifen, R., 2008. Update on alpha-linolenic acid. *Nutr. Rev.* 66, 326-332. doi:10.1111/j.1753-4887.2008.00040.x
- Steibel, J.P., Poletto, R., Coussens, P.M., Rosa, G.J.M., 2009. A powerful and flexible linear mixed model framework for the analysis of relative quantification RT-PCR data. *Genomics* 94, 146-152. doi:10.1016/j.ygeno.2009.04.008
- Sul, H.S., 2013. Metabolism of fatty acid, acylglycerols and sphingolipids, en: Stipanuk, M.H., Caudill, M.A. (Eds.), *Biochemical, physiological, and molecular aspects of human nutrition*. Elsevier Health Sciences, Missouri, USA, pp. Chapter 16, 357-392.
- Tang, C., Cho, H.P., Nakamura, M.T., Clarke, S.D., 2003. Regulation of human delta-6 desaturase gene transcription: identification of a functional direct repeat-1 element. *J. Lipid Res.* 44, 686-695. doi:10.1194/jlr.M200195-JLR200
- Tong, L., 2005. Acetyl-coenzyme A carboxylase: crucial metabolic enzyme and attractive target for drug discovery. *Cell. Mol. Life Sci.* 62, 1784-1803. doi:10.1007/s00018-005-5121-4
- Travers, M.T., Vallance, a. J., Gourlay, H.T., Gill, C. a, Klein, I., Bottema, C.B.K., Barber, M.C., 2001. Promoter I of the ovine acetyl-CoA carboxylase- α gene: an E-box motif at -114 in the proximal promoter binds upstream stimulatory factor (USF)-1 and USF-2 and acts as an insulin-response sequence in differentiating adipocytes. *Biochem. J.* 284, 273-284. doi:10.1042/0264-6021:3590273
- Trujillo, M.E., Scherer, P.E., 2006. Adipose tissue-derived factors: Impact on health and disease. *Endocr. Rev.* 27, 762-778. doi:10.1210/er.2006-0033

- Tyagi, S., Gupta, P., Saini, A.S., Kaushal, C., Sharma, S., 2011. The peroxisome proliferator-activated receptor: a family of nuclear receptors role in various diseases. *J. Adv. Pharm. Technol. Res.* 2, 236-240. doi:10.4103/2231-4040.90879
- Valenzuela, R., Morales, G., González, M., Morales, J., Sanhueza, J., Valenzuela, A., 2014. Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga ω -3 y enfermedad cardiovascular. *Rev. Chil. Nutr.* 41, 319-327.
- Van Ba, H., Hwang, I., Jeong, D., Touseef, A., 2012. Principle of Meat Aroma Flavors and Future Prospect, Latest Research into Quality Control. InTech. doi:http://dx.doi.org/10.5772/51110
- Van Nevel, C.J., Demeyer, D.I., 1996. Influence of pH on lipolysis and biohydrogenation of soybean oil by rumen contents in vitro. *Reprod. Nutr. Dev.* 36, 53-63.
- Van Nevel, C.J., Demeyer, D.L., 1995. Lipolysis and biohydrogenation of soybean oil in the rumen in vitro: inhibition by antimicrobials. *J. Dairy Sci.* 78, 2797-806. doi:10.3168/jds.S0022-0302(95)76910-7
- Vander Heiden, M.G., Cantley, L.C., Thompson, C.B., 2009. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science.* 324, 1029-1034. doi:10.1126/science.1160809
- Vernon, R.G., 1980. Lipid metabolism in the adipose tissue of ruminant animals. *Prog. Lipid Res.* 19, 23-106.
- Vernon, R.G., Denis, R.G.P., Sørensen, A., 2001. Signals of adiposity. *Domest. Anim. Endocrinol.* 21, 197-214. doi:10.1016/S0739-7240(01)00121-7
- Vigouroux, C., Caron-Debarle, M., Le Dour, C., Magré, J., Capeau, J., 2011. Molecular mechanisms of human lipodystrophies: from adipocyte lipid droplet to oxidative stress and lipotoxicity. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 43, 862-876. doi:10.1016/j.biocel.2011.03.002
- Wachira, A.M., Sinclair, L.A., Wilkinson, R.G., Enser, M., Wood, J.D., 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. *Br. J. Nutr.* 88, 697-709. doi:10.1079/BJN2002727
- Wallace, R.J., 1991. Rumen proteolysis and its control, en: Jouany, J.-P. (Ed.), *Rumen Microbial Metabolism and Ruminant Digestion*. INRA Editions, Paris, pp. 131-150.
- Wan, R., Du, J., Ren, L., Meng, Q., 2009. Selective adipogenic effects of propionate on bovine intramuscular and subcutaneous preadipocytes. *Meat Sci.* 82, 372-378. doi:10.1016/j.meatsci.2009.02.008
- Wang, Y., Botolin, D., Christian, B., Busik, J., Xu, J., Jump, D.B., 2005. Tissue-specific, nutritional, and developmental regulation of rat fatty acid elongases. *J. Lipid Res.* 46, 706-715. doi:10.1194/jlr.M400335-JLR200
- Wang, Y., Torres-Gonzalez, M., Tripathy, S., Botolin, D., Christian, B., Jump, D.B., 2008. Elevated hepatic fatty acid elongase-5 activity affects multiple pathways controlling hepatic lipid and carbohydrate composition. *J. Lipid Res.* 49, 1538-1552. doi:10.1194/jlr.M800123-JLR200
- Ward, R.J., Travers, M.T., Richards, S.E., Vernon, R.G., Salter, A.M., Buttery, P.J., Barber, M.C., 1998. Stearoyl-CoA desaturase mRNA is transcribed from a single gene in the ovine genome. *Biochim. Biophys. Acta* 1391, 145-156. doi:10.1016/S0005-2760(97)00210-5
- Waters, S.M., Kelly, J.P., O'Boyle, P., Moloney, A.P., Kenny, D.A., 2009. Effect of level and duration

- of dietary n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation on the transcriptional regulation of $\Delta 9$ -desaturase in muscle of beef cattle. *J. Anim. Sci.* 87, 244-252. doi:10.2527/jas.2008-1005
- White, P.L., 2008. Fatty acids in oilseeds (vegetable oils), en: Chow, K.C. (Ed.), *Fatty Acids in Foods and their Health Implications*. CRC Press, New York, pp. 227-262.
- Wood, J.D., Enser, M., Fisher, A. V, Nute, G.R., Sheard, P.R., Richardson, R.I., Hughes, S.I., Whittington, F.M., 2008. Fat deposition, fatty acid composition and meat quality: a review. *Meat Sci.* 78, 343-358.
- 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 Sci.* 66, 21-32. doi:10.1016/S0309-1740(03)00022-6
- Worgall, T.S., Sturley, S.L., Seo, T., Osborne, T.F., Deckelbaum, R.J., 1998. Decrease Expression of Promoters with Sterol Regulatory Elements by Decreasing Levels of Mature Sterol Regulatory Element-binding Protein. *Biochemistry* 273, 25537-25540. doi:10.1074/jbc.273.40.25537
- Wu, Z., Bucher, N.L., Farmer, S.R., 1996. Induction of peroxisome proliferator-activated receptor gamma during the conversion of 3T3 fibroblasts into adipocytes is mediated by C/EBPbeta, C/EBPdelta, and glucocorticoids. *Mol. Cell. Biol.* 16, 4128-4136.
- Wu, Z., Rosen, E.D., Brun, R., Hauser, S., Adelmant, G., Troy, A.E., McKeon, C., Darlington, G.J., Spiegelman, B.M., 1999. Cross-regulation of C/EBPalpha and PPARgamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. *Mol. Cell* 3, 151-158. doi:10.1016/S1097-2765(00)80306-8
- Wu, Z., Xie, Y., Bucher, N.L., Farmer, S.R., 1995. Conditional ectopic expression of C/EBP beta in NIH-3T3 cells induces PPAR gamma and stimulates adipogenesis. *Genes Dev.* 9, 2350-2363. doi:10.1101/gad.9.19.2350
- Xu, H.E., Lambert, M.H., Montana, V.G., Parks, D.J., Blanchard, S.G., Brown, P.J., Sternbach, D.D., Lehmann, J.M., Wisely, G.B., Willson, T.M., 1999. Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferator-activated receptors. *Mol. Cell* 3, 397-403.
- Yang, X.J., Albrecht, E., Ender, K., Zhao, R.Q., Wegner, J., 2006. Computer image analysis of intramuscular adipocytes and marbling in the *longissimus* muscle of cattle. *J. Anim. Sci.* 84, 3251-3258. doi:10.2527/jas.2006-187
- Young, J.W., Thorp, S.L., De Lumen, H.Z., 1969. Activity of selected gluconeogenic and lipogenic enzymes in bovine rumen mucosa, liver and adipose tissue. *Biochem. J.* 114, 83-88.
- Young, O.A., Berdagué, J.-L., Viallon, C., Rousset-Akrim, S., Theriez, M., 1997. Fat-borne volatiles and sheepmeat odour. *Meat Sci.* 45, 183-200. doi:10.1016/S0309-1740(96)00100-3
- Zulkifli, R.M., Parr, T., Salter, A.M., Brameld, J.M., 2010. Regulation of ovine and porcine stearoyl coenzyme A desaturase gene promoters by fatty acids and sterols. *J. Anim. Sci.* 88, 2565-2575. doi:10.2527/jas.2009-2603

Best Poster

awarded to

Olaia Urrutia

at the 65th Annual Meeting of the European Association
for Animal Production in Copenhagen, Denmark, August 25-29, 2014



A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Philippe Chemineau', written over a horizontal line.

Philippe Chemineau
President of the EAAP