

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Estación Experimental del Zaidín (EEZ)

Departamento de Fisiología y Bioquímica de la Nutrición Animal (IFNA)

&

UNIVERSIDAD DE GRANADA

Facultad de Ciencias

**Utilización de nutrientes y energía
en el lechón Ibérico tras el destete.
Estudio *in vivo* y en hepatocitos**

JOSÉ ALBERTO CONDE AGUILERA

GRANADA, 2010

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: José Alberto Conde Aguilera
D.L.: GR 1548-2011
ISBN: 978-84-694-1059-2

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Estación Experimental del Zaidín (EEZ)

Departamento de Fisiología y Bioquímica de la Nutrición Animal (IFNA)

&

UNIVERSIDAD DE GRANADA

Facultad de Ciencias

Utilización de nutrientes y energía en el lechón Ibérico tras el destete.

Estudio *in vivo* y en hepatocitos

Tesis Doctoral presentada por

JOSÉ ALBERTO CONDE AGUILERA

Realizada bajo la dirección de los doctores

ROSA MARÍA NIETO LIÑÁN

IGNACIO FERNÁNDEZ-FÍGARES IBÁÑEZ



*Facultad de Ciencias
Universidad de Granada*



*Estación Experimental del Zaidín
Unidad de Nutrición Animal
(Granada)*



*Consejo Superior de
Investigaciones
Científicas*

Los doctores Rosa María Nieto Liñán e Ignacio Fernández-Fígares Ibáñez, Investigador Científico y Científico Titular, respectivamente, del Departamento de Fisiología y Bioquímica de la Nutrición Animal de la Estación Experimental del Zaidín (Granada), Consejo Superior de Investigaciones Científicas,

INFORMAN:

Que la memoria titulada **“Utilización de nutrientes y energía en el lechón Ibérico tras el destete. Estudio *in vivo* y en hepatocitos”** presentada por José Alberto Conde Aguilera para optar al grado de Doctor, ha sido realizada bajo su dirección y, considerándola acabada, autorizan su presentación para que sea juzgada por la comisión correspondiente.

Y para que así conste, firman en Granada, a 23 de noviembre de 2010.

Rosa María Nieto Liñán

Ignacio Fernández-Fígares Ibáñez

La realización de la presente Tesis Doctoral se ha llevado a cabo gracias a la concesión de una beca de Formación de Personal Investigador del Ministerio de Ciencia y Tecnología (Ref. BES-2006-12280). El trabajo expuesto ha formado parte de dos proyectos del Plan Nacional de I + D: *“Estudio del perfil metabólico del cerdo ibérico: Cambios inducidos por la presencia de modificadores metabólicos en la dieta”* (Ref. AGL-2002-01562) y *“Distintos aspectos de la nutrición proteica y energética del cerdo ibérico: Necesidades de proteína y energía del lechón, necesidades energéticas de mantenimiento desde el destete al sacrificio, e importancia de la absorción intestinal de aminoácidos de origen microbiano”* (Ref. AGL-2005-01652) financiados por el Ministerio de Educación y Innovación.

La dirección de esta Memoria de Tesis Doctoral la han llevado a cabo los Dres. y Rosa M^a Nieto Liñán y Ignacio Fernández-Fígares Ibáñez, del Departamento de Fisiología y Bioquímica de la Nutrición Animal, de la Estación Experimental del Zaidín (Granada), del Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Para su realización ha sido fundamental la inestimable colaboración de las empresas Sánchez Romero Carvajal Jabugo, S.A. (Sevilla) y Sucesores de Miguel Vílchez Riquelme, S.A. (Granada).

Los resultados preliminares de los ensayos que recoge la presente Tesis Doctoral han sido presentados en los siguientes congresos:

CONDE-AGUILERA JA, AGUINAGA MA, AGUILERA JF AND NIETO R. Effects of protein and feed intake on performance of weaned Iberian piglets. En: 6th International Symposium on the Mediterranean Pig. Book of Abstracts, pág 45. Messina, Italia. Celebrado del 11 al 13 de octubre de 2007.

FERNÁNDEZ-FÍGARES I, CONDE-AGUILERA JA, LACHICA M, NIETO R AND AGUILERA JF. Effects of conjugated linoleic acid on gluconeogenesis, glycogen turnover and IGF-I synthesis in primary culture of porcine hepatocytes. En: 2nd ISEP (Ed. I Ortigues-Marty, N Miraux, W Brand-Williams), pág. 386-6. Vichy, Francia. Celebrado del 9 al 13 de septiembre de 2007.

CONDE-AGUILERA JA; HARO A, FERNÁNDEZ-FÍGARES I. Effect of dexamethasone, insulin and glucagon on triglyceride content in porcine hepatocytes. En: 6th ICFAE, Book of Abstracts, Abstract 6. Roanoke, Virginia, EEUU. Celebrado del 14 al 16 de noviembre de 2008.

AGUINAGA MA, CONDE-AGUILERA JA, RUIZ V, NAVARRO AI, AGUILERA JF, NIETO R. Incorporation of lysine from microbial origin into tissue protein of Iberian and conventional (LD x LW) piglets. En: XI International Symposium on Digestive Physiology of Pigs, Book of Abstracts, Abstract 2.05, 58. Montbrió del Camp, Reus, España. Celebrado del 20 al 22 de mayo de 2009.

CONDE-AGUILERA JA, AGUINAGA MA, AGUILERA JF. Efecto del nivel proteico de la dieta y del plano de alimentación sobre el crecimiento y el balance de nitrógeno de lechones ibéricos en fase de cría (10-25 kg PV). En: XIII Jornadas de Producción Animal, AIDA, tomo I, 244. Zaragoza, España. Celebrado del 12 al 13 de Mayo de 2009.

CONDE-AGUILERA JA, AGUINAGA MA, AGUILERA JF, NIETO R. The performance of Iberian piglets growing from 10 to 25 kg BW as affected by the protein: energy ratio in the diet and the level of feeding. En: 60th EAAP, Book of abstract 15, 567. Barcelona, España. Celebrado del 24 al 27 de agosto del 2009.

CONDE-AGUILERA JA, LARA L, AGUINAGA MA, AGUILERA JF AND NIETO R. Carcass traits and organ weights in Iberian piglets fed diets with different protein to energy ratio. En: 7th International Symposium on Mediterranean Pig, Book of abstract pág 45. Córdoba, España. Celebrado del 14 al 16 de octubre de 2010.

CONDE-AGUILERA JA, AGUINAGA MA, AGUILERA JF Y R NIETO. Energy and nutrient retention in the weaned Iberian piglet. En: *Energy and protein metabolism and nutrition*. (Ed. G Matteo Crovetto), Wageningen Academic Publishers. 3rd ISEP, EAAP publication 127, 389-390. Parma, Italia. Celebrado del 6 al 10 de septiembre de 2010,

y, así mismo, forman parte de las siguientes publicaciones:

CONDE-AGUILERA JA, AGUINAGA MA, AGUILERA JF Y NIETO R. (2010). Nutrient and energy retention in weaned Iberian piglets fed diets with different protein to energy ratio. *J Anim Sci*. Aceptado.

CONDE-AGUILERA JA, AGUINAGA MA, LARA L, AGUILERA JF Y NIETO R. (2010). Carcass traits and organ weights in Iberian piglets fed diets with different protein to energy ratio. *Anim Feed Sci Technol*. Aceptado.

CONDE-AGUILERA JA, M LACHICA, R NIETO AND I FERNÁNDEZ-FÍGARES. (2010). Regulation of fatty acid esterification in porcine hepatocytes: CLA does not induce insulin resistance. *Animal*. En evaluación.

ÍNDICE DE CONTENIDOS



-

CAPÍTULO 1 – INTRODUCCIÓN	1
1.1. ORIGEN Y DEFINICIÓN DEL CERDO IBÉRICO	3
1.2. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA Y EVOLUCIÓN DE LA POBLACIÓN DE CERDO IBÉRICO	8
1.3. SISTEMAS DE PRODUCCIÓN DEL CERDO IBÉRICO	13
1.3.1. Etapa de postdestete del lechón	15
1.3.2. Etapa de cebo	15
<i>De bellota o terminado en montanera</i>	16
<i>De recebo o terminado en recebo</i>	16
<i>De cebo de campo</i>	17
<i>De cebo</i>	17
1.3.3. Acondicionamiento y control ambiental en el postdestete	17
1.4. PERFIL METABÓLICO DEL CERDO IBÉRICO	19
1.4.1. Metabolismo proteico	20
1.4.2. Perfil hormonal	23
1.4.3. Capacidad digestiva	24
1.5. LA CÉLULA HEPÁTICA	27
<i>Células ducturales o colangiocitos</i>	29
<i>Células endoteliales o sinusoidales</i>	29
<i>Células Kupffer</i>	29
<i>Células estrelladas</i>	29
<i>Células ovas o stem</i>	30
1.6. CULTIVO DE HEPATOCITOS	13
1.6.1. Factores que afectan al cultivo de hepatocitos	37
<i>Tipo de sustrato o matriz extracelular</i>	37
<i>Densidad y función celular en el cultivo</i>	38
<i>Medio de cultivo</i>	38
CAPÍTULO 2 – OBJETIVOS	43
2.1. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL	45
2.2. JUSTIFICACIÓN	49

CAPÍTULO 3 – ASPECTOS METODOLÓGICOS	51
3.1. COMPOSICIÓN CORPORAL Y RETENCION DE NUTRIENTES Y ENERGÍA	53
3.2. UTILIZACIÓN DE LA ENERGIA METABOLIZABLE INGERIDA	59
3.3. AISLAMIENTO Y CULTIVO PRIMARIO DE HEPATOCITOS PORCINOS IBÉRICOS	62
3.3.1. Procedimiento	62
3.3.2. Determinacion de la síntesis de IGF-I	65
3.3.3. Determinacion de la síntesis de glucógeno	67
3.3.4. Determinacion de la degradación de glucógeno	68
3.3.5. Determinacion de la gluconeogénesis	68
3.3.6. Determinacion de la síntesis de triglicéridos	69
3.3.7. Determinacion de proteína	70

**CAPÍTULO 4 – Nutrient and energy retention in weaned Iberian piglets
fed diets with different protein concentrations**

4.1. ABSTRACT	75
4.2. INTRODUCTION	77
4.3. MATERIALS AND METHODS	78
4.3.1. Animals and experimental design	78
4.3.2. Diets and feeding	78
4.3.3. Digestibility measurements	80
4.3.4. Comparative slaughter measurements	81
4.3.5. Chemical análisis	82
4.3.6. Calculation and statistical análisis	82
4.4. RESULTS	84
4.4.1. Performance and nutrient digestibility	84
4.4.2. Body composition	86
4.4.3. Body deposition of nutrients	86

4.4.4. Energy utilization	89
4.5. DISCUSSION	92
4.6. LITERATURE CITED	97

CAPÍTULO 5 – Carcass traits and organ weights of 10 to 25 BW Iberian pigs fed diets with different protein to energy ratio

5.1. ABSTRACT	103
5.2. INTRODUCTION	105
5.3. MATERIALS AND METHODS	106
5.3.1. Animals, experimental design and feeding	106
5.3.2. Measurements	108
5.3.3. Chemical analysis	110
5.3.4. Statistical treatments	110
5.4. RESULTS	112
5.4.1. Carcass deposition of nutrients	112
5.4.2. Carcass and organ weights	115
5.4.3. Shoulder and ham dissection	116
5.5. DISCUSSION	120
5.6. CONCLUSIONS	124
5.7. REFERENCES	125

CAPÍTULO 6 – Metabolic regulation of fatty acid esterification and effects of CLA on glucose homeostasis in pig hepatocytes

6.1. ABSTRACT	132
6.2. INTRODUCTION	134
6.3. MATERIALS AND METHODS	135
6.3.1. Isolation of liver cells	135
6.3.2. Cell culture	135

6.3.3. Preparation of albumin bound fatty acids	136
6.3.4. IGF-I synthesis	136
6.3.5. Glycogen synthesis	137
6.3.6. Glycogen degradation	137
6.3.7. Gluconeogenesis	138
6.3.8. TG synthesis	138
6.3.9. Protein determination	139
6.3.10. Statistical analysis	139
6.4. RESULTS	140
6.4.1. CLA	140
6.4.2. Dexamethasone	141
6.4.3. Insulin/Glucagon ratio	144
6.5. DISCUSSION	145
6.5.1. CLA	145
6.5.2. Dexamethasone	147
6.5.3. Insulin/Glucagon ratio	149
6.6. REFERENCES	151
CAPÍTULO 7 – DISCUSION GENERAL	151
7.1. UTILIZACIÓN DE NUTRIENTES Y ENERGÍA EN EL LECHÓN IBÉRICO	161
7.1.1. Crecimiento y otros parámetros productivos	162
7.1.2. Retención corporal de proteína	164
7.1.3. Utilización de la energía de la dieta para el crecimiento y el mantenimiento de las funciones vitales	165
7.1.4. Composición y retención de energía y nutrientes de la canal	167
7.1.5. Efecto de la concentración proteica de la dieta y del nivel de alimentación sobre el peso relativo de vísceras	171
7.2. ESTUDIO EN HEPATOCITOS	173
7.2.1. Efecto del CLA sobre el hepatocito	173
7.2.2. Efecto de la dexametasona sobre el hepatocito	178

7.2.3. Efecto de la relación Insulina/Glucagón sobre el hepatocito	179
CAPÍTULO 8 – RESUMEN Y CONCLUSIONES	183
CAPÍTULO 9 – SUMMARY AND CONCLUSIONS	192
CAPÍTULO 10 – REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	200

CAPÍTULO 1

Introducción

1.1. ORIGEN Y DEFINICIÓN DEL CERDO IBÉRICO

El inicio de la domesticación del cerdo es un tema de gran controversia. Recientemente, el empleo de herramientas genéticas (Larson *et al.*, 2007a; Megens *et al.*, 2008), ha favorecido en gran medida el desarrollo de este campo que hasta hace relativamente poco tiempo se basaba únicamente en la información proporcionada por las tradicionales herramientas arqueológicas (Yuan y Flad, 2002; Dobney y Larson G, 2006; Zeder *et al.*, 2006;). Estos estudios confirman las hipótesis ya establecidas relativas a la domesticación independiente de cerdos salvajes primitivos de origen europeo, y asiático. Si bien, distintas pruebas arqueológicas datan las primeras evidencias de cerdos domesticados en el Viejo Mundo en Turquía, hace 10.500 años (Larson *et al.*, 2007b), y al norte y sur de China, hace 10.000 años (Yuan y Flad, 2002; Luo y Zhang, 2008), aún continua siendo desconocido el grado de independencia o conexión de los cerdos domesticados de cada región, (Larson *et al.*, 2010). También encontramos controversia al encuadrar filogenéticamente al cerdo Ibérico. Partiendo del tipo *vertebrados*, clase *mamíferos*, orden *ungulados* o perisodáctilos y familia *suidae*, todos los autores coinciden en una misma clasificación zoológica del cerdo hasta alcanzar el eslabón de género, *Sus*. A partir de este momento, definir el origen del cerdo comienza a ser una tarea compleja, ya que los distintos autores definen las categorías de subgénero, subespecie y especie de una forma diferente. Independiente de esta divergente clasificación, la mayoría concuerdan en que existen 4 troncos ancestrales: *Scrofa*, *Striatosus*, *Eusus* y *Mediterraneus*, que originan las aproximadamente 100 razas porcinas reconocidas oficialmente en la actualidad. Si descartamos el tronco *Eusus* por su escasa intervención en la ascendencia del cerdo doméstico actual y siguiendo las aportaciones del Tratado de Zootecnia Especial (Aparicio Sánchez, 1960), destacamos 2 características étnicas que clasifican la ascendencia de las razas porcinas actuales en 3 grupos claramente diferenciados. Estas características son el perfil de los huesos nasales a partir de la sutura frontonasal y la configuración del lagrimal. En el Esquema 1 se refleja esta categorización.

SUBGÉNERO	ESPECIE	RAZAS ACTUALES	CARACTÉRES ÉTNICOS
<i>Striatusus</i>	<i>S. Striatusus vitatus</i>	Asiáticos	Lagrimal ancho y acortado Perfil convexo
<i>Mediterraneus</i>	<i>S. mediterraneus</i>	Ibéricos	Lagrimal y perfil intermedios
<i>Scrofa ferus</i>	<i>S. Scrofa ferus</i>	Célticos	Lagrimal largo y estrecho Perfil subcóncavo-rectilíneo

Esquema 1. Origen de las razas porcinas actuales
(Forero Vizcaíno J, 2008)

De forma particular, remarcamos el tronco *Mediterraneus* por considerarse precursor de las distintas variedades, estirpes y líneas, con diferencias tanto fenotípicas como genotípicas, que engloban la denominación actual del cerdo Ibérico. El *Sus mediterraneus* primitivo adquiere su nombre debido al origen de su introducción en la Península, ya que ésta se produjo desde la periferia del mar Mediterráneo hacia el centro y suroeste peninsular, a partir de Grecia, Italia, la costa noroccidental de África y las islas del mar Mediterráneo, donde este animal alcanzó una gran relevancia. Este antecesor se identifica por unas proporciones cefálicas de perfil subcóncavo intermedio y un lagrimal de proporciones medias, a parte de presentar una forma más rechoncha y extremidades más bajas que las otras especies de los demás troncos.

Durante su evolución en la capacidad de adaptación a las condiciones específicas de clima y manejo propias de las zonas adeshadas de la Península Ibérica, estos ancestros expandieron los rasgos genéticos más beneficiosos para su supervivencia, promoviendo lentamente los caracteres fisiológicos que a día de hoy le atribuyen su singularidad al cerdo Ibérico dentro de las razas autóctonas españolas (Alves *et al.*, 2003). De la misma forma, hoy encontramos varias razas de relativa importancia económica, también descendientes del *S. mediterraneus*, como son el cerdo Negro Siciliano en Italia, y los cerdos Bísaro y Alentejano en Portugal.

Mediante una visión más zootécnica, podemos enmarcar al cerdo Ibérico como un animal dentro de una estructura de población. Así pues definimos la “raza porcina Ibérica” como el conjunto de animales de una población con una dotación genética semejante, que lo identifica frente al resto de la especie y es transmisible en aquellos caracteres que se consideran imprescindibles para el patrón racial dentro de una media y varianza previsible, y que se parece a sus progenitores cuando se desarrolla en las mismas condiciones ambientales (Lerner y Donald, 1969; Aparicio Macarro, 1988). Sin embargo, esta definición no recoge la variabilidad de caracteres que presenta la población porcina Ibérica, por ello se ha optado por denominar a toda esta agrupación como “tronco Ibérico”, donde se reúnen las distintas tipologías de la población Ibérica. Y es Aparicio Sánchez, en su clasificación del año 1944 (Laguna Sanz, 1998), el que presenta una definición para el grupo Ibérico y la explica como tronco originario de un sector de dichas agrupaciones que a principios del siglo XX ocupa el centro y sur de la Península Ibérica. Este autor divide al tronco Ibérico en 4 razas diferentes:

- Negra: variedades Lampiña y Entrepelada.
- Colorada: Raza de Olivenza y Extremeña.
- Rubia.
- Manchado de Jabugo.

Bajo la Orden Ministerial de 28 de Mayo de 1987 y las sucesivas órdenes APA/3376/2007 y APA/3628/2007 del 12 de noviembre y 5 de diciembre, respectivamente, se recoge de una forma oficial y administrativa la reglamentación específica que describe las principales características de las distintas variedades de cerdo Ibérico, todas ellas incluidas en el libro genealógico para la Raza Porcina Ibérica, y que engloba a 5 variedades: Retinta, Lampiña, Entrepelado, Torbiscal y Manchado de Jabugo. De una forma esquemática, las principales características que recoge esta definición oficial son las siguientes:

- Tamaño medio, perfil frontonasal subcóncavo, osamenta ligera.
- Piel pigmentada.
- Cabeza y cuello de tamaño medio con frente proporcionada y órbitas oblicuas, hocico fuerte y alargado, con rodete dirigido hacia abajo. Orejas de tamaño medio, dirigidas hacia delante y abajo.
- Tórax fuerte con costillas arqueadas.
- Dorso recto, horizontal, y musculado.
- Vientre proporcionado y desarrollado con línea inferior débilmente abombada.
- Extremidades resistentes y finas.

Desde una caracterización morfológica, la Asociación Española de Criadores de Ganado Porcino Selecto Ibérico Puro y Tronco Ibérico (AECERIBER) engloba al cerdo Ibérico puro dentro de una agrupación racial autóctona presente en la Península Ibérica e integrada por variedades diferenciadas según el color de la capa (Diéguez Garbayo, 1999). Entendemos por variedad, al conjunto de individuos de una misma raza que manifiestan diferencias fenotípicas en unos determinados caracteres y que debido a la heterogeneidad interna que presenta, se divide en estirpes y líneas que guardan semejanzas en sus principales caracteres morfofuncionales (Clemente *et al.*, 2006). Describimos la estirpe como determinados subgrupos de animales que manifiestan y transmiten aquellos caracteres fenotípicos que los permite diferenciar y clasificar dentro de una determinada variedad, y la línea como el conjunto de individuos pertenecientes a una determinada variedad o estirpe que procede directamente de un limitado número de reproductores dentro de explotaciones cerradas. Las distintas variedades de cerdo Ibérico que existen, su color de capa y origen, se recogen en el Esquema 2.

Tipo de variedad	Estirpe o línea		Color de la capa o piel	Origen	
NEGRAS	Entrepelado		Negro	Valle de los Pedroches (Córdoba)	
	Lampiño	del Guadiana	Negro pizarra	Vega del río del Guadiana (Badajoz)	
		De la Serena		Comarca de la Serena (Badajoz)	
COLORADAS	Retinto	Extremeño	Rojo muy oscuro	Extremadura	
					Valdesequera
					Villalón
					Silvela
	Rubio	Cano campiñés	Cano sobre piel negra	Sur de Andalucía	
Dorado gaditano					
Manchado de Jabugo		Piel negra con capa manchada y rojo sobre cano	Sierra de Huelva		
Torbiscal		De rojo a retinto	Raza de nueva creación en Toledo		

Esquema 2. Variedades y líneas del cerdo Ibérico en España (MAPA, 2007)

El cerdo Ibérico posee una naturaleza primitiva y una baja selección genética debido en su mayor parte a la alta variabilidad genética intra-racial que presentan las distintas estirpes de nuestros cerdos autóctonos, palpables en las diferentes características y particularidades productivas que presentan (Barba *et al.*, 2000).

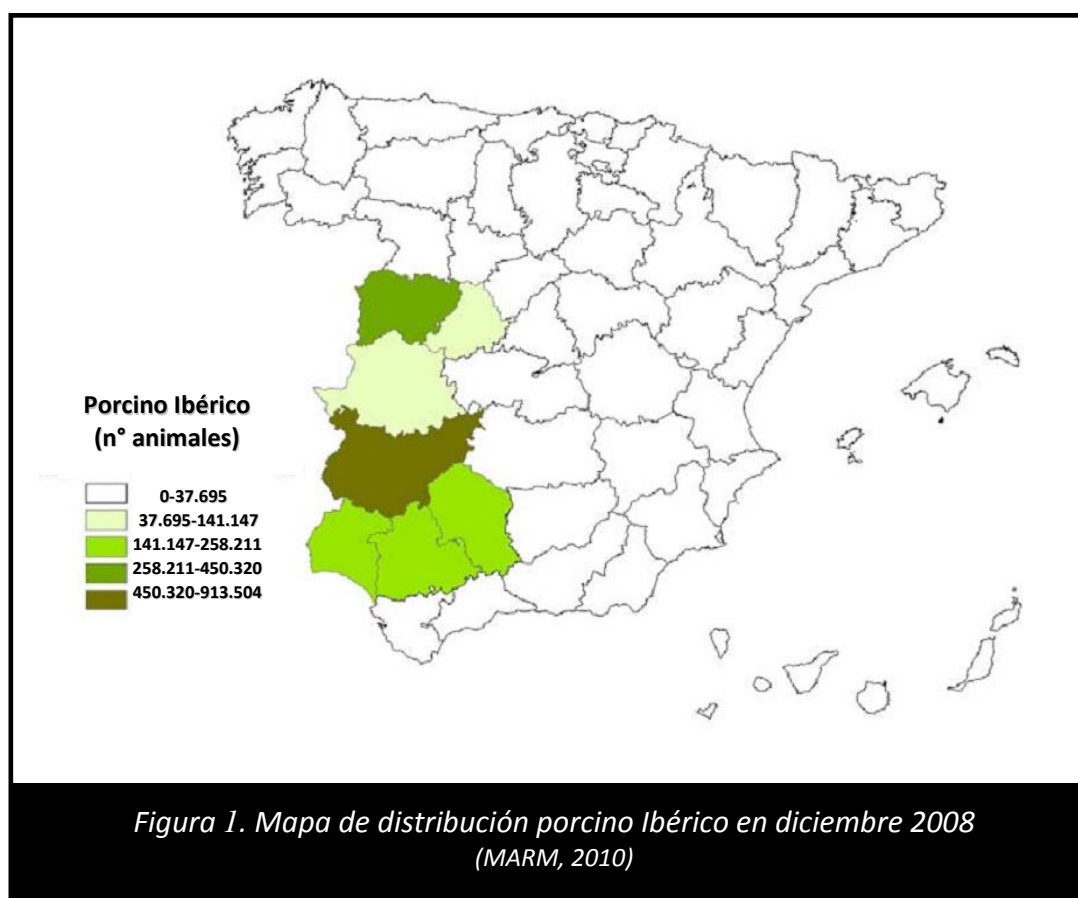
Los animales experimentales utilizados en este trabajo de Tesis Doctoral pertenecen a la estirpe Silvela y proceden de la finca Montecastilla (Granada de Riotinto, Huelva), propiedad de la empresa Sánchez Romero Carvajal, Jabugo, S.A.

1.2. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA Y EVOLUCIÓN DE LA POBLACIÓN DE CERDO IBÉRICO

El cerdo Ibérico coexiste en perfecta adaptación con la dehesa, unión que establece la explotación ganadera más importante de la Península Ibérica en este entorno por el alto grado de aprovechamiento de este particular ecosistema (Gea-Izquierdo y Canellas, 2009; Rodríguez-Estévez *et al.*, 2009). Existen zonas esencialmente productoras en las que se encuentran representadas una amplia densidad de especies arborícolas del género *Quercus* (*Q. rotundifolia*, *Q. ilex* o encina, *Q. suber* o alcornoque, *Q. lusitanicus* o quejigo, fundamentalmente) de los que se obtiene la bellota como fruto principal, de gran importancia en la producción porcina Ibérica; otras, dedicadas a la transformación y elaboración de productos curados y frescos que, junto a la aplicación de nuevas tecnologías y sin perder de vista el carácter artesanal del proceso, dan lugar a la obtención de productos de gran calidad en el mercado actual; y finalmente, regiones donde se solapan estas dos actividades.

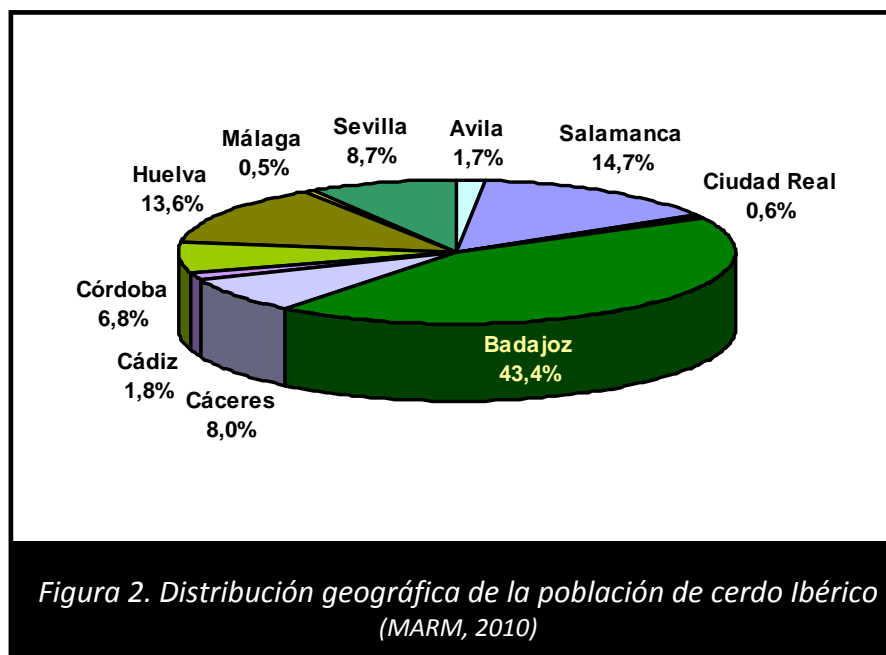
Según la información proporcionada por la Subdirección General de Estadística del MARM del mes de mayo del año 2010, el censo porcino Ibérico cuenta con un total de 1.929.115 animales en España, de los cuales el 83% se reparte entre las comunidades autónomas de Andalucía y Extremadura (con 606.616 y 991.174 cabezas, respectivamente; Figura 1). Por provincias, el 15 y 43% (283.702 y 837.529 animales, respectivamente) del censo nacional se ubica en Salamanca y Badajoz, respectivamente, mientras que en Andalucía las provincias de Huelva, Córdoba y Sevilla poseen un 14, 7 y 9%, respectivamente, del porcino Ibérico nacional (Figura 2).

La situación del sector porcino Ibérico en los últimos 60 años ha sufrido grandes cambios. La década de los 50 se caracterizó por un gran auge en el sector del cerdo Ibérico en la que la población de Ibérico alcanzó un 40% del censo porcino total (Pérez Gil, 2005) y era considerada como una de las actividades ganaderas más importante de nuestro país.



A partir de la década de los 60, este sector experimentó una gran crisis que provocó la casi total desaparición de la raza y extinción de algunas estirpes y variedades. Entre los motivos principales se encuentran:

- La demanda de otros productos animales.
- La disminución de las matanzas familiares tradicionales.
- La reducción de las tareas agrarias y ganaderas por el abandono de zonas rurales.
- La creciente demanda de carne porcina no satisfecha por el sector Ibérico que provocó el cruzamiento incontrolado con razas extranjeras, reduciendo el empleo del sistema tradicional de producción extensivo.
- La Peste Porcina Africana que apareció en la localidad Badajoz y castigó el sector porcino durante al menos 35 años (1960-1995).

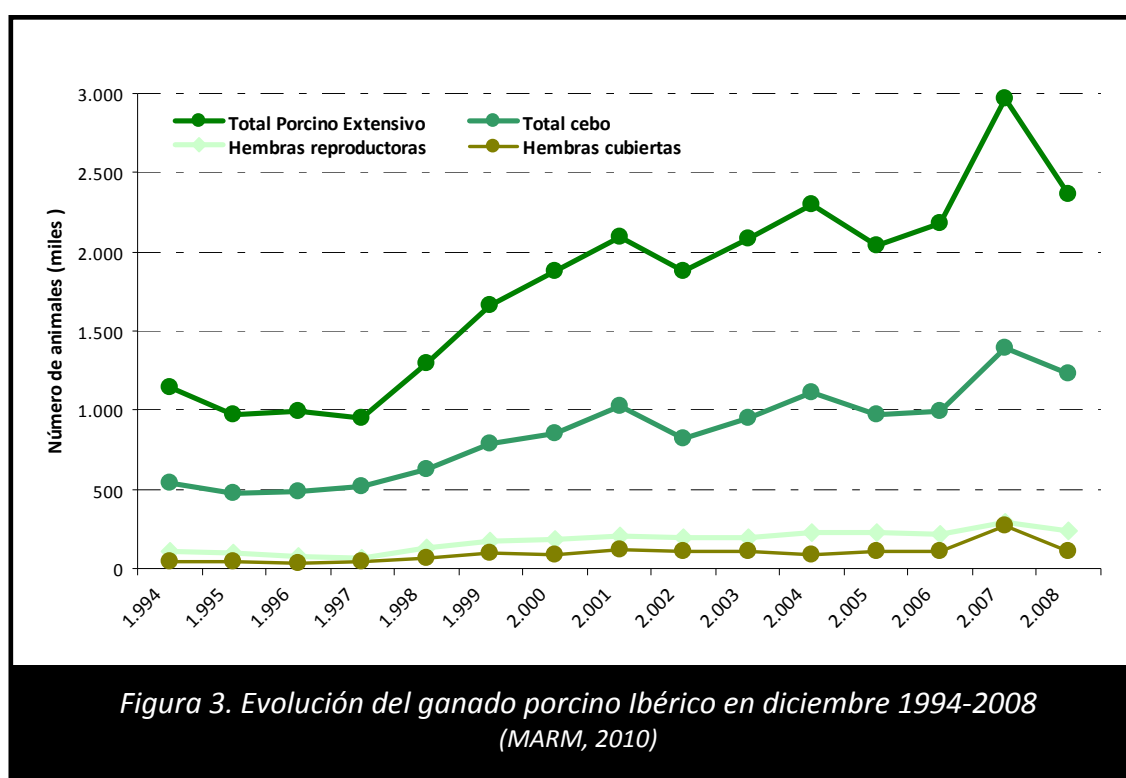


Además, en 1980 la Peste Porcina Clásica provocó una nueva caída en el censo. A partir de la década de los 90 el censo porcino Ibérico comenzó su mejoría, permitiendo la recuperación definitiva de la raza y el aumento de la rentabilidad de las producciones. Este crecimiento no ha cesado en los 18 años posteriores y sus principales causas quedan recogidas en los siguientes puntos (Buxadé, 2001; Rueda y Espárrago, 2004; MARM, 2010):

- La desaparición de la Peste Porcina Africana.
- La mayor valoración social de los productos curados del cerdo Ibérico.
- La preservación de determinados ecosistemas mediante el fomento de la producción agropecuaria.

Según datos del MAPA (2005), el censo del porcino extensivo en España se duplicó durante el intervalo comprendido entre los años 1994 y 2004, pasando de 1,1 a 2,3 millones de ejemplares. En 2005, la extrema sequía produjo un desequilibrio entre los 2 sistemas de producción del cerdo Ibérico, fomentando una mayor

producción de cerdos en régimen intensivo de cebo que ofrecía mejor rentabilidad, frente al sistema extensivo, que aunque permite la obtención de productos cárnicos de calidad máxima, cuenta con las limitaciones de la dehesa (Buxadé Carbó, 2005). Este hecho determinará el futuro del sector hacia una tendencia a la reducción del número de cerdos Ibéricos cebados con bellota (en montanera) frente a los cebado con piensos compuestos. A partir de esta fecha hasta la actualidad, se produce tal aumento del censo Ibérico, de modo que ha llegado a suponer un 11% del censo porcino total en España, para descender hasta valores del 8% en 2010 (MARM, 2010).



En la Figura 3 se muestra la evolución del porcino Ibérico durante el periodo comprendido entre los años 1994 y 2008, desglosado en animales en cebo, hembras reproductoras y cubiertas.

En la actualidad, nos encontramos con el primer descenso importante en el sector Ibérico después de 18 años de crecimiento continuo, cuya causa principal es la crisis global actual, que se traduce en un descenso del 18% del censo Ibérico total en

mayo de 2010 con respecto a finales del año 2008 (MARM). Las regiones más afectadas son Castilla y León, un 37% de descenso, Andalucía, Extremadura y Castilla la Mancha (24, 6 y 2% de descenso, respectivamente). El sistema de producción más afectado por esta disminución es el de cebo, que se reduce un 29% (de 1.235.413 a 880.478 ejemplares).

1.3. SISTEMAS DE PRODUCCIÓN DEL CERDO IBÉRICO

Gracias a la eliminación de obstáculos sanitarios y barreras comerciales, a las nuevas tendencias de consumo del sector alimentario y al aumento del crecimiento económico registrado hasta el año 2008, se produjo un importante aumento en la demanda de los productos del cerdo Ibérico, que provocó un asombroso impulso del sector. El resultado ha sido la implantación de modelos intensivos, con construcción de instalaciones especializadas para cada fase de crecimiento en el interior de naves. De este modo, se ha reducido la producción estacional y se ha limitado la etapa inicial de producción a 25 Kg de peso vivo (aproximadamente 2 arrobas). La etapa de cebo se lleva a cabo en sistemas al aire libre bien en régimen de intensificación, o mediante el régimen tradicional basado en el aprovechamiento de los recursos naturales de la dehesa, para finalmente sacrificar al animal con una edad mínima de 10 meses (Norma de Calidad del cerdo Ibérico RD 1469/2007).

Podemos estudiar los sistemas de producción de esta raza autóctona desde distintos puntos de vista. Atendiendo a la raza, hablamos de una producción con pureza racial, o bien cruzada con genotipos mejorados. Durante las últimas décadas, el cerdo Ibérico se ha cruzado con frecuencia con razas foráneas, principalmente con Duroc-Jersey, con el fin de acelerar la producción para sacrificio e incrementar la prolificidad de las madres. Encontramos 2 tipos de cruzamientos: al 50%, que proceden del cruce de reproductores Ibérico x Duroc, o bien al 75%, para lo que se cruzan animales al 50% con reproductores Ibéricos. Predomina el cruzamiento al 50%, aún presentando unos rendimientos productivos y reproductores menores, debido a dos razones principales: una menor heterogeneidad en la dispersión genética de la F2 y un cómodo manejo de los reproductores (Diéguez Garbayo, 2001a). La Norma de Calidad para el jamón, la paleta y la caña de lomo Ibéricos elaborado por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (RD 1469/2007), que reúne todos los textos vigentes (RD 1083/2001 y RD 144/2003), caracteriza los productos derivados del cerdo

Ibérico y exige un mínimo del 50% de sangre ibérica y que las madres sean siempre Ibéricas puras.

Existen 3 fases en la producción del cerdo Ibérico que presentan un manejo y necesidades diferentes, bien diferenciadas por el mercado (Gómez Carballar, 2000):

1. Cría: periodo que engloba desde el nacimiento hasta los 25 Kg o aproximadamente 2 arrobas de peso vivo y se divide en lactación y postdestete de lechones. Detallaremos seguidamente el periodo de postdestete, donde se encuadran los animales utilizados en este trabajo de Tesis Doctoral.
2. Crecimiento: recoge el periodo de recría desde los 25 a aproximadamente los 60 Kg de peso vivo y el de pre-acabado, comprendido desde los 60 a 100 Kg de peso vivo.
3. Cebo: periodo comprendido entre los 100 y los 160 Kg de peso vivo. Según la Norma de Calidad (RD 1469/2007) la edad mínima de sacrificio se sitúa a los 10 meses.

El manejo del ciclo reproductor de la cerda Ibérica se denomina con el término de banda y viene determinado por 3 ciclos cuya duración global es de 149 días. El concepto de banda consiste en dividir el colectivo reproductor en grupos homogéneos, agrupando tareas que van a desarrollarse en semanas independientes, por ejemplo, una semana la cubriciones, otra los partos, en la siguiente los destetes y movimientos a recría y cebo (Martínez-Almela, 2006a; Ovejero, 1999). Los 3 ciclos corresponden con:

- Intervalo destete-celo: de 7 días.
- Gestación: 113,6 días como media.
- Lactación: con una duración recomendada de 28 días.

1.3.1. Etapa de postdestete del lechón

En la fase de cría, etapa en la que se denomina al animal como lechón, el peso final de 2 arrobas se alcanza aproximadamente a los 75-85 días de edad, y corresponde con el peso de venta o de entrada hacia otra fase de manejo, lo cual implica el cambio a un tipo de instalación diferente. Tradicionalmente el destete de los lechones Ibéricos se hacía a los 45 días de vida con 13-16 Kg de peso vivo, pero actualmente tiende a reducirse a 28-35 días de vida con pesos situados entre 6 y 7 Kg. El periodo de postdestete varía entre 56-58 días, teniendo el animal 75-85 días de vida al terminar la fase de cría. De forma tradicional se distinguían entre 2 tipos de lechones (Buxadé, 2001):

- Navideños o Yerbizos, lechones de partos en los meses de diciembre-enero. Se sacrificaban a los 24 meses tras 2 montaneras.
- Agostones, lechones provenientes de partos en mayo-junio. Sacrificados a los 18 meses, aprovechando una sola montanera.

Actualmente y debido a la necesidad de mejorar el rendimiento y la productividad de las explotaciones, las cerdas se distribuyen en 2 lotes y se agrupan en partos cada 3 meses, produciéndose casi 2 ciclos reproductivos por cerda y año (Buxadé, 2001).

1.3.2. Etapa de cebo

La alimentación recibida en la fase final de cebo clasifica los sistemas de producción en cebo, recebo y montanera. En la actualidad, los sistemas de producción de la etapa de cebo se clasifican en cuatro grupos según se describe en la Norma de Calidad para el jamón, la paleta y la caña de lomo Ibéricos (RD 1469/2007), cuyos requisitos detallamos a continuación.

De bellota o terminado en montanera

Este sistema hace alusión a la alimentación que aprovecha los recursos de la dehesa, esencialmente bellota y hierba. La montanera suele iniciarse a principios de octubre y dura hasta finales de febrero o principios de marzo dependiendo de la densidad arbórea. Considerando una producción media de bellota de 240 a 680 Kg por hectárea y año, y un índice de transformación medio aceptado de 1 Kg de ganancia de peso vivo por cada 8-10 Kg de bellota consumida, la carga ganadera no excederá de 2 cerdos por hectárea (Castel *et al.*, 2002; Buxadé, 2005). Los animales se sacrifican cuando alcanzan 140-160 Kg de peso vivo, con alrededor de 14-18 meses de edad. Los requisitos según la Norma de Calidad son:

- Peso medio de entrada en montanera de 92 y 115 Kg (de 8 a 10 arrobas) desde el 1 de octubre al 15 de diciembre de cada año.
- Reposición en montanera como mínimo de 46 Kg de peso (4 arrobas) durante una estancia mínima de 60 días en una dehesa definida, ubicada y registrada en el Sistema de Información Geográfica de Parcelas Agrarias (SIGPAC) según el artículo 6 de la orden.
- Edad y peso mínimo de sacrificio será de 14 meses y 117 Kg como peso medio de las canales del lote, o 108 Kg de la canal individual, cuyo periodo de sacrificio comprenderá del 15 de diciembre al 15 de abril de cada campaña.

De recebo o terminado en recebo

Tiene lugar cuando en montanera no se ha podido alcanzar el peso comercial adecuado, está destinado a animales que han sufrido un retraso en el crecimiento, a los que es necesario suplementar, una vez finalizado el periodo de montanera, con piensos compuestos o maíz. La Norma de Calidad establece:

- Peso medio de entrada en montanera 92 y 115 Kg (de 8 a 10 arrobas) desde el 1 de octubre al 15 de diciembre de cada año.

- La ganancia en montanera debe ser como mínimo de 29 Kg de peso (frente a 46 kg en animales de bellota) durante una estancia mínima de 60 días en una dehesa definida, ubicada y registrada en el Sistema de Información Geográfica de Parcelas Agrícolas (SIGPAC) según el artículo 6 de la orden.
- Edad y peso mínimo de sacrificio será de 14 meses y 117 Kg como peso medio de las canales del lote, o 108 Kg de la canal individual, cuyo periodo de sacrificio comprenderá del 15 de diciembre al 15 de abril de cada campaña.

De cebo de campo

El engorde se realiza a base de pienso junto con una estancia mínima en el campo de 60 días, alimentados igualmente con pienso. Los requisitos son:

- Edad y peso mínimo de sacrificio será de 12 meses y 117 Kg como peso medio de las canales del lote o 108 Kg de la canal individual.
- Peso medio de entrada en la fase de cebo será de 92 y 115 Kg (de 8 a 10 arrobas) desde el 1 de octubre al 15 de diciembre de cada año.
- La fase final de cebo se desarrollará en campo o recinto cerrado no cementado en el que la densidad máxima será de 15 cerdos/hectárea y habrá al menos 100 metros de separación entre comederos y bebederos.

De cebo

El engorde se realiza a base de pienso. Las características necesarias para cumplir este tipo de sistema son una edad y peso mínimos de sacrificio de 10 meses y 117 Kg como peso medio de las canales del lote o 108 Kg de la canal individual.

1.3.3. Acondicionamiento y control ambiental en el postdestete

A continuación comentaremos muy brevemente las características ambientales que presentan las instalaciones especialmente diseñadas para la etapa del

postdestete, que corresponde con la de los animales experimentales utilizados en el presente trabajo.

Una ventilación correcta, en especial en invierno (Martínez-Almela, 2006b, 2006c), debe permitir la oxigenación adecuada, la eliminación del exceso de vapor de agua y polvo en suspensión, el mantenimiento de niveles aceptables de gases nocivos (amoníaco, sulfuro de hidrógeno, monóxido de carbono y anhídrido carbónico), y la protección contra el estrés térmico del animal. La ventilación de tipo dinámica es la más utilizada para etapas de producción intensiva como son la fase de postdestete y de maternidad. Los parámetros ambientales que hay que controlar son la temperatura óptima (zona de termoneutralidad), el volumen estático y la humedad relativa (Quiles, 2007a). El control de la termoneutralidad es un factor muy importante que depende del peso del animal e incide en gran medida en su gasto energético ya que fuera de los márgenes definidos por la temperatura crítica superior (TC_s) e inferior (TC_i) se requiere de un gasto energético extra para mantener la temperatura corporal (Brown-Brandl, 2004). Por otro lado, una humedad relativa inadecuada favorece el desarrollo microbiano (patologías respiratorias) y la degradación de los edificios. Los parámetros ambientales aconsejados para la ventilación durante la etapa de postdestete del lechón Ibérico vienen reflejados en el Esquema 3.

Peso lechón	Tª Óptima (°C)		Volumen estático (m ³ /lechón)	Humedad Relativa (%)
	TC _i	TC _s		
5-7 kg	29	32	1,2-1,4	
7-15 kg	22	28	1,6-2	50-60
15-25 kg	18	26		

Esquema 3. Parámetros ambientales adecuados para la etapa de postdestete del lechón Ibérico

(Quiles, 2007a)

Leyenda: TC_i, temperatura crítica inferior; TC_s, temperatura crítica superior

1.4. PERFIL METABÓLICO DEL CERDO IBÉRICO

El genotipo Ibérico se caracteriza por una deposición de proteína comparativamente menor y una deposición de grasa superior a las observadas en cerdos de razas convencionales o mejoradas, altamente seleccionadas para alcanzar ritmos elevados de crecimiento y de deposición de proteína (Barea *et al.*, 2007). Podemos decir que el cerdo Ibérico posee un marcado perfil lipogénico y una limitada capacidad de crecimiento, definidos por su genotipo.

En el grupo de investigación del que formo parte investigamos el perfil metabólico del cerdo Ibérico, dedicando parte de nuestra actividad al estudio de la utilización metabólica de nutrientes por este animal. Esto nos ha permitido establecer recomendaciones para su ingesta de energía y nutrientes en distintas fases de su ciclo productivo, y con ello colaborar a que su explotación se pueda realizar acorde con criterios de sostenibilidad ambiental y económica y de bienestar animal. A partir de la información recogida en diversos trabajos publicados por nuestro grupo de investigación (Nieto *et al.*, 2002b; Barea *et al.*, 2007; García-Valverde *et al.*, 2008) podemos poner de relieve las siguientes características metabólicas, confirmadas en las distintas fases productivas del cerdo Ibérico estudiadas:

1. Una alta proporción relativa de deposición lipídica en detrimento de la formación de tejido magro.
2. Necesidades energéticas para mantenimiento ligeramente inferiores a los valores descritos para razas de tipo mejorado o seleccionadas para un rápido crecimiento corporal y deposición de tejido magro.
3. Eficiencias de utilización de la energía metabolizable inferiores a los valores descritos para dichas razas.

En los siguientes apartados comentaremos distintos aspectos sobre el metabolismo y fisiología de nuestra raza autóctona.

1.4.1. Metabolismo proteico

Una de las técnicas más utilizadas en la determinación de la retención de proteína corporal son los ensayos de balance de nitrógeno. A pesar de la relativa simplicidad de estos ensayos, no tenemos evidencia de que se hayan llevado a cabo pruebas específicamente diseñadas para determinar las diferencias entre el potencial para la deposición proteica de cerdos de baja selección genética y cerdos de genotipos mejorados, excepto los realizados en lechones de raza Alentejana (Montenegro *et al.*, 2000), y los efectuados por nuestro grupo de investigación que detallamos en adelante. Rivera-Ferre *et al.* (2006), en cerdas Ibéricas y Landrace de peso vivo próximo a los 25 Kg, observaron mediante técnicas de balance de nitrógeno, que en el genotipo Ibérico la retención de nitrógeno era significativamente inferior, particularmente cuando se le ofreció una ración con un contenido en proteína que excedía sus necesidades, cuyo consumo condujo a una pérdida importante de eficiencia metabólica. Los resultados obtenidos en ensayos de alimentación y sacrificio comparado realizados en cerdos Ibéricos en crecimiento (Nieto *et al.*, 2002b), crecimiento-cebo (Barea *et al.*, 2007) y acabado (García-Valverde *et al.*, 2008) corroboran esta baja capacidad del cerdo Ibérico para la deposición de proteína. La dieta que satisface su potencial para formar proteína propia en cada una de estas fases de su ciclo productivo presenta valores de la relación proteína digestible (de composición aminoácida equilibrada)/energía metabolizable (g/MJ) llamativamente bajos: 6,86, 5,17 y 4,82, respectivamente. Ofrecida *ad libitum* (con una ligera restricción, < 5%), la deposición de proteína alcanza el valor de 74, 71 y 80 g/día, respectivamente, que define la máxima capacidad del animal para depositar proteína (DP_{max}). Independientemente del régimen alimenticio, la deposición energética en forma de grasa supone, en las fases estudiadas, más del 80% de la retención energética total (83,8, 92,6 y 90,3%, respectivamente). Los valores de k_g o eficiencia neta de la utilización de la energía metabolizable para el crecimiento, son muy bajos (0,582, 0,545 y 0,481 respectivamente, en las fases de crecimiento, crecimiento-cebo y acabado) si se tiene en cuenta la contribución relativa de proteína y grasa a la

deposición energética total. De forma análoga, las necesidades energéticas de mantenimiento son comparativamente mas bajas que las observadas en genotipos porcinos convencionales o mejorados (422 y 396 KJ EM/Kg PV^{0,75} y día, respectivamente, para las fases de crecimiento y crecimiento-cebo mencionadas anteriormente). El efecto del contenido proteico de la dieta y el nivel de alimentación sobre las características de la canal y el peso de los tejidos viscerales de cerdos Ibéricos en crecimiento ha sido objeto de estudio en nuestro grupo de investigación en animales de 15 a 50 Kg (Nieto *et al.*, 2003), de 50 a 100 Kg (Barea *et al.*, 2006) y de 100 a 150 Kg (García-Valverde *et al.*, 2008). En las dos primeras fases se observó un aumento en el contenido graso de la canal al disminuir el aporte de proteína en la dieta, mientras que la proporción de proteína en la canal permaneció prácticamente constante. En la fase de acabado cabe destacar el aumento del tejido magro en la canal al restringir el nivel de alimentación de 0,95 a 0,70 × *ad libitum*. En cuanto al peso de las vísceras, se observó un descenso en la contribución relativa de las mismas respecto al peso total al aumentar la edad del animal hasta el final de la fase de crecimiento-cebo, lo que conduce a una disminución relativa de la actividad metabólica debida a este componente conforme el animal madura. En las fases de crecimiento y crecimiento-cebo, el nivel de alimentación también afectó a la deposición proteica y, especialmente, a la de grasa en la canal, incrementándose ésta al aumentar la ingesta de alimento. El contenido en grasa intermuscular del jamón aumentó en animales de 15 a 50 Kg peso vivo al reducir el aporte proteico de la dieta e incrementar el nivel de alimentación. De un mismo modo, observamos que en animales de 50 a 100 Kg (fase de crecimiento-cebo) la grasa intermuscular del jamón aumentó al incrementar el nivel de alimentación. En cambio, en los animales en fase de acabado (100 a 150 Kg PV), la grasa intermuscular del jamón no se vio afectada por los cambios en el plano de alimentación.

Los procesos de síntesis y degradación de proteína que se producen en el organismo de forma continua resultan en el proceso global de deposición proteica que, en la raza Ibérica, presenta un valor más reducido en comparación con el de razas mejoradas, como ya hemos comentado. Rivera-Ferre *et al.* (2006) estudiaron el efecto

del aporte de dietas deficitarias o equilibradas en lisina sobre las diferencias en la renovación proteica corporal total entre hembras de la raza Ibérica y Landrace. Esta situación es comparable a la alimentación exclusiva con bellota que presenta el cerdo Ibérico en la fase de acabado final en montanera, ya que según observaciones de Nieto et al. (2002a) ésta aportaría sólo un 37% de la lisina disponible en la proteína ideal (ARC, 1981; BSAS, 2003). Los resultados de este estudio nos revelan que independientemente de la raza y del nivel de proteína de la dieta y bajo una alimentación equilibrada, la relación síntesis/deposición de proteína para el organismo completo se mantuvo constante (con un valor medio de 5,4 g de proteína sintetizada por g de proteína depositada). Además, los animales de raza Landrace presentaron mayores tasas absolutas de deposición proteica, síntesis y degradación que los de raza Ibérica. En ambos genotipos, la deficiencia en lisina de la dieta tuvo un fuerte efecto depresor del balance de nitrógeno y condujo a un aumento en la relación síntesis/deposición proteica (hasta 6,9-8,3), lo que indica un mayor esfuerzo metabólico por cada gramo de proteína depositada en estas condiciones.

Otro trabajo de nuestro grupo de investigación en el que se estudió la renovación proteica comparada en tejidos y órganos (Rivera-Ferre *et al.*, 2005) mostró que aunque el peso relativo de los músculos fue significativamente menor en los cerdos de raza Ibérica comparado con los animales de raza Landrace (20-30% menor, en función del músculo estudiado: *longissimus dorsi*, *biceps femoris* y *semimembranosus*), las tasas fraccionales de síntesis de proteína muscular fueron significativamente mayores en el cerdo Ibérico. De esta observación se dedujo que las tasas fraccionales de degradación proteica en músculo deberían ser necesariamente superiores en el cerdo Ibérico. Por otro lado, mientras que el nivel de proteína de las dietas empleado (12 y 16% de proteína bruta, PB) no afectó a la tasa fraccional de síntesis de proteína muscular, la deficiencia en lisina la redujo extraordinariamente (así como la masa muscular cuyos valores disminuyeron entre el 46-49%). La contribución de los tejidos y órganos viscerales al peso vivo del animal fue significativamente superior en el genotipo Ibérico y no se observaron diferencias imputables a la raza en cuanto a la tasa fraccional de síntesis de proteína en estos tejidos. Las elevadas tasas

de renovación proteica muscular en el cerdo Ibérico junto con el mayor tamaño relativo de los tejidos viscerales, cuya actividad metabólica es muy elevada, contribuirían a explicar, al menos en parte, las bajas eficiencias de utilización de la proteína y de la energía observadas en esta raza cuando se la compara con razas porcinas convencionales o mejoradas.

1.4.2. Perfil hormonal

Sobre el proceso de síntesis de proteína inciden factores de tipo nutricional y hormonal, que pueden actuar de forma independiente o conjunta. Fernández-Fígares et al. (2007) observaron claras diferencias en el perfil hormonal al comparar cerdas Ibéricas y Landrace, de peso vivo similar (25 Kg) y sometidas a idéntico régimen nutricional. Las cerdas Ibéricas mostraron niveles séricos significativamente superiores de insulina, IGF-I y leptina, junto con una tendencia hacia niveles inferiores de hormona del crecimiento en comparación con las Landrace. El hecho de encontrar niveles de leptina más elevados en la raza Ibérica podría estar relacionado con su mayor adiposidad, ya que esta hormona se sintetiza en los adipocitos. Aunque la hormona leptina reduce la ingesta de alimento, el cerdo Ibérico presenta mayor capacidad de ingesta que las razas porcinas mejoradas, por lo que es probable que en este genotipo exista un mecanismo de resistencia a la acción de la leptina, como sucede en estirpes obesas de otras especies animales. De los metabolitos estudiados los únicos que presentaron diferencias en sus concentraciones en suero imputables al genotipo fueron la glucosa y la creatinina, que alcanzaron niveles 8 y 46% superiores en la raza Landrace, lo que parece lógico ya que la mayor concentración de insulina en la sangre del Ibérico tendería a reducir su nivel de glucemia. Por otro lado, la creatinina, relacionada con el uso de energía en la contracción muscular, aumenta su concentración con la masa muscular lo que explicaría que dicha concentración fuese inferior en el cerdo Ibérico, que presenta menor desarrollo de tejido magro que el genotipo Landrace.

1.4.3. Capacidad digestiva

Existe un limitado número de trabajos en los que se han establecido comparaciones directas entre genotipos sobre capacidad digestiva. En el trabajo ya mencionado de Rivera Ferre et al. (2006) realizado en cerdas Ibéricas de la estirpe Silvela y en cerdas Landrace, ambas de peso vivo próximo a los 25 Kg, se observó mayor capacidad de ingestión (aproximadamente un 9%) en la raza Ibérica. Esta mayor capacidad de ingestión del cerdo Ibérico frente a razas porcinas convencionales también se deduce de un estudio realizado con cerdos Ibéricos en crecimiento-cebo entre 20 y 85 Kg (Nieto *et al.*, 2001). En dicho trabajo, se determinó la ingesta voluntaria de alimento, definida como la máxima cantidad de alimento consumida por el animal al que se permite el libre acceso en solitario a la dieta durante dos periodos de 60 minutos al día, y se la relacionó con el peso vivo de los animales mediante las correspondientes ecuaciones de regresión. Los valores estimados de ingestión voluntaria media fueron 28,5 y 49,4 MJ de energía metabolizable en cerdos Ibéricos de 20-50 y 50-85 Kg de peso vivo, sensiblemente superior a la que se deriva de las ecuaciones predictivas publicadas para genotipos porcinos convencionales (NRC, 1998). Existe suficiente evidencia de que la selección genética realizada para lograr mayor potencial de formación de tejido magro ha comportado una pérdida de capacidad de ingestión (ARC, 1981; van Lunen y Cole, 1996). Contrariamente a lo que se sucede respecto a la ingesta, Rivera-Ferre et al. (2006) observaron que la digestibilidad de la materia seca (MS), de la PB y de la energía fue ligera, aunque significativamente, inferior (2,4, 4,1 y 2,5%, respectivamente) en nuestra raza autóctona respecto a la Landrace. Sin embargo, un trabajo reciente de nuestro grupo de investigación sugiere que esas diferencias en digestibilidad de nutrientes y energía desaparecen conforme el animal aumenta su peso vivo (Barea *et al.*, 2010).

En el citado trabajo de Rivera-Ferre et al. (2005) se registró un mayor tamaño relativo en la mayoría de los tejidos viscerales en la raza Ibérica respecto a la Landrace. La diferencia entre razas alcanzó el 21% al comparar el tracto gastrointestinal completo, destacando el mayor tamaño relativo del estómago, intestino grueso e

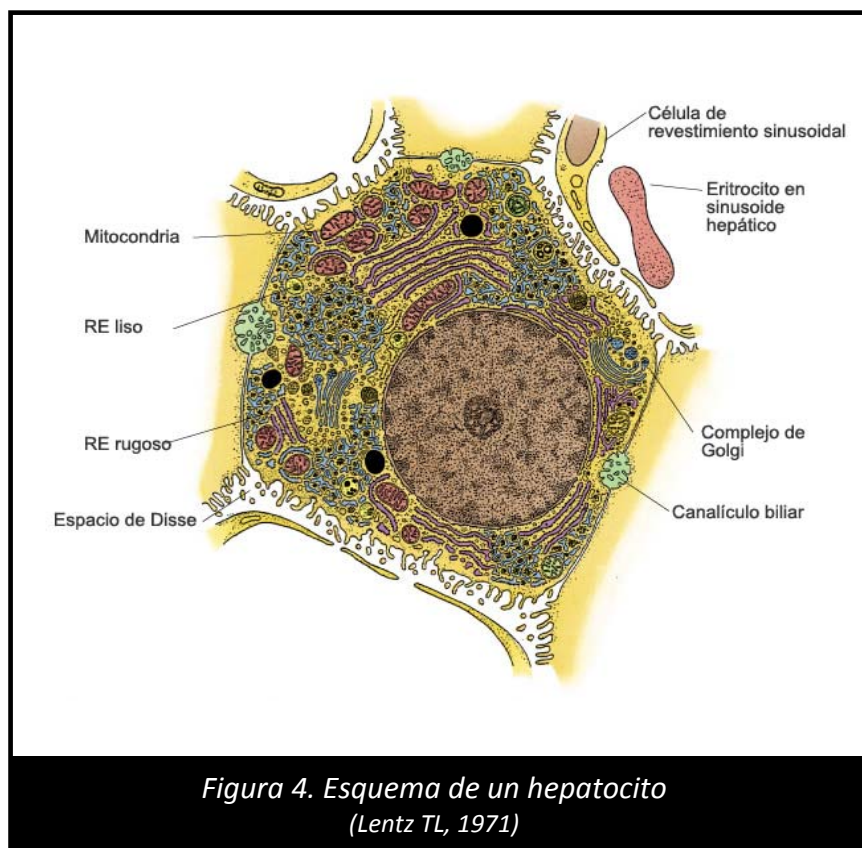
hígado en la raza Ibérica. La gran actividad metabólica de estos tejidos supone que el animal ha de invertir mayor cantidad de la energía ingerida destinada a los procesos de mantenimiento, con la consiguiente pérdida de eficiencia energética. En el estudio de Barea et al. (2010) en el que también se ha comparado el tamaño relativo de los órganos viscerales en cerdos Ibéricos y Landrace-Large White en distintas fases productivas, se observa que dichas diferencias desaparecen en animales de aproximadamente 115 Kg de peso vivo, en los que sólo el hígado presenta un tamaño relativamente mayor en la raza Ibérica. Por lo tanto, esta posible desventaja del cerdo Ibérico respecto a los genotipos convencionales desde el punto de vista de utilización de la energía parece limitarse a los animales más jóvenes con un peso de 25 a 30 Kg aproximadamente.

El conocimiento de las necesidades de nutrientes y energía del animal ocupa una posición clave para su alimentación equilibrada y, consecuentemente, para la rentabilidad de la explotación, ya que el ajuste de los nutrientes a las necesidades del animal constituye uno de los problemas más importantes que se presenta en la práctica de la producción porcina. Un déficit nutricional reduce la eficiencia de transformación alimento/producto, en tanto que un aporte excesivo de nutrientes conlleva pérdidas económicas que suelen acompañarse de deterioro medioambiental. Así pues, en los últimos treinta años han aparecido centenares de publicaciones sobre trabajos de investigación realizados para establecer las necesidades de proteína, otros nutrientes, o de energía en distintas razas porcinas de tipo mejorado, altamente seleccionadas para la producción (ARC, 1981; NRC, 1998). En cambio, son escasos los trabajos de investigación enfocados al conocimiento de las necesidades nutricionales del cerdo Ibérico. Tradicionalmente, ante la falta de datos específicos se ha aceptado que las necesidades nutricionales del cerdo Ibérico son similares a las del ganado porcino convencional o mejorado sin que haya existido el soporte científico suficiente que avale esta extrapolación. Si tenemos en cuenta el singular perfil metabólico de la raza Ibérica parece fundamental aumentar nuestro conocimiento sobre las necesidades nutritivas para mejorar la eficiencia de uso de los recursos disponibles y la productividad de sus explotaciones. Esta es una de las tareas a las que el grupo de

investigación, dentro del que se ha desarrollado este trabajo de Tesis Doctoral, ha dedicado gran parte de su actividad científica durante los últimos años.

1.5. LA CÉLULA HEPÁTICA

El hígado es el órgano de mayor tamaño de los vertebrados, muy implicado en el metabolismo energético, la biotransformación de nutrientes y la detoxificación de sustancias nocivas para el animal. Realiza múltiples funciones tales como secreción de proteínas, síntesis de colesterol y ácidos grasos, además de participar en la oxidación de ácidos grasos, y almacenamiento de glucógeno.



Los hepatocitos o células parenquimales constituyen el 65% del número total de células hepáticas y debido a su gran tamaño ocupan el 80% del volumen total (Weibel *et al.*, 1969, Greengard *et al.*, 1972; Blouin *et al.*, 1977; Drochmans *et al.*, 1978; Fawcett, 1994) y el 90% de la masa celular del hígado (Hierro, 2009). Este tipo

celular posee una morfología poliédrica con 1 o 2 núcleos esféricos, nucleolo prominente y citoplasma acidófilo con cuerpos basófilos, muy rico en inclusiones de glucógeno, grasa y orgánulos derivados de las múltiples funciones que realiza (Figura 4). Debido a la polarización que presentan, visible en el relieve de su membrana plasmática, distinguimos 3 regiones morfológicas y funcionalmente específicas (Evans, 1980; Meier, 1988):

- Membrana lateral: se encuentra entre hepatocitos contiguos y presenta distintos tipos de estructuras celulares que mantienen la conexión funcional y la adhesión mecánica entre los hepatocitos adyacentes.
- Membrana sinuosidal: se orienta hacia el espacio perisinusoidal o espacio de Disse, es decir, al polo sanguíneo y es donde se localiza fundamentalmente la actividad de la sodio-potasio-ATPasa (Erlinger, 1982; Nathanson y Boyer, 1991; Hiero, 2009).
- Membrana canalicular: es una invaginación de la superficie de la membrana en forma de medio cilindro que forma el canalículo biliar entre dos células contiguas. En toda su superficie presenta microvellosidades irregulares proyectadas hacia el lumen del canalículo. Alrededor de los canalículos biliares encontramos una zona de bajo número de orgánulos donde se encuentran estructuras de gran importancia para el mantenimiento de la morfología del canalículo y de la secreción biliar (Meier, 1988; Watanabe *et al.*, 1991).

Las células hepáticas no parenquimales (colangiocitos, células Kupffer, células estrelladas y células indiferenciadas u ovals) constituyen aproximadamente el 35% de las células y el 10% del volumen del órgano y tienen una baja actividad frente a xenobióticos. Todas estas células están englobadas por un esqueleto de fibras de colágeno que compone los espacios extracelulares y que confieren en gran parte el volumen que presenta el órgano. La importancia del hígado en el metabolismo ha sido revisada con detalle en excelentes revisiones (Geelen y Beynen, 1981; Mersmann, 1986). Describimos a continuación brevemente los distintos tipos celulares no parenquimales (Figura 5).

Células ducturales o colangiocitos

Son células epiteliales de diferentes tamaños (6-15 μm) y formas (cuboidal o plana en conductos pequeños, y cilíndrica en los grandes), que tapizan los conductos biliares. No son simples túbulos para el transporte de los productos de secreción de los hepatocitos hasta la vesícula biliar o intestino, si no que secretan bilis, reabsorben agua y electrolitos y transportan azúcares, proteínas, y ácidos biliares.

Células endoteliales o sinusoidales

Constituyen las paredes vasculares. Presentan fenestraciones de unos 175 nm de diámetro de poro que permiten el libre movimiento de la mayor parte de los componentes del plasma del espacio intravascular al espacio de Disse y los hepatocitos y desde éstos a los sinusoides. Una sola célula endotelial puede presentar cientos de fenestraciones que constituyen las denominadas placas cribadas.

Células Kupffer

Son macrófagos específicos del hígado y forman parte del sistema fagocítico mononuclear, inicialmente descritos por Kupffer (1876, 1898). Presentan forma irregular, con numerosos lisosomas muy desarrollados y vesículas pinocíticas; se localizan junto a las células endoteliales.

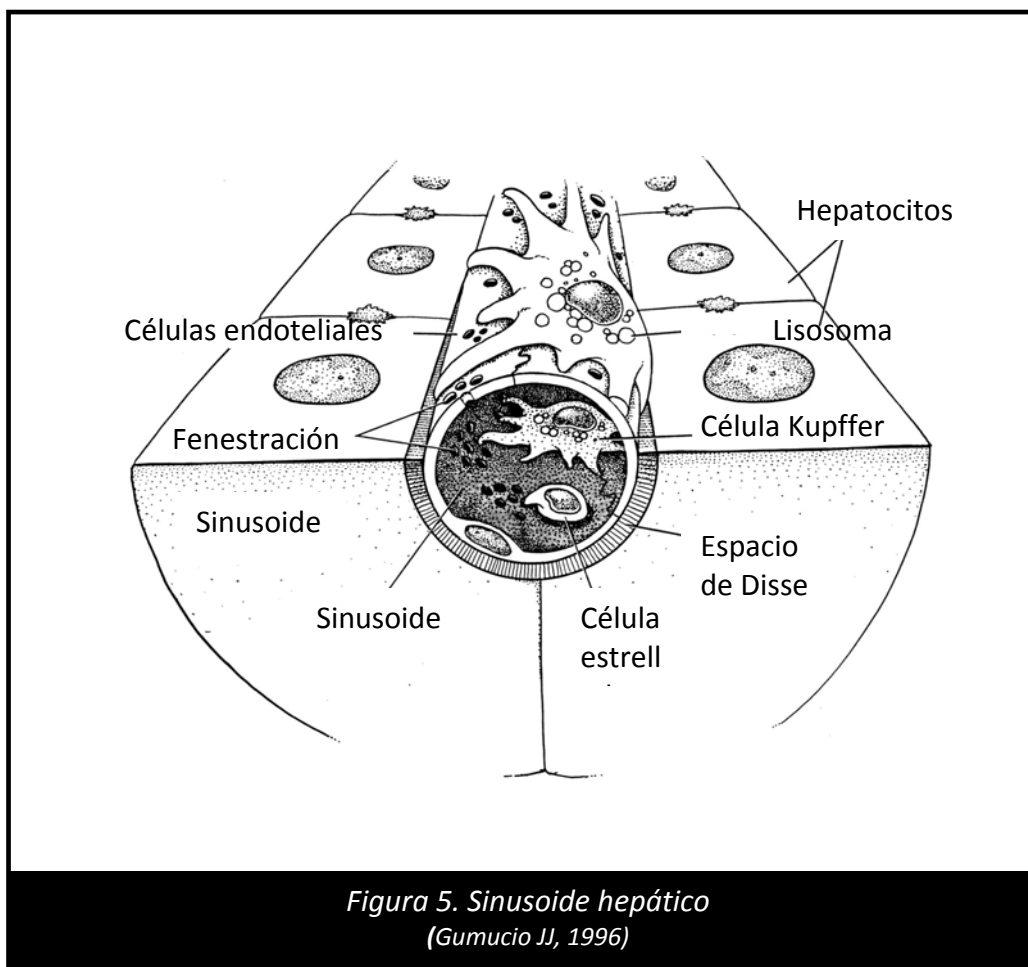
Células estrelladas

Corresponden con el 15% de las células hepáticas. Conocidas como células de Ito o de almacén de grasa, sintetizan el colágeno presente en el espacio de Disse (Schnack *et al.*, 1967) y están localizadas entre los hepatocitos y las células endoteliales. Su función es el almacenamiento y homeostasis de la vitamina A y otros

retinoides en forma de gotas lipídicas citoplasmáticas, la regulación del flujo sanguíneo sinusoidal, y la homeostasis de la matriz extracelular mediante la producción de apolipoproteínas, prostaglandinas, factores de crecimiento y citoquinas (Friedman, 2000).

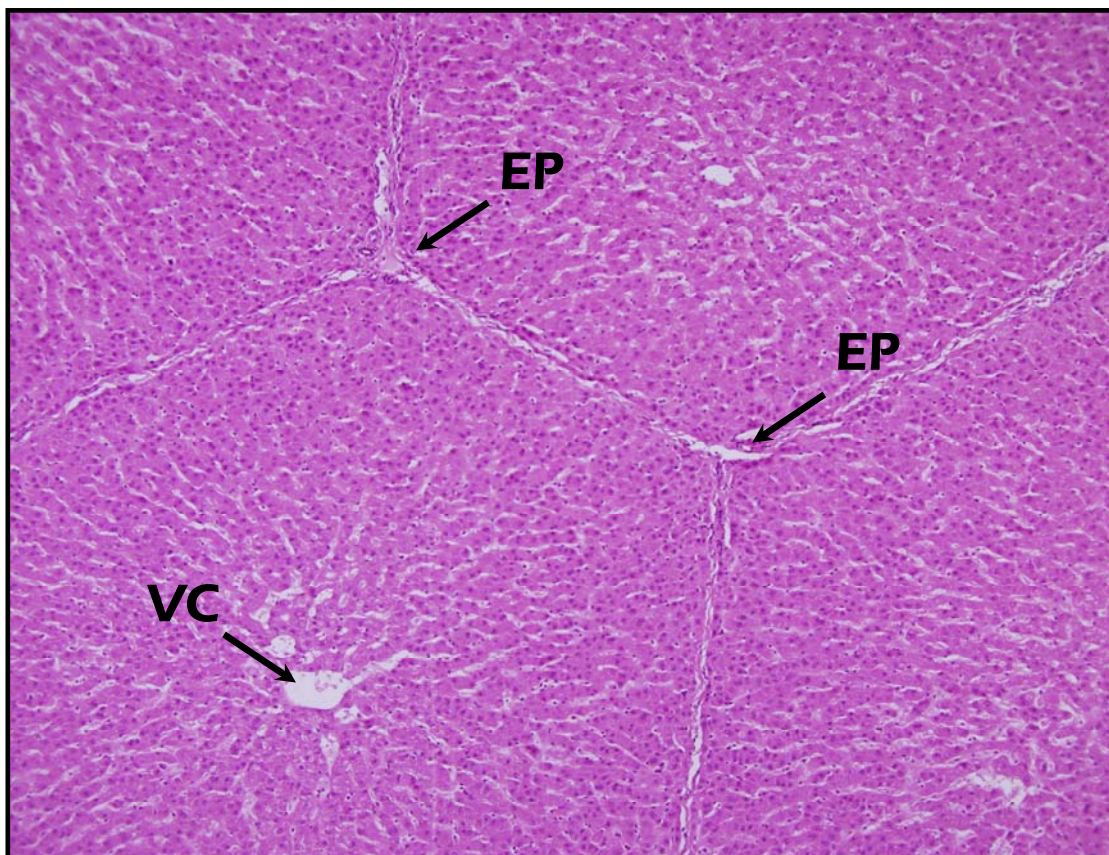
Células ovals o stem

Las constituyen una pequeña población de células indiferenciadas denominadas también células stem, con capacidad proliferativa y capaces de transformarse en cualquier tipo celular hepático, participando en la regeneración del órgano después de un daño (Gupta *et al.*, 1992).



Desde un punto de vista histológico, el hígado está constituido por 4 estructuras claramente diferenciadas que se resumen en los siguientes apartados:

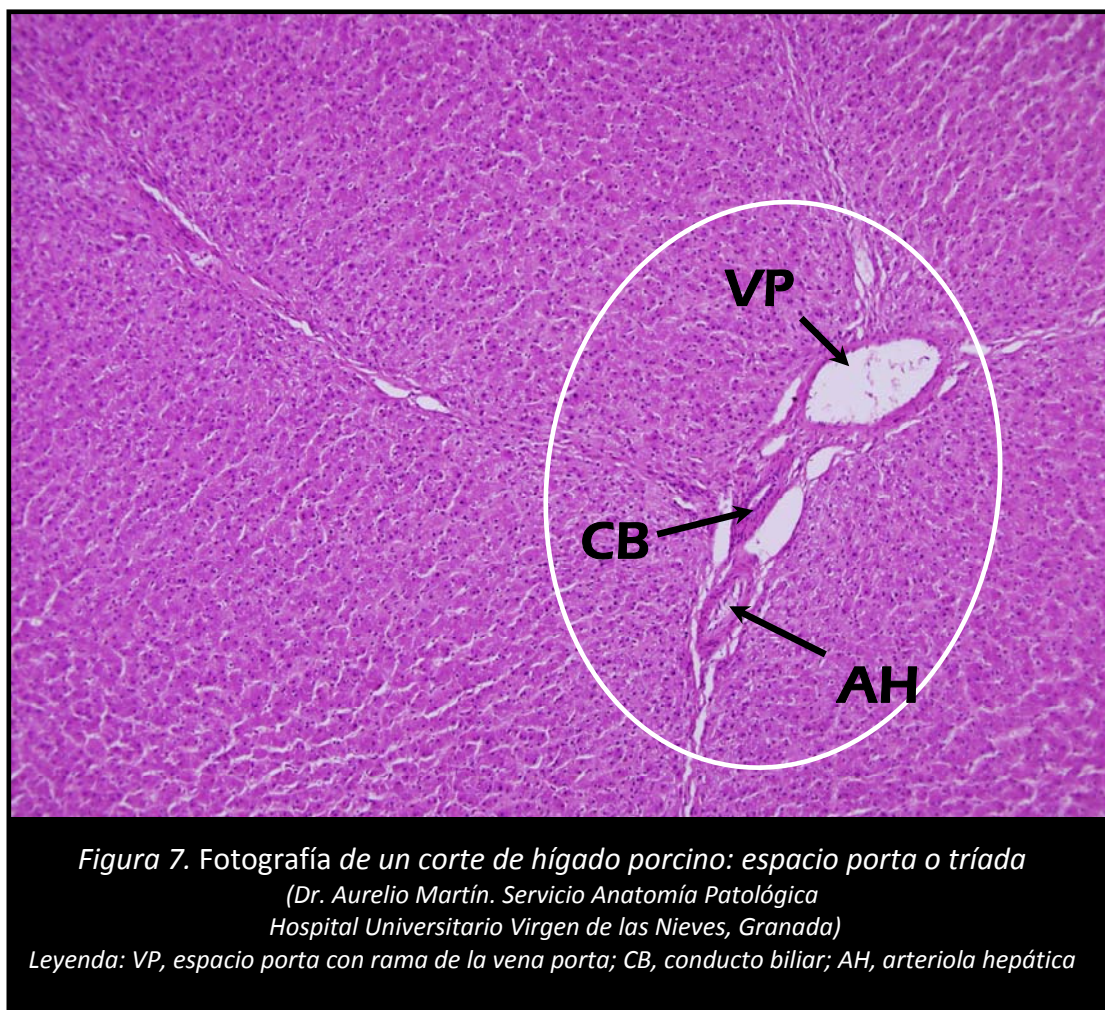
- Lobulillos hepáticos: son subunidades irregularmente hexagonales formadas por láminas fenestradas de hepatocitos que se disponen en forma radiada en torno a una vena central hepática o vena centrolobulillar, ubicada en el centro del lobulillo (Figura 6 y 8).



*Figura 6. Fotografía de un corte de hígado porcino: lobulillos
(Dr. Aurelio Martín. Servicio Anatomía Patológica
Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada)
Leyenda: EP, espacio porta; VC, vena central hepática*

- Espacios porta o triadas: son áreas triangulares situadas en los ángulos de los lobulillos hepáticos, constituidas por un estroma conjuntivo laxo; contienen en

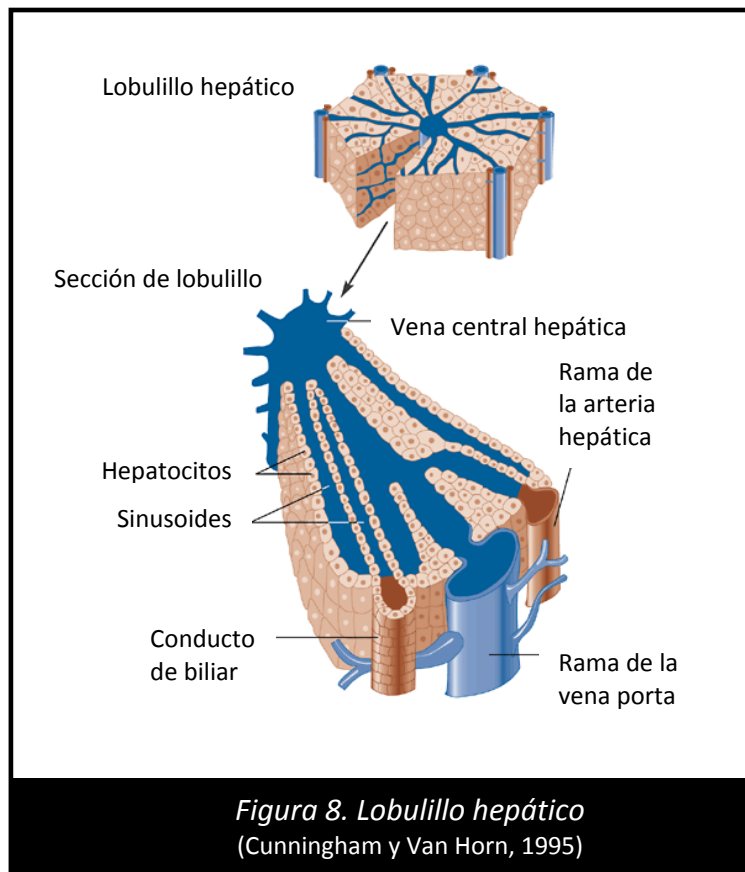
su interior una rama de la arteria hepática, una rama de la vena porta, un capilar linfático y un conductillo biliar como se muestra en la Figura 7 y 8.



- Sinusoides hepáticos: son capilares que se disponen entre las láminas de hepatocitos y donde confluyen, desde la periferia de los lobulillos, las ramas de la arteria hepática y de la vena porta; la sangre fluye desde las tríadas hasta la vena central, circulando en forma centrípeta; la pared de los sinusoides está formada por una capa discontinua de células endoteliales fenestradas, que carecen de membrana basal. La circulación hepática y porta confluyen en los

sinusoides. Éstos drenan su contenido a la vena hepática central, de ésta a las venas hepáticas derecha e izquierda, y finalmente a la vena cava inferior.

- Espacio de Disse: es un estrecho espacio que se encuentra entre la pared de los sinusoides y las láminas de hepatocitos, ocupado por una red de fibras reticulares y plasma sanguíneo que baña libremente la superficie de los hepatocitos. Tiene lugar el intercambio metabólico entre los hepatocitos y el plasma donde se forma la abundante linfa hepática. Además se encuentran células acumuladoras de grasa o células de Ito.



1.6. EL CULTIVO DE HEPATOCITOS

Las funciones específicas del hígado son difíciles de evaluar *in vivo* debido a la interferencia que crea la actividad simultánea de otros órganos. Este obstáculo se supera utilizando hígados aislados y perfundidos, células aisladas o incluso partículas subcelulares. Aunque un hígado perfundido es la situación más parecida al animal completo, sólo se puede mantener de forma viable durante poco tiempo, y en el caso de animales del tamaño del cerdo, la cantidad de medio que habría que perfundir haría prohibitiva la experimentación. Por otro lado, las células hepáticas aisladas de un órgano o tejido para cultivo, denominado primario, son viables durante varios días, y los datos experimentales que se obtienen son extrapolables al órgano completo (Caperna *et al.*, 1985).

El cultivo de células comienza a partir de una disgregación celular, por medios enzimáticos o bien mecánicos, de un órgano o tejido que ocasiona una suspensión de células aptas para el cultivo. El proceso de obtención de una suspensión de hepatocitos es una técnica experimental introducida por Howard *et al.* (1967). Inicialmente, la idea de separar los hepatocitos firmemente conectados unos a otros en el hígado no fue tarea fácil y todos los esfuerzos condujeron a preparaciones dañadas (Berry y Simpsons, 1962). La causa de esos fracasos se debió principalmente a una falta de conocimiento de las propiedades de los distintos componentes implicados en la adhesión celular. Desde entonces, la técnica ha ido evolucionando gracias al desarrollo de una nueva forma de preparación de alta producción (Berry y Friend, 1969), además de los aportes significativos de un gran número de investigadores de diferentes campos de investigación (Williamson *et al.*, 1976; Berry *et al.*, 1983): bioquímica, biología celular, microbiología, histología y microscopía electrónica.

Una vez que se obtiene la suspensión celular, ya sea a partir de medios enzimáticos o mecánicos, ésta puede cultivarse de dos formas diferenciadas, en función de la distribución que adquieren en el medio de cultivo: en monocapa adherente o bien en suspensión.

El crecimiento en monocapa implica una adhesión de las células al substrato base o matriz extracelular para comenzar con la proliferación dentro del cultivo. Muchas líneas celulares son anclaje-dependientes, es decir que no inician la proliferación hasta que se han adherido al sustrato. Este es el modo normal de proliferación de la mayor parte de las células, con excepción de las células hematopoyéticas maduras, cuyo crecimiento es en suspensión. El cultivo en monocapa ha sido el utilizado en el presente trabajo de Tesis Doctoral para el estudio *in vitro* con células de hígado porcino.

Como hemos comentado, uno de los medios utilizados en el proceso de disgregación celular es el enzimático. La enzima más frecuentemente utilizada es la colagenasa, aunque también es posible utilizar hialuronidasa (EC 3.2.1.35), tripsina (EC 3.4.21.4), clostripaína (EC 3.4.22.8), lisozima (EC 3.2.1.17), pronasa (EC 3.4.24.4) o dipasa (EC 3.4.24.4). La colagenasa (EC 3.4.24.3) también se denomina clostridiopeptidasa debido a que se aislaba a partir del microorganismo *Clostridium histolyticum* (Mandl *et al.*, 1953), y en la actualidad esta bacteria continúa siendo la principal fuente comercial de colagenasa. Es una proteasa capaz de hidrolizar la estructura nativa de la región helicoidal de las moléculas de colágeno, por las que presenta gran especificidad.

Los procesos básicos para el aislamiento de células hepáticas son:

1. Exposición de los hepatocitos a un medio pobre en Ca^{+2} .
2. Digestión con enzimas proteasas como la colagenasa.
3. Rotura por medios mecánicos.

La ruptura mecánica provoca daños en las células, sin embargo es un proceso esencial en el proceso de separación celular, previa al cultivo en monocapa. Debemos señalar que una vez separadas, las células son relativamente resistentes a daños mecánicos.

Por otra parte, el calcio es un ión que juega un papel muy importante en el mantenimiento de la integridad de estructuras celulares involucradas en la adhesión

entre células contiguas. Estas estructuras de unión se denominan desmosomas o mácula *adherens* y están localizadas en zonas de invaginación de la membrana plasmática y vacuolas, o bien hemidesmosomas cuando se limitan a zonas de la lámina basal. Dichas estructuras constituyen los principales puntos afectados al inicio de la disgregación celular en el aislamiento de hepatocitos durante el proceso de perfusión del medio. La falta de calcio en el medio de perfusión, ya sea por el empleo de una solución de baja concentración del ión o adicionalmente, por la introducción de un agente quelante de calcio, provoca daños irreversibles en estos complejos de unión, lo cual provoca la separación celular entre células adyacentes. Sin embargo, esta rotura no es instantánea. Un tiempo de perfusión inadecuado puede promover la restauración de los depósitos de calcio y ocasionar la readhesión celular durante el proceso de disgregación celular, dando lugar a una suspensión celular dañada (Seglen 1972; Wittenberg *et al.*, 1986). Sin embargo, el calcio es esencial en la actividad de la enzima colagenasa. Por lo tanto, la utilización de un agente quelante del calcio o bajas concentraciones del ión en la solución en un momento incorrecto del proceso, ocasionaría la reducción de la actividad de la colagenasa.

De este modo surge la técnica de aislamiento en 2 pasos, introducida inicialmente por Seglen (1976), la cual consta de una perfusión inicial del hígado con un medio bajo en calcio para promover la rotura irreversible de desmosomas y hemidesmosomas, seguida de un medio de perfusión rico en calcio y colagenasa.

1.6.1. Factores que afectan al cultivo de hepatocitos

El cultivo se origina en el momento en el que se alcanza la adhesión de las células al sustrato o matriz extracelular mediante la siembra de la solución celular en placas de cultivo, seguida de su posterior mantenimiento con medios de cultivo, tales como *William's E*, *Waymouth* o *Leibovitz*. En la adhesión de la célula a la matriz extracelular intervienen varios factores que detallamos a continuación.

Tipo de sustrato o matriz extracelular

Los cultivos en los que las células establecen un contacto adecuado con el sustrato poseen una distribución celular y unos niveles de expresión de ARN mensajero apropiados (Clayton *et al.*, 1985; Fujita *et al.*, 1987), y por lo tanto, una actividad celular óptima. Encontramos 2 tipos de matrices extracelulares: sólidas y semisólidas. Los principales componentes de estos soportes son el colágeno tipo I, II, III y IV, la fibronectina y la laminina (Martinez-Hernandez, 1984; Bissell *et al.*, 1987, 1990), lográndose mejores resultados con colágeno tipo IV (Bissell *et al.*, 1986; Sawada *et al.*, 1987), aunque entre el 75 y el 90% de los hepatocitos se unirá de forma adecuada al soporte si se utilizan altas concentraciones de cualquiera de ellos (Bissell *et al.*, 1986).

Nosotros hemos utilizado colágeno pero es posible utilizar otros sustratos como la matriz de glicoproteínas y el matrigel o incluso permitir que las células se adhieran directamente al plástico del matraz. Según Rubin *et al.* (1981), todos los tipos de colágeno permiten una unión bastante eficiente de los hepatocitos al soporte. El acoplamiento al colágeno es dependiente de la temperatura y máximo en presencia de iones de calcio y magnesio (Gjessing y Seglen, 1980), requiriendo pequeñas cantidades en las placas de cultivo para obtener una máxima unión y distribución celular (entre 0,5 y 15 μg de colágeno/ cm^2 ; Rubin *et al.*, 1981; Sawada *et al.*, 1987; Jauregui *et al.*, 1986). En el caso del colágeno IV las cantidades necesarias son mucho menores (0,05 μg de colágeno/ cm^2 ; Bissell *et al.*, 1986). La forma más sencilla de introducir colágeno sobre el soporte celular es mediante el secado por aire de una solución de colágeno

diluida, previamente dispensada sobre la base de la placa de cultivo (3-10 μg de colágeno/ cm^2), o bien permitiendo la adsorción de una solución de colágeno diluida (1 mg colágeno/ml) vertida en placa de cultivo durante unas horas y posterior lavado (Kleinman *et al.*, 1987). El colágeno tipo I se puede preparar de una forma muy fácil y económica a partir de cola de cerdo o tendones de rata.

Densidad y función celular en el cultivo

La densidad incide en el crecimiento y diferenciación de hepatocitos siendo necesario el contacto entre los mismos para una adecuada funcionalidad de las células hepáticas en cultivo. Este contacto célula-célula se realiza mediante el restablecimiento de los desmosomas, uniones gap y uniones estrechas o zónula *occludens* (Chapman *et al.*, 1973; Wanson *et al.*, 1977) que se pierden durante el proceso de aislamiento de los hepatocitos.

En el estudio de la densidad, como un factor elemental en el cultivo celular, nos encontramos con dos opciones divergentes. Una de ellas consiste en la siembra de los hepatocitos a una baja densidad, tal que produzca un crecimiento limitado y así obtener una óptima distribución celular en monocapa a lo largo de la matriz extracelular. La otra opción consiste en usar altas densidades celulares que promueven una fuerte conexión entre hepatocitos en la monocapa, es decir una alta confluencia, lo cual retrasaría la pérdida de funciones específicas celulares y minimizaría la acumulación de ARN mensajero que codifica para proteínas del citoesqueleto (Nakamura y Ichihara, 1985; Jauregui *et al.*, 1986).

Medio de Cultivo

En el mantenimiento del sistema de cultivo de hepatocitos a largo plazo, la composición del medio de cultivo juega un papel fundamental. Existe una gran variedad de compuestos hormonales, nutricionales y traza que, incluidos en el medio de cultivo, aportan las sustancias necesarias para el correcto mantenimiento celular. Aunque la composición del medio de cultivo ha sido el factor más investigado de todas

las variables que pueden influir en el mantenimiento del cultivo, actualmente es imposible identificar un único medio como el más idóneo para el cultivo de hepatocitos primario. La alteración de las funciones de los hepatocitos y el crecimiento perjudicial de otros tipos celulares que ocurre por la introducción de factores desconocidos cuando utilizamos suero en el medio de cultivo, ha conducido la investigación hacia la definición del medio óptimo de cultivo libre de suero. Medios comerciales tales como el *Williams Medium E* (Williams *et al.*, 1977), *RPMI 1640* (Reid *et al.*, 1986) y la mezcla de *Dulbecco's modified Eagle minimal essential medium (DMEM)/Ham's F-12* (DMEM/F-12; Sawada *et al.*, 1986) aportan en gran medida muchas de las necesidades para el crecimiento de hepatocitos en cultivo, utilizándose como medio base para el cultivo de los mismos. Los compuestos más frecuentemente añadidos al medio de cultivo de hepatocitos son:

Aminoácidos

Generalmente se emplean niveles altos de aminoácidos para asegurar una adecuada síntesis proteica y crecimiento celular. Ala y Glu provocan la inhibición de la síntesis de ADN a concentraciones mayores de 2 mM (McGowan *et al.*, 1984).

Azúcares

La utilización de altas concentraciones (> 20 mM) de glucosa reduce el gasto de aminoácidos como fuente de energía (Schwarze *et al.*, 1982) manteniendo la síntesis proteica a niveles adecuados. A niveles menores de glucosa, el lactato y piruvato son mejores fuentes energéticas que la misma.

Sales e iones metálicos

El Ca^{2+} está presente en la mayoría de los medios de cultivo (1-2 mM) ya que facilita la mitosis celular (Michalopoulos *et al.*, 1982; McGowan, 1986). Otros iones metálicos tales como el Cu^{2+} , Zn^{2+} y selenito presentes en el medio provocan un efecto estimulante de la síntesis de ADN (Kobusch y Bock, 1990).

Antibióticos

Los más utilizados son penicilina, estreptomina y gentamicina para evitar cualquier contaminación de bacterias en el cultivo. Las concentraciones utilizadas no suponen un riesgo para la integridad del hepatocito (Schwarze y Seglen, 1981; Jeejeebhoy *et al.*, 1975; Vonen y Mørland, 1985). La fungizona (amfotericina B) se usa como suplemento del medio para evitar contaminaciones por levaduras y hongos del medio (Miyazaki *et al.*, 1985; Vintermyr y Døskeland, 1987).

Oxigenación

Las condiciones de cultivo estándares actuales (5% CO₂) proporcionan una oxigenación apropiada para el mantenimiento del sistema de cultivo de hepatocitos, y las placas de cultivo aportan la profundidad del medio que recubre la monocapa conveniente para permitir el intercambio gaseoso adecuado (Bissell y Guzelian, 1980; Holzer y Maier, 1987). Un aumento sustancial del oxígeno en la atmósfera del incubador de CO₂ celular origina una disminución de la supervivencia celular pasados 7 días por la aparición de especies reactivas del O₂ (Miyazaki *et al.*, 1989). En cambio la disminución de la concentración de O₂ mejora ligeramente la viabilidad celular, e influye en el metabolismo de los hidratos de carbono mediante la modificación del estado redox celular que provoca una estimulación de la actividad glucolítica de la célula (Wölflé *et al.*, 1983; Holzer y Maier, 1987).

Hormonas

1. Dexametasona: posee numerosos efectos sobre la morfología, función y viabilidad del hepatocito sobre la superficie de cultivo (Laishes y William, 1976b; Marceau *et al.*, 1982b, 1986a; Guguen-Guillouzo y Guillouzo, 1983; Reid *et al.*, 1986).
2. Insulina: se incluye habitualmente en todos los medios de cultivo por su acción positiva en la adhesión inicial celular al soporte, mejora de la viabilidad y conservación de las funciones celulares (Dich *et al.*, 1988; Tanaka *et al.*, 1978; Hutson *et al.*, 1987).

3. Glucagón: contribuye a la regulación de enzimas clave en el metabolismo de hidratos de carbono, lípidos y aminoácidos además de preservar la síntesis de albúmina de los hepatocitos (Nawa *et al.*, 1986; Lloyd *et al.*, 1987; Dich *et al.*, 1988).

DMSO

El dimetil sulfóxido es un aditivo de tipo no fisiológico en los medios de cultivo de hepatocitos que tiene como propiedad atravesar fácilmente la membrana celular y que produce un efecto sobre la morfología y supervivencia de los hepatocitos cuando se encuentra a niveles comprendidos entre 0.5 y 2%. Fundamentalmente, estimula la síntesis de albúmina, favorece la retención de muchas proteínas específicas del hígado, inhibe la peroxidación lipídica, e induce la organización del citoesqueleto en hepatocitos (McGowan, 1987, 1988; Isom *et al.*, 1987). A mayores concentraciones puede inhibir la síntesis de ADN al bloquear las células en las fases G₀ o al principio de la G₁ del ciclo celular (Chan *et al.*, 1989).

Otros compuestos

Ácido grasos esenciales, entre ellos el ácido linoleico que unido a albúmina favorece el mantenimiento de las uniones gap entre células (Spray *et al.*, 1987); vitaminas; y rojo fenol, como indicador de pH (Dumesic *et al.*, 1989).

CAPÍTULO 2

Objetivos

2.1. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL

Esta Tesis Doctoral se enmarca en un amplio programa experimental, iniciado hace varios años por el grupo de investigación dentro del que se ha desarrollado este trabajo, cuyo objetivo general es mejorar el conocimiento sobre el metabolismo de nutrientes y energía del cerdo Ibérico durante las distintas fases de su ciclo productivo.

El cerdo Ibérico es una raza porcina con clara tendencia a la deposición de grasa, de lento crecimiento y limitada capacidad para la formación de tejido muscular. En trabajos anteriores del grupo de investigación se ha demostrado que las necesidades proteicas y energéticas de esta raza difieren de las establecidas para razas porcinas convencionales, siendo considerablemente inferiores en cuanto a la cantidad de proteína, entendida como proteína de composición ideal (BSAS, 2003), que ha de aportar la dieta en la etapa de crecimiento (de 15 a 50 Kg de peso, Nieto *et al.*, 2002) y en la de crecimiento-cebo (de 50 a 100 Kg de peso, Barea *et al.*, 2007). Por otra parte, resultados obtenidos en un trabajo anterior (Rivera-Ferre *et al.*, 2006) basados en la determinación de la deposición de proteína mediante técnicas de balance de nitrógeno, sugerían que en el animal de peso vivo inferior a los 30 Kg, la retención proteica y la eficiencia de utilización de la proteína de la dieta podían ser comparativamente más elevadas que las determinadas como valor promedio para la etapa de crecimiento (Nieto *et al.*, 2002). Por ello, en esta Tesis Doctoral se ha estudiado en el lechón Ibérico, desde el destete hasta los 25 Kg de peso vivo, el potencial de crecimiento, y la utilización de la proteína y energía de la dieta para la retención de nutrientes y el mantenimiento de sus funciones vitales. En razas porcinas convencionales y magras se considera que esta etapa condiciona el adecuado desarrollo posterior del animal y que la conversión de nutrientes para formar tejidos propios alcanza tasas de eficiencia máximas (Kendall *et al.*, 2008).

Desde un punto de vista práctico, a este peso (aproximadamente 25 kg) finaliza la fase de producción de lechones en la que se especializan muchas explotaciones

denominadas “de cría”, lo que añade un marcado carácter aplicado a algunas de las conclusiones de este trabajo.

Otro aspecto abordado ha sido la puesta a punto de la técnica de cultivo primario de hepatocitos de cerdo Ibérico para el estudio de distintos aspectos del metabolismo del lechón a nivel hepático. El hígado es un órgano cuya localización privilegiada en el sistema circulatorio entre el tracto gastrointestinal y el resto de órganos y los tejidos periféricos (de los que el músculo es el más importante desde el punto de vista productivo), condiciona el aporte de nutrientes a estos últimos. Además, juega un papel primordial en el metabolismo global. El cultivo de hepatocitos nos ha permitido estudiar el efecto del ácido linoleico conjugado (CLA), que pueden ser añadido a la dieta del animal, sobre el metabolismo de lípidos e hidratos de carbono a nivel hepático, sin interferencias del resto de órganos y de un perfil hormonal fluctuante. El CLA tiene *in vivo* un efecto sinérgico con la betaína sobre la deposición de proteína y el contenido en grasa de la canal en cerdos Ibéricos jóvenes (Fernández-Fígares *et al.*, 2008).

El objetivo general de este trabajo ha sido pues aportar información sobre aspectos hasta ahora no abordados sobre la nutrición y el metabolismo del lechón Ibérico.

Los objetivos específicos de trabajo han sido:

1. Determinar la capacidad máxima del lechón Ibérico para forma proteína y la relación entre las concentraciones de proteína de máxima calidad biológica y energía útil de la dieta que satisface dicho potencial, así como la eficiencia marginal de deposición proteica.
2. Abordar el estudio de los cambios que se producen en la composición corporal del animal, proteína y grasa principalmente, por alteraciones en la ingestión de proteína o en el plano de alimentación.

3. Analizar los cambios que pueden producirse en las proporciones relativas de tejidos y órganos como consecuencia de las alteraciones inducidas en el régimen de alimentación.
4. Definir las necesidades energéticas de mantenimiento del lechón Ibérico, desde su destete hasta los 25 Kg de peso vivo y la eficiencia de transformación de la energía ingerida en su organismo.
5. Determinar los efectos del CLA sobre la síntesis de la hormona IGF-I a nivel hepático.
6. Estudiar la regulación de la síntesis de triglicéridos (TG) hepáticos por la insulina, el glucagón, la dexametasona y los ácidos grasos presentes en el medio.
7. Determinar los efectos del CLA en el hepatocito sobre la producción de glucosa, síntesis y degradación de glucógeno.

Para el desarrollo de los 4 primeros objetivos se llevó a cabo un ensayo de alimentación, digestibilidad de nutrientes y balance de N (nitrógeno) y, paralelamente, otro de sacrificios comparados. Se han utilizado 52 lechones Ibéricos puros, castrados, de la estirpe Silvela, tras el destete, con un peso inicial de 9-10 kg y 45 días de edad, aproximadamente, procedentes de la finca Montecastilla, en Granada de Riotinto, Huelva, que pertenece a la empresa Sánchez Romero Carvajal Jabugo, S.A. Durante el ensayo los lechones se albergaron en parques individuales de 2 m² en una nave termorregulada para alcanzar la zona de termoneutralidad de los lechones. Las dietas empleadas, de naturaleza semisintética, se formularon con un contenido en energía metabolizable medio de 14,6 KJ por Kg MS y con un contenido en proteína de alto valor biológico, formulado según el concepto de proteína ideal, que osciló entre 201 y 123 g PB por Kg de MS. Se ha empleado un diseño factorial 4 x 2, con cuatro niveles de concentración proteica de la dieta (201, 176, 149 y 123 g PB/Kg MS) y dos niveles de alimentación (95 y 70% de *ad libitum*) con seis o siete animales por combinación de

tratamientos, lo que permite identificar los efectos intrínsecos de ambos factores, así como su posible interacción.

Para abordar los 3 objetivos restantes se utilizó un lote de cinco lechones, de características similares a las descritas anteriormente y peso vivo comprendido entre los 11 y 21 Kg. Se ha llevado a cabo la técnica de aislamiento y cultivo de hepatocitos porcinos descrita por Fernández-Fígares et al. (2004), adaptada a las condiciones de nuestro laboratorio, para estudiar el efecto de diversos factores endocrinos y nutricionales sobre la glucemia, síntesis de triglicéridos (TG) y la producción de la hormona IGF-I. La gluconeogénesis se determinó midiendo en el medio de cultivo la formación de glucosa a partir de lactato, piruvato y alanina como sustratos gluconeogénicos en presencia de CLA. La síntesis y degradación de glucógeno hepático se determinaron por diferencia en contenido de glucógeno entre cultivos en condiciones que simulaban el estado postprandial o el ayuno, respectivamente, en presencia de CLA. La síntesis de TG e IGF-I se determinó simulando condiciones postprandiales.

2.2. JUSTIFICACIÓN

El estudio del metabolismo y nutrición del lechón Ibérico no había sido abordado hasta la fecha en el grupo de investigación del que actualmente formo parte. Creemos que es importante profundizar en el estudio de esta fase de crecimiento ya que trabajos anteriores del grupo (Rivera-Ferre *et al.* 2006) sugieren que en esta etapa la capacidad de transformación de nutrientes podría ser considerablemente superior a la determinada previamente para la fase de crecimiento (15 a 50 Kg de peso vivo, Nieto *et al.*, 2002, 2003). Esta determinación mejoraría considerablemente la precisión en la estimación de necesidades y, consecuentemente, el sistema de alimentación que estamos desarrollando para el cerdo Ibérico.

El establecimiento de un sistema de cultivo de hepatocitos porcinos permite realizar estudios metabólicos en un ambiente en el que podemos mantener bajo control el efecto de hormonas y el aporte de nutrientes o modificadores metabólicos, evitando la implicación de otros factores que tienen lugar cuando se realizan estudios en el organismo completo. La información básica que nos proporcionan estos estudios contribuye a caracterizar este aspecto del metabolismo del cerdo Ibérico y a profundizar, entre otros parámetros, en las causas que influyen en su bajo potencial de crecimiento y su acusado carácter lipogénico.

Hemos intentado de este modo contribuir al desarrollo de un sistema de alimentación y manejo del cerdo Ibérico que sea riguroso en la predicción de la respuesta del animal, eficiente desde el punto de vista productivo y que tenga en cuenta los aspectos de calidad de la producción, bienestar animal y respeto al medio ambiente que la sociedad actual demanda.

CAPÍTULO 3

Aspectos metodológicos

A lo largo de los siguientes apartados de este capítulo detallaremos como se ha realizado la estimación de la retención de nutrientes y energía para abordar los distintos objetivos planteados en el estudio *in vivo* del lechón, desde el postdestete hasta aproximadamente los 25 Kg de peso. También se indican los modelos de regresión utilizados para calcular las necesidades energéticas de mantenimiento y las eficiencias de utilización de la energía útil proporcionada por el alimento para el crecimiento, y la deposición de grasa y proteína. Por otra parte, dada la singularidad e innovación que presenta el aislamiento y cultivo primario de hepatocitos porcinos del cerdo Ibérico, como técnica desarrollada en la presente Tesis Doctoral, cabe describir con detenimiento el material, métodos y pautas que hemos seguido en la puesta a punto de esta metodología.

3.1. COMPOSICION CORPORAL Y RETENCIÓN DE NUTRIENTES Y ENERGÍA

La composición físico-química de los lechones se analizó sobre el material homogeneizado representativo de cada uno de los 4 componentes en que se dividió el cuerpo del animal (canal, vísceras, sangre y el compartimento formado por cabeza, patas y rabo) mediante la aplicación de las técnicas analíticas citadas en los capítulos 4 y 5 de la presente Tesis Doctoral. Una vez realizados los análisis de composición porcentual en materia seca (MS), nitrógeno y minerales totales y del contenido energético (kJ/g) para cada uno de los componentes corporales citados anteriormente, se procedió a calcular, a partir de estos datos y del peso vivo vacío, las cantidades totales (en g) de proteína, grasa y minerales totales para comprobar la exactitud de los análisis efectuados en cada animal completo. Los valores obtenidos por este método se compararon con el peso seco (PS, g de MS) mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Desviación (\%)} = \frac{(\text{g proteína} + \text{g grasa} + \text{g minerales totales}) - \text{PS (g MS)}}{\text{PS (g MS)}} \times 100$$

Esta desviación nos indica si los ajustes y cálculos desarrollados se realizaron o no de forma correcta, es decir, nos muestra la bondad de la aplicación del método en cada animal.

Como aparece en los capítulos 4 y 5, se tomaron 6 animales sacrificados para constituir el lote inicial. En primer lugar, se calculó la media aritmética del cociente peso vivo vacío (PVV)/peso vivo (PV), que se utilizó posteriormente para estimar el peso vivo vacío inicial de cada animal del lote experimental al comienzo de nuestros ensayos (PVV_i). Esta variable (PVV_i) se estimó multiplicando el PV de cada lechón en el momento de iniciar el ensayo (PV_i) por la relación media PVV/PV media del lote inicial, citada anteriormente. En el lote inicial, se estableció la proporción de cada componente con respecto al PVV de cada animal (comp, g/g), a partir de los pesos en fresco de los componentes en que se dividió el cuerpo de los cerdos tras su sacrificio. A partir de los valores medios de estas relaciones (componente/PVV), estimamos el peso de cada uno de estos componentes en el grupo experimental al inicio del ensayo.

La composición química de los componentes corporales de los cerdos del lote experimental al inicio y al final del ensayo se calculó como se detalla a continuación. El peso seco inicial (PS_i, g) o final (PS_f, g) de cada componente, calculado a partir del material residual en la muestra representativa libre completamente de agua, es decir, liofilizada y determinado en ésta su contenido residual de agua mediante el análisis de MS de la muestra liofilizada, se obtuvo de forma diferente para los estados inicial y final:

$$PS_i (g) = PVV_i (g) \times comp (g/g) \times ML (g/g) \times MS (g/g)$$

$$PS_f (g) = P_{comp} (g) \times ML (g/g) \times MS (g/g)$$

Definimos PS_i y PS_f (g) como los pesos secos para los componentes al inicio y final del ensayo, respectivamente; PVV_i (g) es el peso vivo vacío inicial, comp (g/g) es la proporción calculada de cada componente en el organismo del animal al inicio del ensayo, P_{comp} (g) es el peso del componente al final del ensayo, ML y MS (g/g) son las proporciones de sustancia liofilizada (respecto a sustancia fresca) y de MS (respecto a

sustancia desecada por liofilización) en el material liofilizado, respectivamente, para un componente dado al inicio o final del ensayo.

El contenido en proteína de cada uno de los componentes (Proteína, g), en el grupo experimental tanto al inicio como al final del ensayo, se calculó a partir del peso seco ($PS_{i,f}$, g) y de su contenido en proteína expresado como proporción de su MS, excepto para el componente sangre, ya que la proteína de la sangre se obtiene mediante análisis químico directo de ésta, mientras que para el resto de componentes corporales se usa el material liofilizado.

$$\text{Proteína (g)} = PS_{i,f} \text{ (g)} \times \frac{\text{Prot (g/g)}}{\text{MS (g/g)}}$$

Para esta fórmula, Prot (g/g) y MS (g/g) son el contenido en proteína y el de la materia seca determinados en el material liofilizado representativo del componente.

La composición en cenizas o minerales totales (g) se calculó de la misma forma: el contenido en cenizas totales, obtenido para cada componente animal mediante análisis en el laboratorio, se expresó en función de la MS del componente dado.

La energía total de cada componente del animal (E_t , kJ) se calculó de igual forma para los estados inicial y final del ensayo. Debido a que los resultados de energía bruta obtenidos en la bomba calorimétrica aparecen expresados en cal/g, se requiere de su multiplicación por 4,184 para transformarlos en julios/g; se usaron los múltiplos kJ y MJ en todos los casos. Los cálculos realizados se reflejan en la siguiente fórmula:

$$E_t \text{ (J)} = 4,184 \times PS_{i,f} \times \frac{\text{EB (cal/g)}}{\text{MS (g/g)}}$$

En dicha expresión, EB corresponde con la energía bruta media del material liofilizado.

La energía de la proteína ($E_{pi,f}$, kJ) se obtuvo multiplicando el valor de Proteína (g) por el factor 23,85 debido a que la entalpía de combustión (energía bruta) media de 1 g de la proteína equivale a 23,85 KJ/g (Wenk *et al.*, 2001).

La energía de la grasa ($E_{gi,f}$, kJ) se obtuvo restando a E_t el valor energético de E_p para el inicio y final del experimento. Obviamos el valor energético de los hidratos de carbono en el cálculo anterior debido a su reducida presencia en los componentes analizados. El contenido de grasa (g) se obtuvo dividiendo $E_{gi,f}$ por el factor 39,75 kJ/g, valor correspondiente a la entalpía de combustión (energía bruta) media de 1 g de grasa (Wenk *et al.*, 2001). El cálculo corresponde con la siguiente expresión:

$$E_{gi,f} = E_{ti,f} - E_{pi,f}$$

El factor 39,75 kJ/g es el generalmente aceptado para su aplicación en los estudios de metabolismo energético en animales. Fue propuesto por E. Brouwer (Brouwer, 1965). Sin embargo, subestima en aproximadamente un 2% la cantidad de grasa presente en el componente analizado. Barea (2005) determinó el valor energético de la grasa de los cerdos ibéricos que intervinieron en un estudio en el periodo de crecimiento-cebo (50-100 Kg PV) mediante extracción de la muestra liofilizada con una mezcla de cloroformo-metanol al 2:1 v/v, en equipo Soxhlet, y posterior determinación del calor de combustión de la grasa extraída, en bomba calorimétrica adiabática. Los análisis se realizaron en muestras representativas de la canal de animales sometidos a varios de los tratamientos experimentales. Se analizó un total de nueve muestras, con los siguientes resultados (media \pm error estándar):

Energía bruta de la grasa (kJ/g): 38,87 (\pm 0,212); n = 9

Finalmente, la cantidad de agua (g) en la sangre y vísceras de los animales del grupo experimental al comienzo del ensayo se obtuvo por diferencia entre el peso fresco, calculado como PV_i , multiplicado por la fracción constituida por el componente correspondiente, y PS_i . Al término del ensayo dicha cantidad se calculó restando del

peso del componente al finalizar el ensayo (peso final, g) su peso seco. En este caso la operación es clara y sencilla porque se dispone de los datos, directamente obtenidos, correspondientes al peso final, en fresco, de estos dos componentes. En cambio, para las canales y cabezas la cantidad de agua se calculó indirectamente ya que la cabeza no se escindió del tronco hasta el final del periodo de oreo (24 h). Con este propósito, se dividió el peso de cada componente tras el oreo del conjunto canal-cabeza, entre la relación de pesos del material oreo y fresco. De esta forma, estimamos el peso en fresco de cada uno de los dos componentes; a continuación, a este valor se le restó el peso seco correspondiente.

Para el cálculo de las retenciones parciales de nutrientes y energía en cada componente (g/d) se restó la cantidad de nutriente o energía existente en el componente al inicio del ensayo (nutriente en producto inicial, g) de la existente al término del mismo (nutriente en producto final, g) y se dividió la diferencia entre el número de días que estuvo en ensayo cada animal. La siguiente fórmula se usó igualmente para E_p , ER y E_f (kJ), así como para el cálculo de las retenciones de grasa, cenizas y agua.

$$\text{Proteína(g/d)} = \frac{\text{Prot. final} - \text{Prot. inicial}}{\text{días}}$$

Para expresar los valores relacionados con la energía en función del peso metabólico medio del animal se dividió su valor (kJ/d) entre el peso vivo vacío medio (PVV_m) elevado a la potencia 0,75. Elegimos este coeficiente puesto que es el más utilizado y el que permite una comparación entre animales de distinto perfil metabólico e incluso de diferentes especies (Blaxter, 1989).

La composición química (g/Kg PVV) de los cerdos a los 25 Kg de PV se obtuvo dividiendo la composición corporal dada en términos absolutos (g) para cada uno de los elementos analizados por el PVV final del animal. La composición química de 1 Kg de ganancia de los animales con pesos comprendidos entre los 10 y 25 Kg se hizo

dividiendo la retención de cada nutriente o de la energía entre los incrementos de peso de cada animal.

Los pesos de los componentes canal, cabeza, vísceras y diferentes órganos por separado, se refirieron al PVV final del animal.

3.2. UTILIZACIÓN DE LA ENERGÍA METABOLIZABLE INGERIDA

La energía metabolizable (EM) contenida en los nutrientes que el animal ingiere y absorbe la utiliza para procesos de mantenimiento (EM para mantenimiento, EM_m), y para procesos de producción (EM para producción, EM_p). En los procesos de mantenimiento del animal se emplea la energía libre, resultante de la oxidación de los nutrientes absorbidos y la grasa corporal, para sintetizar el ATP necesario para el mantenimiento de la homeostasis interna. La EM_p engloba los costes energéticos que suponen las síntesis de tejidos o costes energéticos de la retención, y la energía almacenada en esos tejidos o energía retenida.

La eficiencia con la que se utiliza la energía metabolizable para la producción depende de la naturaleza química del nutriente, tipo de producción, especie animal y estado fisiológico. En el caso del crecimiento, como es el de los animales experimentales del presente trabajo, la retención de energía (ER) en el organismo del animal se produce fundamentalmente en forma de deposición grasa (ERG) y de proteína (ERP), lo cual requiere un balance de energía y nutrientes positivo a partir de los nutrientes ingeridos de la dieta. La eficiencia de las transformaciones energéticas de las rutas metabólicas implicadas en la síntesis de grasa y proteína a partir de los nutrientes absorbidos de la ración determinará la eficiencia global de utilización de la EM.

En el animal en producción, la ingesta de energía metabolizable (IEM) menos la pérdida de calor (Q) que se produce, representa la energía total retenida en el organismo (ER). Existen técnicas directas e indirectas para cuantificar la energía que retiene el animal cuando consume un alimento determinado, las cuales tienden a subestimar o sobrestimar, respectivamente, la retención energética, aunque la diferencia entre ambas metodologías no debe superar el 5% de la ingesta de EM. La determinación de la ER y la forma en que ésta se produce (ERG y ERP) empleada en el estudio *in vivo* realizado en la presente Tesis Doctoral se ha realizado por la técnica del

sacrificios seriados o comparados. Las ventajas de utilizar esta metodología son la independencia de instalaciones complejas, el relativo bajo coste y su fácil manejo, junto con el alto grado de fiabilidad que presenta.

Independientemente de la metodología empleada, se necesita llevar a cabo al menos 2 determinaciones de la ingesta y retención energética, correspondientes a 2 niveles de producción, si se desea estimar la eficiencia con la que EM se utiliza en el proceso global del crecimiento. Para ello empleamos modelos factoriales de regresión. En la presente Tesis Doctoral se han ensayado 2 niveles de ingestión energética, 70 y 95% del nivel de *ad libitum*.

Para estimar la eficiencia de utilización de la EM hemos seguido el modelo de ecuación propuesta por el Sistema de Energía Metabolizable Británico (Blaxter, 1967) que relaciona la energía metabolizable con la energía retenida, cuantificándose ésta mediante sacrificios comparados y análisis de composición corporal y demás componentes orgánicos.

$$ER = -a + k_g \times IEM \quad (\text{ecuación 1})$$

En la ecuación, "ER" corresponde con la energía retenida total, "k_g" es la eficiencia parcial de utilización de la EM para la retención, "IEM" es la ingesta de EM, y a es un término equivalente a k_g x IEM_m, siendo la IEM_m la ingesta de EM para mantenimiento (es decir, el valor de IEM cuando ER = 0). En la ecuación inversa:

$$IEM = a + (1/k_g) \times ER \quad (\text{ecuación 2})$$

"a" es el valor de la IEM_m, y el cociente "1/k_g" es el inverso de la eficiencia de utilización de la EM para la retención de energía, es decir, el coste energético de la retención de energía. A partir de esta ecuación podrían obtenerse las necesidades de EM para la producción (IEM_p), restando a IEM los requerimientos de mantenimiento (IEM - a), o sea:

$$\text{IEM}_p = (1/k_g) \times \text{ER} \quad (\text{ecuación 3})$$

Mediante el modelo de regresión múltiple propuesto por Kielanowski (1965) se estima el calor producido asociado con la deposición de proteína (ERP) y la deposición de grasa (ERG). La siguiente ecuación múltiple refleja este modelo:

$$\text{IEM} = b + (1/k_p) \text{ER}_p + (1/k_f) \text{ER}_g \quad (\text{ecuación 4})$$

En dicha ecuación "IEM" corresponde con la energía metabolizable ingerida; "b" es la energía metabolizable necesaria para el mantenimiento (EM_m); " $1/k_p$ " y " $1/k_f$ " son los coeficientes de regresión y " k_p " y " k_f " se corresponden con las eficiencias energéticas parciales para la deposición de proteína y grasa respectivamente.

La ecuación empleada en nuestros ensayos para estimar " k_p " y " k_f " ha sido la 4 modificada, de modo que hemos deducido el término b, es decir, la estimación de EM_m , obtenida mediante la aplicación de la ecuación 2. La ecuación resultante es:

$$\text{IEM}_p = (1/k_p) \text{ER}_p + (1/k_f) \text{ER}_g \quad (\text{ecuación 5})$$

Todos los valores referidos al balance energético se han expresado por unidad de peso metabólico y día ($\text{Kg}^{0,75}$ y d).

3.3. AISLAMIENTO Y CULTIVO PRIMARIO DE HEPATOCITOS PORCINOS IBÉRICOS

Durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral, hemos preparado un sistema de aislamiento y cultivo primario de hepatocitos porcinos en monocapa por procedimientos enzimáticos para el estudio *in vitro* del metabolismo hepático. Hemos seguido el procedimiento en 2 fases, inicialmente descrito por Seglen (1976), que se basa en una perfusión inicial con un medio pobre en calcio (lo que rompe las uniones celulares y facilita la acción de las enzimas proteasas) seguido de otro constituido por colagenasa, principalmente, aunque también por otras enzimas, como proteasas. El medio es rico en calcio para facilitar una actividad óptima de la colagenasa.

3.3.1. Procedimiento

La técnica comienza con el sacrificio del lechón mediante desangrado, previo aturdimiento por electronarcosis. Durante todo el procedimiento se siguieron las directrices de la Unión Europea (No. 86/609/EEC) para el manejo y cuidado de los animales. Previamente al sacrificio, permitimos que el animal dispusiese del alimento necesario para que las reservas hepáticas de glucógeno estuviesen completas. De este modo, los hepatocitos pueden aumentar su viabilidad al disponer de las reservas energéticas necesarias durante el aislamiento hasta disponer de un medio de crecimiento que les aporte nutrientes. La viabilidad de los hepatocitos suele ser mayor cuanto menor es el peso del animal y por esta razón muchos autores usan neonatos para el aislamiento de hepatocitos.

Tras el sacrificio, abrimos la cavidad abdominal del animal sin romper ninguna sección del tracto digestivo para evitar posibles contaminaciones. Extraemos el hígado y seccionamos el lóbulo lateral izquierdo encima de una tabla estéril. Dicho lóbulo se introduce en un medio de transporte frío y se transporta al laboratorio para canular una rama de la vena porta con la mayor rapidez posible. Se elige una rama que perfunda la

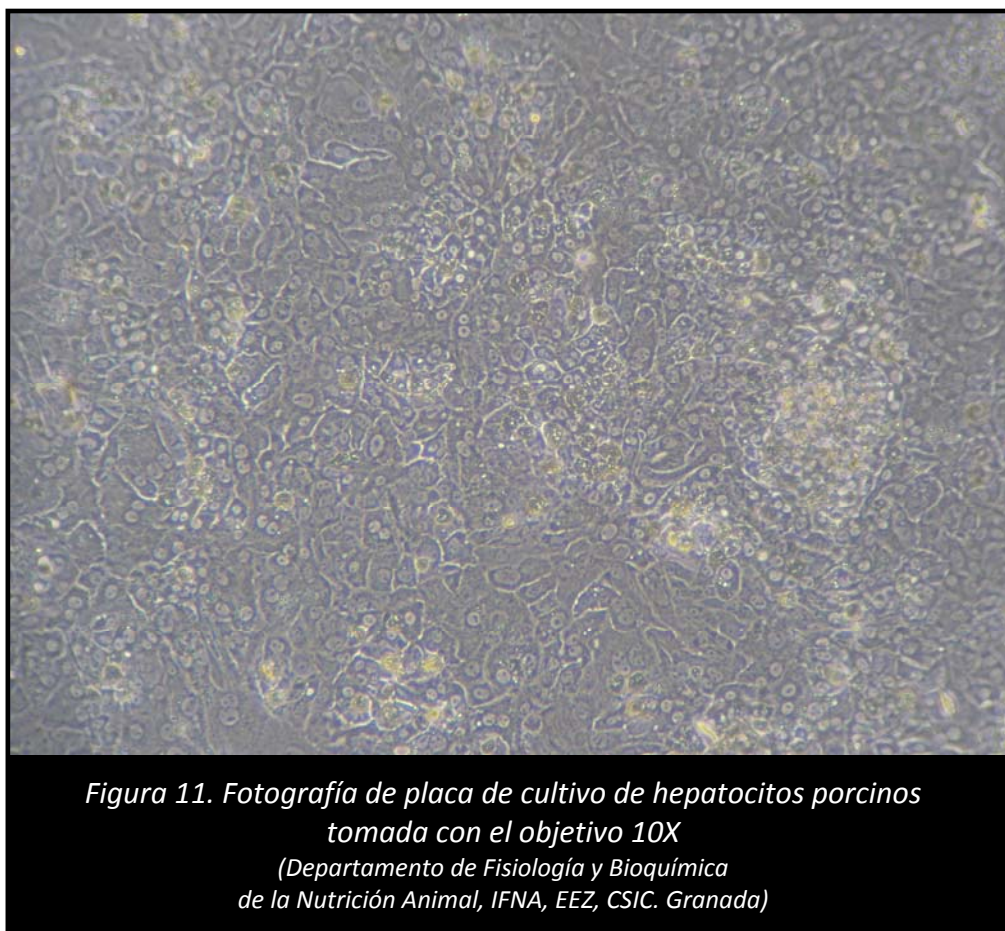
mayor parte posible del lóbulo y se recorta hasta un tamaño (80-90 g) que permita la digestión del mismo con enzima colagenasa. Los extremos del lóbulo se cosen para permitir que el infusato se retenga en el tejido. Durante la canulación (Figura 10) y costura del hígado se infunde un tampón frío rico en glucosa. Una vez canulado el hígado, se infunde un tampón con EGTA (quelante del calcio) y libre de calcio a una mayor temperatura (37°C). A continuación se recircula la solución con colagenasa durante 80 minutos a la misma temperatura, incrementando la velocidad de perfusión paulatinamente hasta llegar a un flujo de 90 ml/min. Durante estas etapas es primordial evitar la entrada de burbujas originadas por el cambio de los distintos medios a infundir, ya que provocaría una disminución del rendimiento del proceso por una perfusión intermitente del lóbulo, reduciendo el número de células que reciben los distintos tampones.

Una vez concluida la recirculación de colagenasa, se secciona longitudinalmente el lóbulo en condiciones de esterilidad y a baja temperatura ($\approx 4^{\circ}\text{C}$), y con ayuda de un raspador se arrastran con delicadeza los hepatocitos a tubos de centrífuga. Añadimos tampón de lavado frío, y se llevan a cabo sucesivas centrifugaciones a bajas revoluciones (80 G) y 4°C hasta obtener un sobrenadante libre de desechos celulares y otras células no parenquimatosas del hígado. Debemos extremar las precauciones para no aspirar el precipitado de hepatocitos junto con el medio sobrante. A continuación, procedemos a la determinación de la viabilidad de dicho precipitado celular mediante el método de exclusión de azul tripán usando una cámara de Neubauer (Tolnai, 1975) y el microscopio óptico con el objetivo de 20X.



*Figura 10. Fotografía de lóbulo hepático porcino canulado
(Departamento de Fisiología y Bioquímica
de la Nutrición Animal, IFNA, EEZ, CSIC. Granada)*

Tras calcular el porcentaje de viabilidad y el número de células viables totales aisladas, procedemos a la siembra de los hepatocitos en placas de cultivo de 25 cm² con medio William's E (5 ml) con suero bovino fetal (10%), a una densidad de $4,5 \times 10^6$ hepatocitos por placa para su incubación en estufa a 37°C y 5% CO₂. Transcurridas 3 horas, comprobamos la adhesión de las células al sustrato mediante su observación por el microscopio. Lavamos las placas y sustituimos el medio por William's E con la mitad de suero bovino fetal (5%) para finalmente dejar incubar en la estufa. Después de aproximadamente 12 horas de incubación, volvemos a comprobar el estado del cultivo al microscopio y se cambia el medio por William's E libre de suero. En este punto, el cultivo se considera preparado para el estudio según las condiciones experimentales de nuestro ensayo.

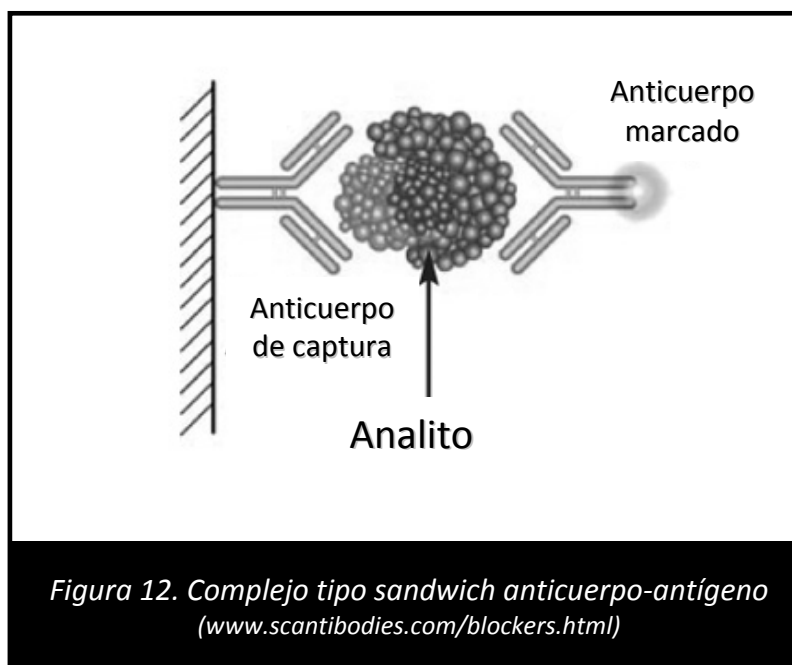


El medio de cultivo se cambia cada 24 horas y los hepatocitos mantienen su morfología típica (Figura 11) y permanecen sin replicarse durante al menos 120 horas, lo que permite investigar los efectos a largo plazo de factores del crecimiento y hormonas específicas sobre el metabolismo hepático. La Figura 11 muestra una fotografía tomada por microscopía óptica con el objetivo de 10 aumentos.

3.3.2. Determinación de la síntesis de IGF-I

El estudio del efecto del nivel de dexametasona, concentración y el tipo de ácido graso sobre la producción de IGF-I en los hepatocitos se llevó a cabo según las condiciones experimentales que se detallan en el capítulo 6. Tras 24 horas de

incubación en las condiciones descritas, se realizó la recogida y almacenamiento del medio a -80°C hasta su posterior análisis.



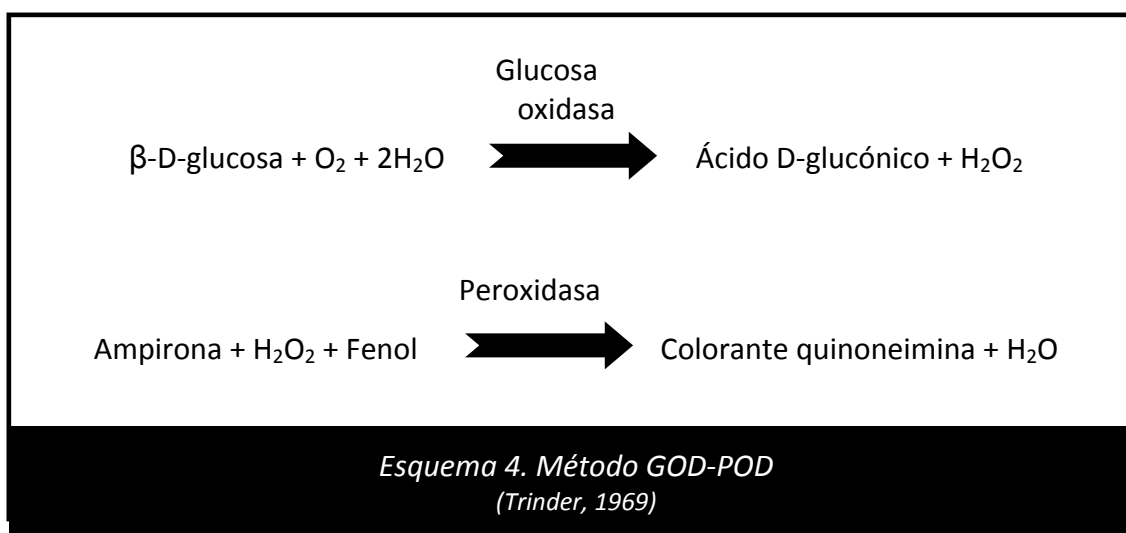
Como los niveles en el medio de cultivo de IGF-I eran casi indetectables se procedió a la concentración del medio (20 veces) mediante una centrifuga de vacío para conseguir unos niveles detectables de la hormona.

La cuantificación de la IGF-I en las muestras se llevó a cabo por ensayo inmunoradiométrico (IRMA; Milles *et al.*, 1974). El procedimiento utilizado incluyó un paso de extracción en el que la IGF-I se separa de sus proteínas transportadoras (IGFBP, de la 1 a la 6) mediante incubación con una solución etanólica de ácido clorhídrico. El IRMA es un ensayo no competitivo en el que la IGF-I (analito) queda fijada entre dos anticuerpos en una reacción tipo *sandwich*, como refleja la Figura 12. El primer anticuerpo (de captura) se encuentra adherido a un soporte fijo, y el segundo, marcado radiactivamente con ^{125}I , se une a la IGF-I unida al anticuerpo de captura formando el complejo tipo *sandwich*. La radiactividad medida es directamente proporcional a la cantidad de analito, contrariamente al radioinmunoensayo clásico. El

reactivo marcado que no se haya unido se elimina mediante decantación y lavado de las muestras. Posteriormente se miden en un contador gamma.

3.3.3. Determinación de la síntesis de glucógeno

La cuantificación la síntesis de glucógeno se realizó mediante una preincubación del cultivo durante unas 3 horas en un medio con alto contenido de glucagón (100 ng/ml) y bajo de insulina (10 ng/ml), con el fin estimular la degradación de glucógeno y consumir los almacenes del mismo. El glucógeno basal se determinó en determinados matraces que actuaron de control para establecer el nivel inicial del mismo. El resto de las células se cultivaron durante 21 horas en condiciones de estimulación de la síntesis de glucógeno como se detalla en el capítulo X. La diferencia existente entre el glucógeno de estas células y el glucógeno basal constituyó la medida de la capacidad de síntesis de glucógeno del hepatocito.



La concentración de glucógeno de las muestras se cuantificó por el método descrito por Nyguen et al. (1998). En este método, las muestras se incuban en ausencia y en presencia de amiloglicosidasa (E.C. 3.2.1.3) para liberar las moléculas

de glucosa que forman el glucógeno. La glucosa resultante se cuantifica por el método enzimático-colorimétrico de la glucosa oxidasa peroxidada (GOD-POD) descrito por Trinder (1969). En el método GOD-POD (Esquema 4), la glucosa oxidasa cataliza la oxidación de la β -D-glucosa a ácido D-glucónico con formación de peróxido de hidrógeno. Éste es utilizado por la enzima peroxidasa para oxidar la ampirona y el fenol, dando lugar a una quinonaimina coloreada que posteriormente se mide en espectrofotómetro a 505 nm. La intensidad de color será proporcional a la concentración de glucosa.

3.3.4. Determinación de la degradación de glucógeno

Para la determinación de la glucogenolisis, preincubamos las células en un medio con elevada concentración de insulina durante 24 horas, con el fin de elevar el contenido de glucógeno celular. Previamente, recogimos un número de matraces para cuantificar el nivel de glucógeno al inicio, y el resto de células, con los tratamientos descritos en el capítulo 6, se cultivaron en un medio que facilitó la degradación de glucógeno (concentración alta de glucagón y baja de insulina) durante 3 horas. La glucogenolisis se estima por diferencia entre el contenido de glucógeno de las células recogidas tras la preincubación con los niveles máximos de glucógeno y el contenido en glucógeno de las células cultivadas según nuestras condiciones experimentales.

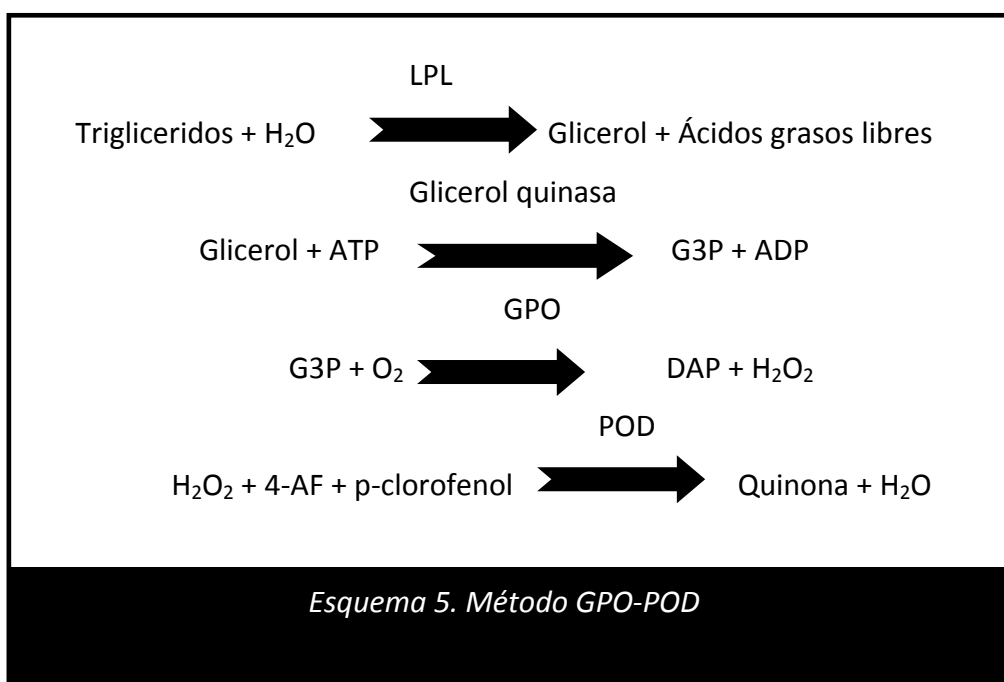
3.3.5. Determinación de la gluconeogénesis

Para cuantificar la gluconeogénesis (glucosa sintetizada a partir de otros sustratos), preincubamos las células en unas condiciones que favorecieron la degradación de glucógeno (glucagón elevado e insulina baja) durante 24 horas para provocar el agotamiento de las reservas hepáticas del mismo. A continuación se incubaron durante 40 minutos en un medio libre de glucosa, al que adicionamos piruvato, lactato y alanina como sustratos gluconeogénicos. La gluconeogénesis se cuantificó como glucosa liberada al medio asumiendo que la glucosa procedente de

glucogenolisis fue inapreciable debido al agotamiento de las reservas celulares de glucógeno lograda mediante la preincubación con glucagón. Por lo tanto, la glucosa libre medida en el medio se utilizó como estimación de la capacidad de gluconeogénesis del hepatocito. El Esquema 5 muestra la ruta de los posibles precursores de la gluconeogénesis.

3.3.6. Determinación de la síntesis de triglicéridos

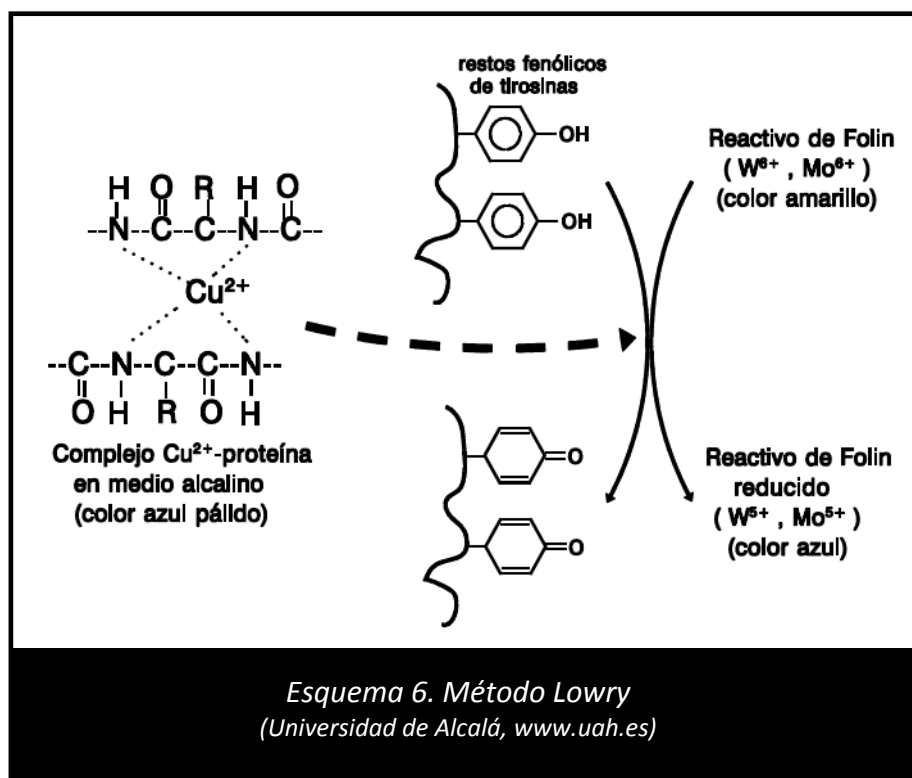
La estimación de la síntesis de triglicéridos se realizó por diferencia en el contenido de triglicéridos de células preincubadas durante 3 horas en condiciones de lipólisis, para agotar los depósitos de triglicéridos (con glucagón alto e insulina baja) y el contenido de las células cultivadas durante 21 horas en condiciones de estimulación de síntesis de triglicéridos (con insulina alta y sin glucagón) según los tratamientos descritos en el capítulo 6. El contenido intracelular de triglicéridos se determinó extrayendo los lípidos celulares con isopropanol según el método descrito por Ametaj et al. (2003) y cuantificando los triglicéridos por el método enzimático-colorimétrico de la glicerolfosfato deshidrogenasa peroxidada (GPO-POD; Buccolo *et al.*, 1973).



En el método GPO-POD (Esquema 5), los triglicéridos incubados con lipoproteín lipasa (LPL) liberan glicerol y ácidos grasos libres. El glicerol es fosforilado por la glicerol quinasa (GK) en presencia de ATP para producir glicerol-3-fosfato (G3P) y adenosina-5-difosfato (ADP). El G3P es entonces oxidado a dihidroxiacetona fosfato (DAP) y peróxido de hidrogeno (H_2O_2) por la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GPO). El peróxido de hidrogeno reacciona con 4-aminofenazona (4-AF) y p-clorofenol, en presencia de peroxidasa (POD), obteniéndose una quinona coloreada que absorbe a 505 nm y cuya concentración es proporcional al contenido en triglicéridos de la muestra.

3.3.7. Determinación de proteína

Para estandarizar la concentración de los distintos metabolitos medidos es práctica habitual el expresar su cantidad relativa a la cantidad de proteína o ADN del cultivo. La concentración en proteínas totales las analizamos por el método colorimétrico de Lowry o Folin-fenol (Esquema 6). El método, inicialmente descrito por Lowry et al. (1951) y modificado posteriormente por Peterson (1983), está basado en la reacción de biuret, en la cual los iones Cu^{2+} acomplejados al tartrato en medio alcalino, se unen a las proteínas formando complejos con los átomos de nitrógeno de los enlaces peptídicos. Estos complejos Cu^{2+} -proteína tienen un color azul claro. A continuación se produce la reducción en medio básico del reactivo de Folin-Ciocalteu por los grupos fenólicos de los residuos de tirosina de la proteína, donde el cobre actúa como catalizador. El principal constituyente del reactivo de Folin-Ciocalteu es el ácido fosfomolibdotúngstico, de color amarillo, que al ser reducido da lugar a un complejo de color azul intenso cuya concentración se mide en un espectrofotómetro a 660 nm.



CAPÍTULO 4

Retención de nutrientes y energía en lechones Ibéricos destetados alimentados con dietas de distinta concentración proteica

JA CONDE-AGUILERA, MA AGUINAGA, JF AGUILERA y R NIETO

2010

Nutrient and energy retention in weaned Iberian piglets fed diets with
different protein concentrations

Journal of Animal Science. Aceptado

4.1. ABSTRACT

Fifty-eight purebred castrated male Iberian (IB) piglets (initial BW 9.9 ± 0.1 kg) were used in an experiment to determine the effect of dietary protein content (PC) and feeding level (FL) on the rates of BW gain, whole body protein deposition (PD), and energy utilization between 10 and 25 kg BW using the serial slaughter method. Treatments followed a 4 x 2 factorial arrangement with 4 dietary protein concentrations (201, 176, 149, and 123 g CP/kg DM) and 2 feeding levels (0.95 and $0.70 \times$ ad libitum) and 6 or 7 piglets per combination of treatments. All diets were formulated to have an optimal AA pattern. Six piglets were slaughtered at the start of the trial to estimate initial body composition. The experimental pigs were individually housed in an environmentally controlled room ($27 \pm 2^\circ\text{C}$) until they reached 25 kg BW, when they were slaughtered and analyzed for body composition. Positive linear effects of dietary PC on ADG, G:F, and gain:ME intake were observed ($P < 0.001$). Piglets fed at the highest FL showed greater ADG, G:F, and gain:ME intake ($P < 0.001$). An average increase was estimated to be 38.0 g gain/MJ ME intake. Protein deposition increased linearly from 35.6 to 50.9 g/d with increasing dietary PC ($P < 0.001$). A daily increase was estimated to be 0.35 g PD/g CP intake. Although the maximal genetic potential for PD of the IB piglet was not attained, a maximal value of 59.9 g/d for whole-body PD was achieved when the diet provided 201 g CP/kg DM and was fed at $0.95 \times$ ad libitum. Piglets on the highest feeding level deposited on average 39% more body protein ($P < 0.001$) than restricted piglets. An average value of 4.39 g increase in PD/MJ ME intake was obtained for diets containing 201 and 176 g CP/kg DM. Maintenance energy requirements (ME_m) and net efficiency of utilization of ME for growth, calculated by linear regression of ME intake on body retained energy, were $427 \text{ kJ/kg BW}^{0.75} \cdot \text{d}^{-1}$ and 0.552, respectively. The corresponding partial efficiencies of utilization of ME for protein and fat deposition were 0.378 and 0.672, respectively, considerably lower than the accepted values for conventional pig breeds. Practical diets of the young IB piglet should contain at least 201 g ideal CP/kg DM.

Key words: dietary protein, energy deposition, Iberian piglet, level of feeding, protein deposition, requirements

4.2. INTRODUCTION

The Iberian (**IB**) pig, one of the autochthonous pig breeds located in the southwest of Spain and Portugal, has experienced continuous expanding and increased economic relevance since the middle 1980's, particularly in the last decade (Diéguez-Garbayo, 2008). Currently, the IB pig population in Spain accounts for more than 9% of total pigs produced (MARM, 2010). Iberian pig production is mainly focused on high-quality, dry-cured products, which are relatively high in market prices. Although, traditionally, these pigs were raised outdoors, current systems favor intensive management during the growing and early stages of the finishing periods. The IB pig is an obese, slow-growing breed. Its requirements for protein and energy differ markedly from pigs of conventional genotypes, as we have previously shown in studies with growing (Nieto et al., 2002) and fattening pigs (Barea et al., 2007).

However, the optimal dietary protein to energy ratio for the young IB piglet remains unknown. This information could be quite valuable in, formulating diets adequate in protein to energy ratio for maximizing lean growth and achieving optimal profitability during the early growth stage. For conventional and modern pigs, the early stage of growth after weaning is considered one of the most efficient in conversion of nutrients to animal tissues (Kendall et al., 2008). The objective of the present work was to explore how the young IB piglet utilizes dietary energy and protein for tissue growth and the maintenance of body functions. To achieve this objective, several traits were considered: the optimal supply of dietary ideal CP leading to maximal performance and daily rates of protein deposition (**PD_{max}**), and the marginal efficiency of body protein accretion [the change in daily protein deposition (**PD**) per unit change in daily ME at restricted intakes]. Additionally, maintenance ME requirements (**ME_m**) and the efficiency of use of ME for tissue growth (**k_g**) were investigated.

4.3. MATERIALS AND METHODS

The experimental protocol was approved by the Bioethical Committee of the Spanish National Research Council (CSIC), Spain.

4.3.1. Animals and experimental design

In total, 58 purebred castrated male IB piglets (Silvela strain) were used. They were weaned at 28 d of age and allowed ad libitum access to a commercial pre-starter diet (195 g CP and 14 g Lys per kg; as-fed basis). The study was conducted with 52 piglets (45 ± 2 d old; 9.9 ± 0.1 kg initial BW) randomly assigned to the experimental treatments. The treatments followed a 4 x 2 factorial arrangement with 4 dietary protein concentrations (**PC**; 201, 176, 149, and 123 g CP/kg DM) and 2 feeding levels (**FL**; 0.95 x and 0.70 x ad libitum) with 6 or 7 piglets per combination of treatments. The piglets were individually housed in an environmentally controlled room ($27 \pm 2^\circ\text{C}$) until they reached 25 kg BW when they were slaughtered. Body weight was recorded weekly. Six piglets were slaughtered at the start of the trial to estimate initial body composition.

4.3.2. Diets and feeding

Four isoenergetic diets were formulated to provide 4 different CP contents. The AA profile was maintained constant by diluting the diet with the highest CP concentration, which was based on barley, soybean meal, and fish meal, with a protein-free mixture made of corn starch, cellulose, vegetable oil, and a mineral/vitamin premix (Tables 1 and 2). The AA pattern of dietary protein followed the ideal protein concept (NRC, 1998; BSAS, 2003). The CP (N x 6.25):Lys ratio (g/g) was 13.8 for all diets. Each diet was offered at the 2 FL described previously in 2 daily equal meals (0900 and 1500 h). Water was freely available.

Table 1. Composition and chemical analysis of the high-protein diet (as-fed basis)

Item	Content
Ingredients, g/kg	
Barley grain	795.3
Soybean meal, 44% CP	130
Fish meal	40
Dibasic calcium phosphate	12
Calcium carbonate	8
NaCl	5
Vitamin/mineral pre-mix ¹	3
L-Lys·HCl ²	5
L-Thr ²	1.2
DL-Met ²	0.3
L-Trp ²	0.2
Diluting mixture ³	-
Analyzed nutrient composition, g/kg	
CP	178.3
Lys	12.9
Met and Cys	6.5
Thr	7.6
Trp	2.3
Ile	7.1
Leu	12.6
His	4.0
Phe and Tyr	14.3
Val	8.9
Lipids	22.5
ADF	59.1
DM	887

¹Provided (per kg of complete diet): retinol, 3.38 mg as retinyl acetate; cholecalciferol, 56.3 µg; DL- α -tocopherol, 25.2 mg as DL- α -tocopheryl acetate; menadione, 1.5 mg as menadione sodium bisulfite; thiamine, 0.15 mg; riboflavin, 3 mg; pyridoxine, 0.15 mg; cyanocobalamin, 15 µg; folic acid, 15 µg; nicotinic acid, 22.5 mg; D-pantothenic acid, 15 mg as calcium pantothenate; Mn, 15 mg as MnSO₄·4H₂O; Fe, 75 mg as FeSO₄·7H₂O; Zn, 120 mg as ZnO; I, 450 µg as KI; Cu, 60 mg as CuSO₄·5H₂O; and Co, 300 µg as CoSO₄·7H₂O.

²L-Lys HCl containing 78.8% L-Lys; L-Thr, DL-Met, and L-Trp ; added as free base, and contained 98, 99, and 100% L-Thr, DL-Met, and L-Trp, respectively.

³Mixed with the higher protein content diet to prepare experimental diets. Contained (g/kg, as-fed): corn starch, 873.7; cellulose, 59.1; dibasic calcium phosphate, 36.7; corn oil (containing butylated hydroxytoluene to provide 0.125 g per kg diluting mixture), 22.5; NaCl, 5; and vitamin/mineral premix, 3.

Table 2. Energy and nutrient composition of the experimental diets obtained by dilution of the high-protein diet with a diluting mixture.

Item	Experimental diet			
	1	2	3	4
High protein diet, g	1000	875	750	625
Diluting mixture, ¹ g	0	125	250	375
Analyzed composition, DM basis				
CP, g/kg	201	176	149	123
DE, MJ/kg	14.99	14.65	15.11	14.88
ME, MJ/kg	14.59	14.34	14.92	14.65
Digestible protein/ME, g/MJ	10.80	9.22	7.87	6.14
Lys/ME, g/MJ	0.99	0.88	0.73	0.62

¹Contained (g/kg, as-fed): corn starch, 873.7; cellulose, 59.1; dibasic calcium phosphate, 36.7; corn oil (containing butylated hydroxytoluene to provide 0.125 g per kg diluting mixture), 22.5; NaCl, 5; and vitamin/mineral pre-mix, 3.

Feed refusals were dried and weighed. Daily feed allowance was calculated based on piglets' BW, measured individually each wk, according to the voluntary feed intake observed in a previous study with individually housed piglets (27 ± 2°C) of similar BW range and fed diets of the same ingredient composition, particle size, and energy density (R. Nieto, unpublished data):

$$\text{Voluntary intake (g/d, as-fed basis)} = -153 \pm 24 + 72.5 \pm 1.5 \times \text{BW (kg)}$$

$$(P < 0.001; n = 24; r^2 = 95.3).$$

4.3.3. Digestibility measurements

The inert marker, Cr₂O₃, was used to estimate total tract nutrient digestibility, which was determined at approximately 15 kg BW. Three days before starting excreta collection, the piglets were individually placed in metabolic cages (0.35 × 0.80 m) for collection of feces and urine separately. Chromic oxide was added to the diet (5 g/kg) at least 5 d before the digestibility measurements started. Uncontaminated feces and all the urine were collected daily during 5 d. Urine was collected into 50 mL of 4M H₂SO₄. At the end of the digestibility measurements, composite samples of feces and urine were obtained separately for the whole period for each pig. The apparent

digestibility of DM (**Ap DM**; g DM apparently digested/g DM ingested) was calculated from the equation: $Ap\ DM = 1 - (Cr_2O_3f/Cr_2O_3e)$, where Cr_2O_3f and Cr_2O_3e are Cr_2O_3 concentrations in DM of feed and feces, respectively. The apparent digestibility of dietary nutrients (**Ap Dn**; g nutrient apparently digested/g nutrient ingested) was calculated from the equation: $Ap\ Dn = 1 - [(Qe \times Cr_2O_3f)/(Qf \times Cr_2O_3e)]$, where Qe and Qf are nutrient concentration in fecal excretion and feed, respectively, and Cr_2O_3e and Cr_2O_3f are Cr_2O_3 concentration in fecal excretion and feed, respectively.

4.3.4. Comparative slaughter measurements

At 25 ± 1 kg BW, the piglets were slaughtered by electrically stunning and exsanguination after an overnight fast. Immediately after slaughter, the gastrointestinal tract and bladder were emptied and their contents discarded. The empty gut, blood, carcass, and other non-carcass parts, including organs, were weighed separately. Viscera, organs, and blood were kept at -20°C for further analysis. The carcass with head and feet were chilled overnight, weighed, and kept at -20°C until analysis. Four components were obtained for each pig: carcass, head (together with feet and tail), viscera and organs, and blood. The right half of the carcass and other components were separately cut into small pieces and ground in a mincer (Talleres Cato, Sabadell, Spain), homogenized in a cutter (Talleres Cato, Sabadell, Spain), and subsamples were taken for freeze-drying and subsequent analysis. Aliquot samples were analyzed for DM content, CP, GE, and ash. The empty BW (**EBW**) at slaughter was calculated as the sum of hot carcass, blood, and organs and viscera, including the empty gastrointestinal tract. Chemical composition at the beginning of the experiment was estimated from the 6 piglets slaughtered at initiation of the trial, assuming identical empty body composition and EBW to BW ratio for the rest of the piglets. Total body composition was calculated from the chemical composition of the 4 body components and their respective weights. Body fat was calculated by assuming an energy content of 23.8 and 39.8 kJ/g for protein and fat, respectively (Wenk et al., 2001). Increases in protein (determined as total body N retention), energy, fat, and ash

were then calculated as the difference between the final measured composition of the experimental pigs and the estimated initial composition.

4.3.5. Chemical analysis

All analyses were performed in duplicate. The following procedures were carried out according to the AOAC (1990): DM content of feed and feces (method 934.01); total ash of feed and freeze-dried samples of body components (method 942.05); and total N in feed, urine, and in freeze-dried samples of body components (except blood, which was directly taken for the analysis) and feces by the Kjeldahl procedure (method 984.13). Whenever an analysis was made on freeze-dried material, a DM was determined on an aliquot sample to establish the residual water content after freeze-drying and the corresponding analytical result was expressed on a DM basis. Chromic oxide was determined by a micromethod involving alkaline fusion mixture and dry ashing (Aguilera et al., 1988). Gross energy of feeds and freeze-dried samples of feces, urine, and body components was measured in an isoperibolic bomb calorimeter (Parr Instrument Co., Moline, IL). Samples of approximately 10 mL of urine were weighed, freeze-dried in a polyethylene sheet of known energy value and their gross energy value obtained by difference. Amino acids in feeds were determined after protein hydrolysis in 6M HCl plus 1% phenol in sealed, evacuated tubes at 110°C for 24 h, by HPLC (Pico Tag method; Waters, Milford, MA; Cohen et al., 1989) as described by Rivera-Ferre et al. (2006).

4.3.6. Calculations and statistical analysis

Linear regressions were calculated for each experimental diet to relate rate of gain (g/d) and ME intake. For this purpose, the average value of the whole feeding period for each pig was used. As no significant effect of dietary PC on the regression coefficients was found, a composite regression was established including all dietary PC levels. The marginal efficiency of body protein accretion ($\Delta PD:\Delta ME$, g/MJ) was

established by linear regressions with individual data from the different dietary treatments. Composite regressions were established including the data from PC treatments showing no significantly different regression coefficients. To predict ME_m and calculate k_g in the growing animal, ME intake [$\text{kJ}/(\text{kg BW}^{0.75} \cdot \text{d}^{-1})$] was related to total retained energy [RE , $\text{kJ}/(\text{kg BW}^{0.75} \cdot \text{d}^{-1})$] by means of linear regression equations using ME intake as the dependent variable. Separate regressions were calculated within dietary CP content. All diets showed regression coefficients that were not statistically different, thus, a common regression was calculated across all treatment data. Estimates of the partial efficiencies of ME utilization for protein deposition (k_p) and fat deposition (k_f) were calculated by means of a multiple regression equation (Kielanowski, 1965), in which ME intake above maintenance [ME_p , $\text{kJ}/(\text{kg BW}^{0.75} \cdot \text{d}^{-1})$, calculated as total ME intake - ME_m , using the ME_m estimate obtained by the linear approach] was used as the dependent variable and energy retained as protein and fat [RE_p and RE_f , respectively, $\text{kJ}/(\text{kg BW}^{0.75} \cdot \text{d}^{-1})$] as independent variables. An equation was derived from the data with the 4 dietary treatments.

Treatment effects were assessed by analysis of variance using the GLM procedure of SAS (SAS Inst. Inc. Carry, NC). The effects of PC, FL, and their interaction were included in the statistical model. The individual piglet was the experimental unit. Orthogonal polynomial contrasts were used to determine linear and quadratic effects of PC on performance and body retention variables. As only 2 FL treatments were assayed, least square means were used to ascertain statistical differences between feed intake levels. The level of significance was set at 5%.

4.4. RESULTS

All piglets showed good health and normal behavior during the experiment. Ten piglets on the highest feeding level occasionally did not consume their full daily ration. When feed refusals occurred, refused feed was collected the next morning, dried to a constant weight, and weighed to calculate actual feed intake. The amount of feed refused varied from 5 to 15% of the whole daily allowance. No CP × FL interactions were observed.

4.4.1. Performance and nutrient digestibility

Piglet daily feed intake was not altered by dietary CP and averaged 694 g DM/d; Table 3). Positive linear effects of dietary PC ($P < 0.001$) on ADG, G:F, and gain:ME intake were observed. Piglets fed the higher FL showed greater ADG and gain efficiency ratios, i.e., G:F and gain:ME intake ($P < 0.01$).

Digestibility data are shown in Table 4. The apparent digestibility of energy was not altered by the dietary PC or by the FL. The coefficient of metabolizability of GE increased linearly ($P < 0.05$) as dietary PC decreased. However, the average daily intake of DE and ME was not altered by dietary CP concentration. The ME:DE was slightly lower in piglets fed diets with 201 and 176 g CP/kg DM than in the two low CP diets (linear and quadratic effects, $P < 0.01$). Nitrogen digestibility decreased linearly ($P < 0.05$) with decreasing dietary PC and was not affected by FL.

As expected, average daily gain was related to ME intake. Data from all treatments were used to develop a single equation as equations for individual PC treatments had similar individual regression coefficients: $ADG \text{ (g/d)} = -68.3 \pm 27.1 + 38.0 \pm 2.6 \times ME \text{ intake (MJ/d)}$ ($n = 52$; $r^2 = 0.798$; $P < 0.001$; Equation 1). The regression coefficient indicates an average increase of 38.0 g gain per MJ increase in ME intake, equivalent to an energy cost of 26.3 kJ ME/g gain (1MJ/38.0 g gain).

Table 3. Effect of dietary protein concentration (PC) and feeding level (FL) on performance of Iberian piglets growing from 10 to 25 kg BW¹

Item	PC, g/kg DM					FL (x ad libitum)			P-value ²	
	201	176	149	123	SEM	0.95	0.70	SEM	PC	FL
									L	Q
Number of animals	13	13	13	13	-	25	27	-	-	-
Days on experiment	46.9	48.0	51.1	56.2	2.1	40.0	61.0	1.5	<0.05	0.29 <0.01
ADFI, g	692	689	701	692	12	801	587	8	0.81	0.81 <0.01
ADG, g	344	336	310	292	9	391	251	6	<0.01	0.64 <0.01
G:F, g/g	0.496	0.481	0.438	0.416	0.008	0.488	0.426	0.006	<0.01	0.52 <0.01
Gain:ME intake, g/MJ	33.58	33.16	29.21	28.27	0.70	32.87	29.24	0.43	<0.01	0.71 <0.01

¹Initial BW, 9.9 ± 0.1 kg at 45 ± 2 d of age; n = 6 or 7 individually housed piglets per each PC × FL combination.

²Contrasts: L = linear effects; Q = quadratic effects.

Table 4. Effect of dietary protein concentration (PC) and feeding level (FL) on energy and nitrogen digestibility of Iberian piglets growing from 10 to 25 kg BW¹

Item	PC, g/kg DM					FL (x ad libitum)			P-value ²	
	201	176	149	123	SEM	0.95	0.70	SEM	PC	FL
									L	Q
DE:GE	0.817	0.814	0.831	0.833	0.008	0.827	0.820	0.006	0.11	0.79 0.43
ME:GE	0.795	0.797	0.821	0.820	0.008	0.813	0.804	0.006	<0.05	0.90 0.28
DE intake, MJ/d	10.69	10.24	10.69	10.38	0.22	12.15	8.72	0.16	0.81	0.82 <0.01
ME intake, MJ/d	10.17	10.04	10.54	10.22	0.22	11.93	8.55	0.15	0.50	0.66 <0.01
ME:DE	0.973	0.979	0.987	0.985	0.001	0.982	0.980	0.001	<0.01	<0.001 <0.05
N digestibility	0.788	0.760	0.788	0.739	0.012	0.768	0.769	0.009	<0.05	0.44 0.93

¹Initial BW, 9.9 ± 0.1 kg at 45 ± 2 d of age; n = 6 or 7 individually housed piglets per each PC × FL combination.

²Contrasts: L = linear effects; Q = quadratic effects.

4.4.2. Body composition

Mean body composition of piglets slaughtered at the start of the experiment (10 kg BW, n = 6) was: 155 ± 2 , 110 ± 7 , 40.3 ± 1.5 , and 695 ± 4 g/kg EBW for protein, fat, ash, and water, respectively. Mean energy content was 8.05 ± 0.23 MJ/kg EBW. The empty-body chemical composition (g/kg EBW) at 25 kg BW is shown in Table 5. The effect of CP content of the diet on nutrient or energy composition of piglets was linear ($P < 0.01$), being positive for protein and water, and negative for fat and energy content. No effect of PC was detected for ash content ($P = 0.09$). Protein and ash concentration were greater in piglets fed $0.70 \times$ ad libitum ($P < 0.01$). The nutrient composition of body gain (data not shown) was altered by the PC and FL factors in a similar way as described for piglets' empty body composition

4.4.3. Body deposition of nutrients

Body PD (g/d) of piglets during the whole experimental period (10 to 25 kg BW) is shown in Table 6. There was a linear effect ($P < 0.01$) of the dietary PC on all estimates of PD. Maximal body PD (59.9 g/d; pooled SEM, 1.9 g/d) was achieved with the diet containing 201 g CP fed at $0.95 \times$ ad libitum (Table 7). Piglets on the highest FL deposited on average 39% more body protein ($P < 0.01$) than restricted piglets (Table 6). The overall efficiency of body PD, both expressed as the PD:CP intake ratio (g/g), and PD:digestible protein (**DgP**) intake ratio (g/g), improved linearly with decreasing dietary CP ($P < 0.01$). A positive linear response of dietary CP on protein deposition, expressed as g per MJ ME intake, was observed ($P < 0.01$). The efficiency of protein deposition was not affected by FL.

The following composite linear regression equations were obtained with data from all experimental piglets as no differences were found for the slopes of the linear regressions established for individual dietary CP treatments: PD (g/d) = $3.7 \pm 2.3 + 0.35 \pm 0.01 \times$ CP intake (g/d) (n = 52; $r^2 = 0.853$; $P < 0.001$; Equation 2), and PD (g/d) = $6.4 \pm 2.4 + 0.43 \pm 0.03 \times$ DgP intake (g/d) (n = 52; $r^2 = 0.822$; $P < 0.001$; Equation 3).

Table 5. Effect of dietary protein concentration (PC) and feeding level (FL) on empty-body composition (g/kg) of Iberian piglets growing from 10 to 25 kg BW¹

Item	PC, g/kg DM					FL (x ad libitum)			P-value ²		
	201	176	149	123	SEM	0.95	0.70	SEM	PC	FL	
									L	Q	
Protein	164	158	153	147	2	151	160	1	<0.01	0.72	<0.01
Fat	159	168	193	219	5	189	181	4	<0.01	0.11	0.16
Ash	37.0	36.9	36.0	35.4	0.8	34.5	38.2	0.5	0.09	0.74	<0.01
Water	640	637	618	599	4	626	621	3	<0.01	0.07	0.27
Energy, MJ/kg	10.2	10.5	11.3	12.2	0.2	11.1	11.0	0.1	<0.01	0.09	0.63

¹Initial BW, 9.9 ± 0.1 kg at 45 ± 2 d of age; n = 6 or 7 individually housed piglets per each PC × FL combination.

²Contrasts: L = linear effects; Q = quadratic effects.

Table 6. Effect of dietary protein concentration (PC) and feeding level (FL) on energy and nutrient deposition of Iberian piglets growing from 10 to 25 kg BW¹

Item	PC, g/kg DM					FL (x ad libitum)			P-value ²		
	201	176	149	123	SEM	0.95	0.70	SEM	PC		FL
									L	Q	
Empty BW, kg	23.4	23.3	23.5	23.6	0.2	23.5	23.5	0.1	0.34	0.42	0.95
Empty BW/BW, kg/kg	0.927	0.932	0.936	0.938	0.004	0.926	0.940	0.003	<0.05	0.72	<0.01
PD ³ (N × 6.25), g/d	50.9	46.8	40.8	35.6	1.4	50.6	36.4	1.0	<0.01	0.68	<0.01
PD:CP intake, g/g	0.364	0.387	0.391	0.417	0.009	0.393	0.386	0.007	<0.01	0.90	0.46
PD:Digestible CP, g/g	0.465	0.517	0.499	0.569	0.013	0.517	0.508	0.009	<0.01	0.51	0.48
PD:ME intake, g/MJ	4.99	4.67	3.89	3.49	0.12	4.27	4.25	0.09	<0.01	0.75	0.89
Fat, g/d	57.5	61.7	70.3	77.3	3.0	82.3	51.1	2.1	<0.01	0.65	<0.01
Ash, g/d	10.1	9.7	8.6	7.9	0.4	10.1	8.0	0.3	<0.01	0.61	<0.01
Water, g/d	203	197	173	156	6	221	143	4	<0.01	0.29	<0.01
Energy, MJ/d	3.5	3.6	3.8	3.9	0.1	4.5	2.9	0.1	<0.05	0.75	<0.01

¹Initial BW, 9.9 ± 0.1 kg at 45 ± 2 d of age; n = 6 or 7 individually housed piglets per each PC × FL combination.

²Contrasts: L = linear effects; Q = quadratic effects.

³PD = protein deposition.

From Equations 2 and 3, an increase of 0.35 and 0.43 g of daily PD per g of increase in intake of CP or DgP, respectively, can be expected. Protein deposition was related to ME intake by the following equations: PD (g /d) = $3.26 \pm 4.53 + 4.39 \pm 0.45 \times$ ME intake (MJ/d) (n = 26; $r^2 = 0.802$; $P < 0.001$; Equation 4, and PD (g /d) = $4.94 \pm 4.01 + 3.20 \pm 0.38 \times$ ME intake (MJ/d) (n = 26; $r^2 = 0.742$; $P < 0.001$; Equation 5). Equation 4 was established for diets containing 201 and 176 g CP/kg DM, and Equation 5 for diets containing 149 and 123 g CP/kg DM, respectively, as regression coefficients were not different between these PC treatments. The marginal efficiency of body PD (Δ PD: Δ ME, g/MJ) obtained from Equation 4 is 4.39. This means that in the IB piglets growing from 10 to 25 kg BW and consuming these PC diets, each additional MJ in ME ingested at restricted intakes was associated with 4.39 g of body PD.

Body deposition of energy and of nutrients other than protein is also presented in Table 6. Fat deposition showed an inverse relationship with PD, i.e., increasing linearly with each decrease in dietary CP content ($P < 0.01$). Ash and water retention (g/d) paralleled PD and increased linearly ($P < 0.01$) as the PC increased. Whole-body energy deposition increased linearly as PC in the diet decreased ($P < 0.05$). Daily deposition of fat, water, ash, and energy was enhanced in piglets fed close to ad libitum ($P < 0.01$).

4.4.4. Energy utilization

Total energy retained increased linearly from 434 to 484 kJ/(kg BW^{0.75}.d⁻¹) by decreasing the ideal CP content in the diet ($P = 0.01$). The overall efficiency of use of ME for energy retention increased from 0.343 to 0.376 with decreasing CP in the diet. The pattern of the response to PC was linear ($P < 0.05$). The proportion of RE_f to RE increased linearly at the expense of RE_p, with reducing dietary CP ($P < 0.01$). Piglets fed at 0.95 × ad libitum showed greater overall efficiency of use of ME for energy retention (0.375 vs. 0.338; $P < 0.01$) and RE_f:RE than piglets restricted to 0.70 × ad libitum (0.724 vs. 0.697; $P < 0.05$). An opposite effect was observed for the RE_p:RE ($P < 0.05$).

Linear and multiple regression equations were constructed with data from piglets on all dietary treatments to estimate ME_m , k_g , k_p , and k_f based on the following equations:

$$ME \text{ intake (kJ/kg BW}^{0.75} \cdot \text{d}^{-1}) = 427 \pm 43 + 1.81 \pm 0.09 \times RE \text{ (kJ/kg BW}^{0.75} \cdot \text{d}^{-1}) \\ (n = 52; r^2 = 0.885; P < 0.001) \text{ (Equation 6);}$$

$$ME_p \text{ (kJ/kg BW}^{0.75} \cdot \text{d}^{-1}) = \\ 2.65 \pm 0.24 \times RE_p \text{ (kJ/kg BW}^{0.75} \cdot \text{d}^{-1}) + 1.49 \pm 0.09 \times RE_f \text{ (kJ/kg BW}^{0.75} \cdot \text{d}^{-1}) \\ (n = 52; r^2 = 0.993; P < 0.001) \text{ (Equation 7)}$$

Figure 1 represents the linear relationship between ME intake and RE. Equation 6 gives the preferred estimate for ME_m . From this equation ME_m can be estimated as 427 kJ/kg $BW^{0.75} \cdot d^{-1}$, and the energetic cost of growth γ as 1.81 kJ ME per kJ RE [equivalent to a k_g value of 0.552 (1/1.81)]. Equation 7 estimates k_p and k_f as 0.378 (1/2.65) and 0.672 (1/1.49), respectively. These estimates of k_p and k_f were obtained after deducting the corresponding amount of ME required for maintenance, which was obtained from Equation 6 to estimate the fraction of ME intake used for productive purposes, from total ME intake of each pig.

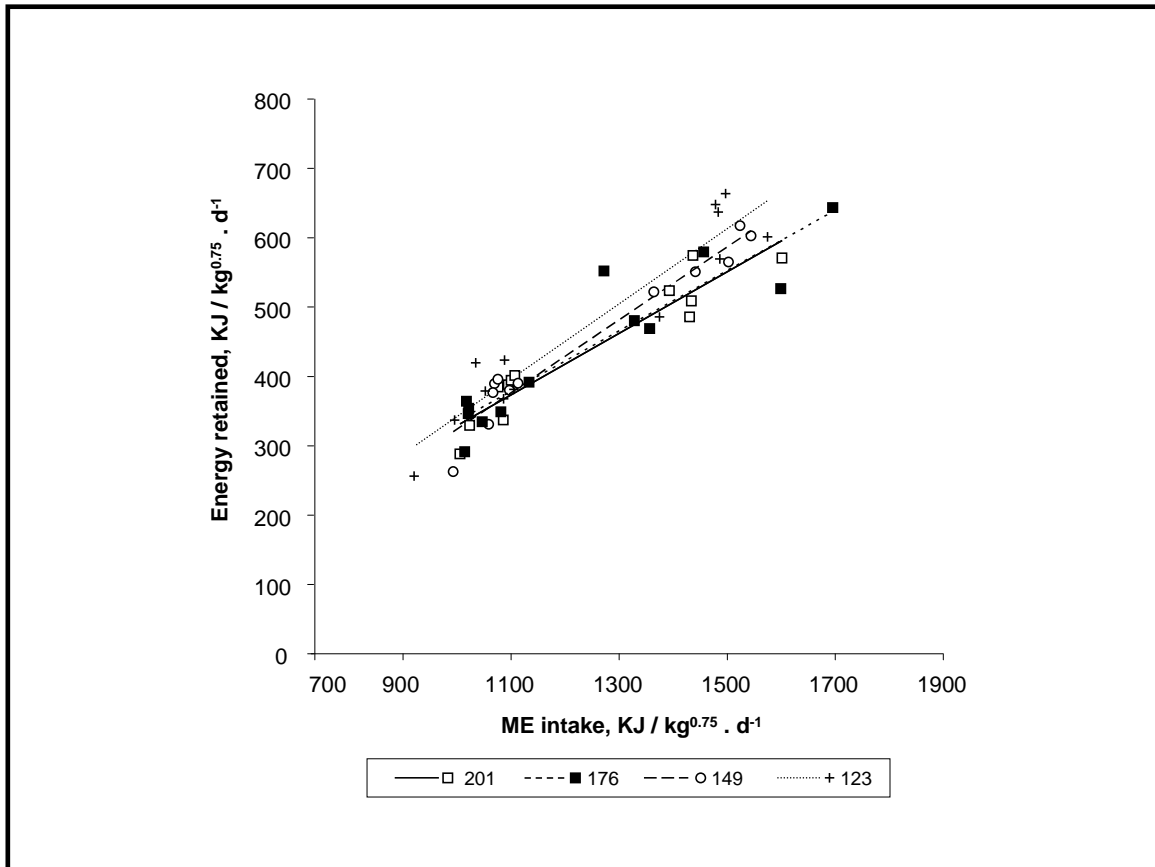


Figure 1. The relationship between ME intake and energy retained in the body of Iberian piglets (10 to 25 kg BW) fed 4 isoenergetic diets varying in protein content (201, 176, 149, or 123 g CP/kg DM) fed either at 0.95 or 0.70 × ad libitum.

4.5. DISCUSSION

In the last 2 decades many studies have been devoted to defining the optimal Lys to energy ratio to maximize performance of nursery pigs (Nam and Aherne, 1994; Urynek and Buraczewska, 2003; Schneider et al., 2010). The great efficiency of conversion, which characterizes this stage of growth (Kendall et al., 2008), provides an opportunity for obtaining the best performance genetically attainable for the animal. Nevertheless, protein and energy requirements are highly influenced by pig genotype (van Lunen and Cole, 1996). We have shown that protein and energy requirements of growing (Nieto et al., 2002) and fattening (Barea et al., 2007) IB pigs differed clearly from those reported for conventional or lean genotypes at similar stages of growth; however, the growth potential and nutrient requirements of the IB piglet have not yet been investigated. Consequently, the present work has been focused on quantifying how the young IB piglet utilizes dietary protein and energy for nutrient deposition and for the maintenance of body functions. For this purpose, a factorial arrangement similar to those used by Kyriazakis and Emmans (1992) and Fuller et al. (1995), among many others, was applied to examine the response in growth rate, PD, and lipid deposition of growing pigs to energy and protein supply, and ultimately defining the concentration of nutrients in the diet that allow the pig to express maximal growth performance.

Maximal performance under the present experimental conditions was attained when piglets were fed the diet containing 201 g CP/kg DM. Assuming an average coefficient of apparent N digestibility of 0.788 and the Lys content of the experimental diets, this dietary PC is equivalent to 10.8 g DgP/MJ ME or 0.99 g total Lys/MJ ME. Amino acid pattern of dietary protein followed the ideal protein concept (NRC, 1998; BSAS, 2003); nevertheless, N supply for synthesis of non-essential amino acids may have been limiting as no plateau in performance was observed. The maximal values for ADG, G:F, gain:ME intake, and PD (Table 7) were obtained in piglets fed the highest CP diet at 0.95 × ad libitum (one average, 11.9 MJ ME/d). Realizing maximal performance

Table 7. Performance and daily energy and nutrient retention of Iberian piglets growing from 10 to 25 kg BW (least square means for each dietary protein concentration (PC) × feeding level (FL) combination)¹

PC g/kg DM	FL × ad libitum	Performance				Energy and nutrient retention				
		ADFI, g	ADG, g	G:F, g/g	Gain:ME intake, g/MJ	CP (N × 6.25), g/d	Fat, g/d	Ash, g/d	Water, g/d	Energy, MJ/d
201	0.95	787	416	0.529	35.69	59.9	66.9	11.3	246	4.1
176	0.95	802	407	0.506	34.89	54.4	77.3	10.3	239	4.4
149	0.95	811	378	0.467	30.78	47.0	87.0	10.0	208	4.6
123	0.95	804	362	0.451	30.12	41.3	97.9	8.8	192	4.9
201	0.70	597	273	0.455	31.48	42.0	48.2	8.9	160	2.9
176	0.70	576	264	0.457	31.43	39.2	46.1	9.1	156	2.8
149	0.70	592	242	0.408	27.68	34.6	53.6	7.2	138	3.0
123	0.70	581	223	0.383	26.42	29.9	56.6	6.9	119	3.0
SE		16	13	0.011	0.99	1.9	4.2	0.6	8	0.2

¹Initial BW, 9.9 ± 0.1 kg at 45 ± 2 d of age; n = 6 or 7 individually housed piglets per each PC × FL combination.

may not have been achieved, growth performance was considerably lower compared with piglets of conventional pig breeds at similar BW and raised in similar experimental conditions (van Lunen and Cole, 1998; Le Bellego and Noblet, 2002; Schneider et al., 2010). The present results indicate that the growth potential of the IB pig declines sharply as the stage of growth advances. Compared with performance data from the present study, at least a 35% decrease in G:F and Gain:ME intake is observed in IB pigs growing from 15 to 50 kg BW and fed diets of adequate protein to energy ratio (Nieto et al., 2002).

The average coefficients for DE:GE and ME:GE, and the ME:DE obtained in the IB piglets fed at 0.95 × ad libitum (0.827, 0.813, and 0.982, respectively; Table 4) are close to those reported previously for growing (15 to 50 kg) IB pigs (0.839, 0.820, and 0.976, respectively; Nieto et al., 2002) fed diets based on the same ingredients at 0.95 × ad libitum. The average coefficient of apparent N digestibility obtained in both experiments was also similar (0.768 vs. 0.767). So, it seems that IB piglet attains a similar digestive capacity to older IB pigs during an early stage of growth.

The present results of the orthogonal polynomial contrast indicate that no plateau in PD was established, so PD_{max} was not reached. Maximal protein deposition (59.9 g/d, Table 7) was achieved when IB piglets were fed the diet containing the highest PC at 0.95 × ad libitum. This value is approximately 83 % of the PD_{max} observed in growing and fattening IB pigs (74 and 71 g/d, respectively) fed diets containing 129 g CP /kg DM (or 6.86 g DgP/MJ ME, Nieto et al., 2002) ♂ and 95 g CP/kg DM (5.17 g DgP/MJ ME, Barea et al., 2007), respectively, both formulated to have an amino acid profile according to the ideal protein concept (BSAS, 2003). Moughan and Verstegen (1988) and Möhn and de Lange (1998) supported that PD_{max} may be reached as early as 20 kg BW. Although a further increase in CP concentration in the IB piglet diet might enhance PD, it remains unknown whether PD in the IB pig breed would adjust to this model. In any case, the pattern of PD in the IB growing pig corresponds to that of an early maturing animal with a low potential for lean tissue deposition. Consequently, an efficient, sustainable, and profitable production of this pig genotype can be achieved

with diets of much lower protein (Lys) to energy ratio than conventional porcine breeds.

The marginal efficiency of body PD ($\Delta PD:\Delta ME$) obtained in the present work for the diets of higher PC (4.39 g/MJ ME) indicates greater efficiency of PD when compared with IB of higher BW (2.81 g/MJ ME, Nieto et al., 2002; 1.34 g/MJ ME, Barea et al., 2007). The decrease in efficiency of PD as the IB pig gets heavier is also reflected in the lower efficiencies of PD related to protein intake (PD:CP intake), or DgP intake (PD:DgP intake), obtained in those experiments with pigs fed diets of optimum CP to energy ratio. Overall, these results are in line with other authors (Black et al., 1986; Bikker, 1994) who reported a decrease in marginal efficiency of body PD with increasing BW.

The lipogenic character of the IB pig breed is noticeable at this relatively early growth stage as indicated by the proportions of fat in both the empty body and empty-body gain of IB piglets. Fat in the empty body and empty body fat gain is 40% greater than in conventional piglets of different genetic potential and similar BW (Campbell and Taverner, 1988; Morgan et al., 1989; Le Bellego and Noblet, 2002). According to van Lunen and Cole (1996), the IB pig breed would have an early maturing size compared to conventional pig breeds, which have higher proportions of lean tissue at a given BW, because lipid is deposited in greater quantities than lean as the animal approaches maturity.

Although both linear and multiple regression approaches, in which ME intake is related to total RE or to RE_p and RE_f , respectively, yield ME_m estimations, the one generated by the linear approach has been adopted as more accurate and applied to the multiple regression for obtaining partial efficiencies of use of ME for protein and fat deposition. The mode of expression of ME_m influences the calculation of k_p and k_f (Noblet et al., 1999). By adopting this approach this effect could be at least partially reduced. The ME_m estimation obtained in Equation 6 is in close agreement with our previous estimation in IB growing pigs from 15 to 50 kg BW ($422 \text{ kJ/kg BW}^{0.75} \cdot \text{d}^{-1}$; Nieto et al., 2002) and approximately 4 to 7% lower than the values assumed for conventional pigs [458 and $443 \text{ kJ/kg BW}^{0.75} \cdot \text{d}^{-1}$, ARC (1981) and NRC (1998),

respectively]. The net efficiency for energy gain associated with this estimate for ME_m ($k_g = 0.552$) is near to the values observed previously for growing and fattening IB pigs [0.582 and 0.545, Nieto et al. (2002) and Barea et al. (2007), respectively] in spite of the wide differences in protein to lipid deposition ratio among studies. Nevertheless, all these k_g estimations are low, considering the high deposition of fat, an efficient process, usually found in this pig breed.

Protein and lipid deposition are deemed to be closely correlated, specially in pigs under moderate to low feeding levels or for genetically very lean animals (Noblet et al., 1999). However, the correlation found between protein and lipid deposition for a wide range of pig types was found to be rather low (Noblet et al., 1999). The partial efficiency of ME use for fat deposition obtained in the current experiment is at the lower end of the range of values previously observed in heavier IB pigs (0.658 and 0.812); the estimation for k_p (0.378) is higher than corresponding estimates obtained in heavier pigs of this breed (0.218 and 0.303). Nevertheless, this efficiency is lower than values suggested for conventional pigs (ARC, 1981). The lower energetic efficiency of PD might be partly attributed to the comparatively higher muscle protein turnover rate in IB pigs described by Rivera-Ferre et al. (2005). Ultimate causes of the low k_f and k_g values observed in the IB pig remain unexplained. Further research is required to clarify these aspects.

The present work underlines that compared to conventional or lean pigs, there are substantial differences in metabolic responses of the IB piglet to dietary protein and energy supply, especially in terms of their comparatively lower nutrient utilization efficiency. Maximal genetic potential of the IB piglet for performance and PD was not achieved in this study. It seems that maximal PD would require feeding diets containing greater than 201 g CP/kg DM.

4.6. LITERATURE CITED

- AGUILERA JF, C PRIETO, E MOLINA, AND M LACHICA.** (1988). A micromethod for routine determination of chromic oxide in nutrition studies. *Analisis 16*, 454-457.
- AOAC.** (1990). Official Methods of Analysis. 15th ed. Assoc Off Anal Chem, Arlington, VA.
- ARC.** (1981). The nutrient requirements of pigs. Agricultural Research Council. Commonwealth Agricultural Bureaux, Slough, UK.
- BAREA R, R NIETO AND JF AGUILERA.** (2007). Effects of the dietary protein content and the feeding level on protein and energy metabolism in IB pigs growing from 50 to 100 kg body weight. *Animal 1*, 357-365.
- BIKKER P.** (1994). Protein and lipid accretion in body components of growing pigs: Effects of body weight and nutrient intake. Ph.D. Diss. Agric. Univ., Wageningen, the Netherlands.
- BLACK JL, RG CAMPBELL, IH WILLIAMS, KJ JAMES AND GT DAVIES.** (1986). Simulation of energy and amino acid utilization in the pig. *Res Dev Agric 3*, 121-145.
- BSAS.** (2003). Nutrient Requirement Standards for Pigs. *Brit Soc Anim Sci, Penicuik, UK.*
- CAMPBELL RG AND MR TAVERNER.** (1988). Relationships between energy intake and protein and energy metabolism, growth and body composition of pigs kept at 14 or 32°C from 9 to 20 kg. *Livest Prod Sci 18*, 289-303.
- COHEN SA, M MEYS AND TL TARVIN.** (1989). The *Pico-Tag* method. A manual of advanced techniques for amino acid analysis. ed. Millipore Corporation, Bedford, MA.
- DIÉGUEZ-GARBAYO E.** (2008). Comercialización y selección del cerdo Ibérico. Pages 399-414 in *El cerdo Ibérico, una revisión transversal*, ed. Junta de Andalucía, Consejería de Agricultura y Pesca, Fundación Caja Rural del Sur, Spain.
- FULLER MF, MF FRANKLIN, R MCWILLIAM AND K PENNIE.** (1995). The responses of growing pigs, of different sex and genotype, to dietary energy and protein. *Anim Sci 60*, 291-298.

- KENDALL DC, AM GAINES, GL ALLEE AND JL USRY.** (2008). Commercial validation of the true ileal digestible lysine requirements for eleven- to twenty-seven-kilogram pigs. *J Anim Sci* 86, 324-332.
- KIELANOWSKI J.** (1965). Estimates of the energy cost of protein deposition in growing animals. Page 13-20 in Energy Metabolism. EAAP publication 11. Academic Press, NY.
- KYRIAZAKIS I AND GC EMMANS.** (1992). The effects of varying protein and energy intakes on the growth and body composition of pigs 2. The effects of varying both energy and protein intake. *Br J Nutr* 68, 615-625.
- LE BELLEGO L AND J NOBLET.** (2002). Performance and utilization of dietary energy and amino acids in piglets fed low protein diets. *Livest. Prod. Sci.* 76:45-48.
- MARM (SPANISH MINISTRY OF ENVIRONMENT AND RURAL AND MARINE AFFAIRS).** (2010). <http://www.marm.es/> Accessed Apr. 5, 2010.
- MÖHN S AND CFM DE LANGE.** (1998). The effect of body weight on the upper limit to protein deposition in a defined population of growing gilts. *J Anim Sci.* 76, 124-133.
- MORGAN CA, CT WHITEMORE AND AG TAYLOR.** (1989). Body composition and growth of young pigs as affected by protein source and a growth promoter. *Anim Feed Sci Tech* 24, 219-232.
- MOUGHAN PJ AND MWA VERSTEGEN.** (1988). The modeling of growth in the pig. *Neth. J Agric Sci* 36, 145-166.
- NAM DS AND FX AHERNE.** (1994). The effects of lysine:energy ratio on the performance of weanling pigs. *J Anim Sci* 72, 1247-1256.
- NIETO R, A MIRANDA, MA GARCÍA AND JF AGUILERA.** (2002). The effect of dietary protein content and feeding level on the rate of protein deposition and energy utilization in growing IB pigs from 15 to 50 kg body weight. *Br J Nutr* 88, 39-49.
- NOBLET J, S KAREGE, S DUBOIS AND J VAN MILGEN.** (1999). Metabolic utilization of energy and maintenance requirements in growing pigs: effects of sex and genotype. *J Anim Sci* 77,1208-1216
- NRC.** (1998). Nutrient requirement of swine. 10th rev. ed. Natl Acad Press, Washington, DC.

- RIVERA-FERRE MG, JF AGUILERA AND R NIETO.** (2006). Differences in whole-body protein turnover between Iberian and Landrace pigs fed adequate or lysine-deficient diets. *J Anim Sci* 84, 3346-3355.
- RIVERA-FERRE MG, JF AGUILERA AND R NIETO.** (2005). Muscle fractional protein synthesis is higher in Iberian than in Landrace growing pigs fed adequate or lysine-deficient diets. *J. Nutr* 135:469-478.
- SCHNEIDER JD, MD TOKACH, SS DRITZ, JL NELSEN, JM DEROUCHAY AND RD GOODBAND.** (2010). Determining the effect of lysine:calorie ratio on growth performance on ten- to twenty-kilogram of body weight nursery pigs of two different genotypes. *J Anim Sci* 88, 137-146.
- URYNEK W AND L BURACZEWSKA.** (2003). Effect of energy concentration and apparent ileal digestible lysine:metabolizable energy ratio on nitrogen balance and growth performance of young pigs. *J Anim Sci* 81, 1227-1236.
- VAN LUNEN TA AND DJA COLE.** (1996). Energy-amino acid interactions in modern pig genotypes. Pages 233-234 in *Recent Advances in Animal Nutrition*. Garnsworthy PC, Wiseman J and W Haresign, ed. Nottingham University Press, UK.
- VAN LUNEN TA AND DJA COLE.** (1998). The effect of dietary energy concentration and lysine/digestible energy ratio on growth performance and nitrogen deposition of young hybrid pigs. *Anim Sci* 67, 117-129.
- WENK C, PC COLOMBANI, J VAN MILGEN AND A LEMME.** (2001). Glossary: Terminology in animal and human energy metabolism. Page 409-421 in *Energy Metabolism in Animals*. EAAP Publ 103, A Chwalibog and K Jakobsen, ed. Wageningen Pers, The Netherlands.

CAPÍTULO 5

**Características de la canal y peso de las vísceras
de lechones Ibéricos de 10 a 25 Kg de peso vivo
alimentados con dietas de distinta relación
proteína/energía**

J A CONDE-AGUILERA, MA AGUINAGA, JF AGUILERA y R NIETO

2010

Carcass traits and organ weights of 10 to 25 kg BW Iberian pigs fed diets
with different protein to energy ratio

Animal Feed Science and Technology. Aceptado

5.1. ABSTRACT

Fifty eight pure-breed castrated male Iberian (IB) piglets were used to investigate the effects of dietary crude protein concentration [CP, 201, 176, 149 and 123 g CP/kg dry matter (DM)] and level of feeding (FL, 0.95 and 0.70 × *ad libitum*) on carcass traits and relative organ weights from 10 to 25 kg body weight (BW). Six piglets were slaughtered at the start of the trial to estimate initial carcass composition. The remaining piglets (n=52) were randomly assigned to experimental treatments following a factorial design (4 CP × 2 FL) with 6 or 7 piglets per treatment combination. Dietary amino acid (AA) profile (ideal protein) remained constant. Piglets were individually housed (27 ± 1.5°C) and feed allowance was adjusted weekly. Carcass chemical composition of piglets at the start of the experiment was (g/kg) 155, 113, 696, 40.8 for crude protein, crude fat, water and total ash, respectively, and 8.19 MJ/kg for energy. Crude protein and water concentration (g/kg) in the carcasses of piglets slaughtered at 25 kg BW increased linearly as CP was raised ($P<0.001$). However, no significant differences were observed between diets containing 201 and 176 g CP/kg DM. Total ash content was also higher as CP increased ($P<0.05$) whereas crude fat and energy content followed the inverse trend ($P<0.001$). Carcass protein deposition (PD, g/day) increased linearly with increasing dietary CP and was maximum in piglets fed diets with 201 and 176 g CP/kg DM ($P<0.001$). The effect of CP upon carcass ash and water deposition was similar as for PD ($P<0.001$). Fat daily accretion increased linearly with decreasing CP ($P<0.001$). Average chemical composition of carcass gain was 153, 215, 31 and 602 g/kg for crude protein, crude fat, total ash and water, respectively. Total viscera increased by 20% ($P<0.001$), digestive tract by 25% ($P<0.001$) and liver and kidney by 30% ($P<0.001$) on piglets offered the higher feeding level. Weights of sirloin and ham and total carcass lean (as g/kg carcass) increased linearly as CP increased. Lean tissue proportions in shoulder and ham increased and intermuscular dissectable fat in ham decreased as CP was raised. Proportional weights of skin, bone and lean tissue in shoulder and ham increased as FL was reduced from

0.95 to 0.70 × *ad libitum* ($P<0.05$), and the opposite trend was found for intermuscular ($P<0.05$) and subcutaneous ($P<0.01$) fat in shoulder and ham intermuscular fat ($P<0.01$). A diet containing at least 201 g ideal CP/kg DM (13.7 g ideal CP/MJ ME, or 0.99 g total Lys/MJ ME) provides an adequate crude protein to energy ratio for maximizing carcass lean growth in Iberian pigs from 10 to 25 kg BW.

Keywords: Carcass protein deposition; Iberian pigs; Organ weights; Dietary protein; Energy intake.

Abbreviations: AA, aminoacid; ADG, average daily gain; IB, Iberian; BW, body weight; CP, crude protein; DM, dry matter; EBW, empty body weight; FL, feeding level; GE, gross energy; HPLC, high performance liquid chromatography; Lys, lysine; ME, metabolizable energy; MEm, maintenance energy requirements; N, nitrogen; PD, protein deposition; RW, relative weight.

5.2. INTRODUCTION

The traditional production system of the Iberian (IB) pig, a native pig breed raised in the Southwest of Spain and Portugal, has relied on outdoor rearing at the Mediterranean forest, particularly at the late stage of fattening. This type of management provides high-quality dry-cured products of relatively high market prices. However, intensification of the growing and early fattening stages is broadly practised. In previous papers we have described the response to different protein and energy intakes in terms of nutrient retention, carcass characteristics and organ development, of growing (15 to 50 kg BW; Nieto et al., 2003) and fattening (50 to 100 kg BW; Barea et al., 2006) IB pigs. These studies underline the lypogenic character of this breed, with limited carcass lean tissue deposition and increased deposition of fat, particularly in heavier animals, as compared with conventional pigs of similar BW. Consequently, an efficient, sustainable and profitable production of the IB pig under intensive management practices can be achieved with diets with lower crude protein and lysine to energy ratios than those used for rearing conventional pig breeds. Nevertheless, young IB pigs (10 to 25 kg BW) have greater potential for growth and lean deposition than older IB pigs. Recently, Conde-Aguilera et al. (2010a) observed that the performance of 10 to 25 kg BW pigs was enhanced with diets containing a minimum of 176 g ideal CP/kg dry matter (DM) or 9.22 g digestible CP/MJ metabolizable energy (ME), within a range of approximately 120 to 200 g ideal CP/kg DM, which is well above previous observations for IB pigs growing from 15 to 50 kg BW (129 g ideal CP/kg DM, 5.86 g digestible CP/MJ ME, Nieto et al., 2002), although considerable lower than optimum dietary CP to energy ratio for piglets of conventional breeds (Le Bellego and Noblet, 2002). With this background, the aim of the present study was to investigate the effects of CP content of the diet and level of feeding (FL), on carcass nutrient deposition, carcass traits and relative weights of organs, in Iberian pigs from 10 to 25 kg BW.

5.3. MATERIALS AND METHODS

5.3.1. Animals, experimental design and feeding

The study was performed with 58 pure-breed IB barrows. They were taken from 32 litters of 6-8 piglets each. Pigs were weaned at 28 days and offered free-choice a commercial pre-starter diet (222 g CP, 16 g Lys/kg DM) until the start of the experiment (45 ± 2 days and 9.9 ± 0.09 kg BW). Six piglets were slaughtered at the start of the trial to estimate initial carcass composition. The other 52 piglets were randomly assigned to the experimental treatments following a factorial design with 4 CP (from 200 to 120 g CP/kg DM) and 2 FL (0.95 and $0.70 \times ad libitum$) with six or seven piglets per combination of treatments. Pigs were individually housed in 2 m² pens located in an environmentally controlled room (27 ± 1.5 °C) and exposed daily to 12 h lighting until slaughter at 25 kg.

The experimental diets were isoenergetic and their amino acid (AA) profile (formulated according to the ideal protein concept, British Society of Animal Science, 2003) was maintained constant by diluting the diet with the highest CP concentration, based on barley, soybean meal and fish meal, with a protein-free mixture made of maize starch, cellulose, vegetable oil, and a mineral/vitamin premix (Tables 1 and 2). The final concentrations obtained were 201, 176, 149 and 123 g ideal CP/kg DM, respectively (Table 2). Each diet was offered at the FL described previously in two-daily equal meals (0900 and 1500) and water was freely available. Daily feed allowance was calculated on BW basis adjusted weekly. Feed refusals were daily collected, dried, and weighed to calculate actual feed intakes. The experimental protocol was reviewed and approved by the Bioethical Committee of the Spanish National Research Council (CSIC), Spain, and piglets were cared for following the Spanish Ministry of Agriculture guidelines (Boletín Oficial del Estado, 2005)

Table 1. Ingredient composition and chemical analysis of the diet with the highest protein content (g/kg as-fed basis)

Item	Content
Ingredients, g/kg	
Barley grain	795.3
Soybean meal, 44% CP	130
Fish meal	40
Dibasic calcium phosphate	12
Calcium carbonate	8
NaCl	5
Vitamin/mineral pre-mix ^A	3
L-Lys·HCl	5
L-Thr	1.2
DL-Met	0.3
L-Trp	0.2
Diluting mixture	-
Analyzed nutrient composition, g/kg	
CP	178.3
Lys	12.9
Met and Cys	6.5
Thr	7.6
Trp	2.3
Ile	7.1
Leu	12.6
His	4.0
Phe and Tyr	14.3
Val	8.9
Lipids	22.5
ADF ^B	59.1
DM	887

^A Provided (per kg of complete diet): retinol, 3.38 mg as retinyl acetate; cholecalciferol, 56.3 µg; DL-α-tocopherol, 25.2 mg as DL-α-tocopheryl acetate; menadione, 1.5 mg as menadione sodium bisulfite; thiamine, 0.15 mg; riboflavin, 3 mg; pyridoxine, 0.15 mg; cyanocobalamin, 15 µg; folic acid, 15 µg; nicotinic acid, 22.5 mg; D-pantothenic acid, 15 mg as calcium pantothenate; Mn, 15 mg as MnSO₄·4H₂O; Fe, 75 mg as FeSO₄·7H₂O; Zn, 120 mg as ZnO; I, 450 µg as KI; Cu, 60 mg as CuSO₄·5H₂O; Co, 300 µg as CoSO₄·7H₂O.

^B Calculated based on FEDNA (2003).

Table 2. Nutrient composition of the experimental diets

	Experimental diet ^A			
	1	2	3	4
High protein diet ^B (g/kg)	1000	875	750	625
Diluting mixture ^C (g/kg)	0	125	250	375
Analysed composition (dry matter basis)				
Crude protein (g/kg DM)	201	176	149	123
Digestible energy (MJ/kg DM)	14.99	14.65	15.11	14.88
ME ^D (MJ/kg DM)	14.59	14.34	14.92	14.65
Digestible protein/ME ^D (g/MJ)	10.80	9.22	7.87	6.14
Lysine/ME ^D (g/MJ)	0.99	0.88	0.73	0.62

^A Obtained by dilution of the diet with the highest crude protein content with a diluting mixture as specified.

^B See composition in Table 1.

^C Containing (g/kg, as fed): maize starch, 873.7; cellulose, 59.1; dicalcium phosphate, 36.7; maize oil (containing butylated hydroxytoluene to provide 0.125 g per kg diluting mixture), 22.5; common salt, 5; vitamin and trace mineral premix, 3.

^D ME: metabolizable energy.

5.3.2. Measurements

The comparative slaughter technique was used including a digestibility trial performed at approximately 15 kg BW. Three days before starting excreta collection, the piglets were individually allocated to metabolic cages (0.35 × 0.80 m) for collection of feces and urine separately. Chromic III oxide (Cr₂O₃) was added to the diet (5 g/kg) at least 5 d before the digestibility measurements started. Uncontaminated feces and all the urine were collected daily during 5 d. Urine was collected into 50 ml of 4M-H₂SO₄. At the end of the digestibility measurements, composite samples of feces and urine were obtained separately for the whole period for each pig. The apparent digestibility of dietary nutrients (*n*) (Ap D_n; g nutrient *n* apparently digested/ g nutrient *n* ingested) or energy, was calculated as $Ap D_n = 1 - [(Q_e \times Cr_2O_3)_i] / [(Q_i \times Cr_2O_3)_e]$, where e and i indicate fecal excretion and feed intake, respectively, and Q and Cr₂O₃ are concentration of nutrient *n* and Cr₂O₃ in the specified samples.

At 25 ± 0.5 kg BW piglets were killed by exsanguination after electrically stunning. The empty gut, blood, carcass and non-carcass parts were weighed

separately. The head was removed by section at the occipito-atlas joint, the feet by section at the carpus-metacarpal and tarsus-metatarsal joints and the carcass was divided longitudinally. These components were chilled overnight and weighed. After weighing they were sealed in plastic bags and kept at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until analysis. The right half of the carcass was cut into small pieces and ground in a mincer (Talleres Cato, Sabadell, Spain) and homogenized in a cutter (Talleres Cato, Sabadell, Spain) and subsamples were taken for freeze-drying and subsequent analysis. Aliquot samples were analysed for DM, CP, gross energy (GE) and total ash content. Carcass crude fat content was calculated assuming an energy content of 23.85 and 39.75 kJ/g for protein and fat, respectively (Wenk et al., 2001). The left half of the carcass was dissected as described by García-Valverde et al. (2008). Briefly, mid-line back-fat measurements were made at first rib, last rib and last lumbar vertebrae. Carcass length was measured from the proximal end of the first rib to the pubic symphysis. The shoulder was separated from the loin and belly by a straight cut between the second and third ribs and a straight cut 2.5 cm ventral to the ventral edge of the scapula. The ham was removed from the loin by a straight cut between the second and third sacral vertebrae approximately perpendicular to the shank bones. Each cut retained its corresponding skin and subcutaneous fat. The loin was separated from the belly by a cut beginning just ventral to the ventral side of the scapula at the cranial end and followed the natural curvature of the vertebral column to the ventral edge of the *psoas major* at the caudal end of the loin. Each cut was weighed. After weighing, the shoulder and ham were separated into skin, subcutaneous fat, intermuscular fat, muscle (including blood vessels, ligaments, tendons and connective tissue) and bone.

The empty BW (EBW) at slaughter was calculated as the sum of hot carcass, blood and viscera. Carcass chemical composition at the beginning of the experiment was estimated from the 6 piglets slaughtered at 10 kg BW, assuming identical composition and EBW to BW ratio for the rest of the piglets. Carcass protein, energy, fat and ash retention were then calculated as the difference between the final measured composition of the experimental piglets and the estimated initial composition assessed from the initial group.

5.3.3. Chemical analysis

Analyses were performed in duplicate. Dry matter content of feed and feces (no. 934.01), total ash of feed and freeze-dried carcass samples (no. 942.05), and total nitrogen (N) in feed and freeze-dried carcass and faeces samples, determined by the Kjeldahl procedure (no. 984.13), were carried out according to the Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 2003). Crude protein was determined as total N x 6.25. Chromium III oxide was determined by a micromethod involving alkaline fusion mixture and dry ashing (Aguilera et al., 1988). A DM determination was performed on aliquot samples of freeze-dried materials to establish the residual water content after freeze-drying, and the corresponding analytical result was expressed on a DM basis. Gross energy of feeds and freeze-dried samples of carcass, faeces and urine were measured in an isoperibolic bomb calorimeter (PARR 1356, Biometra, Moline, IL). The latter were freeze-dried in a polyethylene sheet of known energy value and the GE values were obtained by difference. Amino acids in feeds were determined after protein hydrolysis in 6M HCl plus 1% phenol in sealed, evacuated tubes at 110 °C for 24 h, by high performance liquid chromatography (HPLC) according to the Waters Pico Tag method (Cohen et al., 1989). Cysteine and methionine were determined as cysteic acid and methionine sulphone, respectively, after oxidation with performic acid before hydrolysis with 6 N HCl (Moore, 1963). Tryptophan was not measured.

5.3.4. Statistical treatment

The experimental data were analysed by two-way ANOVA using the GLM procedure of SAS (Statistical Analysis Systems Institute, 2004). The effects of CP, FL and their interactions were included in the statistical model. Piglet was considered as the experimental unit. When interactions between the two main factors were significant, the means for each of the eight treatment combinations were compared by one-way ANOVA. Results are expressed as least square means and S.E.M. Statistical significance

was assessed using Tukey's *t* test. The level of significance was set to 5%. Orthogonal polynomial contrasts were also used to determine linear and quadratic effects of dietary CP on performance, carcass retention variables and body components growth.

5.4. RESULTS

Piglets did not show abnormal behavior or signs of illness during the experiment. Some piglets on the higher FL had feed refusals that were quantitatively recovered and weighed.

Main data on piglet growth performance are shown in Table 3. Daily ME intakes for the whole experimental period did not vary among CP treatments and achieved, on average, 11.93 and 8.55 MJ ME/day according to the FL programmed. Average daily gain (ADG) increased linearly on raising dietary CP ($P<0.001$). Piglets fed the 201 and 176 g CP/kg DM diets had increased ADG as compared to those fed the lower CP (on average, 340 vs. 301 g/day; $P<0.001$). The rate of growth was highest in piglets fed close to *ad libitum* consumption ($P<0.001$). Gain:feed ratio improved on increasing CP and FL ($P<0.001$). No CP \times FL interactions were observed.

Table 3. Effects of crude protein content (CP, g/kg dry matter) of the diet and level of feeding (FL, \times *ad libitum* consumption) on growth performance of Iberian piglets from 10 to 25 kg body weight

	CP				S.E.M. ^A	FL			P value		
	201	176	149	123		0.95	0.70	S.E.M. ^A	CP	FL	CP \times FL
ME ^B intake	10.17	10.04	10.54	10.22	0.217	11.93	8.55	0.153	NS	***	NS
ADG ^{C, D}	344 ^a	336 ^a	310 ^b	292 ^b	8.9	391	251	6.3	***	***	NS
Gain:feed ^D	0.496 ^a	0.481 ^a	0.438 ^b	0.416 ^b	0.0079	0.488	0.426	0.0056	***	***	NS

Values with the same superscript are not significantly (NS) different (NS= $P>0.05$). Probability of significance: *** $P<0.001$.

^A $n = 6$ or 7 piglets per each CP \times FL combination.

^B ME: metabolizable energy (MJ/day).

^C Average daily gain (g)

^D Linear effect of CP ($P<0.001$).

5.4.1. Carcass deposition of nutrients

The average chemical composition of carcass of piglets slaughtered at the start of the experiment was (g/kg) 155 (S.E.M. 2.4), 113 (S.E.M. 5.1), 696 (S.E.M. 3.9), 40.8 (S.E.M. 1.97) and 8.19 MJ/kg (S.E.M. 0.159) for crude protein, crude fat, water, total

ash and energy, respectively. Crude protein and water concentration (g/kg) of the carcasses of piglets slaughtered at the end of the experiment (25 kg BW) increased linearly as the CP was raised ($P<0.001$). However, no significant differences were observed between diets containing 201 and 176 g CP/kg DM (Table 4). Total ash content was also higher in piglets fed diets of higher CP ($P<0.05$); crude fat and energy content followed an inverse trend, increasing linearly as CP decreased ($P<0.001$). Restricted fed piglets had greater CP ($P<0.001$) and total ash ($P<0.01$) and tended to have lower ($P=0.06$) crude fat carcass contents than those on the higher FL. No significant effect of FL was detected on water and energy contents. No CP \times FL interactions were detected.

Carcass total gain (Table 4) increased linearly with increasing the CP in the diet ($P<0.01$). However, piglets fed diets with 201 and 176 g CP/kg DM did not differ in rate of growth, achieving an average value of 228 g/day. The average daily gain was greater in piglets fed close to *ad libitum* consumption than in restricted pigs (253 vs. 180 g/day, $P<0.001$). Carcass gain and total body gain (ADG) were related by the following linear function ($P<0.001$) which indicates that carcass daily gain accounts for 57.2% of whole-body gain:

$$\text{Carcass gain (g/day)} = 30 \text{ (S.E.M. 6.7)} + 0.572 \text{ (S.E.M. 0.0202)} \times \text{ADG (g/day)}$$

(Eq.1) ($n=52$; $R^2 = 0.95$)

Protein deposition (PD, g/day) in carcass of piglets fed diets of 149 and 123 g CP/kg DM was lower than those fed 201 and 176 g CP/kg DM with no significant differences between these two treatments ($P<0.001$). The effect of dietary CP on carcass PD was linear ($P<0.001$). The efficiency of carcass PD, expressed as the ratio PD: CP intake (g/g) was not significantly altered by dietary CP. However, the ratio carcass PD:ME intake (g/MJ) was 34% higher in diets with 201 and 176 g CP/kg DM than in diets of lower CP ($P<0.001$). The rates of carcass PD and whole-body PD were related by linear regression:

Table 4. Effects of crude protein content (CP, g/kg dry matter) of the diet and level of feeding (FL, × ad libitum consumption) on carcass composition and carcass nutrient deposition of Iberian piglets slaughtered at 25 kg body weight

	CP				S.E.M. ^A	FL			P value		CP x FL
	201	176	149	123		0.95	0.70	S.E.M. ^A	CP	FL	
Carcass composition (g/kg)											
Crude protein ^B	163 ^a	160 ^a	152 ^b	144 ^c	1.9	150	160	1.4	***	***	NS
Crude fat ^B	190 ^c	199 ^c	234 ^b	266 ^a	6.1	228	216	4.3	***	#	NS
Total ash	35.4 ^{ab}	37.0 ^a	33.8 ^b	33.8 ^b	0.91	33.5	36.5	0.6	*	**	NS
Water ^B	611 ^a	604 ^a	580 ^b	556 ^c	4.8	588	587	3.3	***	NS	NS
Energy ^B (MJ/kg)	11.5 ^c	11.7 ^c	12.9 ^b	14.0 ^a	0.21	12.4	12.6	0.150	***	NS	NS
Carcass gain ^B (g/day)	229 ^a	227 ^a	212 ^{ab}	198 ^b	5.8	253	180	4.3	**	***	NS
Nutrient deposition											
Protein ^B (g/day)	36.7 ^a	34.8 ^a	29.6 ^b	25.1 ^c	1.11	35.3	27.7	0.78	***	***	NS
PD/PI ^C (g/g)	0.260	0.283	0.282	0.292	0.0090	0.274	0.285	0.0064	NS	NS	NS
PD:ME ^{C, B} intake (g/MJ)	3.59 ^a	3.48 ^a	2.83 ^b	2.46 ^b	0.101	2.98	3.20	0.072	*	***	NS
Fat ^B (g/d)	49.0 ^c	52.4 ^{bc}	60.6 ^{ab}	65.4 ^a	2.6	68.7	45.0	1.9	***	***	NS
Ash ^B (g/day)	6.87 ^{ab}	7.21 ^a	5.78 ^{bc}	5.31 ^c	0.325	6.85	5.72	0.230	***	**	NS
Water ^B (g/day)	143 ^a	140 ^a	122 ^b	106 ^c	3.9	149	106	2.8	***	***	NS
Total energy ^D (MJ/day)	2.82	2.91	3.12	3.20	0.111	3.57	2.45	0.079	#	***	NS

Values with the same superscript are not significantly (NS) different (NS= $P>0.05$). Probability of significance: *** $P<0.001$, ** $P<0.01$, * $P<0.05$, # $0.05<P<0.10$.

^A $n = 6$ or 7 piglets per each CP × FL combination.

^B Linear effect of CP ($P<0.001$).

^C PD: protein deposited, PI: protein intake, ME: metabolizable energy.

^D Linear effect of CP ($P<0.05$).

$$\text{Carcass PD (g/day)} = 1.64 \text{ (S.E.M. 0.854)} + 0.680 \text{ (S.E.M. 0.0188)} \times \text{whole-body PD (g/day)}$$

$$\text{(Eq. 2) (n=52; R}^2\text{= 0.97)}$$

The resulting equation shows that 68.0% of total daily PD occurred in the carcass of the IB piglet growing from 10 to 25 kg BW.

The effect of CP upon carcass ash and water deposition was similar than for PD ($P < 0.001$). Carcass fat daily accretion ($P < 0.001$) and energy deposition ($P < 0.05$) increased linearly on decreasing CP. The rates of deposition of nutrients and energy in the carcass of piglets fed at the higher FL were greater than in restricted piglets (27% for protein, 53% for fat, 20% for ash, 40% for water and 46% for energy retention, respectively; $P < 0.01$, Table 4). The carcass PD:ME intake ratio (g/MJ) increased in piglets fed for 0.70 x *ad libitum* consumption. No significant CP × FL interactions were detected.

Expressed on an energy basis, the average carcass protein and fat deposition of piglets fed the diets containing 201 and 176 g CP/kg DM accounted for 0.303 (S.E.M. 0.0103) and 0.697 (S.E.M. 0.0103) of total energy retained, respectively. The average chemical composition of 1 kg carcass gain was 153, 215, 31 and 602 g for crude protein, crude fat, total ash and water, respectively. The mean energy content of carcass gain was 12.54 kJ/g.

5.4.2. Carcass and organs weights

Dietary CP content did not have any significant effect on the relative weights (RW) of carcass, viscera and the rest of whole-body components (g/kg EBW), except for the weight of kidneys which increased as CP increased ($P < 0.05$; Table 5). On the other hand, FL had a significant effect on RW of most of body components except blood. The weight of carcass decreased ($P < 0.01$), and that of head ($P < 0.001$) was reduced approximately by 9%, on piglets fed close to *ad libitum* consumption respect

to restrictedly fed piglets. In contrast, total viscera weight increased by 20% ($P<0.001$), digestive tract by 25% ($P<0.001$) and liver and kidney by 30% ($P<0.001$) on piglets fed for $0.95 \times ad libitum$ consumption as compared to piglets fed for $0.70 \times ad libitum$ consumption.

Mid-line backfat thickness measurements were not significantly affected by CP (Table 5). Backfat thickness tended to increase at the first rib ($P=0.09$) and decreased at the last lumbar vertebrae ($P<0.05$) with increasing FL. The RW of sirloin and ham (g/kg carcass without head) increased as CP increased ($P<0.01$ and $P<0.05$, respectively). Total carcass lean increased by 11% in piglets fed diets containing 201 and 176 g CP/kg DM ($P<0.05$). Kidney fat increased progressively on decreasing CP ($P<0.01$).

As a result of feed restriction the RW of sirloin ($P<0.05$), loin ($P<0.05$) and ham ($P<0.001$) increased significantly, whereas the weight of ribs, shoulder and kidney fat ($P<0.05$) was reduced. The RW of belly also tended to be reduced ($P=0.078$) on restricted piglets.

There were no significant CP \times FL interactions except for the proportional weight of heart ($P=0.016$) and backfat ($P=0.016$).

5.4.3. Shoulder and ham dissection

The RW of lean tissue in shoulder ($P<0.001$) and ham ($P<0.01$) increased linearly as the CP was raised (Table 6). The RW of bone in shoulder and ham was not affected by CP and that of skin increased linearly as CP was elevated ($P<0.05$), although differences between CP treatments were not significant. Shoulder subcutaneous fat increased linearly as CP decreased, achieving a maximum (224 g/kg; $P<0.001$) in piglets fed at 123 g CP/kg DM, and a similar trend was observed for shoulder intermuscular fat ($P=0.09$). Intermuscular dissectable fat in ham increased linearly ($P<0.001$) on decreasing CP. Feeding level had a significant effect on most of dissectable components of shoulder and ham, except for skin and bone proportions in ham. The

RW of skin, bone and lean tissue in shoulder increased as FL dropped from 0.95 to 0.70 × *ad libitum* consumption ($P < 0.05$), and the opposite trend was found for both intermuscular and subcutaneous fat in shoulder ($P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively) and intermuscular fat in ham ($P < 0.01$). No significant CP × FL interactions were observed for dissectable components of shoulder and ham, except for the RW of subcutaneous fat tissue in ham ($P = 0.037$). When mean values of these parameters were analysed by one-way ANOVA, the ham subcutaneous fat of piglets fed for 0.95 × *ad libitum* consumption was higher than that of pigs fed for 0.70 × *ad libitum* consumption only for diets containing 149 and 123 g CP/kg DM ($P = 0.002$, data not shown).

Table 5. Effects of crude protein content (CP, g/kg dry matter) of the diet and level of feeding (FL, × *ad libitum* consumption) on relative organ weights (RW, g/kg empty BW) and carcass traits of Iberian piglets slaughtered at 25 kg body weight (BW).

	CP					FL			FL		
	201	176	149	123	S.E.M. ^A	0.95	0.70	S.E.M. ^A	CP	FL	CP x FL
RW											
Carcass	671	672	679	674	4.3	667	681	3.1	NS	**	NS
Head	90.2	91.4	92.4	93.5	2.06	87.2	96.5	1.45	NS	***	NS
Head, feet and tail	115	117	118	119	2.2	112	123	1.6	NS	***	NS
Total viscera	146	145	141	144	3.6	157	131	2.5	NS	***	NS
Digestive tract	66.2	66.0	63.9	63.2	1.47	72.1	57.5	1.04	NS	***	NS
Liver	28.6	27.1	26.4	26.6	0.77	30.7	23.6	0.54	NS	***	NS
Kidneys ^B	4.72 ^a	4.72 ^a	4.27 ^{ab}	3.96 ^b	0.188	4.97	3.87	0.133	*	***	NS
Heart	4.98	5.28	5.25	5.13	0.128	5.28	5.04	0.090	NS	#	*
Blood	59.1	58.8	54.9	55.3	1.48	57.7	56.4	1.05	#	NS	NS
Carcass length (cm)	50.0	50.5	51.1	50.6	0.56	49.7	51.4	0.39	NS	**	NS
Backfat thickness (cm)											
First rib	1.87	2.23	2.31	2.43	0.176	2.36	2.05	0.125	NS	NS	NS
Last rib	1.38	1.20	1.39	1.32	0.123	1.22	1.43	0.087	NS	NS	NS
Last lumbar	1.36	1.18	1.29	1.25	0.130	1.16	1.38	0.092	NS	*	NS
RW^C											
Sirloin ^B	0.85 ^a	0.79 ^a	0.74 ^{ab}	0.64 ^b	0.039	0.71	0.80	0.028	**	*	NS
Butt lean	3.85	4.65	4.32	4.48	0.239	4.52	4.12	0.169	NS	NS	NS
Loin	4.98	4.60	4.80	4.30	0.232	4.35	5.00	0.164	NS	**	NS
Ribs	7.43	7.52	7.11	7.65	0.183	7.62	7.23	0.129	NS	*	0.06
Spine	6.55	6.85	6.44	6.59	0.407	6.77	6.44	0.288	NS	NS	NS
Backfat	3.42	3.48	3.86	3.76	0.147	3.44	3.82	0.104	NS	*	*
Shoulder ^D	24.7	25.3	25.7	25.5	0.27	25.7	25.0	0.19	#	*	NS
Ham ^D	34.7 ^a	33.3 ^{ab}	33.3 ^{ab}	33.2 ^b	0.40	32.9	34.3	0.28	*	***	NS
Kidney fat ^B	0.97 ^b	1.10 ^{ab}	1.26 ^{ab}	1.43 ^a	0.094	1.30	1.07	0.066	**	*	NS
Belly	12.6	12.4	12.5	12.5	0.28	12.7	12.2	0.20	NS	#	NS
Carcass lean ^{D,E}	43.9 ^a	42.9 ^a	38.4 ^b	39.8 ^{ab}	1.51	40.7	41.8	1.07	*	NS	NS

Values with the same superscript are not significantly (NS) different (NS= $P>0.05$). Probability of significance: *** $P<0.001$, ** $P<0.01$, * $P<0.05$, # $0.05<P<0.10$.

^A $n = 6$ or 7 piglets per each CP × FL combination.

^B Linear effect of CP ($P<0.01$).

^C g/kg carcass without head

^D Linear effect of CP ($P<0.05$).

^E Sum of: sirloin, butt lean, loin and lean tissue of shoulder and ham.

Table 6. Effects of crude protein content (CP, g/kg dry matter) of the diet and level of feeding (FL, × *ad libitum* consumption) on relative weight of tissues (g/kg) in shoulder and ham of Iberian piglets slaughtered at 25 kg body weight.

	CP				S.E.M. ^A		FL		P value		
	201	176	149	123		0.95	0.70	S.E.M. ^A	CP	FL	CP x FL
Shoulder											
Skin ^B	73.8	75.4	72.4	70.1	1.38	71.2	74.7	0.98	#	*	NS
Bone	173.6	174.4	171.8	174.2	3.04	169.6	177.3	2.15	NS	*	NS
Lean ^C	536.4 ^a	522.7 ^a	504.3 ^{ab}	470.3 ^b	9.77	498.4	518.5	6.91	***	*	NS
Intermuscular fat ^B	52.3	57.8	61.0	61.4	2.77	61.9	54.4	1.96	#	*	NS
Subcutaneous fat ^C	164.0 ^b	169.6 ^b	190.5 ^b	224.0 ^a	7.54	198.9	175.1	5.33	***	**	NS
Ham											
Skin	61.2	60.7	59.8	54.6	2.34	58.6	59.5	1.65	NS	NS	NS
Bone	157.4	164.6	170.9	167.5	5.75	169.1	161.2	4.07	NS	NS	NS
Lean ^C	604.5 ^a	589.3 ^{ab}	549.4 ^b	554.5 ^{ab}	14.15	557.4	591.5	10.01	*	*	NS
Intermuscular fat ^C	48.7 ^c	51.5 ^{bc}	64.6 ^a	62.0 ^{ab}	2.79	61.2	52.2	1.97	***	**	NS
Subcutaneous fat ^C	128.2	133.9	155.2	161.5	7.38	153.8	135.6	5.22	**	*	*

Values with the same superscript are not significantly (NS) different (NS= $P>0.05$). Probability of significance: *** $P<0.001$,

** $P<0.01$, * $P<0.05$, # $0.05<P<0.10$.

^A $n = 6$ or 7 piglets per each CP × FL combination.

^B Linear effect of CP ($P<0.05$).

^C Linear effect of CP ($P<0.001$).

5.5. DISCUSSION

One of the main factors affecting pig body composition and growth is genotype. At the same physiological age selected pigs have higher capacity for lean deposition and lower lipid deposition rate than unimproved pigs (van Lunen and Cole, 1996). Consequently, carcass gain and composition differ and therefore protein and energy requirements vary widely between pig genotypes. Nieto et al. (2002) and Barea et al. (2007) have shown that protein requirements of growing and fattening IB pigs are considerably lower than those reported for conventional lean pigs at similar stages of growth. These authors observed also that the maintenance energy requirements of IB pigs were 6 to 10% lower than those of lean pigs, probably associated with their relatively smaller lean mass. In the present work growth performance was enhanced with diets that contained 201 and 176 g CP/kg DM, equivalent to 10.8 and 9.22 g digestible protein/MJ ME. Nieto et al. (2002) reported that at a later stage of growth (15 to 50 kg BW) the IB pigs require only 130g ideal CP/kg DM (5.86 g digestible CP/MJ ME) for optimum growth. These results suggest a considerable decrease in growth potential of the weaned IB piglet with age. This is not surprising as it is known that the potential for PD decreases as the pig approaches maturity (van Lunen and Cole, 1996).

Average ME intakes were 11.93 and 8.55 MJ/day (1,478 and 1,056 kJ/kg^{0.75}.day, for piglets fed for 0.95 and 0.70 × *ad libitum* consumption). Nieto et al. (2002) estimated that the ME_m of IB pigs growing from 15 to 50 kg BW were 422 kJ/kg^{0.75}.day. Therefore, pigs in the current experiment consumed approximately 3.5 to 2.5-fold their ME_m. Nieto et al. (2002) reported in IB growing pigs (15 to 50 kg BW) which consumed the diet close to *ad libitum* FCR 35% lower than those found in present experiments (0.488 vs. 0.313). Nevertheless, the growth rate of the IB piglet is rather moderate compared to modern piglets of similar BW range fed diets with optimum CP (Lys) to energy ratio (van Lunen and Cole, 1998; Le Bellego and Noblet, 2002; Urynek and Buraczewska, 2003; Kendall et al., 2007).

Carcass protein content of IB piglets fed diets of 201 and 176 g CP/kg DM was in the lower range of the values (160 to 176 g protein/kg carcass, 18.7 to 25 kg BW) reported for conventional or modern piglets of similar BW (Shields et al., 1983; Thomke et al., 1995; Dritz et al., 1996; Owen et al., 2001; Conde-Aguilera et al., 2010b). Also, values on water content were 7 to 13% lower, total ash was on the upper range, and crude fat content was clearly above (50 to 100 g more crude fat/kg carcass) than those reported in the cited papers. In fact, carcass water to protein ratio ranged from 3.7 to 3.9, a value somewhat higher than those previously found by Nieto et al. (2003) in growing IB pigs (3.5 to 3.6) and slightly below ratios (3.9 to 4.3) derived from experiments on conventional or modern piglets (Shields et al., 1983; Thomke et al., 1995; Dritz et al., 1996; Owen et al., 2001; Conde-Aguilera et al., 2010b). Obviously, carcass composition at slaughter was heavily influenced by daily protein and fat deposition, which in piglets fed diets with 201 and 176 g CP/kg DM under $0.95 \times ad\ libitum$ conditions averaged 40.3 and 60.6 g/day for CP and crude fat, respectively. The crude fat:CP ratio in carcass daily gain was 1.5, considerably greater than values reported for conventional piglets (0.56 to 0.88) by Dritz et al. (1996), Owen et al. (2001) and Trindade Neto et al. (2004). These figures highlight the lipogenic profile of the IB pig breed even during early growth stages.

In contrast to IB pigs growing from 15 to 50 kg BW, in which protein and fat carcass contents remained fairly unchanged by a wide range of dietary CP (101 to 223 g CP/kg DM; Nieto et al., 2003), carcass protein content and carcass daily PD in the young IB piglet was considerably reduced when fed diets with sub-optimum CP. The reduction in protein accretion was accompanied by a noticeable increase in carcass fat deposition (15 to 20%), indicating that the young IB piglet was more sensitive to protein restriction than older IB pigs. Therefore, adequate dietary CP to energy ratios are essential for optimum piglet lean growth.

The highest carcass PD, obtained when piglets were fed close to *ad libitum* consumption diets of 201 and 176 g CP/kg DM, averaged 40.3 g/day, a value which is consistent with that previously reported for growing IB pigs of 15 to 50 kg BW (54.6 g/day) fed for $0.95 \times ad\ libitum$ consumption a diet containing 129 g crude (ideal)

protein/kg DM (Nieto et al., 2003). Also, Barea et al. (2006) in fattening IB pigs of 50 to 100 kg BW reported 55.7 g/day when fed for 0.95 × *ad libitum* consumption a diet containing 95 g crude (ideal) protein/kg DM. However, in the present experiments, although differences in PD of piglets receiving the two highest CP diets were small and not significant, the linearity of the effect of dietary CP on PD suggests that the maximal potential for protein accretion might have not been reached. In all cases, carcass protein was more efficiently deposited in the young IB piglet (3.54 vs. 2.12 and 1.15 g protein/MJ ME intake, respectively). On the other hand, carcass fat gain averaged 52, 157 and 355 g/day for IB pigs from 10 to 25 kg BW (current trial), 15 to 50 kg BW (Nieto et al., 2003) and 50 to 100 kg BW (Barea et al., 2006), respectively. These data support that the IB pig reaches maturity rather early and underline the limited capacity for carcass lean growth of this native pig type.

Except for the kidney, the RW of visceral organs were not affected by changes in CP, in agreement with data of Le Bellego and Noblet (2002) in conventional piglets fed diets with CP varying from 169 to 224 g/kg. However, in conventional growing pigs, the excess of protein supply seems to be associated to increased visceral organs mass (Le Bellego et al., 2002). Nieto et al. (2003) observed also increased weight of the digestive tract tissues in growing IB pigs fed diets with CP surplus. Similarly, Nieto et al. (2003) and Barea et al. (2006) have recorded higher RW of kidneys in growing and fattening IB pigs as dietary CP was increased, probably because of higher metabolic activity associated to urea synthesis and excretion.

For IB piglets fed close to *ad libitum* consumption the average proportion of total visceral mass was 157 g/kg EBW, a value considerably higher than those found in growing (127 g/kg EBW, Nieto et al., 2003), fattening (102 g/kg EBW, Barea et al., 2006) and finishing (97 g/kg EBW, García-Valverde et al., 2008) IB pigs under similar feeding conditions. This reduction in visceral mass with age has been associated to increasing maturity (Kolstad and Vangen, 1996). In the present work, raising FL resulted in increases in the RW of total viscera, digestive tract, liver and kidney, as has been previously described for pigs of lean and obese genetic types at different stages of growth (Koong et al., 1983; Rao and MacCracken, 1992; Nieto et al., 2003; Barea et

al., 2006). An increased RW of visceral tissues might affect the proportion of ME intake required for maintenance of body functions, because visceral tissues are metabolically more active than carcass tissues (Rivera-Ferre et al., 2005).

We have not found any survey in the literature on the effect of dietary CP on RW of carcass components of piglets although some data are available for pigs close to market weights. For example, Wagner et al. (1999) studied in barrows and gilts of 5 genetic lines changes in body composition during growth and development from 25 to 152 kg BW. At 25 kg BW, those pigs that were offered free-choice diets formulated to allow maximum protein accretion had longer carcasses (3.4 to 3.7 cm longer) with 9% greater lean proportion and 35% lower last-rib backfat thickness than the piglets of the current experiment.

Compared to IB pigs of 15 to 50 kg BW, the RW of carcass lean components of young animals were more sensitive to changes in dietary CP or FL. For example, sirloin, ham and total carcass lean proportion increased on increasing CP. In heavier growing pigs, only sirloin proportion increased as dietary CP was augmented from marginal to adequate levels (Nieto et al., 2003). Increasing dietary CP increased lean proportions in shoulder and ham of piglets similarly as reported for ham lean proportions in growing pigs (Nieto et al., 2003). Carcass length and proportion of lean components (except for shoulder) were greater in restricted fed pigs than in animals fed close to *ad libitum* consumption. The effect of reducing FL was more pronounced in IB piglets than in growing pigs (Nieto et al., 2003), giving rise to increased proportions of lean tissue in shoulder and ham and a general decrease on fat depots. Reduction in ME intake leads to leaner carcasses as a result of the increased proportion of ME above maintenance used for PD (van Milgen et al., 2000). Nevertheless, this feeding strategy will decrease PD and therefore will increase the time required to reach a certain BW.

5.6. CONCLUSIONS

The pattern of carcass nutrient deposition and the singularities of composition of carcass and non-carcass components in the IB pig growing from 10 to 25 kg BW suggest the convenience of applying a specific protein to energy regime clearly differentiated from those adequate for older IB pigs or for more selected piglets. According to the results obtained in the present work, a diet containing at least 201 g ideal CP/kg DM (13.7 g ideal CP/MJ ME, or 0.99 g total Lys/MJ ME) provided to allow *ad libitum* consumption will satisfy protein requirement for maximizing carcass lean growth at this stage of growth.

Acknowledgments

Supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation (MICINN, grant No. AGL2005-1652). J.A. Conde-Aguilera was recipient of a FPI grant from MCINN. Thanks to M.A. Liñán, A. Rodríguez, L. González, J.M. Rodríguez and F. Funes for their skilful assistance. Also we are very grateful to Sánchez Romero Carvajal Jabugo S.A. (Seville, Spain) for the provision of piglets.

5.7. REFERENCES

- AGUILERA JF, PRIETO C, MOLINA E, LACHICA M.** (1988). A micromethod for routine determination of chromic oxide in nutrition studies. *Analisis 16*, 454-457.
- AOAC.** (2003). Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis, 17th ed., 2nd revision. AOAC International, Gaithersburg, MD, USA.
- BAREA R, NIETO R, AGUILERA JF.** (2007). Effects of the dietary protein content and the feeding level on protein and energy metabolism in Iberian pigs growing from 50 to 100 kg body weight. *Animal 1*, 357-365.
- BAREA R, NIETO R, LARA L, GARCÍA MA, VÍLCHEZ MA, AGUILERA JF.** (2006). Effects of dietary protein content and feeding level on carcass characteristics and organ weights of Iberian pigs growing between 50 to 100 kg live weight. *Anim Sci 82*, 405-413.
- BOE.** (2005). Boletín Oficial del Estado, Real decreto Español 1201/2005 sobre la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. *Boletín Oficial Estado 252*, 34367-34391.
- BSAS.** (2003). British Society of Animal Science. Nutrient requirement standards for pigs. Brit Soc Anim Sci, Penicuik, UK.
- COHEN SA, M MEYS, TL, TARVIN.** (1989). The *Pico-Tag* method. A manual of advanced techniques for amino acid analysis. Millipore Corporation, Bedford, MA.
- CONDE-AGUILERA JA, AGUINAGA MA, AGUILERA JF, NIETO R.** (2010a). Energy and nutrient retention in the weaned Iberian piglet. In: Crovetto GM (Ed.) Energy and protein metabolism and nutrition. EAAP Publ. No. 127, Wageningen Academic Publishers, The Netherlands, pp 389-390.
- CONDE-AGUILERA JA, BAREA R, LE FLOC'H N, LEFAUCHEUR L, VAN MILGEN J.** (2010b). A sulfur amino acid deficiency changes the amino acid composition of body protein in piglets. *Animal 4*, 1349-1358.

- DRITZ SS, OWEN KQ, NELSEN JL, GOODBAND RD, TOKACH MD.** (1996). Influence of weaning age and nursery diet complexity on growth performance and carcass characteristics and composition of high-health status pigs from weaning to 109 kilograms. *J Anim Sci* 74, 2975-2984.
- FEDNA.** (2003). Fundación Española Desarrollo Nutrición Animal. Tablas FEDNA de composición y valor nutritivo de alimentos para la fabricación de piensos compuestos, 2nd ed. De Blas, C., Mateos, G.G., Rebollar, P.G., (Eds.). Madrid, Spain.
- GARCÍA-VALVERDE R, BAREA R, LARA L, NIETO R, AGUILERA JF.** (2008). The effects of feeding level upon protein and fat deposition in Iberian heavy pigs. *Livest Sci* 114, 263-273.
- KENDALL DC, GAINES AM, ALLEE GL, USRY JL.** (2008). Commercial validation of the true ileal digestible lysine requirements for eleven- to twenty-seven-kilogram pigs. *J Anim Sci*.86, 324-332.
- KOLSTAD K, VANGEN O.** (1996). Breed differences in maintenance requirements of growing pigs when accounting for changes in body composition. *Livest Prod Sci* 47, 23-32.
- KOONG, L.J., NIENABER, J.A., MERSMANN, H.J.** (1983). Effects of plane of nutrition on organ size and fasting heat production in genetically obese and lean pigs. *J Nutr* 113, 1626-1631.
- LE BELLEGO, L., NOBLET, J.** (2002). Performance and utilization of dietary energy and amino acids in piglets fed low protein diets. *Livest Prod Sci* 76, 45-48.
- Le BELLEGO, L., NOBLET, J., VAN MILGEN, J.** (2002). Effect of high temperature and low protein diets on performance of growing-finishing pigs. *J Anim Sci* 80, 691-701.
- MOORE S.** (1963). On the determination of cystine as cysteic acid. *JBiol Chem* 238, 235–237.
- NIETO R, LARA L, GARCÍA MA, VÍLCHEZ MA, AGUILERA JF.** (2003). Effects of dietary protein content and feed intake on carcass characteristics and organ weights of growing Iberian pigs. *Anim Sci* 77, 47-56.

- NIETO R, MIRANDA A, GARCÍA MA, AGUILERA JF.** (2002). The effect of dietary protein content and feeding level on the rate of protein deposition and energy utilization in growing Iberian pigs from 15 to 50 kg body weight. *Br J Nutr* 88, 39-49.
- OWEN KQ, NELSEN JL, GOODBAND RD, TOKACH MD, FRIESEN KG.** (2001). Effect of dietary L-carnitine on growth performance and body composition in nursery and growing-finishing pigs. *J Anim Sci* 79, 1509-1515.
- RAO DS, McCRACKEN KJ.** (1992). Energy:protein interactions in growing boars of high genetic potential for lean growth. 1. Effects on growth, carcass characteristics and organ weights. *Anim. Prod.* 54, 75-82.
- RIVERA-FERRE MG, AGUILERA JF, NIETO R.** (2005). Muscle fractional protein synthesis is higher in Iberian than in Landrace growing pigs fed adequate or lysine-deficient diets. *J. Nutr* 135, 469-478.
- SHIELDS JR RG, MAHAN DC, GRAHAM PL.** (1983). Changes in swine body composition from birth to 145 kg. *J. Anim. Sci.* 57, 43-54.
- SAS.** (2004). Statistical Analysis Systems Institute. SAS User's Guide: Statistics, Version 9.1.2 edition. SAS Inc, Cary, NC, USA.
- THOMKE S, ALAVIUHKOLA T, MADSEN A, SUNDSØL F, MORTENSEN HP, VANGEN O, ANDERSSON K.** (1995). Dietary energy and protein for growing pigs. 2. Protein and fat accretion and organ weights of animals slaughtered at 20, 50, 80 and 110 kg live weight. *Acta Agric Scand Sect A-Anim Sci* 45, 54-63.
- TRINDADE NETO MA, PETELINCAR IM, BERTO DA, SCHAMMASS EA, BISINOTO KS, CALDARA FR.** (2004). Lysine level for piglets in the initial phase of post-weaning growth-I. Body composition at 11.9 and 19.0 kg. *R Bras Zootecn* 33, 1777-1789.
- URYNEK W, BURACZEWSKA L.** (2003). Effect of energy concentration and apparent ileal digestible lysine:metabolizable energy ratio on nitrogen balance and growth performance of young pigs. *J Anim Sci* 81, 1227-1236.

- VAN LUNEN TA, COLE DJ.** (1996). Energy-amino acid interactions in modern pig genotypes. In: Garnsworthy PC, Wiseman J, W Haresign, (Eds.), Recent Advances in Animal Nutrition. Nottingham University Press, UK, pp. 233-234.
- VAN MILGEN J, QUINIOU N, NOBLET J.** (2000). Modelling the relation between energy intake and protein and lipid deposition in growing pigs. *Anim Sci* 71, 119-130.
- WAGNER JR, SCHINCKEL AP, CHEN W, FORREST JC, COE BL.** (1999). Analysis of body composition changes of swine during growth and development. *J Anim Sci* 77, 1442-1466.
- WENK, C., COLOMBANI, P.C., VAN MILGEN, J., LEMME, A.,** 2001. Glossary: Terminology in animal and human energy metabolism. In: Chwalibog, A., K., Jakobsen, (Eds.), Proceedings of the 15th symposium on Energy Metabolism in Animals held in Snekersten, Denmark, 2000. EAAP Publ. No. 103, Wageningen Press, The Netherlands, pp. 409-421.

CAPÍTULO 6

**Regulación metabólica de la esterificación de
ácidos grasos y efecto del CLA sobre la
homeostasis de la glucosa de hepatocitos
porcinos**

JA CONDE-AGUILERA, M LACHICA, R NIETO, y I FERNÁNDEZ-FÍGARES

2010

**Metabolic regulation of fatty acid esterification and effects of CLA on glucose
homeostasis in porcine hepatocytes**

Animal. En evaluación

6.1 ABSTRACT

Conjugated linoleic acid (CLA) are geometric and positional isomers of linoleic acid (LA) that promote growth, alter glucose metabolism and decrease body fat in growing animals although the mechanisms are poorly understood. A study was conducted to elucidate the effects of CLA on glucose metabolism, triglycerides (TG) synthesis and IGF-1 synthesis in primary culture of porcine hepatocytes. Also, hormonal regulation of TG and IGF-1 synthesis was addressed. Hepatocytes were isolated from piglets ($n = 5$) by collagenase perfusion and seeded into collagen-coated T-25 flasks. Hepatocytes were cultured in William's E containing dexamethasone (10^{-8} and 10^{-7} M), insulin (10 and 100 ng/mL), glucagon (0 and 100 ng/mL) and CLA (1:1 mixture of *cis*-9, *trans*-11 and *trans*-10, *cis*-12 CLA, 0.05 and 0.10 mM) or LA (0.05 and 0.10 mM). IGF-1 production, glycogen synthesis and degradation, gluconeogenesis and TG synthesis were determined. Addition of CLA decreased gluconeogenesis ($P < 0.05$) while glycogen synthesis and degradation, TG synthesis and IGF-1 synthesis were not affected compared to LA. Increased concentration of fatty acids in the media decreased IGF-1 production ($P < 0.001$) and glycogen synthesis ($P < 0.01$), and increased gluconeogenesis ($P < 0.001$) and TG synthesis ($P < 0.001$). IGF-1 synthesis increased ($P < 0.001$) and TG synthesis decreased ($P < 0.001$) as dexamethasone concentration in the media rose. High Insulin/Glucagon increased TG synthesis. These results indicate that TG synthesis in porcine hepatocytes is hormonally regulated so that dexamethasone decreases and Insulin/Glucagon increases it. Also, that CLA decreases hepatic glucose production through decreased gluconeogenesis.

Keywords: CLA, insulin, glucagon, dexamethasone, pig hepatocytes

Implications

This study reports that free fatty acids esterification into triglycerides is hormonally regulated in pig hepatocytes so that it is decreased by dexamethasone and

increased by insulin/glucagon ratio. CLA has been reported to induce insulin resistance in murine models. Nevertheless, glucose production was decreased in pig hepatocytes in the presence of CLA.

6.2. INTRODUCTION

Conjugated linoleic acids (CLA), naturally occurring isomers of linoleic acid (**LA**), have been reported to impact glucose metabolism, improving glucose tolerance in diabetic models (Houseknecht *et al.*, 1998) but inducing hyperinsulinemia in wild type mice (Tsuboyama-Kasaoka *et al.*, 2000). In animal nutrition, the interest in feeding CLA to pigs has increased as a result of its potential to improve growth (Thiel-Cooper *et al.*, 2001) and reduce body fat (Thiel-Cooper *et al.*, 2001; Dugan *et al.*, 1997). Body fat reduction elicited by CLA was accompanied by liver enlargement and steatosis in mice [(Tsuboyama-Kasaoka *et al.*, 2000; Clement *et al.*, 2002). Some of the effects of CLA appear to be associated with lipid and carbohydrate metabolism.

Many of the effects of fatty acids or hormones on hepatic metabolism may not be noticed when using short-term (3 hours) cultures. Monolayer cultures of porcine hepatocytes provide a viable model for testing long-term (≥ 24 hours) effects on hepatocyte function (Fernández-Fígares *et al.*, 2004). Although a great deal is known about xenobiotic metabolism and albumin synthesis in primary monolayer cultures of pig hepatocytes (Fernández-Fígares *et al.*, 2004; Koebe and Schildberg, 1996; Behnia *et al.*, 2006; Gregory *et al.*, 2000), few studies have been conducted to elucidate how hormones control hepatic functions and energy metabolism in these cultures. In pig hepatocytes, insulin and glucagon have been shown to regulate glycogen deposition and ketogenesis (Fernández-Fígares *et al.*, 2004). However, their effect on triglyceride (**TG**) synthesis or content has not been investigated. Furthermore, to our knowledge, there is no available information on how CLA affects porcine liver lipids content *in vivo* or *in vitro*. The addition of dexamethasone has long been known to be important for maintenance of differentiated hepatocyte function *in vitro* (Guillouzo and Guguen-Guillouzo, 1986). Nevertheless, there is no available data on the role of dexamethasone in TG synthesis or content of pig hepatocytes

Therefore, the aims of the present work were to study the effects of CLA on hepatic lipid and glucose metabolism and IGF-1 production, to determine TG synthesis capacity of monolayer cultures of pig hepatocytes, their regulation by hormones that are integrally involved in the utilization and partitioning of dietary nutrients, and the possible interaction with fatty acids.

6.2. MATERIALS AND METHODS

6.2.1. Isolation of liver cells

Care and treatment of all pigs were approved in advance by the Institutional Bioethical Committee of CSIC. Except where noted, reagents were purchased from Sigma Aldrich Spain. Hepatocytes were isolated from five pure bred Iberian barrows (11-21 kg live weight, 50-80 days old) provided from Sánchez Romero Carvajal Jabugo S.A (Seville, Spain). At arrival, piglets were restrictively fed (85% *ad libitum*) a standard commercial diet. The day before slaughter they had free access to food. After stunning by electric shock they were exsanguinated and livers were immediately excised and the left lateral lobe removed. Hepatocytes were isolated as previously described by Fernández-Fígares et al. (2004), except that collagenase-digestion buffer was modified to contain 92 mM NaCl, 3.1 mM CaCl₂, and 6.0 mM KCl. Collagenase class two used was from Worthington Biochemical Corp. (Lakewood, NJ).

Viability of isolated hepatocytes from animals in this study was $80.7 \pm 1.2\%$ (trypan blue dye exclusion) and cell yield from each liver preparation was $5.4 \pm 0.8 \times 10^8$ viable hepatocytes.

6.2.2. Cell culture

Hepatocytes (4.5×10^6) were seeded into vented T-25 flasks essentially as described by Fernández-Fígares *et al.* (2004), except that basal medium was William's

E amended with β -mercaptoethanol (0.1 mM), Gln (2 mM), antibiotics (gentamicin, penicillin, streptomycin and amphotericin B; GIBCO-BRL, Rockville, MD) containing insulin : transferrin : selenium (2.5 μ g/mL : 2.75 ng/mL : 2.5 ng/mL) and 10% fetal bovine serum (Hyclone, Logan, UT, USA). Following a 3 hours attachment period, flasks were washed twice with HEPES-buffered saline and subsequently, basal medium containing 5% fetal bovine serum was added to each flask. On the following day, flasks were washed twice with HEPES-buffered saline and medium was replaced with serum-free basal medium containing dimethyl sulfoxide (1 mg/L), carnitine (1 mM), Na₂SeO₃ (100 nM) dexamethasone (10 and 100 nM), insulin (10 and 500 ng/ml), glucagon (0 and 100 ng/ml) and CLA or LA (0.05 and 0.10 mM) as detailed for each assay. Triplicate flasks were used for each experimental condition.

6.2.3. Preparation of albumin-bound fatty acids

According to Svedberg *et al.* (1990), LA and CLA (mixture of c9t11 and t10c12-CLA) were bound to albumin with slight modifications. Fatty acids were provided by Sigma. The fatty acid-albumin molar ratio was kept at < three to ensure that the fatty acids were bound to fatty acid free albumin. Final concentrations of fatty acids were 0.05 and 0.10 mM.

6.2.4. IGF-I synthesis

Cells were amended the first day of serum-free culture with a high concentration of insulin (high insulin, 500 ng/mL), dexamethasone (10 and 100 nM) and fatty acids (LA or CLA; 0.05 and 0.10 mM) and cultivated for 24 hours to study how dexamethasone, concentration and the type of fatty acid affect IGF-1 secretion. Media and cells were harvested and frozen at -80°C. Prior to analysis of IGF-1, media was concentrated 12X by means of a rotary evaporator (SpeedVac, SPD131DDA-230, Thermo, Milford, MA, USA). A two-site immuno-radiometric assay (Diagnostic Systems

Laboratories, Inc., Webster, TX) was used to analyze IGF-1. The analytical procedure included an extraction step in which IGF-1 was separated from its binding proteins, for detection of total IGF-1 in culture media. The intra and inter-assay CV were 4.8 and 6.9%, respectively.

6.2.5. Glycogen synthesis

Cells were pre-incubated on day 1 for 3 hours in culture medium with low concentration of insulin (10 ng/mL) and high concentration of glucagon (100 ng/mL) to deplete glycogen stores (Fernández-Fígares *et al.*, 2004) and cells from three flasks were harvested to set the initial point for glycogen synthesis determination. The rest of flasks were switched to culture medium with LA or CLA (0.05 and 0.10 mM) and high insulin (Fernández-Fígares *et al.*, 2004) for 21 hours. The effect of concentration and kind of fatty acid on glycogen synthesis was evaluated. Cells were harvested and frozen at -80°C. Glycogen synthesis was quantified as the difference in glycogen content of cells cultured in the presence of high insulin and cells with basal glycogen content. Glycogen in cell homogenates was determined as described by Fernández-Fígares *et al.* (2004) except that the enzymatic method used was Glucose Trinder (Labkit, Chemelex, S.A., Barcelona, Spain).

6.2.6. Glycogen degradation

Cells were cultured on day 1 for 24 hours in culture medium with high insulin to achieve maximal glycogen content and three flasks harvested to set the starting point for glycogen degradation. The rest of flasks were cultivated in glucose free Dulbecco's modified Eagle's medium with low insulin and high glucagon, to ease glycogen degradation, and LA or CLA (0.05 and 0.10 mM), for 3 hours to study how concentration and type of fatty acid affect glycogen content. Cells were harvested and

frozen at -80°C. Glycogen degradation was quantified as the difference in glycogen content of cells with full glycogen load and cells where degradation was facilitated.

6.2.7. Gluconeogenesis

Cells were cultured on day 1 for 24 hours in basal medium with high glucagon and low insulin to deplete glycogen stores and subsequently cultured for 40 minutes in glucose free Dulbecco's modified Eagle's medium, 5 mM lactate, 0.5 mM pyruvate, 5 mM Ala and LA or CLA (0.05 and 0.10 mM), low insulin and high glucagon. Gluconeogenesis was estimated as glucose released to the media assuming negligible glycogenolysis.

6.2.8. TG synthesis

Cells were cultured for 3 hours in culture medium with low insulin and high glucagon to deplete lipids stores and cells from three flasks harvested to estimate the basal TG content for the determination of TG synthesis.

To study the effect of dexamethasone on TG synthesis and possible interactions with the type and concentration of fatty acid, cells were switched to culture medium with high insulin to mimic postprandial conditions, fatty acid (LA or CLA; 0.05 and 0.10 mM) and dexamethasone (10 and 100 nM) for 21 hours.

Similarly, to evaluate the effect of Insulin/Glucagon ratio and possible interactions with the type and concentration of fatty acid, cells were switched to culture medium amended with dexamethasone (100 nM), fatty acid (LA or CLA; 0.05 and 0.10 mM) and high or low Insulin/Glucagon ratios (500 ng/mL insulin: 0 ng/mL glucagon; and 10 ng/mL insulin: 100 ng/mL glucagon, respectively). Cells were harvested and frozen at -80°C until analysis.

Lipids were extracted according to Ametaj *et al.* (2003) and dissolved in isopropanol. Intracellular TG content was determined using the glycerol determination

procedure (Labkit, Chemelex, S.A. Barcelona, Spain). TG synthesis was estimated as the difference in TG content of cells cultured in the presence of high insulin and cells with basal TG content.

6.2.9. Protein determination

Protein in cell homogenates was determined by a modified Lowry procedure following NaOH solubilization of trichloroacetic acid precipitated material (Nerurkar *et al.*, 1981). As the protein standard bovine serum albumin was used. All data were normalized to protein content.

6.2.10. Statistical analysis

Five cell preparations constituted an experiment, and treatments within each preparation were replicated in three flasks. All data from individual flasks were used in the analysis of variance. Data were analyzed using a mixed model analysis of a split plot design (SAS Institute 2004, version 9.1.3.) with pigs fitted as random, so that possible differences in the size of the treatment effect across pigs could be assessed. The factors introduced in the model were: type of fatty acid (CLA or LA) and concentration (0.05 and 0.10 mM) for all assays, dexamethasone concentration (10 and 100 nM) for IGF-1 synthesis, TG content and TG synthesis, and insulin/glucagon ratio (high and low) for TG content and TG synthesis. All possible treatments combinations were tested. Results are expressed as least square means \pm s.e. of triplicate flasks. Statistical significance was assessed using Fisher's least significant difference test to determine differences between treatment groups. The level of significance was set to 5%.

6.3. RESULTS

6.3.1. CLA

In the present conditions, CLA amended to the media did not alter IGF-1 production compared to LA, although increased concentration of fatty acids decreased IGF-1 in the media (32%; $P < 0.001$; Figure 1). No differences ($P > 0.10$) in TG content or synthesis were found when CLA or LA supplemented porcine hepatocytes were compared at different dexamethasone levels (Figure 2) and Insulin/Glucagon ratios (Figure 3). Nevertheless, hepatic TG content and synthesis of hepatocytes cultured without glucagon were increased (37%; $P < 0.001$ and 85%; $P < 0.05$, respectively) as the amount of fatty acids in the media increased (Figure 2). When glucagon was present in the media TG synthesis did not increase on increasing fatty acids concentration (Figure 3). Glucose production was decreased (16%; $P < 0.05$) when hepatocytes were cultured with CLA compared to LA (Figure 4). Increasing the concentration of fatty acid increased (16%; $P < 0.05$) gluconeogenesis (Figure 4). Basal glycogen content of hepatocytes cultured for 3 hours with high glucagon was 6.0 ± 1.1 μg glycogen/mg of protein. CLA had no effect ($P > 0.10$) on glycogen synthesis (Figure 5). Glycogen synthesis significantly decreased (14%, $P < 0.001$) when concentration of fatty acid in the media increased (Figure 5). As for glycogen degradation, basal glycogen content of hepatocytes cultured for 24 hours with high insulin was 208 ± 24 μg glycogen/mg of protein. A trend ($P = 0.066$) for a slight increase (5%) in glycogen degradation was found in hepatocytes cultivated in the presence of CLA compared to LA (Figure 6). Nevertheless, no effect of the concentration of fatty acids on glycogen degradation was found ($P > 0.10$).

6.3.2. Dexamethasone

In our hands, porcine hepatocytes cultivated in the presence of high insulin and fatty acids had increased (29%; $P < 0.001$) IGF-1 production when dexamethasone concentration in the media rose from 10 to 100 nM (Figure 1). In the present experiment, the addition of 100 nM dexamethasone to porcine hepatocytes in the presence of insulin and fatty acids sharply decreased (91%; $P < 0.001$) TG synthesis as compared to 50 nM dexamethasone (Figure 2) and as a consequence, hepatocytes TG content diminished (42%; $P < 0.001$) accordingly.

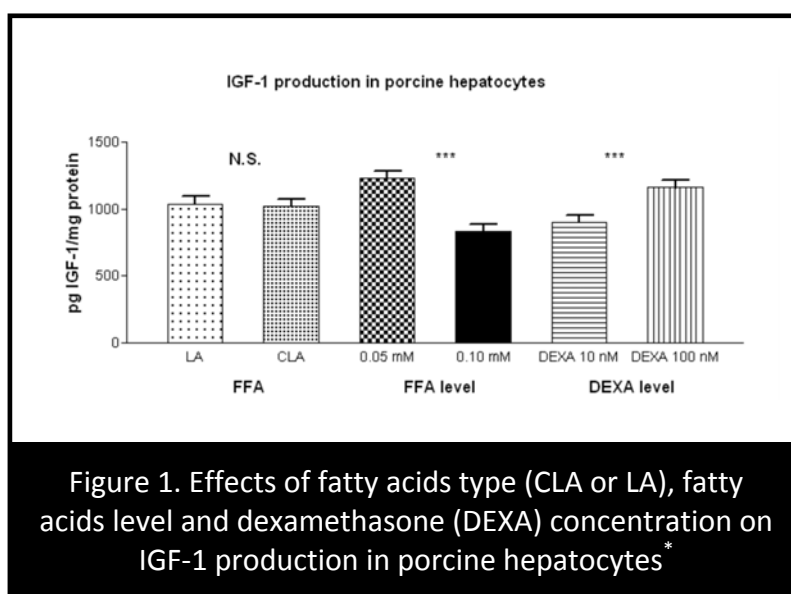
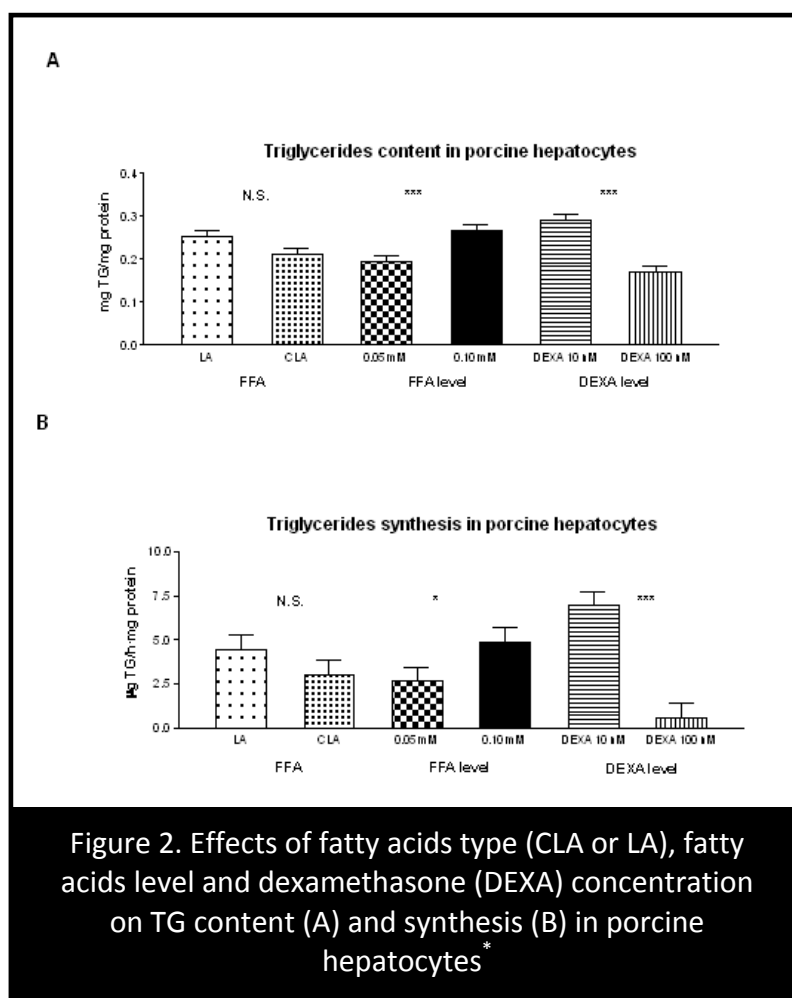


Figure 1. Effects of fatty acids type (CLA or LA), fatty acids level and dexamethasone (DEXA) concentration on IGF-1 production in porcine hepatocytes*

*Hepatocytes were cultivated in the presence of insulin (500 ng/ml) for 24 hours. No significant interactions were found between factors. Data are expressed as means \pm s.e., $n = 5$. *** Groups differ at $P < 0.001$; N.S., Not significant, $P > 0.10$



* Hepatocytes were cultivated in the presence of insulin (500 ng/ml) and absence of glucagon for 21 hours. No significant interactions were found between factors. Data are expressed as means \pm s.e., n = 5 * Groups differ at $P < 0.05$; *** Groups differ at $P < 0.001$; N.S., Not significant, $P > 0.10$.

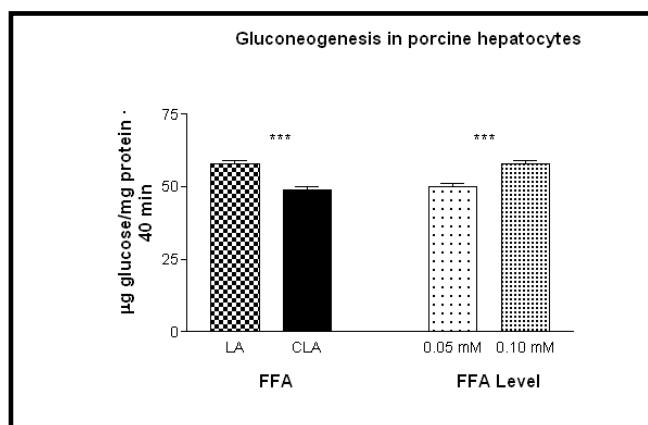


Figure 4. Effects of fatty acids type (CLA or LA) and fatty acids level on gluconeogenesis in porcine hepatocytes*

* Hepatocytes were cultivated in the presence of insulin (10 ng/mL), glucagon (100 ng/mL) and dexamethasone (10 nM). No significant interactions were found between factors. Data are expressed as means ± s.e., n = 5. *** Groups differ at $P < 0.001$

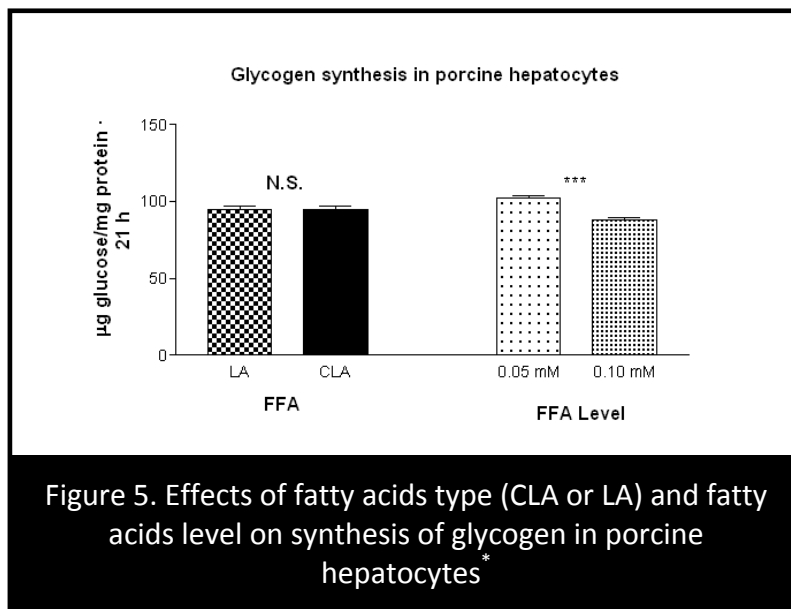


Figure 5. Effects of fatty acids type (CLA or LA) and fatty acids level on synthesis of glycogen in porcine hepatocytes*

* Hepatocytes were cultivated in the presence of insulin (500 ng/mL) and dexamethasone (10 nM) for 21 hours. No significant interactions were found between factors. Data are expressed as means ± s.e., n = 5. *** Groups differ at $P < 0.001$; N.S., Not significant, $P > 0.10$

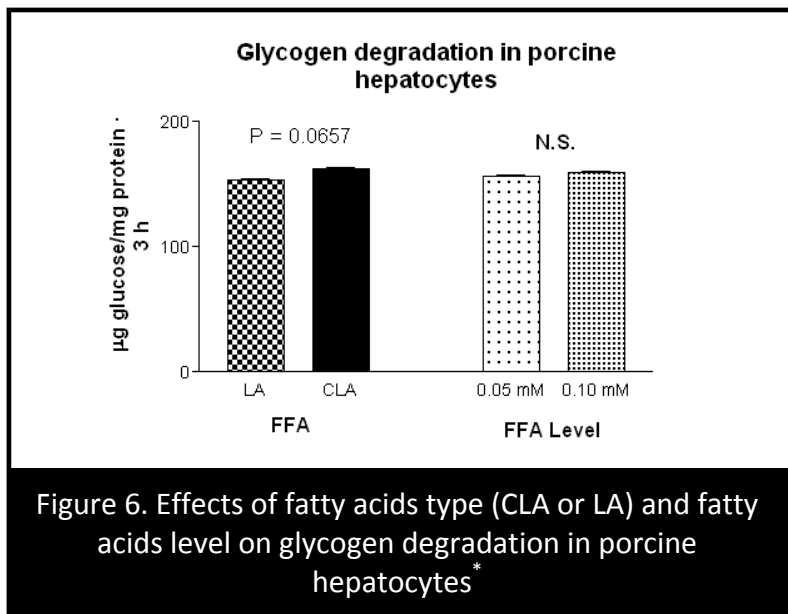


Figure 6. Effects of fatty acids type (CLA or LA) and fatty acids level on glycogen degradation in porcine hepatocytes*

* Hepatocytes were cultivated in the presence of insulin (10 ng/mL), glucagon (100 ng/mL) and dexamethasone (10 nM). No significant interactions were found between factors. Data are expressed as means ± s.e., n = 5. N.S., Not significant, $P > 0.10$

6.3.3. Insulin/Glucagon ratio

Porcine hepatocytes cultivated in the presence of dexamethasone (10 nM), fatty acids and a high Insulin/Glucagon ratio for 24 hours increased (450%) hepatic TG synthesis and cellular TG content (61%; both $P < 0.001$) compared to hepatocytes cultivated with low Insulin/Glucagon ratio (Figure 3). No significant interactions were found between factors in any case.

6.4. DISCUSSION

To our knowledge, present results represent the first direct demonstration of the control of TG synthesis by insulin, glucagon, and dexamethasone in pig hepatocytes. Additionally, the influences of CLA and concentration of fatty acids on pig hepatocytes metabolism have not been previously investigated. In the present study, carnitine was added to all culture medium to ensure that fatty acid entry into mitochondria was not limited by carnitine availability (Agius *et al.*, 1986), and all fatty acids were complexed to albumin (Calder *et al.*, 1990) and at concentrations that simulated physiological conditions (Stangl *et al.*, 1999).

6.4.1. CLA

Liver is an organ that plays a crucial role in metabolism and has been reported to be a key target for CLA (Pariza and Park, 2001). Although Li *et al.* (1999) suggested that CLA modulates body mass through mechanisms involving the IGF system in rats, we have not found any effect of CLA on IGF-1 synthesis in porcine hepatocytes, in line with *in vivo* evidence in young pigs (Fernández-Fígares *et al.*, 2007). Although some workers have reported modest improvement of growth parameters in pigs fed CLA (Thiel-Cooper *et al.*, 2001), circulating IGF-1 was not determined.

No information has been found on how the concentration of fatty acids in the media affects IGF-1 synthesis in hepatocytes. Increasing fatty acids level decreased hepatocytes IGF-1 production in our conditions. The role of IGF-1 in regulating glucose homeostasis and insulin sensitivity has become increasingly recognized over recent years (Dunger *et al.*, 2004). Reduced IGF-1 secretion induced by fatty acids in our study may be interpreted as a derangement on insulin sensitivity.

Pig hepatocytes were refractive to an effect of CLA on TG synthesis in our experimental conditions. Furthermore, fatty acid oxidation in liver of neonatal pigs fed CLA was not affected (Corl *et al.*, 2008). Nevertheless, CLA treatment decreased fatty acid synthase activity and transcripts when compared to LA in pig adipose tissue explant cultures (AAFBV *et al.*, 2008), although esterification was not determined. In rats, CLA decreased hepatic steatosis *in vivo* (Purushotham *et al.*, 2007) and hepatic TG level and increased fatty acid oxidation in cultured hepatocytes (Priore *et al.*, 2007). It should be noted that the pig liver is not an important site of lipogenesis (Lee *et al.*, 2000; Gondret *et al.*, 2001).

It is interesting to note that fatty acids stimulation of hepatic TG synthesis elicited in porcine hepatocytes was blunted in the presence of glucagon, may be, due to increased ketogenesis. In accordance with this hypothesis, low insulin/glucagon ratio markedly increased ketogenesis in porcine hepatocytes (Fernández-Fígares *et al.*, 2004), and pharmacological levels of glucagon abolished lipogenesis while stimulated fatty acid oxidation in rat hepatocytes (McGarry *et al.*, 1980). Furthermore, inhibition of fatty acid oxidation increased TG secretion in perfused rat livers (Yamamoto *et al.*, 1996), and increasing fatty acid concentration raised fatty acid uptake, TG synthesis (Hansson *et al.*, 2004) and lipid accumulation (Granlund *et al.*, 2005) in primary rat hepatocytes.

As for gluconeogenesis, hepatocytes were preincubated with high glucagon for 24 hours, which virtually depleted glycogen stores (data not shown). Media glucose was therefore a consequence essentially from gluconeogenesis and not from glycogen degradation. The effects of CLA on gluconeogenesis have not been extensively studied. In the present study, CLA had an insulin sensitizing effect depressing glucose production compared to LA in porcine hepatocytes, similarly to rat hepatocyte cultures (Cantwell *et al.*, 2001).

Increasing fatty acids in the media increased gluconeogenesis in pig hepatocytes in line with similar findings in perfused livers of rats (Williamson *et al.*, 1969). Stimulation of gluconeogenesis by the level of fatty acids in the media could act to increase glycogenesis by expanding the pool of glycogen precursors and pushing

substrate toward glucose storage (Nordlie *et al.*, 1980; Youn *et al.*, 1986). Although in the present experiment fatty acids decreased glycogen synthesis with high insulin/glucagon ratio, we cannot rule out the possibility that fatty acids elicit a relative increase in glycogenesis under low insulin/glucagon ratio. The link between adequate rates of fatty acid oxidation and gluconeogenesis has been clearly established in the rat (Pégorier *et al.*, 1977), where oxidation of fatty acids supports gluconeogenesis by supplying acetyl-CoA and NADH (Ferré *et al.*, 1981). Furthermore, long chain fatty acid oxidation has been shown to inhibit glycolysis in rat liver (Hue *et al.*, 1988). In hepatocytes isolated from newborn pigs, a medium chain fatty acid, octanoate, failed (Lepine *et al.*, 1991) while oleic acid stimulated gluconeogenesis (Duée *et al.*, 1985), although to a lesser extent than in rat hepatocytes (Ferré *et al.*, 1981), probably because of the pig low capacity for liver fatty acid oxidation *in vitro* (Pégorier *et al.*, 1983).

There is a scarcity of information regarding the effect of CLA on hepatic glycogen in any species. We have shown that porcine hepatocytes are refractive to CLA regarding glycogen synthesis at different CLA concentrations. Furthermore, while glycogen synthesis was diminished on increasing fatty acids in the culture media of pig hepatocytes, glycogen degradation was not affected. Although it has been suggested a regulation of hepatic glucose production by decreasing glycogenolysis when gluconeogenesis is elevated and vice versa (Clare *et al.*, 1991), this mechanism does not seem to apply in porcine hepatocytes. Regarding glycogenolysis, the trend towards increased degradation of glycogen in the presence of CLA encountered in porcine hepatocytes was marginal. Although there is some evidence that the CLA isomer t10c12 may produce liver hypertrophy and insulin resistance via a redistribution of fat deposition that resembles lipodystrophy (Larsen *et al.*, 2003), CLA-induced changes in glucose tolerance and liver metabolism observed in various animal studies are conflicting. In our hands, a CLA mixture containing similar amounts of c9t11 and t10c12-CLA isomers, decreased gluconeogenesis, marginally affecting glycogen turnover in pig hepatocytes.

In our experimental conditions, increased fatty acids concentration induced hepatic insulin resistance increasing endogenous glucose output by decreasing glycogen synthesis and increasing gluconeogenesis without affecting glycogen breakdown. Furthermore, diminished hepatic IGF-1 synthesis could also facilitate peripheral insulin resistance.

6.4.2. Dexamethasone

There is a scarcity of information on the effects of glucocorticoids on IGF-1 production in pigs. Dexamethasone stimulation of IGF-1 production found in our experiments is in accordance with Brameld *et al.* (1995) who showed increased expression of IGF-1 class 1 transcripts by dexamethasone in pig hepatocytes. Furthermore, addition of dexamethasone in the absence of insulin increased IGF-1 production of hepatocytes isolated from suckling piglets (Ajuwon *et al.*, 2003). Culture of rat hepatocytes with dexamethasone (1 μ M) stimulated IGF-1 expression (Beauloye *et al.*, 1999) and production (Arany *et al.*, 1993). Although several studies have reported a positive relationship between circulating IGF-1 and postnatal growth in the pig, results are conflicting (Weiler *et al.*, 1997). While fatty acids synthesis has been studied in great detail, rather less is known about the mechanisms regulating esterification, which mediates TG synthesis. Reduction of TG content elicited by dexamethasone in our experiments is in accordance with a lower rate of TG synthesis. It has been established that ketogenesis increases in parallel with dexamethasone level in pig hepatocyte monolayers (Fernández-Fígares *et al.*, 2004); glucagon had a similar effect to dexamethasone and opposite to insulin, suggesting that dexamethasone may enhance cyclic adenosine monophosphate production. In agreement with this hypothesis, low insulin/glucagon ratio had a similar effect to dexamethasone on TG synthesis and content in our experiments. In rats, however, glucocorticoids stimulate directly hepatic fatty acid and TG synthesis *in vitro* (Diamant and Shafrir, 1975) and *in vivo* (Mantha *et al.*, 1999). Interestingly, lipogenesis was inhibited by dexamethasone

in the absence and stimulated in the presence of insulin (Amatruda *et al.*, 1983), indicating an interaction between insulin and glucocorticoids.

The lower hepatocyte TG content when dexamethasone level was increased could be due to increased fatty acid oxidation (Yamamoto *et al.*, 1996) or increased very low-density lipoprotein secretion. If as suggested by Fernández-Fígares *et al.* (2004), dexamethasone increases cyclic adenosine monophosphate production, then an increased ketogenesis would be expected with higher dexamethasone concentration in the media. According to our results, dexamethasone may modulate IGF-1 and TG synthesis and storage, i.e. the long-term endogenous TG production in porcine hepatocytes.

6.4.3. Insulin/Glucagon ratio

There is lack of information regarding how insulin and glucagon regulate hepatic energy metabolism in pigs. No data on the control of TG synthesis by insulin and glucagon in pig hepatocytes have been found in the literature. Our results indicate that TG synthesis is regulated by glucagon and insulin, so that increasing insulin/glucagon augmented TG content and synthesis in porcine hepatocytes. Fernández-Fígares *et al.* (2004) showed that high levels of insulin increased NADH/NAD⁺. A relative increase in NADH would result in an inhibition of enzymes that would promote the tricarboxylic acid cycle activity (Nelson and Cox, 2000). Consequently, a shift towards TG and glycogen deposition, with a concomitant reduction in ketogenesis would be expected in porcine hepatocytes cultivated with high insulin/glucagon.

Similarly to our results, it has been shown that insulin stimulates cellular TG content in rat (Duerden and Gibbons, 1990) hepatocytes. It has been suggested that insulin inhibits the secretion of apolipoprotein B by enhancing the susceptibility of apolipoprotein B to degradation (Sparks and Sparks, 1994), which would decrease very low-density lipoprotein secretion and increase TG accumulation in the liver. Indeed, in

rats, insulin increased hepatic TG synthesis and reduced the rate of secretion of very low-density lipoprotein, increasing TG content of the hepatocyte (Duerden and Gibbons, 1990). On the other hand, glucagon inhibited TG synthesis in perfused isolated rat liver (Soler-Argilaga *et al.*, 1977) and hepatocytes (Christiansen *et al.*, 1977). Pharmacological levels of glucagon (5 µg/mL), though, abolished lipogenesis and stimulated fatty acid oxidation in rat hepatocytes (McGarry *et al.*, 1980). Glucagon enhancement of ketogenesis has been reported consistently in rats (Witters and Trasko, 1979) and pigs (Fernández-Fígares *et al.*, 2004). Decreased ketogenesis with high insulin/glucagon ratio, as found previously in pig hepatocytes (Fernández-Fígares *et al.*, 2004) would partially explain the increased esterification of fatty acids into cellular TG in our experiment.

In conclusion, esterification of fatty acids into TG is regulated in primary culture of porcine hepatocytes so that it is decreased by dexamethasone and increased by insulin/glucagon ratio. Furthermore, dexamethasone increased liver IGF-1 production. Additionally CLA did not induce insulin resistance in terms of glucose production.

Acknowledgments

The authors wish to thank to Dr. A. Haro for TG analysis, Dr. L. Lara for statistical advice and Professor Dr. J.F. Aguilera for critically reading the manuscript. This work was supported by the Ministry of Science and Education of Spain, grant AGL2002-01562.

6.5. REFERENCES

- AGIUS L, CHOWDHURY MH, ALBERTI KGMM.** (1986). Regulation of ketogenesis, gluconeogenesis and the mitochondrial redox state by dexamethasone in hepatocytom monolayer cultures. *Biochem J* 239, 593–601.
- AJUWON, KM, KUSKE JL, RAGLAND D, ADEOLA O, HANCOCK DL, ANDERSON DB, SPURLOCK ME.** (2003). The regulation of IGF-1 by leptin in the pig is tissue specific and independent of changes in growth hormone. *J Nutr Biochem* 14, 522–30.
- AMATRUDA JM, DANAHY SA, CHANG CL 1983.** The effects of glucocorticoids on insulin-stimulated lipogenesis in primary cultures of rat hepatocytes. *Biochem J* 212, 135–41.
- AMETAJ BN, BOBE G, LU Y, YOUNG JW, BEITZ DC.** (2003). Effect of sample preparation, length of time, and sample size on quantification of total lipids from bovine liver. *J Agric Food Chem* 51, 2105-10.
- ARANY E, STRAIN AJ, HUBE MJ, PHILLIPS ID, HILL DJ.** (1993). Interactive effects of nutrients and hormones on the expression of Insulinlike growth factor binding protein-I (IGFBP-I) mRNA and peptide, and IGF-1 release from isolated adult rat hepatocytes. *J Cell Physiol* 155, 426–35.
- BEAULOYE V, KETELSLEGERS JM, MOREAU B, THISSEN JP.** (1999). Dexamethasone inhibits both growth hormone (GH)-induction of insulin-like growth factor-I (IGF-I) mRNA and GH receptor (GHR) mRNA levels in rat primary cultured hepatocytes. *Growth Horm IGF Res* 9, 205-211
- BEHNIA K, BHATIA S, JASTROMB N, BALIS U, SULLIVAN S, YARMUSH M, TONER M.** (2000). Xenobiotic metabolism by cultured primary porcine hepatocytes. *Tissue Eng* 6, 467–79.

- BRAMELD JM, WELLER PA, SAUNDERS JC, BUTTERY PJ, GILMOUR RS.** (1995). Hormonal control of insulin-like growth factor-I and growth hormone receptor mRNA expression by porcine hepatocytes in culture. *J Endocrinol* 146, 239-45.
- CALDER PC, BOND JA, HARVEY DJ, GORDON S, NEWSHOLME EA.** (1990). Uptake and incorporation of saturated and unsaturated fatty acids into macrophage lipids and their effect upon macrophage adhesion and phagocytosis. *Biochem J* 269, 807-14.
- CANTWELL H, DEVERY R, OSHEA M, STANTON C.** (1999). The effect of conjugated linoleic acid on the antioxidant enzyme defense system in rat hepatocytes. *Lipids* 34, 833-39.
- CHRISTIANSEN RZ.** (1977). Regulation of palmitate metabolism by carnitine and glucagon in hepatocytes isolated from fasted and carbohydrate refeed rats. *Acta Biochim Biophys* 488, 249-62.
- CLEMENT L, POIRIER H, NIOT I, BOCHER V, GUERRE-MILLO M, KRIEF S, STAELS B, BESNARD P.** (2002). Dietary *trans*-10,*cis*-12 conjugated linoleic acid induces hyperinsulinemia and fatty liver in the mouse. *J Lipid Res* 43, 1400-09.
- CLORE JN, GLICKMAN PS, HELM ST, NESTLER JE, BLACKARD WG.** (1991). Evidence for dual control mechanism regulating hepatic glucose output in nondiabetic men. *Diabetes* 40, 1033-40.
- CORL BA, OLIVER SAM, LIN X, ET AL.** (2008). Conjugated linoleic acid reduces body fat accretion and lipogenic gene expression in, neonatal pigs fed low- or high-fat formulas. *J Nutr* 138. 449-454.
- DIAMANT S, SHAFRIR E.** (1975). Modulation of the activity of insulin-dependent enzymes of lipogenesis by glucocorticoids. *Eur J Biochem* 53, 541-46.
- DUÉE PH, PÉGORIER JP, PERET J, GIRARD J.** (1985). Separate effects of fatty acid oxidation and glucagon on gluconeogenesis in isolated hepatocytes from newborn pigs. *Biol Neonate* 47, 77-83.

- DUERDEN JM, GIBBONS GF.** (1990). Storage, mobilization and secretion of cytosolic triacylglycerol in hepatocyte cultures. The role of insulin. *Biochem J* 272, 583-87.
- DUGAN MER, AALHUS JL, SCHAEFER AL, KRAMER JKG.** (1997). The effect of conjugated linoleic acid on fat to lean repartitioning and feed conversion in pigs. *Can J Anim Sci* 77, 723–25.
- DUNGER D, YUEN K, ONG K.** (2004). Insulin-Like Growth Factor I and Impaired Glucose Tolerance. *Horm Res* 62, 101–7.
- FERNÁNDEZ-FÍGARES I, LACHICA M, NIETO R, AGUILERA JF.** (2007). Serum profile of metabolites and hormones of growing Iberian gilts fed diets supplemented with betaine, conjugated linoleic acid or both. In 2nd International Symposium on energy and protein metabolism and nutrition (eds I Ortigues-Marty, N Miraux, W Brand-Williams), pp. 386-6. Vichy, France.
- FERNÁNDEZ-FÍGARES I, SHANNON AE, WRAY-CAHEN D, CAPERNA TJ.** (2004). The role of insulin, glucagon, dexamethasone, and leptin in the regulation of ketogenesis and glycogen storage in primary cultures of porcine hepatocytes prepared from 60 kg pigs. *Domes Anim Endocrinol* 27, 125-40.
- FERRÉ P, SATABIN P, EL MANOUBI L, CALLIKAN S, GIRARD J.** (1981). Relationship between ketogenesis and gluconeogenesis in isolated hepatocytes from newborn rats. *Biochem J* 200, 429-33.
- GONDRET F, FERRÉ P, DUGAIL I.** (2001). ADD-1/SREBP-1 is a major determinant of tissue differential lipogenic capacity in mammalian and avian species. *J Lipid Res* 42, 106-113.
- GRANLUND L, LARSEN LN, NEBB HI, PEDERSEN JI.** (2005). Effects of structural changes of fatty acids on lipid accumulation in adipocytes and primary hepatocytes. *Acta Biochim Biophys* 1687, 23-30.
- GREGORY PG, CONNOLLY CK, TONER M, SULLIVAN SJ.** (2000). In vitro characterization of porcine hepatocyte function. *Cell Transplant* 9, 1–10.

- GUILLOUZO A, GUGUEN-GUILLOUZO C.** (1986). In Research in isolated and cultured hepatocytes (eds A Guillouzo, C Guguen-Guillouzo), John Libbey Eurotext Ltd, Montrouge.
- HANSSON PK, ASZTÉLY A, CLAPHAM JC, SCHREYER SA.** (2004). Glucose and fatty acid metabolism in McA-RH7777 hepatoma cells vs. rat primary hepatocytes: responsiveness to nutrient availability. *Acta Biochim Biophys* 1684, 54-62.
- HOUSEKNECHT KL, VANDEN HEUVEL JP, MOYA-CAMARENA, SY, PORTOCARRERO, CP, PECK LW, NICKEL KP, BELURY MA.** (1998). Dietary conjugated linoleic acid normalizes impaired glucose tolerance in the Zucker diabetic fatty fa/fa rat. *Biochem Biophys Res Commun* 244, 678-82.
- HUE L, MAISIN L, RIDER MH.** (1988). Palmitate inhibits liver glycolysis. Involvement of fructose 2,6-bisphosphate in the glucose/fatty acid cycle. *Biochem J* 251, 541-5. *Erratum in: Biochem J* 253, 935.
- JOSÉ AAFBV, GAMA MAS, LANNA DDP.** (2008). Effects of trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid on gene expression and lipid metabolism of adipose tissue of growing pigs. *Genet Mol Res* 7, 284-94.
- KOEBE HG, SCHILDBERG FW.** (1996). Isolation of porcine hepatocytes from slaughterhouse organs. *Int J Artif Organs* 19, 53-60.
- LARSEN TM, TOUBRO S, ASTRUP A.** (2003). Efficacy and safety of dietary supplements containing CLA for the treatment of obesity: evidence from animal and human studies. *J Lipid Res* 44, 2234-41.
- LEE KC, AZAIN MJ, HAUSMAN DB, RAMSAY TG.** (2000). Somatotropin and adipose tissue metabolism: substrate and temporal effects. *J Anim Sci* 78, 1236-1246.
- LEPINE AJ, BOYD RD, WHITEHEAD DM.** (1991). Effect of colostrum intake on hepatic gluconeogenesis and fatty acid oxidation in the neonatal pig. *J Anim Sci* 69, 1966-74.
- LI Y, SEIFERT MF, NEY DM, GRAHN M, GRANT AL, ALLEN KG, WATKINS BA.** (1999). Dietary conjugated linoleic acids alter serum IGF-1 and IGF binding protein

concentrations and reduce bone formation in rats fed (n-6) or (n-3) fatty acids. *J Bone Miner Res* 14, 1153-62.

MANTHA L, PALACIOS E, DESHAIES Y. (1999). Modulation of triglyceride metabolism by glucocorticoids in diet-induced obesity. *Am J Physiol* 277, R455-64.

MCGARRY JD, FOSTER DW. (1980). Effects of exogenous fatty acid concentration on glucagon-induced changes in hepatic fatty acid metabolism. *Diabetes* 29, 236-40.

NELSON DL, COX MM. (2000). In 3rd ed. Lehninger principles of biochemistry (eds Worth Publishers), New York. USA.

NERURKAR LS, MARINO PA, ADAMS DO. (1981). Quantification of selected intracellular and secreted hydrolases of macrophages. In Manual of macrophage methodology (eds HB Herscovitz, HT Holden, JA Bellanti, A Ghaffer), pp. 229–47. Marcel Dekker, Inc.

NORDLIE RC, SUKALSKI A, ALVARES FL. (1980). Responses of glucose 6-phosphate levels to varied glucose loads in the isolated perfused rat liver. *J Biol Chem* 255, -38.

PARIZA MW, PARK Y. (2001). The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. *Prog Lipid Res* 40, 283-98.

PÉGORIER JP, DUÉE PH, GIRARD J, PERET J. (1983). Metabolic fate of non-esterified fatty acids in isolated hepatocytes from newborn and young pigs. Evidence for a limited capacity for oxidation and increased capacity for esterification. *Biochem J* 212, 93-7.

PÉGORIER JP, FERRÉ P, GIRARD J. (1977). The effects of inhibition of fatty acid oxidation in suckling newborn rats. *Biochem J* 166, 631-4.

PRIORE P, GIUDETTI AM, NATALI F, GNONI GV, GEELLEN MJ. (2007). Metabolism and short-term metabolic effects of conjugated linoleic acids in rat hepatocytes. *Acta Biochim Biophys* 1771, 1299-307.

PURUSHOTHAM A, SHRODE GE, WENDEL AA, LIU LF, BELURY MA. (2007). Conjugated linoleic acid does not reduce body fat but decreases hepatic steatosis in adult Wistar rats. *J Nutr Biochem* 18, 676-84.

- SOLER-ARGILAGA C, RUSSELL RL, HEIMBERG M.** (1977). Reciprocal relationship between uptake of Ca⁺⁺ and biosynthesis of glycerolipids from sn-glycerol-3-phosphate by rat liver microsomes. *Biochem Biophys Res Commun* 78, 1053-9.
- SPARKS JD, SPARKS CE.** (1994). Insulin regulation of triacylglycerol-rich lipoprotein synthesis and secretion. *Acta Biochim Biophys* 1215, 9-32.
- STANGL GI, MÜLLER H, KIRCHGESSNER M.** (1999). Conjugated linoleic acid effects on circulating hormones, metabolites and lipoproteins, and its proportion in fasting serum and erythrocyte membranes of swine. *Eur J Nutr* 38, 271-7.
- SVEDBERG J, BJÖRNTORP P, SMITH U, LÖNNROTH P.** (1990). Free-fatty acid inhibition of insulin binding, degradation, and action in isolated rat hepatocytes. *Diabetes* 39, 570-4.
- THIEL-COOPER RL, PARRISH JRFC, SPARKS JC, WIEGAND BR, EWAN RC.** (2001). Conjugated linoleic acid changes swine performance and carcass composition. *J Anim Sci* 79, 1821-8.
- TSUBOYAMA-KASAOKA N, TAKAHASHI M, TANEMURA K, KIM HJ, TANGE T, OKUYAMA H, KASAI, M, IKEMOTO S, EZAKI O.** (2000). Conjugated linoleic acid supplementation reduces adipose tissue by apoptosis and develops lipodystrophy in mice. *Diabetes* 49, 1534-42.
- WEILER HA, WANG Z, ATKINSON SA.** (1997). Whole body lean mass is altered by dexamethasone treatment through reductions in protein and energy utilization in piglets. *Biol Neonate* 71, 53-9.
- WILLIAMSON JR, BROWNING ET, SCHOLZ R.** (1969). Control of mechanisms of gluconeogenesis and ketogenesis. Effects of oleate on gluconeogenesis in perfused rat liver. *J Biol Chem* 244, 4607-16.
- WITTERS LA, TRASKO CS.** (1979). Regulation of hepatic free fatty acid metabolism by glucagon and insulin. *Am J Physiol* 237, E23-9.

YAMAMOTO K, FUKUDA N, FUKUI M, KAI Y, IKEDA H, SAKAI T. (1996). Increased secretion of triglyceride and cholesterol following inhibition of long-chain fatty acid oxidation in rat liver. *Ann Nutr Metab* 40, 157-64.

YOUN JH, YOUN MS, BERGMAN RN. (1986). Synergism of glucose and fructose in net glycogen synthesis in perfused rat livers. *J Biol Chem* 261, 15960-9.

CAPÍTULO 7

Discusión general

7.1. UTILIZACIÓN DE NUTRIENTES Y ENERGÍA EN EL LECHÓN IBÉRICO

Durante las dos últimas décadas se han publicado numerosos trabajos dedicados a establecer la relación óptima entre lisina (proteína) y energía de la dieta, con el objetivo de mejorar los parámetros productivos del lechón (Nam y Aherne, 1994; Urynek y Buraczewska, 2003; Schneider *et al.*, 2010). La alta eficiencia de conversión del alimento que encontramos en esta fase de desarrollo (Kendall *et al.*, 2008) ofrece la oportunidad de alcanzar unos elevados índices de crecimiento, que vendrán determinados por el genotipo del animal. Las necesidades de energía y proteína están enormemente influenciadas por el genotipo del cerdo. Según van Lunen y Cole (1996), el genotipo es uno de los factores fundamentales que incide sobre la composición corporal y el crecimiento del animal, de forma que, a una misma edad fisiológica, un cerdo de genotipo magro presentará mayor capacidad para la deposición de proteína en sus tejidos y menor retención de grasa que otro de raza no mejorada. Como consecuencia, el crecimiento y la composición corporal de genotipos porcinos diferentes es distinta, y por lo tanto, también lo será el aporte de proteína y energía en la dieta más adecuado para cada el crecimiento óptimo de cada uno de ellos. Siguiendo este razonamiento, trabajos previos de nuestro grupo de investigación demuestran que las necesidades de proteína y energía de cerdos Ibéricos en fase de crecimiento (Nieto *et al.*, 2002) y de crecimiento-cebo (Barea *et al.*, 2007) son claramente distintas a las de cerdos de razas convencionales o mejoradas para fases de crecimiento equivalentes. Sin embargo, el estudio del potencial de crecimiento y las necesidades nutricionales del lechón Ibérico en el periodo comprendido desde el destete hasta aproximadamente los 25 Kg de peso vivo no se había abordado en profundidad. En los trabajos anteriormente mencionados (Nieto *et al.*, 2002; Barea *et al.*, 2007) se ha descrito que las necesidades de energía para el mantenimiento son, en la raza Ibérica, del 6 al 10% menores que las estipuladas para genotipos porcinos convencionales. Este hecho está posiblemente relacionado con la menor proporción

de masa magra que presenta el genotipo Ibérico. Debido a que el potencial para la deposición de proteína disminuye conforme avanza el desarrollo del animal (van Lunen y Cole, 1996), el nivel de proteína adecuado para conseguir un crecimiento y retención de proteína óptimos en el lechón Ibérico podría ser más elevado que el observado para el cerdo Ibérico en crecimiento (de 15 a 50 kg PV), es decir, superior a 130 g PB/kg MS (5,86 g proteína digestible/MJ EM, Nieto *et al.*, 2002). Por ello, nuestro estudio se ha centrado en determinar cómo el lechón Ibérico utiliza la proteína y energía suministrada en la dieta para la deposición de nutrientes en sus tejidos y para el mantenimiento de sus funciones vitales. Con este fin, hemos empleado un diseño factorial, similar al aplicado por Kyriazakis y Emmans (1992) y Fuller *et al.* (1995), entre otros autores, en el que hemos utilizamos 4 dietas de diferente contenido en proteína, con una composición ideal en aminoácidos (BSAS, 2003), ofrecidas en 2 planos de alimentación. Con este planteamiento, hemos examinado la respuesta al aporte de proteína y energía de la dieta sobre el ritmo de crecimiento, la deposición de nutrientes y energía en la canal, y el organismo completo, el peso relativo de los órganos, y la composición de los principales componentes de la canal en el lechón, desde los 10 a 25 Kg de peso vivo. Además, hemos estimado las necesidades energéticas para el mantenimiento y la eficiencia de utilización de la energía metabolizable para el crecimiento y la formación de proteína y grasa en sus tejidos.

7.1.1. Crecimiento y otros parámetros productivos

El mayor crecimiento observado en nuestro estudio se obtuvo con los animales alimentados con la dieta que contenía 201 g PB/Kg MS. Asumiendo el coeficiente medio de digestibilidad aparente del N obtenido en los lechones que consumieron este tratamiento (0,788), esta cifra sería equivalente a 10,8 g proteína digestible/MJ energía metabolizable (EM), equivalente a 0,99 g lisina total/MJ EM, teniendo en cuenta el contenido en lisina de la dieta. El perfil de aminoácidos de la proteína se ajustó según el concepto de proteína ideal (NRC, 1998; BSAS, 2003); no obstante, el aporte de N para la síntesis de aminoácidos no esenciales podría haber sido limitante,

ya que no se observó una estabilización en los parámetros de crecimiento con los tratamientos ensayados sino que éstos aumentaron de forma lineal, según muestra el análisis polinomial de la concentración proteica de la dieta sobre estos parámetros. Los valores más altos observados para la ganancia media diaria (GMD) y eficiencia de transformación, expresados en función de los g de alimento consumido (G:I) o de la ingesta de EM (G:IEM), se alcanzaron en los animales que recibieron la dieta anteriormente citada, a un nivel de alimentación del 95% *ad libitum* (11,9 MJ EM/día o 1,478 KJ/Kg^{0,75} y día). Esta ingesta se traduce en un aporte equivalente a 3,5 veces las necesidades de energía para el mantenimiento (EM_m), teniendo en cuenta el valor de dicha variable determinado en el presente trabajo (427 KJ/Kg^{0,75} y día), muy próximo a una estimación previa, obtenida durante el periodo de crecimiento de 15 a 50 Kg de PV (422 KJ/Kg^{0,75} y día; Nieto *et al.*, 2002). Los resultados generados en este estudio indican que el potencial de crecimiento del lechón Ibérico disminuye bruscamente conforme avanza la fase de crecimiento. Se aprecia un descenso de más del 35% para los parámetros G:I y G:IEM, al compararlo con los correspondientes a cerdos Ibéricos en fase de crecimiento de 15 a 50 Kg de PV, que consumieron una dieta con una relación adecuada de proteína/energía (Nieto *et al.*, 2002). Sin embargo, la velocidad de crecimiento de los lechones Ibéricos es moderada cuando se la compara con la de lechones de razas convencionales, de PV similar, y bajo condiciones experimentales análogas a las del presente trabajo (van Lunen y Cole, 1998; Le Bellego y Noblet, 2002; Urynek y Buraczewska, 2003; Kendall *et al.*, 2007; Schneider *et al.*, 2010).

Los coeficientes medios de digestibilidad (ED/EB) y metabolicidad (EM/EB) y el cociente EM/ED medio, obtenidos en lechones Ibéricos alimentados al 95% de *ad libitum* (0,827, 0,813, y 0,982, respectivamente) son muy próximos a los registrados en trabajos anteriores para cerdos Ibéricos en fase de crecimiento (de 15 a 50 Kg de PV; 0,839, 0,820, y 0,976, respectivamente; Nieto *et al.*, 2002), alimentados con dietas basadas en los mismos ingredientes y a un plano de alimentación semejante. Los coeficientes de digestibilidad aparente del N obtenido en ambos experimentos fueron también similares (0,768 vs. 0,767). Este análisis nos indica que el lechón Ibérico

parece alcanzar una capacidad digestiva análoga a la que presenta el animal en fases posteriores de desarrollo.

7.1.2. Retención corporal de proteína

Los resultados del contraste de polinomios aplicado en nuestro estudio muestran que no se alcanzó una estabilización en el valor de deposición proteica corporal (DP) con los tratamientos empleados, es decir, no se ha logrado estimar el máximo valor para este parámetro (DP_{max}) en el lechón Ibérico. La DP más elevada observada en nuestras condiciones experimentales (59,9 g/día) se alcanzó cuando los lechones consumieron la dieta con mayor contenido en proteína (201 g PB/Kg MS) al nivel de alimentación próximo a *ad libitum*. Este valor supone aproximadamente un 83% de la DP_{max} estimada para cerdos Ibéricos en las fases de crecimiento y de cebo (74 y 71 g/día, respectivamente), alimentados con dietas con un contenido en proteína de 129 g PB/Kg MS (o 6,86 g de proteína digestible/MJ EM, Nieto *et al.*, 2002), y 95 g de proteína digestible/Kg MS (5,17 g Pdig/MJ EM, Barea *et al.*, 2007), respectivamente, ambas formuladas de acuerdo al concepto de proteína ideal (BSAS, 2003). Moughan y Verstegen (1988), y Möhn y de Lange (1998) sostienen que la DP_{max} podría alcanzarse relativamente temprano en la vida del animal, aproximadamente a los 20 Kg de PV. Aún cuando el empleo de niveles superiores de proteína dietética podría haber conducido a un aumento en la DP en los lechones, los resultados obtenidos en este trabajo no nos permiten conocer si el proceso de DP en el cerdo Ibérico se ajusta al modelo propuesto por estos autores. En cualquier caso, el patrón de deposición proteica en el cerdo Ibérico en crecimiento corresponde al de un animal de desarrollo temprano, con bajo potencial para la deposición de tejido magro. De esta forma, es recomendable el uso de dietas prácticas con una relación proteína/energía más reducida que la empleada para lechones de razas convencionales para lograr una producción eficiente, sostenible y económicamente más rentable en este periodo de desarrollo del animal.

La estimación de la eficiencia marginal de la deposición de proteína corporal en el lechón ($\Delta DP:\Delta EM$; g/MJ) obtenida para las dietas de mayor concentración proteica, 4,39 g/MJ EM, es considerablemente superior a la observada previamente para cerdos Ibéricos de mayor peso vivo (2,81 g/MJ EM, Nieto *et al.*, 2002; 1,34 g/MJ EM, Barea *et al.*, 2007). La disminución en la eficiencia de DP a medida que el cerdo Ibérico aumenta su peso se refleja también en la baja relación entre la proteína depositada y la ingerida, o entre ésta y la proteína digestible, deducidas en los experimentos citados anteriormente, a partir de animales que consumieron dietas con una relación proteína/energía óptima para cada fase de desarrollo. Este descenso en la eficiencia marginal de deposición proteica a medida que avanza la edad (o peso) del animal, ha sido también apuntado por otros autores, que han registrado observaciones similares en cerdos de genotipo convencional (Black *et al.*, 1986; Bikker, 1994).

7.1.3. Utilización de la energía de la dieta para el crecimiento y el mantenimiento de las funciones vitales

Para la estimación de las necesidades energéticas de mantenimiento (EM_m) hemos utilizado técnicas de regresión lineal y múltiple. Mediante ellas, esta estimación se obtiene relacionando la ingesta de energía metabolizable (IEM) con la retención energética total (ER), en el modelo simple, o bien, con la retención energética en forma de proteína (ERP) y de grasa (ERG), en el múltiple. Hemos optado por la estimación proporcionada por el modelo lineal, por considerarla más exacta. El valor derivado de este modelo es 427 KJ/Kg PV^{0,75}. día. Una vez obtenido este valor, se ha deducido de la IEM total de cada animal el valor correspondiente a EM_m . De este modo, se ha calculado la ingesta de energía metabolizable para la producción, EM_p , a la que hemos relacionado, mediante el modelo de regresión múltiple, con ERP y ERG. De este modo se han estimado las eficiencias parciales para la retención corporal de proteína y grasa, k_p y k_f , respectivamente. La eficiencia neta de utilización de la EM para el crecimiento, k_g , proporcionada por la ecuación lineal, fue 0,552. Al eliminar el término correspondiente a EM_m del modelo de regresión múltiple se reduce, al menos

parcialmente, la influencia que este término ejerce sobre las estimaciones de k_p y k_f , descritas por otros autores (Noblet *et al.*, 1999). La estimación de EM_m obtenida para el lechón Ibérico (427 KJ/Kg PV^{0,75}. día) es muy similar a la observada en cerdos Ibéricos durante la fase de crecimiento, de 15 a 50 Kg de PV (422 KJ/Kg PV^{0,75}. día; Nieto *et al.*, 2002), y aproximadamente un 4 al 7% inferior a los valores deducidos para cerdos de genotipos convencionales (458 y 443 KJ/kg PV^{0,75}. día; ARC, 1981; NRC, 1998, respectivamente). La eficiencia neta de utilización de la EM para el crecimiento obtenida, 0,552, se encuentra próxima a los valores descritos anteriormente para las fases de crecimiento y crecimiento-cebo en cerdos Ibéricos (0,582 y 0,545, Nieto *et al.*, 2002; Barea *et al.*, 2007, respectivamente), a pesar de las grandes diferencias entre la deposición relativa de grasa y proteína registradas en los distintos experimentos. En cualquier caso, todas estas estimaciones de k_g son bajas si se tiene en cuenta la elevada deposición de grasa que caracteriza a este genotipo porcino, y la alta eficiencia energética que desde el punto de vista bioquímico presenta este proceso biológico. Una de las principales dificultades que se atribuye al cálculo de k_p y k_f mediante el modelo de regresión múltiple es la elevada correlación existente entre la deposición de proteína y grasa, especialmente en el caso de animales sometidos a un nivel de alimentación moderado o reducido, o en animales genéticamente muy magros (Noblet *et al.*, 1999). Sin embargo, Noblet *et al.* (1999) en un estudio realizado con genotipos porcinos ampliamente variables en su potencial para la deposición proteica (incluyendo cerdos Pietrain y Meishan), encontraron que la correlación matemática que presentaban ambos procesos biológicos era bastante reducida (0,107), lo que justificaría el uso de las técnicas de regresión múltiple para el cálculo de dichas eficiencias. La eficiencia parcial de utilización de la EM para la deposición de grasa observada en el presente experimento ($k_f = 0,672$), se encuentra en el extremo inferior del rango de valores anteriormente obtenidos en cerdos Ibéricos de mayor peso (0,812 y 0,658, respectivamente, para cerdos en crecimiento y crecimiento-cebo), mientras que la estimación de k_p (0,378) es superior a las observadas en cerdos en crecimiento y crecimiento-cebo (0,303 y 0,218, respectivamente). Sin embargo, todo este rango de valores de k_p deducidos en los distintos experimentos realizados en el cerdo Ibérico

son considerablemente inferiores a los valores considerados en la literatura para genotipos convencionales (0,54-0,56; ARC, 1981; NRC, 1998). Esta reducida eficiencia parcial para la retención corporal de proteína puede estar relacionada con las altas tasas de renovación proteica muscular, descritas en esta raza, en comparación con las de genotipos porcinos convencionales. Esto daría lugar a una síntesis y degradación proteica muscular comparativamente más elevadas, aún cuando la masa proteica de este genotipo es considerablemente menor que la de cerdos convencionales (Rivera-Ferre *et al.*, 2005), y por lo tanto, conllevaría un gasto energético superior. Carecemos de una explicación que justifique las bajas estimaciones de k_f y k_g obtenidas consistentemente en los distintos experimentos realizados. Para aclarar este aspecto, probablemente es necesario realizar estudios adicionales que aborden en profundidad el proceso de síntesis y deposición de grasa en los tejidos del cerdo Ibérico.

7.1.4. Composición y retención de energía y nutrientes en la canal

En relación a la composición de la canal del lechón Ibérico, los animales que consumieron las dietas de mayor concentración proteica (201 y 176 g PB/Kg MS) presentaron un cantidad de proteína en la canal próxima al margen inferior del intervalo de los valores descritos en la bibliografía para lechones de razas convencionales o mejoradas, de peso vivo similar (de 160 a 176 g proteína/Kg canal, y 18,7 a 25 Kg peso; Shields *et al.*, 1983; Thomke *et al.*, 1995; Dritz *et al.*, 1996; Owen *et al.*, 2001; Conde-Aguilera *et al.*, 2010b). Continuando con esta comparación, el contenido en agua de la canal fue entre el 7 y el 13% menor, los minerales se encontraron en el margen superior del intervalo descrito, y el contenido en grasa fue muy superior en lechones Ibéricos (de 50 a 100 g más de grasa/Kg) que en lechones de genotipo convencional. La relación agua/proteína de la canal osciló entre 3,7 y 3,9, algo mayor a la estimada en cerdos Ibéricos en fase de crecimiento (de 3,5 a 3,6; Nieto *et al.*, 2003), y ligeramente inferior a los valores detectados en lechones de razas convencionales (de 3,9 a 4,3). Lógicamente, la composición de la canal al sacrificio está

muy influenciada por la deposición diaria de proteína y energía que tienen lugar en el organismo del lechón. Estos parámetros alcanzaron unos valores medios de 40,3 y 60,6 g/día para la deposición de proteína y grasa, respectivamente, en la canal de los lechones alimentados con las dietas que contenían 201 y 176 g PB/Kg MS ofrecidas al 95 % de *ad libitum*. La relación grasa/proteína en la retención diaria de nutrientes de la canal observada fue 1,3, sensiblemente superior a las registradas en lechones de genotipo convencional (de 0,56 a 0,88; Dritz *et al.*, 1996; Owen *et al.*, 2001, Trindade Neto *et al.*, 2004), lo que enfatiza el marcado perfil lipogénico del genotipo Ibérico incluso a esta fase tan temprana de desarrollo.

Los valores más elevados de deposición proteica en la canal se alcanzaron en los lechones que consumían las dos dietas de contenido proteico superior, ofrecidas al 95% de *ad libitum*. El valor medio obtenido, 40,3 g proteína/día, se encuentra relativamente próximo a los valores máximos registrados para la canal de cerdos Ibéricos en fase de crecimiento, 54,6 g/día, (Nieto *et al.*, 2003) y de fase de crecimiento-cebo, 55,7 g/día (Barea *et al.*, 2006), obtenidos en animales que consumieron dietas de adecuada relación proteína/energía para cada una de esas fases, ofrecidas al 95% de *ad libitum*. En el caso del presente experimento, los valores de DP en la canal no difirieron significativamente entre las dos dietas de más alta concentración proteica. Sin embargo, el hecho de que el análisis polinomial del nivel de proteína dietética sobre este parámetro arroje un efecto lineal significativo, indica que el máximo nivel de DP en la canal del lechón Ibérico podría no haberse alcanzado. En cualquier caso, la proteína en la canal se depositó de una forma más eficiente en el lechón Ibérico que en los cerdos de mayor edad, según se deduce al considerar el cociente proteína depositada/IEM (3,58 *versus* 2,12 y 1,15 g/MJ, respectivamente). A pesar de las cifras similares encontradas para el nivel de deposición proteica en la canal entre cerdos Ibéricos en distinta fase de crecimiento, al comparar la ganancia de grasa en la canal en lechones de 10 a 25 Kg y en cerdos en crecimiento (Nieto *et al.*, 2003) y crecimiento-cebo (Barea *et al.*, 2006) observamos que éstas fueron de 56, 157 y 355 g/día, respectivamente, para cada grupo. Estas cifras ponen de manifiesto la

marcada tendencia del genotipo Ibérico a la acumulación de lípidos en sus tejidos y su limitada capacidad para el crecimiento de tejido magro.

A diferencia del cerdo Ibérico en crecimiento (15 a 50 Kg PV), en el que los contenidos en proteína y grasa de la canal permanecieron prácticamente invariables a pesar del amplio margen de concentraciones proteicas de la dieta ensayadas (de 101 a 223 g PB/Kg MS; Nieto *et al.*, 2003), en el lechón, el contenido y la deposición diaria de proteína de la canal se redujo considerablemente al disminuir la concentración proteica de la dieta hasta niveles deficientes. Paralelamente, a la vez que se disminuyó la DP, se produjo un aumento del 15 al 20% en la retención diaria de grasa en la canal. Así pues, el lechón Ibérico parece ser más sensible a la restricción proteica que los cerdos de pesos superiores, lo que pone de manifiesto la importancia de conocer la adecuada relación proteína/energía en la dieta que permita alcanzar el óptimo crecimiento magro del lechón.

No hemos hallado estudios en la bibliografía sobre el efecto del contenido proteico de la dieta sobre los componentes de la canal en cerdos de peso vivo similar al de los utilizados los utilizados en este estudio, aunque sí existe información disponible para animales de peso vivo superior, próximos a los habituales de sacrificio para la venta en el mercado. Wagner *et al.* (1999) utilizaron cerdos castrados y cerdas de 5 líneas genéticas diferentes para estudiar las alteraciones de la composición corporal durante el crecimiento y desarrollo de animal desde los 25 a los 152 Kg de PV. A los 25 Kg de PV, los lechones del estudio de Wagner, alimentados con dietas formuladas para permitir una máxima DP, consumidas *ad libitum*, presentaron canales de mayor longitud (3,4-3,7 cm superiores) y con mayor proporción de tejido magro (9% mayor, en promedio), mientras que el grosor del tocino dorsal a nivel de la última costilla fue un 35% menor que el registrado en los lechones de nuestro estudio. Esta comparación de las medidas físicas de la canal confirma, desde otro ángulo, la tendencia hacia la adiposidad del lechón Ibérico.

El peso relativo de los distintos cortes magros de la canal en el lechón Ibérico fue más susceptible a cambios en el contenido proteico de la dieta y el nivel de alimentación que los de cerdos Ibéricos en crecimiento. La proporción de solomillo, jamón y de tejido magro total de la canal aumentó al elevarse la concentración proteica de la dieta en los primeros, mientras que en los cerdos Ibéricos en crecimiento, únicamente aumentó la proporción de solomillo cuando se incrementó la proteína dietética (Nieto *et al.*, 2003). Respecto a los efectos provocados por cambios en el nivel de alimentación, la longitud de la canal y la proporción relativa de los principales cortes magros de la misma (excepto la paleta) fueron mayores en los lechones con alimentación restringida, que en los que consumieron la dieta a niveles cercanos al consumo *ad libitum*. En general, el efecto de la restricción de alimento fue más pronunciado en los lechones que en los cerdos Ibéricos en crecimiento (Nieto *et al.*, 2003), y dio lugar a un incremento en las proporciones de tejido magro en paleta y jamón y una disminución general de los depósitos de grasa. Una de las consecuencias de la reducción de la ingesta de EM es la producción de canales más magras. Esto es debido a que se incrementa la proporción de EM sobre mantenimiento dedicada a la DP (van Milgen *et al.*, 2000). Sin embargo, esta estrategia nutricional tiene como consecuencia que se reduce la DP total y, a la vez, se incrementa el tiempo necesario para alcanzar un determinado peso vivo. Por lo tanto, la adopción de esta estrategia para conseguir un aumento del tejido magro en la canal dependerá de los objetivos perseguidos en cada situación específica.

7.1.5. Efecto de la concentración proteica de la dieta y del nivel de alimentación sobre el peso relativo de vísceras

Con la excepción del riñón, el peso relativo de los órganos y vísceras del lechón Ibérico no se vio afectado por cambios en el contenido en proteína de la dieta, lo que guarda similitud con lo observado en lechones de genotipo convencional que consumieron dietas cuyo contenido proteico que osciló entre 169 y 224 g PB/Kg MS (Le Bellego y Noblet, 2002). No obstante, en cerdos de razas convencionales de peso vivo superior, un exceso en el aporte proteico en la dieta parece estar asociado con un incremento de la masa visceral (Le Bellego *et al.*, 2002). En otro estudio de nuestro grupo de investigación, también observamos un incremento del peso de los tejidos del tracto digestivo en cerdos Ibéricos en crecimiento, alimentados con dietas con exceso de proteína (Nieto *et al.*, 2003). De forma similar a lo observado en el presente estudio, también se registró un mayor peso relativo de los riñones en cerdos Ibéricos en crecimiento y crecimiento-cebo conforme aumentó el contenido proteico de la dieta, probablemente debido a una mayor actividad metabólica que se traduce en una mayor síntesis y excreción de urea (Nieto *et al.*, 2003; Barea *et al.*, 2006).

En los lechones Ibéricos sometidos a un nivel de alimentación cercano a *ad libitum*, la proporción media de vísceras totales fue 157 g/Kg peso vivo vacío (PVV), considerablemente superior a la observada en cerdos Ibéricos en crecimiento (127 g/Kg PVV, Nieto *et al.*, 2003), crecimiento-cebo (102 g/Kg EBW, Barea *et al.*, 2006) y acabado (97 g/Kg PVV, García-Valverde *et al.*, 2008), alimentados todos al 95% de *ad libitum*. La reducción en las proporciones relativas de los tejidos viscerales es un proceso que ocurre a medida que el animal madura (Kolstad y Vangen, 1996), y ha sido un aspecto ampliamente estudiado en la bibliografía (Coudenys, 1998; de Lange *et al.*, 2003; Wiseman *et al.*, 2007). En el presente trabajo, la elevación del nivel de alimentación condujo a un incremento del peso relativo del tracto digestivo, hígado, riñones y masa total visceral. Esta respuesta se ha descrito anteriormente para cerdos de genotipo magro y obeso, en diferentes fases de crecimiento (Koong *et al.*, 1983;

Rao y MacCracken, 1992; Nieto *et al.*, 2003; Barea *et al.*, 2006). Un aumento en las proporciones relativas de estos tejidos viscerales, metabólicamente mucho más activos que el músculo (Rivera-Ferre *et al.*, 2005), puede tener como consecuencia un aumento en la proporción de la IEM dedicada al mantenimiento de las funciones corporales.

Como conclusión, podemos decir que el análisis de los distintos parámetros estudiados en este trabajo ponen de manifiesto que existen diferencias metabólicas notables entre el cerdo Ibérico en la fase de crecimiento comprendida entre el destete y los 25 Kg de peso vivo, y lechones de genotipos convencionales o magros. Estas divergencias conciernen especialmente a la eficiencia de utilización de los nutrientes y energía de la dieta, más reducida en el genotipo Ibérico, y a los ritmos de deposición de proteína y grasa en la canal y el organismo completo, característicos de un animal con tendencia a la lipogénesis. Aunque no se ha podido determinar cual es el techo biológico para la deposición de proteína en el genotipo Ibérico durante esta fase temprana del crecimiento, las dietas prácticas formuladas para esta fase debieran contener al menos 201 g PB/MS, equivalente a 13.7 g proteína ideal/MJ EM, o 0,99 g lisina total/MJ EM, para obtener un crecimiento óptimo y favorecer la deposición de tejido magro en la canal.

7.2. ESTUDIO EN HEPATOCITOS

Los resultados obtenidos constituyen la primera demostración directa del control de la síntesis de triglicéridos (TG) por insulina, glucagón y dexametasona en células hepáticas porcinas. Además, nuestro trabajo es pionero en el estudio del efecto del ácido linoleico conjugado (CLA) y la concentración de ácidos grasos sobre el metabolismo de hepatocitos porcinos.

En el presente experimento, se adicionó carnitina al medio para permitir la entrada de ácidos grasos a la mitocondria (Agius *et al.*, 1986). Además, los ácidos grasos se acomplejaron a albúmina para simular condiciones fisiológicas (Calder *et al.*, 1990). De un mismo modo, los niveles de concentración del ácido graso linoleico (LA) y CLA utilizados en este estudio (0,05 y 0,10 mM) corresponden con concentraciones fisiológicas en el organismo (Stangl *et al.*, 1999).

7.2.1. Efecto del CLA sobre el hepatocito

Los ácidos grasos que llegan al hígado pueden ser esterificados para formar TG o bien ser oxidados dando lugar a acetyl-CoA, que puede oxidarse a su vez en el ciclo de Krebs u originar cuerpos cetónicos si se encuentra en exceso. El hígado es un órgano que juega un papel crucial en el metabolismo y se considera una diana central para el CLA (Pariza y Park, 2001). Sin embargo, aún se desconoce el mecanismo exacto por el que el CLA provoca sus efectos sobre este órgano.

A diferencia del efecto modulador del CLA sobre la masa corporal observado en ratas por Li *et al.* (1999) a través de mecanismos relacionados con el sistema de IGF, no hemos encontrado ningún efecto del CLA sobre la síntesis de IGF-I en hepatocitos porcinos, en coincidencia con estudios *in vivo* donde el CLA no afectó los niveles plasmáticos de IGF-I (Ramsay *et al.*, 2001; Bontempo *et al.*, 2004; Fernández-Fígares *et al.*, 2007b). No obstante, otros autores observaron una modesta mejora de los

parámetros de crecimiento en cerdos alimentados con CLA, pero en ninguno de los estudios se determinó la IGF-I circulante (Thiel-Cooper *et al.*, 2001).

En la bibliografía no hallamos ningún estudio que relacione el nivel del ácido graso en el medio y la síntesis de IGF-I. En el presente trabajo observamos que al aumentar la concentración del ácido graso, se redujo la producción de IGF-I utilizando concentraciones de dexametasona en el medio del orden de 100 nM. El conocimiento del papel de la IGF-I sobre la homeostasis de la glucosa y la sensibilidad a la insulina se ha reforzado en la última década (Dunger *et al.*, 2004). En nuestro estudio, la reducción de la producción de IGF-I inducida por el nivel del ácido graso podría interpretarse como una disminución en la sensibilidad a la insulina.

Respecto al CLA, no encontramos ningún efecto sobre la síntesis de TG en el cultivo de hepatocitos porcinos en nuestras condiciones experimentales. En cerdos neonatos, el CLA tampoco mostró ningún efecto sobre la oxidación de ácidos grasos hepática (Corl *et al.*, 2008). Sin embargo, se ha observado que el CLA disminuyó la actividad de la ácido graso sintasa y su nivel de transcripción en comparación con el tratamiento de LA en cultivos de explantes de tejido adiposo porcino (AAFV *et al.*, 2008), aunque no se determinó el nivel de esterificación. En ratas, el CLA disminuyó *in vivo* la esteatosis y el nivel de TG hepáticos (Purushotham *et al.*, 2007) y aumentó la oxidación de ácidos grasos en cultivo de hepatocitos (Priore *et al.*, 2007).

Es interesante el hecho de que la estimulación de la síntesis de TG al aumentar la concentración ácidos grasos en hepatocitos porcinos fue más pronunciada en ausencia de glucagón, lo que probablemente disminuyó la cetogénesis aumentándose los procesos de esterificación de ácidos grasos hacia triglicéridos. A favor de esta hipótesis observamos que en estudios donde se empleó una baja relación Insulina/Glucagón en el medio se produjo un aumento de la cetogénesis (Fernández-Fígares *et al.*, 2004), de un mismo modo que a concentraciones farmacológicas (5 µg/ml) de glucagón en el medio se inhibió la lipogénesis y se estimuló la oxidación de los ácidos grasos en hepatocitos de rata (McGarry y Foster, 1980). Por otro lado, la inhibición de la oxidación de ácidos grasos provocó un aumento en la producción de TG en hígado de rata perfundido (Yamamoto *et al.*, 1996), y el aumento en la

concentración de ácidos grasos del medio elevó la absorción de ácidos grasos, la síntesis de TG (Hansson *et al.*, 2004) y la acumulación lipídica (Granlund *et al.*, 2005) en cultivos primarios de hepatocitos de rata.

El efecto del CLA sobre la gluconeogénesis aún no se ha descrito en profundidad en la bibliografía. En este trabajo, la glucosa presente en el medio provino esencialmente de la gluconeogénesis y no de la degradación de glucógeno ya que los hepatocitos se sometieron a una preincubación con una concentración alta de glucagón durante 24 horas, lo cual agotó las reservas de glucógeno (datos no presentados). El tratamiento con CLA aumentó la sensibilidad a la insulina, lo que se tradujo en una disminución de la producción de glucosa en comparación con el tratamiento con LA en hepatocitos porcinos, al igual que en hepatocitos de rata (Cantwell *et al.*, 1999). Igualmente, la ingesta del 0,4% de 10-*trans*, 12-*cis* CLA por ratones provocó una disminución del nivel de ARN mensajero de la enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinasa en ratones, enzima implicada en la gluconeogénesis (Clement *et al.*, 2002).

La estimulación de la gluconeogénesis que observamos bajo una alta concentración de ácidos grasos en el medio también se ha encontrado en otros estudios realizados en hígados perfundidos de rata (Williamson *et al.*, 1969; Martín-Requero *et al.*, 1993). La estimulación de la gluconeogénesis puede aumentar el *pool* de precursores del glucógeno facilitando la síntesis del mismo (Nordlie *et al.*, 1980; Youn *et al.*, 1986). No podemos descartar una estimulación de la síntesis de glucógeno por la concentración de ácido graso presente en un medio que muestra una baja relación Insulina/Glucagón.

La relación entre unos niveles adecuados de oxidación de ácidos grasos y gluconeogénesis está bien establecida en roedores (Pégorier *et al.*, 1977) donde la oxidación de ácidos grasos mantiene los niveles de gluconeogénesis administrando los sustratos necesarios tales como el acetyl-CoA y el NADH (Ferré *et al.*, 1979; 1981). Asimismo, se ha observado que la oxidación de ácidos grasos de cadena larga provoca la inhibición de la glucólisis en el hígado de ratas (Hue *et al.*, 1988). En hepatocitos aislados de cerdos neonatos la situación es compleja. Lepine *et al.* (1991) mostraron

que el aumento en la oxidación de ácidos grasos, específicamente de octanoato, no provocaba la estimulación de la gluconeogénesis. Sin embargo, el oleato elevó la producción de glucosa a partir de lactato y la inhibición de la oxidación de ácidos grasos endógena redujo la gluconeogénesis (Duée *et al.*, 1985), lo cual sugiere la existencia de una relación entre la oxidación de ácidos grasos y la gluconeogénesis. Aún así, la contribución de la oxidación de ácidos grasos en la regulación de la gluconeogénesis es menor que los niveles observados en hepatocitos aislados de rata (Ferré *et al.*, 1981), debido probablemente a la baja capacidad para la oxidación hepática de ácidos grasos *in vitro* encontrada en cerdos neonatos o lechones cuando se compara con el de ratas (Pégorier *et al.*, 1983; Ferré *et al.*, 1983).

Existe escasa información en la bibliografía sobre el estudio del efecto del CLA sobre el glucógeno hepático en las diferentes especies. En nuestro estudio, observamos que los hepatocitos porcinos responden ante diferentes niveles de CLA en presencia de insulina en relación a la síntesis de glucógeno. Aunque la menor concentración de ácidos grasos del medio provocó el aumento de la síntesis de glucógeno, en el caso de la degradación de glucógeno, no observamos ningún efecto de la concentración de ácido graso. Clore *et al.* 1991 indicaron una regulación de la producción de glucosa mediante la disminución de la glucogenolisis durante situaciones de alta gluconeogénesis y viceversa, pero parece que este mecanismo no se aplica a hepatocitos porcinos.

Respecto al efecto del CLA en la glucogenolisis, descubrimos una tendencia hacia una mayor degradación de glucógeno en hepatocitos porcinos en presencia de CLA en comparación con ácido linoleico. Mashek y Grummer (2004), investigaron el efecto de diferentes isómeros del CLA (9-*cis*, 11-*trans*, y CLA 10-*trans*, 12-*cis*) a concentraciones de 0,1 or 1,0 mM y observaron un aumento del contenido en TG en comparación con el control de LA, pero sin ningún efecto sobre la gluconeogénesis o el contenido en glucógeno de hepatocitos bovinos. Estudios realizados en humanos y roedores demuestran que el empleo de los isómeros 10-*trans*, 12-*cis* del CLA provocan hipertrofia del hígado y resistencia a la insulina a través de la redistribución de la deposición de grasa, de forma similar a la lipodistrofia (Larsen *et al.*, 2003). No

obstante, muchas de las modificaciones provocadas por el CLA sobre el metabolismo hepático y la tolerancia a la glucosa en diferentes razas animales son contradictorias. El CLA mejora el metabolismo de la glucosa, como hemos comprobado, mediante el descenso de las concentraciones de glucosa o insulina, o la disminución de la tolerancia a la glucosa en modelos diabéticos (Houseknecht *et al.*, 1998). Aún así, se ha observado hiperinsulinemia en ratones con dietas suplementadas con CLA (Tsuboyama-Kasaoka *et al.*, 2000). A pesar de estos datos, en humanos el CLA no provocó efecto alguno sobre la glucosa sanguínea en ayunas o sobre la concentración plasmática de insulina (Larsen *et al.*, 2006), lo cual coincide con estudios realizados en porcino (Stangl *et al.*, 1999; Fernández-Fígares *et al.*, 2007b). Se ha comprobado que los isómeros 10-*trans*, 12-*cis* están relacionados con la resistencia a la insulina (Ryder *et al.*, 2001). En nuestro estudio, una mezcla de CLA con una composición similar en los isómeros 9-*cis*, 11-*trans* y 10-*trans*, 12-*cis*, utilizados habitualmente en alimentación humana, redujo la gluconeogénesis, afectando a la tasa de síntesis y degradación del glucógeno y/o la síntesis de TG en hepatocitos porcinos, provocando así, un efecto de aumento de la sensibilidad a la insulina sobre el metabolismo de la glucosa.

El contenido en TG de los hepatocitos presenta una correlación negativa con la sensibilidad a la insulina (Ryysy *et al.*, 2000). No obstante, aunque se ha indicado una relación entre el aumento de la concentración lipídica en el hígado y la reducción de la función hepática, existe escasa información sobre cambios en las funciones específicas del hígado (Andreoli *et al.*, 2009). En nuestras condiciones experimentales, el aumento en la concentración de los ácidos grasos intensificó la resistencia hepática a la insulina provocando la salida de glucosa endógena debido a la disminución de la síntesis de glucógeno e incremento de la gluconeogénesis, sin ningún efecto sobre la degradación de glucógeno. Además, la disminución en la producción de IGF-I hepática observada podría igualmente facilitar la resistencia periférica a la insulina.

7.2.2. Efecto de la dexametasona sobre el hepatocito

Nos encontramos con escasa información en la bibliografía referente al efecto de los glucocorticoides sobre la producción de IGF-I en cerdos (Ajuwon *et al.*, 2003). De una forma parecida a la estimulación de la síntesis de IGF-I por la adición de dexametasona (100 μ M) al medio observada en el presente experimento, otros autores obtuvieron un aumento del nivel de ARN mensajero de la IGF-I en hepatocitos porcinos (Brameld *et al.*, 1995) y un aumento de la producción de IGF-I bajo un medio libre de insulina en hepatocitos de lechones en fase de lactación (Ajuwon *et al.*, 2003). El cultivo de hepatocitos de rata con dexametasona (1 μ M) estimuló la expresión (Beauloye *et al.*, 1999) y la producción (Arany *et al.*, 1993) de la IGF-I. Varios estudios han demostrado que existe una relación positiva entre la IGF-I circulante y el crecimiento postnatal en el cerdo (Schoknecht *et al.*, 1997; Carroll, 2001) aunque algunos de estos resultados son algo contradictorios (Weiler *et al.*, 1997). A pesar de que la síntesis de ácidos grasos se ha estudiado en detalle, los mecanismos que regulan los procesos de esterificación, que intervienen en la síntesis de TG, se conocen en menor medida. La reducción del contenido en TG provocada por la dexametasona en nuestro experimento guarda analogía con la baja producción de TG observada. Se ha demostrado un aumento de la cetogénesis al elevarse el nivel de dexametasona del medio en el cultivo de hepatocitos porcinos en monocapa (Fernández-Fígares *et al.*, 2004); el glucagón produjo un efecto similar inducido por la dexametasona y de forma contraria a la insulina, lo que podría indicar un incremento de la producción de AMP cíclico promovido por la presencia de dexametasona. De acuerdo con esta hipótesis, observamos que una relación de Insulina/Glucagón baja produjo un efecto similar a la dexametasona sobre el contenido y la síntesis de TG en nuestro ensayo. No obstante en ratas, la mayoría de los estudios muestran una estimulación directa de la síntesis de ácidos grasos y TG *in vitro* (Diamant y Shafir, 1975; Brindley, 1995) e *in vivo* (Mantha *et al.*, 1999; Dolinsky *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2007). Curiosamente, se ha observado que la dexametasona inhibe la lipogénesis en ausencia de la insulina (Amatruda *et al.*, 1983), aunque su presencia incita un efecto contrario de estimulación (Martin-Sanz *et*

al., 1990; Amatruda *et al.*, 1983), indicando una posible interacción entre la insulina y el glucocorticoide.

Los resultados que encontramos en la bibliografía relativos al metabolismo lipídico para las distintas especies no son equiparables. Por ejemplo, en roedores (Jansen *et al.*, 1966), el hígado y el tejido adiposo representan grandes centros lipogénicos con una misma importancia en ambos casos, sin embargo el tejido adiposo porcino actúa como el mayor órgano lipogénico (O`Hea y Leveille, 1969; Mildner y Clarke, 1991) junto con la pequeña aportación que realiza el hígado.

La disminución en el contenido en TG, observado en nuestro experimento, al adicionar un mayor nivel de dexametasona podría deberse a un aumento en la oxidación de ácidos grasos (Yamamoto *et al.*, 1996) o bien, a una mayor secreción de VLDL. Si la dexametasona provocase un aumento de la producción de AMP cíclico, como indican Fernández-Fígares *et al.* (2004), un nivel alto de dexametasona en el medio originaría una estimulación de la cetogénesis. Para validar esta hipótesis se requiere de la determinación de la producción de cuerpos cetónicos o cetogénesis, o bien de la secreción de VLDL al medio.

Por lo tanto, la dexametasona podría modular la producción de IGF-I, y la síntesis y el almacenaje de TG hepáticos, es decir, la producción endógena de TG a largo plazo en hepatocitos porcinos.

7.2.3. Efecto de la relación Insulina/Glucagón sobre el hepatocito

De un mismo modo que en el estudio del efecto de la dexametasona, nos encontramos con insuficiente información en la bibliografía relacionada con la regulación del metabolismo energético hepático por insulina y glucagón. Estudios de nuestro grupo de investigación indicaron que el glucagón provocó una estimulación de la cetogénesis, y la insulina produjo un efecto contrario de inhibición en cultivo primario de hepatocitos porcinos y sin embargo, la insulina estimuló la deposición de

glucógeno y el glucagón la atenuó (Fernández-Fígares *et al.*, 2004). No tenemos conocimiento de ningún dato en la bibliografía relacionado con el control de la síntesis de TG por insulina y glucagón en hepatocitos porcinos. Nuestros resultados sugieren que la síntesis de TG está regulada por el glucagón y la insulina, ya que el aumento de la relación Insulina/Glucagón provocó un incremento del contenido de TG en hepatocitos porcinos. Fernández-Fígares *et al.* (2004) observaron que altos niveles de insulina aumentaban la relación NADH/NAD⁺. Un aumento relativo del NADH resultaría en la inhibición de las enzimas que promueven la actividad del ciclo de Krebs, como la citrato sintasa, α -ketoglutarato y piruvato deshidrogenasa (Nelson y Cox, 2000), es decir, en la inhibición de una ruta metabólica de oxidación habitual de ácidos grasos. Por lo tanto, en condiciones de una relación Insulina/Glucagón más elevada, adicionada al medio de hepatocitos porcinos en cultivo, supondría una mayor deposición de TG y glucógeno junto con una reducción de la cetogénesis.

En analogía con nuestros resultados, la insulina indujo un efecto de estimulación sobre el contenido en TG celular de hepatocitos de rata (Durrington *et al.*, 1982; Duerden y Gibbons, 1990) y pollo (Legrand *et al.*, 1996). Se ha sugerido una inhibición de la secreción de la apolipoproteína B por la insulina ya que aumentaría su susceptibilidad a degradarse (Sparks y Sparks, 1994), lo cual podría disminuir la secreción de lipoproteína de muy baja densidad VLDL e incrementar la acumulación de TG en el hígado. En monogástricos, la insulina reduce la oxidación de los ácidos grasos hepáticos al elevar las concentraciones celulares de malonil-CoA, un inhibidor de la enzima que transporta los ácidos grasos a los lugares de oxidación en la célula: la carnitina aciltransferasa. En hígados perfundidos de rata, se originó una respuesta similar, en la cual la insulina inhibió la cetogénesis y la secreción de lípidos al impedir la oxidación de ácidos grasos (Yamamoto *et al.*, 1996). De hecho, en ratas y humanos, la insulina aumentó la síntesis hepática de TG y redujo el nivel de secreción de la VLDL, elevando el contenido en TG del hepatocito (Duerden y Gibbons, 1990; Gibbons, 1990). La concentración extracelular de ácidos grasos podría ser un regulador importante de la acción de la insulina en el hígado (Svedberg *et al.*, 1990). Por ejemplo, el nivel de síntesis y degradación de insulina se afectó por la adición de oleato durante

45 minutos al medio de hepatocitos en cultivo, aunque no hubo efecto sobre su afinidad aparente por el receptor (Svedberg *et al.*, 1990). Como hemos mencionado anteriormente, la alta relación Insulina/Glucagón en el medio de cultivo provocó la inhibición de la cetogénesis en hepatocitos porcinos (Fernández-Fígares *et al.*, 2004). Si la regulación de los TG observada en ratas ocurriese de forma similar en hepatocitos de cerdo, cabría la posibilidad de que la menor oxidación de ácidos grasos, provocada por la alta relación Insulina/Glucagón empleada, redirigiese esta acumulación de ácidos grasos exógenos hacia su esterificación, lo cual podría explicar parcialmente nuestros resultados.

Respecto al efecto del glucagón, observamos que en ratas provocó la inhibición de la síntesis de TG en hígado perfundido (Soler-Argilaga *et al.*, 1977) y en cultivo de hepatocitos (Christiansen, 1977). A niveles farmacológicos de glucagón (5 µg/mL), se produjo un efecto de inhibición de la lipogénesis y de estimulación de la oxidación de ácidos grasos en hepatocitos de rata (McGarry y Foster, 1980). El aumento de la cetogénesis promovido por glucagón se ha descrito de forma consistente en la bibliografía para diferentes especies, tales como rata (Bjornsson *et al.*, 1994; Witters y Trasko, 1979), cerdo (Fernández-Fígares *et al.*, 2004) y humano (Vons *et al.*, 1991). El efecto negativo del glucagón sobre la esterificación de ácidos grasos se ha indicado por Witters y Trasko (1979), y Vons *et al.* (1991), aunque no por otros autores como Bjornsson *et al.* (1994). La disminución de la cetogénesis promovida por una alta relación Insulina/Glucagón en el medio, como previamente se ha observado en hepatocitos porcinos (Fernández-Fígares *et al.*, 2004), podría explicar parcialmente el aumento de la esterificación de ácidos grasos hacia TG intracelulares en nuestro experimento.

Concluimos que la síntesis de triglicéridos a nivel hepático está regulada hormonalmente en cultivo primario de hepatocitos de cerdo Ibérico de forma que la dexametasona la disminuye y una elevada relación Insulina/Glucagón conduce a su aumento. Además, el CLA disminuye la producción de glucosa por parte del hígado mediante una inhibición de la gluconeogénesis pero sin afectar la síntesis y degradación del glucógeno.

CAPÍTULO 8

Resumen y conclusiones

El cerdo Ibérico presenta tendencia a la deposición de grasa, crecimiento lento y capacidad limitada para la formación de tejido muscular. Estudios previos de nuestro grupo de investigación, centrados en las etapas de crecimiento (15 a 50 Kg PV) y crecimiento-cebo (50 a 100 Kg PV), han mejorado el conocimiento del metabolismo de la proteína y la energía en esta raza porcina y la base fisiológica que explica sus peculiaridades metabólicas, claramente diferenciadas de las de otros genotipos. Los trabajos desarrollados en esta Tesis Doctoral se han dedicado al estudio de la etapa comprendida entre el destete y los 25 Kg de PV, que en razas porcinas convencionales y magras se caracteriza por unas elevadas tasas de eficiencia de conversión de nutrientes para formar tejidos propios, muy superiores a las de etapas posteriores en el desarrollo del animal. Concretamente, esta Tesis Doctoral se ha ocupado del estudio del potencial de crecimiento y de la utilización de la proteína y energía de la dieta para la retención de nutrientes y el mantenimiento de las funciones vitales del lechón Ibérico, desde el destete hasta los 25 Kg de peso vivo.

Además, hemos abordado el estudio de distintos aspectos del metabolismo del lechón Ibérico a nivel hepático, mediante el empleo de la técnica de cultivo primario de hepatocitos. En estudios previos hemos demostrado que el ácido linoleico conjugado (CLA) tiene *in vivo* un efecto sinérgico con la betaína sobre la deposición de proteína y grasa de la canal en cerdos Ibéricos en crecimiento. El cultivo de hepatocitos nos ha permitido estudiar el efecto del CLA sobre el metabolismo de lípidos e hidratos de carbono a nivel hepático, sin interferencias del resto de órganos y de un perfil hormonal fluctuante.

Para el estudio del crecimiento y la utilización de nutrientes del lechón Ibérico desde el destete hasta los 25 Kg PV, se empleó un diseño factorial 4 (concentraciones proteicas de la dieta; 201, 176, 149, y 123 g PB/Kg MS) x 2 (niveles de alimentación; 95 y 70% de *ad libitum*) con 6 o 7 lechones por tratamiento (52 animales) más 6 animales sacrificados al inicio del experimento y empleados como referencia de la composición corporal inicial. Las dietas, semisintéticas, formuladas para contener 201, 176, 149, y 123 g de proteína bruta por Kg de MS e isoenergéticas (aproximadamente 14,6 MJ de

EM), se suplementaron con aminoácidos esenciales para que la composición de la proteína tuviese el perfil de la proteína *ideal*. La dieta de concentración proteica máxima se formuló con cebada y torta de soja como ingredientes mayoritarios, y las tres dietas restantes se obtuvieron por dilución de la anterior con distintas proporciones de una mezcla carente de proteína, compuesta fundamentalmente por almidón, de modo que el perfil de la proteína dietética y la concentración de nutrientes, excepto la proteína, se mantuvo constante. Se utilizaron lechones Ibéricos, machos castrados, de la estirpe Silvela, de aproximadamente 10 Kg de peso y 47 días de edad.

Durante el experimento, los animales permanecieron alojados individualmente en parques de 2 m² en condiciones de termoneutralidad ($27 \pm 1,5^{\circ}\text{C}$) y se ajustó la ingesta semanalmente en función del peso vivo. La ración diaria se ofreció en dos tomas (9:00 y 16:00 horas), y se controló diariamente la ingesta individual cuantificando la dieta no consumida. Aproximadamente a los 15 Kg de PV se realizaron ensayos de digestibilidad y balance, alojando a los animales en jaulas metabólicas para lechones. Cuando los animales alcanzaron los 25 Kg de peso vivo se sacrificaron por desangrado previa electronarcosis. El grupo inicial de referencia se sacrificó al inicio del periodo experimental con 10 Kg de peso vivo. Al sacrificio se registraron los pesos de órganos, canal, sangre y resto de componentes corporales. La semicanal derecha se empleó para determinación de la composición química y la izquierda para el estudio de disección. Tras la homogeneización y liofilización de cada uno de los cuatro compartimentos en los que se dividió el animal (canal, sangre, vísceras y cabeza, que incluía patas y rabo) se realizaron por duplicado las determinaciones analíticas de proteína bruta, materia seca, materia orgánica y de energía bruta. Se aplicó la metodología de los sacrificios comparados para determinar la retención energética y la forma en que ésta se produce: proteína o grasa.

La ganancia media diaria, el índice de transformación y la eficiencia de utilización de la energía del alimento, expresada como ganancia de peso/ingesta de energía metabolizable (g/MJ IEM) se vieron afectados de forma lineal por la concentración proteica de la dieta ($P < 0,001$). Dichos parámetros aumentaron

significativamente al elevarse el plano de alimentación ($P < 0,001$). Los valores más altos para estas variables, proporcionados por los animales que consumieron la dieta que contenía 201g PB/Kg MS, alimentados a 95% de *ad libitum*, fueron, respectivamente, 416 g/d, 0,529 g/g y 35,7 g/MJ EM.

La retención corporal total de proteína, grasa, agua, minerales y energía registrada entre los 10 y los 25 Kg de peso vivo se vieron afectados por la concentración proteica de la dieta y el nivel de alimentación ($P < 0,01- 0,05$). La deposición proteica aumentó linealmente desde 35,6 hasta 50,9 g/día al incrementarse el contenido en proteína de la dieta ($P < 0,01$). Se obtuvo una deposición proteica diaria de 0,35 g por cada gramo de proteína ideal ingerida, y una eficiencia marginal de deposición de proteína corporal ($\Delta DP:\Delta EM$; g/MJ) de 4,39 g/MJ EM para las dos dietas de mayor concentración proteica (201 y 176 g PB/Kg MS). La retención de proteína más alta (59,9 g/día; valor medio correspondiente a dicho periodo de crecimiento) se obtuvo con la dieta que proporcionaba 201 g PB/Kg de MS a 95% de *ad libitum*. Este tratamiento dio lugar, a su vez, a la máxima deposición de agua y minerales (246 y 10,3 g/día, respectivamente) y a la mínima deposición de grasa entre los animales alimentados a 95% de *ad libitum* (66,9 g/día) obtenida en nuestras condiciones experimentales.

Al relacionar la IEM con la retención energética, determinada en el organismo de los animales durante el periodo experimental, obtuvimos una eficiencia de uso de la EM para el crecimiento (k_g) de 0,552 y unas necesidades de mantenimiento de 427 KJ EM/Kg^{0,75} y día. Las eficiencias parciales de utilización de la EM para la deposición de grasa (k_f) y proteína (k_p) obtenidas fueron, respectivamente, 0,672 y 0,378.

En la canal, la deposición de proteína, agua y minerales aumentó al incrementarse el contenido en proteína de la dieta ($0,001 < P < 0,05$), no encontrándose diferencias significativas entre las 2 dietas con mayor contenido en proteína (201 y 173 g PB/Kg MS). En cambio, la retención de grasa disminuyó al incrementar el contenido proteico de la dieta ($P < 0,001$). Por otra parte, observamos un aumento de las proporciones de solomillo, jamón y contenido magro total en la canal al elevar el contenido proteico de la dieta, así como mayor proporción relativa de

tejido magro en jamón y paleta, y menor proporción de grasa intermuscular del jamón ($0,001 < P < 0,05$). Al incrementar el nivel de alimentación del 70 al 95% de *ad libitum*, se registró un aumento del 20% del peso total de las vísceras, un 25% del tracto digestivo y 30% del hígado.

Para estudiar distintos aspectos del metabolismo del lechón a nivel hepático establecimos un cultivo primario de hepatocitos a partir del hígado de lechones Ibéricos puros de la estirpe Silvela, de 11-21 Kg de peso vivo y 50-80 días, mantenidos durante 2 semanas con alimentación restringida, 85% *ad libitum*, para posteriormente ofrecerles alimento *ad libitum* las 24 horas previas al sacrificio. El número de repeticiones (animales) mínimo por experimento fue de 5. Se sacrificó al animal y se extrajo el hígado de la forma más aséptica posible. Tras canular un lóbulo del hígado, se infundieron diferentes soluciones para la digestión enzimática con colagenasa y se extrajeron las células del hígado mediante raspado. Tras centrifugar para separar los hepatocitos de otros tipos celulares hepáticos, se determinó el número de hepatocitos viables mediante la tinción de azul tripán. Se sembraron los hepatocitos en placas de cultivo de 25 cm² a una densidad de $4,5 \times 10^6$ hepatocitos por placa y se incubaron en estufa a 37°C y 5% CO₂. Después de aproximadamente 12 horas de incubación, se establecieron las condiciones experimentales para el estudio, en el que se utilizó una mezcla isomolecular de los isómeros del CLA 9-*cis*, 11-*trans* y 10-*trans*, 12-*cis*.

La adición de CLA disminuyó la gluconeogénesis ($P < 0,05$) sin afectar la síntesis y degradación de glucógeno. El aumento de la concentración de ácidos grasos en el medio de cultivo produjo una disminución en la síntesis de glucógeno ($P < 0,01$) e IGF-I ($P < 0,001$), junto con un aumento de la gluconeogénesis ($P < 0,001$) y síntesis de triglicéridos ($P < 0,01$). Al aumentar la concentración de dexametasona se produjo una elevación de la síntesis de IGF-I ($P < 0,001$) y una disminución en la producción endógena de TG a nivel hepático. El aumento de la relación Insulina/Glucagón en el medio condujo al aumento en la síntesis de TG.

Los resultados obtenidos en ambos experimentos nos permiten establecer las siguientes conclusiones:

1. En la fase de crecimiento del lechón Ibérico comprendida entre los 10 y 25 Kg de peso vivo, la dieta suministrada al animal debe contener al menos 201 g proteína ideal /Kg MS, equivalente a 10,8 g proteína digestible/MJ EM, o 0,99 g lisina total/MJ EM, para obtener un óptimo crecimiento y eficiencia de utilización de los nutrientes suministrados por la dieta.
2. La eficiencia de deposición de proteína en los tejidos para este periodo es de 4,39 g proteína/MJ EM, sensiblemente superior a la observada en fases posteriores de desarrollo. La máxima deposición de proteína corporal se registró con la dieta de más alta concentración proteica cuando los animales la consumieron al nivel próximo a *ad libitum*. Sin embargo, el efecto lineal de la concentración de proteína dietética sobre este parámetro indica que la máxima deposición (PD_{max}) podría no haberse alcanzado.
3. La estimación las necesidades de energía metabolizable para el mantenimiento de las funciones vitales indican que el lechón Ibérico requiere 427 KJ/Kg PV^{0,75}. día. La eficiencia neta de utilización de la EM para el crecimiento obtenida fue 0,552, y las eficiencias parciales de utilización de la EM para la deposición de proteína y grasa observadas fueron 0,378 y 0,672, respectivamente, considerablemente inferiores a las descritas en la bibliografía para genotipos porcinos convencionales.
4. Las tasas de deposición de nutrientes en la canal indican una marcada tendencia hacia la deposición de tejido graso y limitado potencial para la retención proteica en comparación con cerdos de genotipo convencional o

mejorado de peso vivo similar. La composición en nutrientes de la canal en el cerdo Ibérico de 10 a 25 Kg es más sensible a cambios en el aporte de proteína dietético que la de cerdos Ibéricos de peso vivo superior.

5. Los ritmos de crecimiento, de deposición de nutrientes en la canal y el organismo completo y la eficiencia de utilización de la energía proporcionada por la dieta en el lechón Ibérico de 10 a 25 Kg de peso muestran la conveniencia de emplear un régimen alimenticio con una relación proteína/energía específica, diferenciada de la empleada en lechones de otros genotipos con mayor potencial de crecimiento, y de la adecuada para cerdos Ibéricos de peso vivo superior.

6. El aumento de la concentración del ácido graso en el medio de cultivo de hepatocitos porcinos disminuye la producción de IGF-I y la síntesis de glucógeno lo que junto con la estimulación de la gluconeogénesis antagoniza la acción de la insulina.

7. Una mezcla de CLA con una composición similar en los isómeros *9-cis*, *11-trans* y *10-trans*, *12-cis*, disminuye la producción de glucosa hepática mediante una inhibición de la gluconeogénesis, provocando así un efecto de aumento de la sensibilidad a la insulina sobre el metabolismo de la glucosa en el cultivo de hepatocitos porcinos.

8. La síntesis de IGF-1 no se afecta por la presencia de CLA en el medio, mientras que la dexametasona estimula su síntesis en hepatocitos porcinos.

9. La producción endógena de TG está regulada hormonalmente en cultivo primario de hepatocitos de cerdo siendo inhibida por la dexametasona y estimulada por una relación alta Insulina/Glucagón en el medio de cultivo.

CAPÍTULO 9

Summary and conclusions

The Iberian pig is a slow growing porcine breed characterized by a high fat deposition rate and limited capacity for lean tissue growth. Previous studies of our research group focused on growing (15 to 50 kg BW) and growing-fattening (50 to 100 kg BW) Iberian pigs have improved our knowledge on protein and energy metabolism, physiology and metabolic characteristics of this pig breed, clearly different from those of modern pig types. The growth stage from weaning until 25 kg BW in conventional and lean genotypes is considered of maximal efficiency of conversion, much higher than in older pigs. In the present Doctoral Thesis we have studied the growth potential and dietary protein and energy utilization for nutrient retention and the maintenance of body functions, in the Iberian piglet from 10 to 25 kg BW.

Additionally, we have undertaken the study of different aspects of hepatic metabolism of the Iberian piglet by means of a primary hepatocyte culture system. In a previous work we have shown *in vivo* that conjugated linoleic acid (CLA) had a synergistic effect with betaine on carcass protein deposition and fat content in Iberian growing pigs. The hepatocyte culture has allowed us to study the effect of CLA on lipid and carbohydrates metabolism at the hepatic level, without the interference of the rest of organs and a fluctuant hormone profile.

For the study of growth and nutrient utilization of the Iberian piglet from weaning to 25 kg BW, we used a factorial arrangement with 4 protein concentrations (from 201 to 123 g CP/kg DM) and 2 feeding levels (95 and 70% of *ad libitum*), with 6 or 7 piglet per combination of treatments, involving a total of 52 piglets, plus 6 piglets slaughtered at the beginning of the trial to assess chemical body composition at the start of the experiment. The semisynthetic experimental diets were isoenergetic (approximately 14.6 MJ de EM) and they were formulated to contain 201, 176, 149, y 123 g CP/kg DM. Diets were supplemented with essential amino acids to resemble the amino acid profile of the *ideal* protein. The highest protein content diet was formulated with barley and soybean meal as main components, and the rest of experimental diets were obtained by mixing the highest protein content diet with a diluting mixture based on corn starch. In this way, the amino acid profile and concentration of dietary nutrients, except for protein, were maintained constant. The

piglets were pure-bred castrated males of the strain Silvela of approximately 10 kg BW and 47 d of age.

During the experiments, piglets were individually allocated in 2 m² boxes in an environmentally controlled room (27 ± 1.5°C). Daily feed allowance was calculated based on piglets' BW, measured individually each week. Each diet was offered daily in 2 equal meals (09:00 and 15:00 h), and feed refusals were quantified. At approximately 15 kg BW piglets were allocated in metabolic cages to perform digestibility measurements. At 25 kg BW they were slaughtered by electrically stunning and exsanguination after an overnight fast. The initial slaughter group had an average weight of 10 kg BW. The weights of organs, carcass, blood and rest of body components were recorded at slaughter. The right half of the carcass was used for determination of chemical composition and the left half was used for physical dissection study. After the homogenization and freeze-drying, all of the four body compartments in which each animal was divided (carcass, blood, viscera and head, which included feet and tail) was analyzed in duplicate for crude protein, dry matter, ash and gross energy. The serial slaughter procedure was applied to determine nutrient and energy retention.

Average daily gain (ADG), feed efficiency and the efficiency of use of ME for body gain, expressed as gain/ME intake (g/MJ MEI), increased linearly as dietary protein concentration was augmented ($P < 0.001$). These traits significantly increased as feeding level was elevated from 70 to 95% of *ad libitum* feeding ($P < 0.001$). The highest values for these parameters were provided by the piglets consuming the diet containing 201 g CP/kg DM fed at 95% of *ad libitum*. The values obtained were 416 g/d, 0.529 g/g y 35.7 g/MJ EM, respectively, for ADG, feed efficiency and efficiency of use of ME for body gain.

Total body retention of protein, fat, water, ash and energy, between 10 to 25 kg BW, were affected by dietary protein concentration and feeding level ($0.01 < P < 0.05$). Protein deposition increased linearly from 35.6 to 50.9 g/d as dietary protein increased ($P < 0.01$). A daily increase of 0.35 g protein per g of *ideal* protein ingested was estimated. The marginal efficiency of protein deposition ($\Delta DP:\Delta EM$; g/MJ)

obtained for the two diets of higher protein content (201 and 176 g CP/kg DM) was 4.39 g/MJ EM. The highest protein deposition (59.9 g/d) was observed with the diet providing 201 g CP/kg DM fed at 95% de *ad libitum*. The maximal water and ash deposition (246 and 10.3 g/d, respectively) and minimum fat (66.9 g/d) retention -for *ad libitum* fed pigs- was also obtained with this treatment.

When body energy retention was related to MEI we obtained a net efficiency of use of ME for growth (k_g) of 0.552, and the estimated maintenance energy requirements resulting from this equation was 427 KJ EM/Kg^{0.75} per day. Partial efficiencies of use of ME for protein (k_p) and fat (k_f) deposition were 0.378 and 0.672, respectively.

As for carcass, protein, water and ash deposition, it increased on increasing dietary protein content ($0.001 < P < 0.05$) with no significant differences between the 2 diets of higher protein content (201 and 173 g CP/kg DM). On the other hand, carcass fat retention diminished when dietary protein concentration was elevated ($P < 0.001$). The relative weights of sirloin, ham and total carcass lean increased on increasing protein concentration of the diet. Augmented proportions of lean in ham and shoulder and decreased weight of intermuscular fat of ham were also observed when dietary protein concentration was raised ($0.001 < P < 0.05$). A 20% increase in proportional weights of total viscera, 25% in the gut and 30% in the liver, were recorded when feeding level increased from 70 to 95% of *ad libitum*.

To study different aspects of the hepatic metabolism of the Iberian piglet we established a primary culture of hepatocytes from the liver of pure-bred Iberian piglets 11 to 21 kg BW and 50 to 80 d of age. Animals were at 85% *ad libitum* for two weeks and 24 h previous to slaughter they were fed *ad libitum*. Minimum number of pigs per experiment was 5. Piglets were slaughtered by electrically stunning and exsanguination, and liver was extracted in aseptic conditions. After cannulation, the left lateral lobe was infused with different solutions for collagenase digestion and liver cells were extracted by scraping. Hepatocytes were separated from other liver cells by centrifugation and the viability of hepatocytes determined by tripan blue dye exclusion. Hepatocytes (4.5×10^6) were seeded into vented T-25 flasks (25 cm²) and

incubated at 37 C, 5% CO₂. After an incubation period of 12 h the experimental conditions of the study were established. An isomolecular mix of the CLA isomers 9-*cis*, 11-*trans* and 10-*trans*, 12-*cis* was used.

Addition of CLA to the culture media decreased gluconeogenesis ($P < 0.05$) without affecting glycogen synthesis and degradation. The increase of fatty acid concentration in the media decreased the synthesis of glycogen ($P < 0.01$) and IGF-1 ($P < 0.001$), and increased gluconeogenesis ($P < 0.001$) and triacylglycerol (TG) synthesis ($P < 0.01$). A decrease in the endogenous production of TG and an increase in IGF-I hepatic synthesis ($P < 0.001$) was detected when dexamethasone concentration in the media was elevated. The increase of Insulin/glucagon ratio was related to increased TG synthesis.

According to the results obtained with the experiments carried out in the present Thesis we draw the following conclusions.

1. In the growing period from 10 to 25 kg BW, the Iberian piglet diet should contain at least 201 g *ideal* protein /kg DM, equivalent 10.8 g digestible protein/MJ ME, or 0.99 g total lysine /MJ ME, for an optimal growth and efficiency of use of dietary nutrients.
2. The efficiency of protein deposition in tissues for this period of growth is 4.39 g protein /MJ ME, considerably higher than that obtained for older pigs of the Iberian genotype. Maximal deposition of body protein was obtained with the diet containing the highest protein concentration provided at 95% of *ad libitum*. However, the linear effect of dietary protein concentration over this parameter indicates that maximal protein deposition (PD_{max}) may have not been achieved.
3. The estimation of energy requirement for the maintenance of body functions in the Iberian piglet was 427 KJ/Kg PV^{0.75} . d. The related net efficiency of use

of ME for growth obtained for this estimation was 0.552, and partial efficiencies of use of ME for protein and fat deposition were 0.378 and 0.672, respectively. All of these values are considerably below those established for conventional genotype pigs.

4. Nutrient deposition rates for the carcass of the Iberian piglet indicate a marked lipogenic profile, with increased fat deposition and limited potential for lean tissue growth, compared with piglets of conventional and lean types of similar body weight. Carcass nutrient composition in the Iberian piglet from 10 to 25 kg BW is more sensible to changes in dietary protein supply than Iberian pigs of higher BW.
5. The rates of growth and nutrient deposition in the carcass and at the whole body level and the efficiency of use of feed energy obtained in the present work for the Iberian piglet from 10 to 25 BW, suggest the convenience of applying a specific protein/energy dietary regime clearly differentiated from those adequate for older Iberian pigs or piglets of modern breeds.
6. The increase in fatty acid concentration in the media of porcine hepatocytes decreases liver IGF-1 production and glycogen synthesis and increases gluconeogenesis antagonizing insulin action.
7. A mixture of CLA isomers with equal concentrations of 9-*cis*, 11-*trans* and 10-*trans*, 12-*cis*, decreases hepatic glucose production by inhibiting gluconeogenesis. In this way, increased insulin sensitivity upon glucose metabolism is achieved in the hepatocyte culture.
8. While dexamethasone stimulates IGF-1 synthesis CLA has no effect in porcine hepatocytes.

9. Endogenous production of TG is hormonally regulated in primary culture of porcine hepatocytes as their synthesis is inhibited by dexamethasone and stimulated by high insulin/glucagon ratio in the media.

CAPÍTULO 10

Referencias bibliográficas

AGRODIGITAL (2004). MAPA: Inauguración de las VI Jornadas sobre modernización de explotaciones de cerdo Ibérico.

<http://www.agrodigital.com/PlartStd.asp?CodArt=35377>

AGRODIGITAL (2006). Importante aumento del censo de porcino ibérico en los últimos años. <http://www.agrodigital.com/PlartStd.asp?CodArt=46726>

AGUILERA JF, RIVERA MG, BAREA R Y NIETO R. (2003). Adecuación de la nutrición del Ibérico a su metabolismo. Nutrición proteica y energética en el cebo. *Revista Mundo Ganadero* 158, 36-39.

ALVES E, ÓLIVO C, RODRÍGUEZ C Y SILIÓ L. (2003). El origen del cerdo ibérico a la luz del análisis del ADN mitocondrial. *Sólo Cerdo Ibérico* 11, 27-32.

AMETAJ BN, BOBE G, LU Y, YOUNG JW, BEITZ DC. (2003). Effect of sample preparation, length of time, and sample size on quantification of total lipids from bovine liver. *J Agric Food Chem* 51, 2105-10.

APARICIO MACARRO JB. (1988). El cerdo ibérico. En: Accésit al Premio de Investigación, 1987, Sánchez Romero Carvajal, Jabugo SA (Eds). Cádiz: Industrias Gráficas Gaditanas, SA

APARICIO SÁNCHEZ G. (1960). En: Zootecnia especial. Etnología compendiada, 4ª ed. Córdoba: Imprenta Moderna.

ATTAIX D, TAILLANDIER D, TEMPARI S, LARBAUD D, AUROUSSEAU E, CJOMBARET L, VOISIN L. (1994). Regulation of ATP-ubiquitin-dependent proteolysis in muscle wasting. *Reproduction, Nutrition and Development* 34, 583-597.

AZAIN MJ, HAUSMAN DB, SISK MB, FLATT WP, JEWELL DE. (2000). Dietary conjugated linoleic acid reduces rat adipose tissue cell size rather than cell number. *J Nutr* 130, 1548-1554.

- BANNI S Y MARTIN JC.** (1998). Conjugated linoleic acid and metabolites. En: Trans fatty acids in human nutrition (ed. J.L. Sebedio, W.W. Christie). Dundee, UK. The Oily Press p. 261-302.
- BANNI S, ANGIONI E, CONTINI MS, CARTA G, CASU V, LENGU GA, MELIS MP, DEIANA M, DESSI MA Y CORONGIU FP.** (1998). Conjugated linoleic acid and oxidative stress. *J Am Oil Chem Soc* 75, 261-267.
- BARAK AJ, BECKENHAUER HC, JUNNILA M. Y TUMA DJ.** (1993). Dietary betaine promotes generation of hepatic S-adenosylmethionine and protects the liver from ethanol-induced fatty infiltration. *Alcohol Clin Exp Res* 17, 552-555.
- BARBA C, DELGADO JV, SERENO RBS, DIÉGUEZ E. Y CAÑUELO P.** (2000). Caracterización productiva de las variedades del Cerdo Ibérico. I: Estudio preliminar de los pesos y crecimientos en premontanera y montanera. *Archivos de Zootecnia* 49, 179-187.
- BAREA R, NIETO R Y JF AGUILERA.** (2007). Effects of the dietary protein content and the feeding level on protein and energy metabolism in Iberian pigs growing from 50 to 100 kg body weight. *Animal* 1, 357-365.
- BAREA R.** (2005). Utilización metabólica de dietas de contenido proteico variable en el cerdo ibérico en crecimiento-cebo. *Tesis Doctoral. Unidad de Nutrición Animal. Estación Experimental del Zaidín (CSIC), Granada.*
- BEE G.** (2000a). Dietary conjugated linoleic acids alter adipose tissue and milk lipids of pregnant and lactating sows. *J Nutr* 130, 2292-2298.
- BEE G.** (2000b). Dietary conjugated linoleic acid consumption during pregnancy and lactation influences growth and tissue composition in weaned pigs. *J Nutr* 130, 2981-2989.
- BELURY MA.** (2002). Dietary conjugated linoleic acid in health: Physiological effects and mechanisms of action. *Annu Rev Nutr* 22, 505-531.

- BERRY MN Y FRIEND DS.** (1969). High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study. *J Cell Biol* 43, 506-20.
- BISSELL DM, ARENSON DM, MAHER JJ, ROLL FJ.** (1987). Support of cultured hepatocytes by a laminin-rich gel. Evidence for a functionally significant subendothelial matrix in normal rat liver. *J Clin Invest* 79, 801-12.
- BISSELL DM, FRIEDMAN SL, MAHER JJ, ROLL FJ.** (1990). Connective tissue biology and hepatic fibrosis: report of a conference. *Hepatology* 11,488-98.
- BISSELL DM, GUZELIAN PS.** (1980). Phenotypic stability of adult rat hepatocytes in primary monolayer culture. *Ann N Y Acad Sci* 349, 85-98.
- BISSELL DM, STAMATOGLOU SC, NERMUT MV, HUGHES RC.** (1986). Interactions of rat hepatocytes with type IV collagen, fibronectin and laminin matrices. Distinct matrix-controlled modes of attachment and spreading. *Eur J Cell Biol* 40, 72-8.
- BLAXTER KL.** (1967). The energy metabolism of ruminants. Londres: Hutchinson. 2ª edición.
- BLAXTER KL.** (1989). Energy metabolism in animals and man. Cambridge: Cambridge University Press. 336 págs.
- BRIATA P, LAURINO C, GHERZI R.** (1989). C-myc gene expression in human cells is controlled by glucose. (1989). *Biochem Biophys Res Commun* 29, 1123-9.
- BROUWER E.** (1965). Report of subcommittee on constants and factors. En: Energy
- BROWN-BRANDL TM, NIENABER JA, XIN H Y GATES RS.** (2004). A literature review of swine heat production. *Transactions of the ASAE* 47, 259-270.
- BUCCOLO G ET AL.,** (1973). Quantitative determination of serum triglycerides by use of enzymes. *Clin Chem* 19, 476-482.
- BUXADÉ C.** (2001). Estructura del subsector. En: Porcino Ibérico: aspectos claves (pp 21-49), C Buxadé y A Daza (coordinadores). Madrid: Ediciones Mundi-Prensa.

- BUXADÉ C.** (2005). El sector del ibérico ante la nueva Union Europea-25. *Sólo Cerdo Ibérico* 13, 59-64.
- CADOGAN DJ, CAMPBELL RG, HARRISON D Y EDWARDS AC.** (1993). The effects of betaine on the growth performance and carcass characteristics of female pigs. En: *Manipulating Pig Production IV* (pp 219), ES Batterham (Eds). Attwood, Victoria, Australia: Australasian Pig Science Association.
- CAÑELLAS I, ROIG S, POBLACIONES MJ, GEA-IZQUIERDO G, OLEA L.** (2007). An approach to acorn production in Iberian dehesas. *Agroforest Syst* 70, 3–9. DOI 10.1007/s10457-007-9034-0.
- CAPERNA TJ, FAILLA ML, KORNEGAY ET, RICHARDS MP Y STEELE NC.** (1985). Isolation and cultura of parenchymal and nonparenchymal cels from neonatal swine liver. *J Anim Sci* 61, 1576-1586.
- CASTEL JM, CARAVACA F, GARCÍA A.** (2002). La gestión en la explotación porcina extensión. En: *Zootecnia. Bases de la producción animal. Monografía III La gestión en la explotación ganadera* (pp 209-225), Buxadé C (coordinador). Madrid: Ediciones Mundi-Prensa.
- CATO AC, NESTL A, MINK S.** (2002). Rapid actions of steroid receptors in cellular signaling pathways. *Sci STKE* 138, re9.
- CHAN K, KOST DP, MICHALOPOULOS G.** (1989). Multiple sequential periods of DNA synthesis and quiescence in primary hepatocyte cultures maintained on the DMSO-EGF on/off protocol. *J Cell Physiol* 141, 584-90.
- CHAPMAN GS, JONES AL, MEYER UA, BISSELL DM.** (1973). Parenchymal cells from adult rat liver in nonproliferating monolayer culture. II. Ultrastructural studies. *J Cell Biol* D59, 735-47.
- CHIN SF, LIU W, STORKSON SS, HA YL Y PARIZA MW.** (1992). Dietary sources of conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a newly recognized class of anticarcinogens. *J Food Compos Anal* 51, 185-197.

- CHIN SF, STORKSON JM, ALBRIGHT KJ, COOK ME Y PARIZA MW.** (1994). Conjugated linoleic acid is a growth factor for rats as shown by enhanced weight gain and improved feed efficiency. *J Nutr* 124, 2344-2349.
- CLAYTON DF, HARRELSON AL, DARNELL JE JR.** (1985). Dependence of liver-specific transcription on tissue organization. *Mol Cell Biol* 5, 2623-32.
- CLEMENT L, POIRIER H, NIOT I, BOCHER V, GUERRE-MILLO M, KRIEF S, STAELS B, BESNARD P.** (2002). Dietary trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid induces hyperinsulinemia and fatty liver in the mouse. *J Lipid Res* 43, 1400-1409.
- CLEMENTE I, MEMBRILLO A, AZOR P, DORADO G, RODERO A Y MOLINA A.** (2006). Algunas consideraciones sobre las diferentes clasificaciones del tronco porcino ibérico: una propuesta integradora. *Sólo Cerdo Ibérico* 16, 7-18.
- COLEMAN ME, PAN YC, ETHERTON TD.** (1991). Identification and NH₂-terminal amino acid sequence of three insulin-like growth factor-binding proteins in porcine serum. *Biochem Biophys Res Commun* 181, 1131-1136.
- CROMWELL GL, LINDEMANN MD, RANDOLF JR, LAURENT KM, PARKER GR, Y COFFEY RD** (2000). Effects of betaine levels in reduced energy diets for finishing pigs. *J Anim Sci* 78 (Suppl 1), 189 (Abstr).
- CROMWELL GL, LINDEMANN MD, RANDOLF JR, MONEGUE KM, LAURENT KM Y PARKER GR** (1999). Efficacy of betaine as a carcass modifier in finishing pigs fed normal and reduced energy diets. *J Anim Sci* 77 (Suppl. 1), 179 (Abstr.).
- CUNNINGHAM CC Y VAN HORN CG.** (2003). Energy availability and alcohol-related liver pathology. *Alcohol Res Health* 27, 291-299.
- DAVIES AS.** (1974). A comparison of tissue development in Pietrain and Large White pigs from birth to 64 kg live weight. 1. Growth changes in carcass composition. *Anim Prod* 19, 367-376.
- DAYTON W.R. Y HATHAWAY M.R.** (1991). Control of Animal Growth by Glucocorticoids, Thyroid Hormones, Autocrine and/or Paracrine Growth Factors. En: Growth

regulation of farm animals. *Advances in Meat Research*, Volumen 7 (pp 17-45), AM Pearson y TR Dutson (Eds). Nueva York: Elsevier Applied Science.

DELANY JP, BLOHM F, TRUETT AA, SCIMECA JA y WEST DB. (1999). Conjugated linoleic acid rapidly reduces body fat content in mice without affecting energy intake. *Comp Physiol* 45, R1172–R1179.

DESCHENES J, VALET JP, MARCEAU N. (1980). Hepatocytes from newborn and weanling rats in monolayer culture: isolation by perfusion, fibronectin-mediated adhesion, spreading, and functional activities. *In Vitro* 16, 722-30.

DICH J, VIND C, GRUNNET N. (1988). Long-term culture of hepatocytes: effect of hormones on enzyme activities and metabolic capacity. *Hepatology* 8, 39-45.

DIÉGUEZ GARBAYO E. (1999). La raza porcina ibérica: sus estirpes y selección. En: I Jornadas sobre el cerdo Ibérico y sus productos (pp 18-25). Salamanca: Estación Tecnológica de la Carne de Castilla y León.

DIÉGUEZ GARBAYO E. (2001a). Base animal: pasado, presente y futuro. En: Porcino Ibérico: aspectos claves (pp. 49-83), Buxadé C y Argimiro D (coordinadores). Madrid: Ediciones Mundi-Prensa.

DOBNEY K, LARSON G. (2006). Genetics and animal domestication: New windows on an elusive process. *J Zool* 269, 261–271.

DODSON MV, ALLEN RE, HOSSNER KL. (1985). Ovine somatomedin, multiplication-stimulating activity, and insulin promote skeletal muscle satellite cell proliferation in vitro. *Endocrinology* 117, 2357–2363

DUGAN MER, AALHUS JL, SCHAEFER AL y KRAMER JKG. (1997). The effect of conjugated linoleic acid on fat to lean repartitioning and feed conversion in pigs. *Can J Anim Sci* 77, 723–725.

DUMESIC DA, RENK M, KAMEL F. (1989). Estrogenic effects of phenol red on rat pituitary cell responsiveness to gonadotropin-releasing hormone. *Life Sci* 44, 397-406.

- ERLINGER S. (1982). Does Na⁺-K⁺-atpase have any role in bile secretion? *Am J Physiol* 243, G243-G247.
- ETHERTON TD Y KESINGER RS. (1984). Endocrine regulation of fetal and postnatal meat animal growth. *J Anim Sci* 59, 511-525.
- EVANS M, GEIGERMAN C, COOK J, CURTIS L, KUEBLER B, Y MCINTOSH M. (2000). Conjugated linoleic acid suppresses triglyceride accumulation and induces apoptosis in 3T3-L1 preadipocytes. *Lipids* 35, 899–910.
- EVANS WH. (1980). A biochemical dissection of the functional polarity of the plasma membrane of the hepatocyte. *Biochem Biophys Acta* 604, 27-67.
- FAWCETT DW. (1961). Intercellular bridges. *Exp Cell Res Suppl* 8, 174-87.
- FAWCETT DW. (1994). The liver and gallbladder. En: A Textbook of Histology (pp 622-668) 12th ed, Bloom W y Fawcett DW (Eds). New York: Chapman & Hall.
- FERGUSON NS Y GOUS RM. (1993a). Evaluation of pig genotypes. 1. Theoretical aspects of measuring genetic parameters. *Animal Production* 56, 233-243.
- FERGUSON NS Y GOUS RM. (1993b). Evaluation of pig genotypes. 2. Testing experimental procedures. *Animal Production* 56, 245-249.
- FERNÁNDEZ-FÍGARES I, SHANNON AE, WRAY-CAHEN D, CAPERNA TJ. (2004). The role of insulin, glucagon, dexamethasone and leptin in the regulation of ketogenesis and glycogen storage in primary cultures of porcine hepatocytes prepared from growing pigs. *Domest Anim Endocrinol* 27, 125-40.
- FERNÁNDEZ-FÍGARES I, WRAY-CAHEN D, STEELE NC, CAMPBELL RG, HALL DD, VIRTANEN E, Y CAPERNA TJ. (2002). Effect of dietary betaine on energy utilization and partitioning in the young growing feed restricted pig. *J Anim Sci* 80, 421-428.
- FIEDMAN SL. (2000). Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 275, 2247-50.
- FINKELSTEIN JD. (1990). Methionine metabolism in mammals. *J Nutr Biochem* 1, 228-237.

- FLORINI JR, EWTON DZ Y COOLICAN SA.** (1996). Growth hormone and the insulin-like growth factor system in myogenesis. *Endocr Rev* 17, 481-517.
- FORERO VIZCAÍNO, J.** (2008). El cerdo ibérico, una revisión transversal. Ed. Junta de Andalucía , 2008 1ª edición.
- FREAKE HC Y OPPENHEIMER JH.** (1995). Thermogenesis and thyroid function. *Annu Rev Nutr* 15, 263-291.
- FROESCH ER, SCHMID CHR, SCHWANDER J Y ZAPF J.** (1985). Actions of insuline-like growth factors. *Annu Rev Physiol* 47, 443-67.
- FUJITA M, SPRAY DC, CHOI H, SAEZ JC, WATANABE T, ROSENBERG LC, HERTZBERG EL, REID LM.** (1987). Glycosaminoglycans and proteoglycans induce gap junction expression and restore transcription of tissue-specific mRNAs in primary liver cultures. *Hepatology* 7(1 Suppl), 1S-9S.
- MICHALOPOULOS G, CIANCIULLI HD, NOVOTNY AR, KLIGERMAN AD, STROM SC, Y JIRTLE RL.** (1982). Liver Regeneration Studies with Rat Hepatocytes in Primary Culture. *Cancer Res* 42, 4673.
- MICHALOPOULOS G, CIANCIULLI HD, NOVOTNY AR, KLIGERMAN AD, STROM SC, Y JIRTLE RL.** (1982). Liver Regeneration Studies with Rat Hepatocytes in Primary Culture. *Cancer Res* 42, 4673.
- GARCÍA-VALVERDE R, BAREA R, LARA L, NIETO R Y JF AGUILERA.** (2008). The effects of the feeding level upon protein and fat deposition in Iberian heavy pigs. *Lives Sci* 114, 263-273.
- GARCÍA-VALVERDE R, NIETO R, LACHICA M Y JF AGUILERA.** (2007). Effects of herbage ingestión on the digestión site and nitrógeno balance in heavy Iberian pigs fed on an acorn-based diet. *Lives Sci* 112, 63-77.
- GEA-IZQUIERDO G, ROIG S, CANELLAS I.** (2009). Acorn Production in Iberian Dehesas. 1st Annual Meeting of the Modelling, Valuing and Managing Mediterranean Forest Ecosystems for Non-Timber Goods and Services, OCT 26-27, 2007 Palencia, SPAIN. MODELLING, VALUING AND MANAGING MEDITERRANEAN FOREST

ECOSYSTEMS FOR NON-TIMBER GOODS AND SERVICES Book Series: EUROPEAN FOREST INSTITUTE PROCEEDINGS Issue: 57 Pages: 73-84.

- GEELLEN MJH Y AC BEYNEN.** (1981). En: Short term regulation of liver metabolism, Hue L y Van de Werve G (Eds). Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biomedical Press.
- GJESSING R, SEGLEN PO.** (1980). Adsorption, simple binding and complex binding of rat hepatocytes to various in vitro substrata. *Exp Cell Res* 129, 239-49.
- GOGLIA F, GALLO G, PALMERO S, VOCI A, FUGASSA E.** (1985). Triiodothyronine receptor sites in serum-free cultured hepatocytes from adult rat liver. *Cell Biochem Funct* 3, 91-4.
- GÓMEZ CARBALLAR F.** (2000). Evolución de los sistemas de explotación del cerdo ibérico. *Sólo Cerdo Ibérico* 4, 39-44.
- GRIZARD J, DARDEVET D, PAPET I, MOSONI L, MIRAND FP, ATTAIX D, TAUVERON I, BONIN D Y ARNAL M.** (1995). Nutrient regulation of skeletal muscle protein metabolism in animals. The involvement of hormones and substrates. *Nutrition Research Reviews* 8, 67-91.
- GRUNNET N, VIND C, DICH J.** (1989). Maintenance of alcohol dehydrogenase activity in long-term culture of hepatocytes from female rat. *Alcohol Clin Exp Res* 13, 25-8.
- GU Y., SCHINCKEL P. Y MARTIN T.G.** (1992). Growth, development, and carcass composition in five genotypes of swine. *J Anim Sci* 70, 1719-1729.
- GUGUEN-GUILLOUZO C, GUILLOUZO A.** (1983). Modulation of functional activities in cultured rat hepatocytes. *Mol Cell Biochem* 53-54, 35-56.
- GUMUCIO JJ, BERKOWITZ, CM, WEBSTER ST, Y THORNTON, A.J.** (1996). Structural and functional organization of the liver. En: *Liver and Biliary Diseases*, (pp 3-19). Kaplowitz, N. (Eds). Baltimore: Williams & Wilkins.
- GUPTA PD.** (1992). Ultrastructural feature of epithelioid tumors. *Indian J Pathol Microbiol* 35, 278-88.

- HIERRO DELGADO C.** (2009). Papel de proteínas transportadoras de aniones orgánicos en la captación de sustancias antioxidantes por las células hepáticas: implicaciones fisiológicas y fisiopatológicas. *Tesis Doctoral. Departamento de Fisiología y Farmacología, Universidad de Salamanca.*
- HOLZER C, MAIER P.** (1987). Maintenance of periportal and pericentral oxygen tensions in primary rat hepatocyte cultures: influence on cellular DNA and protein content monitored by flow cytometry. *J Cell Physiol* 133, 297-304.
- HOUSEKNECHT KL, VANDEN HEUVEL JP, MOYA-CAMARENA SY, PORTOCARRERO CP, PECK LW, NICKEL KP Y BELURY MA.** (1998). Dietary conjugated linoleic acid normalizes impaired glucose tolerance in the Zucker diabetic fatty fa/fa rat. *Biochem Biophys Res Commun* 244, 678–682.
- HUTSON SM, STINSON-FISHER C, SHIMAN R, JEFFERSON LS.** (1987). Regulation of albumin synthesis by hormones and amino acids in primary cultures of rat hepatocytes. *Am J Physiol* 252, E291-8.
- HWA V, OH J, ROSENFELD RG.** Insulin-like growth factor binding proteins: a proposed superfamily. *Acta Paediatr Suppl* 428, 37–45.
- INOUE C, YAMAMOTO H, NAKAMURA T, ICHIHARA A, OKAMOTO H.** (1989). Nicotinamide prolongs survival of primary cultured hepatocytes without involving loss of hepatocyte-specific functions. *J Biol Chem* 264, 4747-50.
- INOUE C, YAMAMOTO H, NAKAMURA T, ICHIHARA A, OKAMOTO H.** (1989). Nicotinamide prolongs survival of primary cultured hepatocytes without involving loss of hepatocyte-specific functions. *J Biol Chem* 264, 4747-50.
- JAUREGUI HO, HAYNER NT, DRISCOLL JL, WILLIAMS-HOLLAND R, LIPSKY MH, GALLETTI PM.** (1981). Trypan blue dye uptake and lactate dehydrogenase in adult rat hepatocytes--freshly isolated cells, cell suspensions, and primary monolayer cultures. *In Vitro* 7, 1100-10.
- JAUREGUI HO, McMILLAN PN, DRISCOLL J, NAIK S.** (1986). Attachment and long term survival of adult rat hepatocytes in primary monolayer cultures: comparison of

different substrata and tissue culture media formulations. *In Vitro Cell Dev Biol* 22, 13-22.

JEEJEBHOY KN, HO J, GREENBERG GR, PHILLIPS MJ, BRUCE-ROBERTSON A, SODTKE U. (1975). Albumin, fibrinogen and transferrin synthesis in isolated rat hepatocyte suspensions. A model for the study of plasma protein synthesis. *Biochem J* 146, 141-55.

JEFFERSON DM, LIVERPOOL C, REID LM. (1984). hormonal modulation of steady-state levels of specific messenger-rnas in primary cultures of adult-rat hepatocytes. *J Cell Biol* 99, 201a.

JOHANSSON S, KJELLÉN L, HÖÖK M, TIMPL R. (1981). Substrate adhesion of rat hepatocytes: a comparison of laminin and fibronectin as attachment proteins. *J Cell Biol* 90, 260-4.

JOO SR, LEE JI, HA YL Y PARK GB. (2002). Effects of dietary conjugated linoleic acid on fatty acid composition, lipid oxidation, color and water-holding capacity of pork loin. *J Anim Sci.* 80, 108-12.

JR WILLIAMSON, JA GIMPEL, AJ MEIJER, GA DELEEuw AND C REFINO. (1976). En: Use of Isolated Liver Cells and Kidney Tubules in Metabolic Studies, Tager JM, Söling HD y Williamson JR (Eds). Amsterdam: North-Holland Publ Co.

KIDD MT, FERKET PR Y GARLICH JD. (1997). Nutritional and osmoregulatory functions of betaine. *World's Poult Sci J* 53, 125-139.

KIELANOWSKI J. (1965). Estimates of the energy cost of protein deposition in growing animals. En: Energy metabolism, K. L. Blaxter (editor), EAAP publication No. 11, 13-20.

KLEINMAN HK, LUCKENBILL-EDDS L, CANNON FW, SEPHEL GC. (1987). Use of extracellular matrix components for cell culture. *Anal Biochem* 166, 1-13.

KLEINMAN HK, MCGARVEY ML, HASSELL JR, STAR VL, CANNON FB, LAURIE GW, MARTIN GR. (1986). Basement membrane complexes with biological activity. *Biochemistry* 25; 28, 312-8.

- KLEINMAN HK, MCGARVEY ML, LIOTTA LA, ROBESY PG, TRYGGVASON K, MARTIN GR.** (1982). Isolation and characterization of type IV procollagen, laminin, and heparan sulfate proteoglycan from the EHS sarcoma. *Biochemistry* 21; 24, 6188-93.
- KOBUSCH AB, BOCK KW.** (1990). Zinc increases EGF-stimulated DNA synthesis in primary mouse hepatocytes. Studies in tumor promoter-treated cell cultures. *Biochem Pharmacol* 1; 39, 555-8.
- KRAMER RH, BENSCH KG, WONG J.** (1986). Invasion of reconstituted basement membrane matrix by metastatic human tumor cells. *Cancer Res* 46 (4 Pt 2), 1980-9.
- KUPFFER C.** (1876). Ueber sternzellen der leber. Briefliche mittheilung an Professor Waldeyer. *Arch. Mikr. Anat* 12, 353-8.
- KUPFFER C.** (1898). Ueber sternzellen der leber. *Verh. Anat Ges* 12, 80-86.
- LAGUNA SÁNZ E.** (1998). En: El cerdo ibérico en el próximo milenio. Madrid: Ediciones Muni-Prensa.
- LAISHES BA, WILLIAMS GM.** (1976). Conditions affecting primary cell cultures of functional adult rat hepatocytes. II. Dexamethasone enhanced longevity and maintenance of morphology. *In Vitro* 12, 821-32.
- LARSON CJ, ROSEN J Y JM MINER.** (2003). Protein turnover and energy metabolism in animals: interactions in leanness and obesity. *Metabolism*, ed. K.L. Blaxter, pág. 441-443. Londres, Academic Press.
- LARSON G, ET AL.** (2007a). Ancient DNA, pig domestication, and the spread of the Neolithic into Europe. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 15276–15281.
- LARSON G, ET AL.** (2007b). Phylogeny and ancient DNA of *Sus* provides insights into neolithic expansion in island southeast Asia and Oceania. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 4834–4839.
- LARSON G, ET AL.** (2010). Patterns of East Asian pig domestication, migration, and turnover revealed by modern and ancient DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 107, 7686-7691.

- LAWRENCE BV, SCHINCKEL AP, ADEOLA O, Y CERA K.** (2002) Impact of betaine on pig finishing performance and carcass composition. *J Anim Sci* 80, 475-482.
- LAWRENCE TJL Y FOWLER VR.** (1997). Growth of farm animals (pp 375). Reino Unido: CAB International.
- LEE CY, BAZER FW, ETHERTON TD, SIMMEN FA.** (1991). Ontogeny of insulin-like growth factors (IGF-I and IGF-II) and IGF-binding proteins in porcine serum during fetal and postnatal development. *Endocrinology* 128, 2336–2344.
- LEE KN, KRITCHEVSKY D Y PARIZA MW.** (1994). Conjugated linoleic acid and atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis* 108, 19-25.
- LENTZ TL.** (1971). En: Cell fine structure (pp 142), WB Saunders (Eds). Philadelphia.
- LERNER IM Y DONALD HP.** (1969). *La nueva zootecnia*. León: Ed. Academia.
- LIN YG, KREEFT A, SCHUURBIERS JAE, DRAIJER R.** (2001). Different effects of conjugated linoleic acid isomers on lipoprotein lipase activity in 3T3-L1 adipocytes. *J Nutr Biochem* 12, 183-189.
- LLOYD CE, KALINYAK JE, HUTSON SM, JEFFERSON LS.** (1987). Stimulation of albumin gene transcription by insulin in primary cultures of rat hepatocytes. *Am J Physiol* 252 (2 Pt 1), C205-14.
- LOBLEY GE.** (1988). Protein turnover and energy metabolism in animals: interactions in leanness and obesity. En: Leanness in domestic birds (pp 331-361), Leclercq B y Whitehead CC (Eds). Londres: Butterworths
- LOOR JJ Y HERBEIN JH.** (1998). Exogenous conjugated linoleic acid isomers reduce bovine milk fat concentration and yield by inhibiting de novo fatty acid synthesis. *J Nutr* 128, 2411–2419.
- LOUVEAUA I ,DAUNCEYB MJ, LE DIVIDICHA J.** (2000). Regulation of development by nutrition and by the somatotrophic and thyroid axes in the neonatal pig. *Livest Prod Sci* 66, 121–131.

- LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL Y RJ RANDALL.** (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-75.
- MAKINO H, MANGANIELLO VC Y KONO T.** (1994). Roles of ATP in insulin actions. *Annu Rev Physiol* 56, 273-295.
- MANDL I, MACLENNAN JD Y HOWES EL.** (1953). Isolation and characterization of proteinase and collagenase from *Cl-histolyticum*. *J Clin Invest* 32, 1323.
- MAPA.** (2005). *Encuesta sobre superficies y rendimientos de cultivos del año 2005*. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Secretaría General Técnica. Subdirección General de Estadísticas Agroalimentarias, 166.
- MARCEAU N, GOYETTE R, GUIDOIN R, ANTAKLY T.** (1982). Hormonally induced formation of extracellular biomatrix in cultured normal and neoplastic liver cells. Effect of dexamethasone. *Scan Electron Microsc Pt 2*, 815-23.
- MARTÍNEZ-ALMELA J.** (2006a). Consideraciones previas al diseño de alojamientos e instalaciones ganaderas. En: *Buscando Equilibrios para un Nuevo Orden Zootécnico* (pp 7-14), Muñoz A (Eds). Madrid: Alcanthis Comunicaciones y Estrategias, S.L.U.
- MARTÍNEZ-ALMELA J.** (2006b). Solera y pavimentos aislantes. En: *Buscando Equilibrios para un Nuevo Orden Zootécnico* (pp 53-68). Muñoz A. (Eds). Madrid: Alcanthis Comunicación y Estrategias, S.L.U.
- MARTÍNEZ-ALMELA J.** (2006c). Materiales estructurales y de Cubierta: *Buscando Equilibrios para un Nuevo Orden Zootécnico* (pp 15-33). Muñoz A (Eds). Madrid: Alcanthis Comunicación y Estrategias, S.L.U.
- MARTÍNEZ-ALMELA J.** (2006d). Ahorro y eficiencia energética en instalaciones ganaderas. En: *Buscando Equilibrios para un Nuevo Orden Zootécnico* (pp 69-94). Muñoz A (Eds). Madrid: Alcanthis Comunicación y Estrategias, S.L.U.
- MARTINEZ-HERNANDEZ A.** (1984). The hepatic extracellular matrix. I. Electron immunohistochemical studies in normal rat liver. *Lab Invest* 51, 57-74.

- MATHEWS JO, SOUTHERN LL Y BIDNER TD.** (2001a). Estimation of the total sulfur amino acid requirement and the effect of betaine in diets deficient in total sulfur amino acids for the weanling pig. *J Anim Sci* 79, 1557-1565.
- MATHEWS JO, SOUTHERN LL, HIGBIE AD, PERSICA MA Y BIDNER TD.** (2001b). Effects of betaine on growth, carcass characteristics, pork quality, and plasma metabolites of finishing pigs. *J Anim Sci* 79, 722-728.
- MATHEWS JO, SOUTHERN LL, PONTIF JE, HIGBIE AD, Y BIDNER TD.** (1998). Interactive effects of betaine, crude protein, and net energy in finishing pigs. *J Anim Sci* 76, 2444-2455.
- MCCUSKER RH, CAMPION DR, JONES WK, CLEMMONS DR.** (1985). The insulin-like growth factor-binding proteins of porcine serum: endocrine and nutritional regulation. *Endocrinology* 125, 501-509.
- MCGOWAN JA, RUSSELL WE, BUCHER NL.** (1984). Hepatocyte DNA replication: effect of nutrients and intermediary metabolites. *Fed Proc* 43, 131-3.
- MCGOWAN JA, RUSSELL WE, BUCHER NL.** (1984). Hepatocyte DNA replication: effect of nutrients and intermediary metabolites. *Fed Proc* 43, 131-3.
- MCGOWAN JA.** (1986). En: *Research in Isolated and Cultured Hepatocytes* (pp 13-38), Guillouzo A y Guguen-Guillouzo C (Eds). Londres: John Libbey Eurotext Ltd. Inserm.
- MEGENS HJ, ET AL.** (2008) Biodiversity of pig breeds from China and Europe estimated from pooled DNA samples: Differences in microsatellite variation between two areas of domestication. *Genet Sel Evol* 40, 103-128.
- MEIER PJ.** (1988). Transport polarity of hepatocytes. *Semin Liver Dis* 8, 293-307.
- MERSMANN HJ.** (1986). En: *Lipid metabolism in swine. Swine in cardiovascular research*, HC Stanton y HJ Mersmann (Eds). Boca Ratón, Florida: CRC Press.
- MILES LEM, LIPSCHITZ DA, BIEBER CP Y COOK JD.** (1974). Measurement of serum ferritin by a 2-site immunoradiometric assay. *Analyt Biochem* 61, 209-224.

- MILLER CC, PARK Y, PARIZA MW Y COOK ME.** (1994). Feeding conjugated linoleic acid to animals partially overcomes catabolic responses due to endotoxin injection. *Biochem Biophys Res Commun* 198, 1107-1112.
- MILLWARD DJ, ODEDRA B Y BATES PC.** (1983b). The role of insulina, corticosterone and other factors in the acute recovery of muscle protein synthesis on refeeding food-deprived rats. *Biochem J* 216, 583-587.
- MINER JL, CEDERBERG CA, NIELSEN MK, CHEN XL Y BAILE CA.** (2001). Conjugated linoleic acid (CLA), body fat, and apoptosis. *Obesity Res* 9, 129–134.
- MITCHELL AD Y PURSEL VG.** (2001) Effects of dietary conjugated linoleic acid on growth and body composition of control and IGF-I transgenic pigs. *FASEB J* 15, A962.
- MIYAZAKI M, HANDA Y, ODA M, YABE T, MIYANO K, SATO J.** (1985). Long-term survival of functional hepatocytes from adult rat in the presence of phenobarbital in primary culture. *Exp Cell Res* 159, 176-90.
- MIYAZAKI M, UTSUMI K, SATO J.** (1989). Mechanisms responsible for long-term survival of adult rat hepatocytes in the presence of phenobarbital in primary culture. *Exp Cell Res* 182, 415-24.
- MN BERRY, C FARRINGTON, AR GRIVELL, S GAY AND PG WALLACE.** (1983). En: Isolation, Characterization and Use of Hepatocytes, Harris RA y Cornell NW (Eds). Nueva York: Elsevier Biomedical.
- MONTENEGRO MSC, CUNHA MCC, FREIRE JPB, CUNHA LF Y AUMAITRE A.** (2000). Résultats préliminaires sur le besoin en protéine et en lisien des porcelets de race Alentejana. En : Tradition and innovation in Mediterranean pig production (pp. 129-136). J.A. Alfonso de Almeida y J.L. Tirapicos Nunes (Eds.). Zaragoza : CIHEAM-IAMZ (Options Méditerranéennes. Série A. Séminaires Méditerranéens; n. 41 ISBN 2-85352-213-X). 4. International Symposium on Mediterranean Pig, 1998/11/26-28, Évora (Portugal).
- MUÑOZ A.** (2006). Alcalanthis comunicación y estrategias, S.L.U. La granja y El Bienestar Animal. *Revista PORCI* 42.

- NAKAMURA T, ICHIHARA A.** (1985). Control of growth and expression of differentiated functions of mature hepatocytes in primary culture. *Cell Struct Funct* 10, 1-16.
- NATHANSON MH Y BOYER JL.** (1991). Mechanisms and regulation of bile secretion. *Hepatology* 14, 551-566.
- NAWA K, NAKAMURA T, KUMATORI A, NODA C, ICHIHARA A.** (1986). Glucocorticoid-dependent expression of the albumin gene in adult rat hepatocytes. *J Biol Chem* 25;261, 16883-8.
- NETO MAD, PETELINCAR IM, BERTO DA, SCHAMMASS EA, BISINOTO KS, CALDARA FR.** (2004). Lysine level for piglets in the initial phase of post-weaning growth-I. Body composition at 11.9 and 19.0 kg. *Revista Brasileira De Zootecnia-Brazilian Journal of Animal Science* 33, 1777-1789.
- NGUYEN LT, STEPHENSON DG, STEPHENSON GMM.** A direct microfluorometric method for measuring subpicomole amounts of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, glucose, and glycogen. *Anal Biochem* 259, 274-8.
- NIETO R Y LOBLEY GE.** (1999). Integration of protein metabolism within the whole body and between organs. *Proceedings of the VIIIth International Symposium on Protein Metabolism and Nutrition. EAAP Publication* 96, 69-89.
- NIETO R, LARA L, GARCÍA MA, VÍLCHEZ MA, AGUILERA JF.** (2003). Effects of dietary protein content and food intake on carcass characteristics and organs weights of growing Iberian pigs. *Anim Sci* 77, 47-56.
- NIETO R, MIRANDA A, GARCÍA MA Y JF AGUILERA.** (2002a). Amino acid availability and energy value of acorn in the Iberian pig. *Lives Prod Sci* 77, 227-239.
- NIETO R, MIRANDA A, GARCÍA MA Y JF AGUILERA.** (2002b). The effect of dietary protein content and feeding level on the rate of protein deposition and energy utilization in growing Iberian pigs from 15 to 50 kg body weight. *Br J Nutr* 88, 39-49.
- NORDLIE RC, FOSTER JD Y LANGE AJ.** (1999). Regulation of glucose production by the liver. *Ann Rev Nutr* 19, 379-406.

- OBRINK B.** (1986). Epithelial cell adhesion molecules. *Exp Cell Res* 163, 1-21.
- OPPENHEIMER JH, SCHWARTZ HL, MARIASH CN, KINLAW WB, WONG NC, FREAKE HC.** (1987). Advances in our understanding of thyroid hormone action at the cellular level. *Endocr Rev* 8, 288-308.
- ORELLANA E.** (2003). En: Solo Cerdo Ibérico 10 (pp 5). Cáceres: Ediciones Orellana.
- OSTROWSKA E, MURALITHARAN M, CROSS RF, BAUMAN DE, Y DUNSHEA, FR.** (1999). Dietary conjugated linoleic acids increase lean tissue and decrease fat deposition in growing pigs. *J Nutr* 129, 2037-2042.
- OVEJERO I.** (1999). Últimas tendencias en alojamientos de reproductoras. En: Producción Porcina Aspectos Claves (pp 185-201). C. Buxadé (coordinador). Madrid: Ediciones Mundi-Prensa.
- ØVERLAND MK, RØRVIK KA Y SKREDE A.** (1999). Effect of trimethylamine oxide and betaine in swine diets on growth performance, carcass characteristics, nutrient digestibility, and sensory quality of pork. *J Anim Sci* 77, 2143-2153.
- PARIZA MW, ASHOOR SH, CHU FS Y LUND DB.** (1979). Effects of temperature and time on mutagen formation in pan-fried hamburger. *Cancer Letters* 7, 63-69.
- PARIZA MW, PARK Y Y COOK ME.** (2000). Mechanisms of action of conjugated linoleic acid: evidence and speculation. *Proc Soc Exp Biol Med* 223, 8-13.
- PARIZA MW, PARK Y, COOK ME.** (2001). The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. *Prog Lipid Res* 40, 283-298.
- PARIZA MW.** (2004). Perspective on the safety and effectiveness of conjugated linoleic acid. *Am J Clin Nutr* 79, 1132-1136.
- PARK Y, ALBRIGHT KJ, LIU W, STORKSON JM, COOK ME Y PARIZA MW.** (1997). Effect of conjugated linoleic acid on body composition in mice. *Lipids* 32, 853-858.
- PARK Y, STORKSON JM, ALBRIGHT KJ, LIU KJ Y PARIZA MW.** (1999). Evidence that the trans-10, cis-12 isomer of conjugated linoleic acid induces body composition changes in mice. *Lipids* 34, 235-241.

- PEREZ GIL JL.** (2005). El sector porcino Ibérico en España. *Mundo ganadero* 176, 8-64.
- PETERSON GL.** (1983). Determination of total protein. *Methods Enzymol*, 91: 95-119.
- PETRONINI PG, DE ANGELIS EM, BORGHETTI P, BORGHETT AF Y WHEELERS KP.** (1992). Modulation by betaine of cellular responses to osmotic stresses. *Biochem J* 282, 69-73.
- QUILES A.** (2007a). Necesidades ambientales en las explotaciones porcinas. *Ediporc* 107, 6-11.
- QUILES A.** (2007b). Medidas preventivas para luchar contra el estrés térmico en el manejo de las cerdas reproductoras. *Ediporc* 107, 30-35.
- RAMSAY TG, EVOCK-CLOVER CM, STEELE NC, Y AZAIN MJ.** (2001). Dietary conjugated linoleic acid alters fatty acid composition of pig skeletal muscle and fat. *J Anim Sci* 79, 2152–2161.
- REEDS PJ Y DAVIS TA.** (1992). Hormonal regulation of muscle protein synthesis and degradation. En: *The control of fat and lean deposition* (pp 1-23), EPJ Bultery, KN Booman, DB Lindsay (Eds). Londres: ediciones Butterworths.
- REEDS PJ.** (1988). Regulation of protein metabolism. Control and regulation of animal growth. Proceedings of EAAP seminar. *EAAP Publication* 36, 25-44.
- REID LM, NARITA M, FUJITA M, MURRAY Z, LIVERPOOL C Y ROSENBERG L.** (1986). En: *Research in Isolated and Cultured Hepatocytes* (pp 255-258), Guillouzo A y Guguen-Guillouzo C (Eds.). Londres: John Libbey Eurotext Ltd. Inserm.
- RIVERA-FERRE MG, AGUILERA JF Y NIETO R.** (2006). Differences in whole-body protein turnover between Iberian and Landrace pigs fed adequate or lysine-deficient diets. *J Anim Sci* 84, 3346-3355.
- RIVERA-FERRE MG, AGUILERA JF, Y NIETO R.** (2005). Muscle fractional protein synthesis is higher in Iberian than in Landrace growing pigs fed adequate or lysine-deficient diets. *J Nutr* 135, 469-478.

- RIVERA-FERRE MG, NIETO R, AGUILERA JF.** (2003a). Whole body protein turnover of Iberian and Landrace pigs fed adequate or amino acid deficient diets. En: Progress in research on energy and protein metabolism. Symposium on Energy and Protein Metabolism and Nutrition. EAAP Publication 109, 805-808. Ediciones WB Souffrant y CC Metges. Wageningen Academic Publishers.
- RODRÍGUEZ-ESTÉVEZ V, GARCÍA A, PEÑA F Y AG GÓMEZ.** (2009). Foraging of Iberian fattening pigs grazing natural pasture in the dehesa. *Lives Sci* 9, 135 -143.
- RUBIN K, HÖÖK M, OBRINK B, TIMPL R.** (1981). Substrate adhesion of rat hepatocytes: mechanism of attachment to collagen substrates. *Cell* 24, 463-70.
- RUEDA L Y ESPARRAGO F.** (2004). El cerdo ibérico en Extremadura. Situación respecto al resto de España. *Mundo Ganadero* 168, 42-46.
- SAKONO M, MIYANAGA F, KAWAHARA S, YAMAUCHI K, FUKUDA N, WATANABE K, IWATA T, Y SUGANO M.** (1999). Dietary conjugated linoleic acid reciprocally modifies cetogénesis and lipid secretion by the rat liver. *Lipids* 34, 997-1000.
- SAWADA N, TOMOMURA A, SATTLER CA, SATTLER GL, KLEINMAN HK, PITOT HC.** (1986). Extracellular matrix components influence DNA synthesis of rat hepatocytes in primary culture. *Exp Cell Res* 167, 458-70.
- SAWADA N, TOMOMURA A, SATTLER CA, SATTLER GL, KLEINMAN HK, PITOT HC.** (1986). Extracellular matrix components influence DNA synthesis of rat hepatocytes in primary culture. *Exp Cell Res* 167, 458-70.
- SAWADA N, TOMOMURA A, SATTLER CA, SATTLER GL, KLEINMAN HK, PITOT HC.** (1987). Effects of extracellular matrix components on the growth and differentiation of cultured rat hepatocytes. *In Vitro Cell Dev Biol* 23, 267-73.
- SCHNACK H, STOCKINGER L Y WEWALKA F.** (1967). Adventitious connective tissue cells in the space of Disse and their relation to fibre formation. *Rev Int Hepatol* 17, 855-60.

- SCHUETZ EG, LI D, OMIECINSKI CJ, MULLER-EBERHARD U, KLEINMAN HK, ELSWICK B, GUZELIAN PS.** (1988). Regulation of gene expression in adult rat hepatocytes cultured on a basement membrane matrix. *J Cell Physiol* 134, 309-23.
- SCHWARZE PE, SOLHEIM AE, SEGLEN PO.** (1982). Amino acid and energy requirements for rat hepatocytes in primary culture. *In Vitro* 18, 43-54.
- SEGLEN PO.** (1972). Preparation of rat liver cells. I. Effect of Ca²⁺ on enzymatic dispersion of isolated, perfused liver. *Exp Cell Res* 74, 450-4.
- SPONENBER DP.** (1992). Colonial Spanish sheep, goats, hogs and asses in the United States. *Archivos de Zootecnia* 41 (extra), 415-419.
- SPRAY DC, FUJITA M, SAEZ JC, CHOI H, WATANABE T, HERTZBERG E, ROSENBERG LC, REID LM.** (1987). Proteoglycans and glycosaminoglycans induce gap junction synthesis and function in primary liver cultures. *J Cell Biol* 105, 541-51.
- STAECKER JL, PITOT HC.** (1988). The effect of sodium butyrate on tyrosine aminotransferase induction in primary cultures of normal adult rat hepatocytes. *Arch Biochem Biophys* 261, 291-8.
- SWAN JE, PARRISH FC, WIEGAND BR, LARSEN ST, BAAS TJ, Y BERG EP.** (2001). Total body electrical conductivity (TOBEC) measurement of compositional differences in hams, loins, and bellies from conjugated linoleic acid (CLA)-fed stress-genotype pigs. *J Anim Sci* 79, 1475–1482.
- TANAKA K, SATO M, TOMITA Y, ICHIHARA A.** (1978). Biochemical studies on liver functions in primary cultured hepatocytes of adult rats. I. Hormonal effects on cell viability and protein synthesis. *J Biochem* 84, 937-46.
- TESS MW, DICKERSON GE, NIENABER JA Y FERRELL CL.** (1986). Growth, development and body composition in three genetic stocks of swine. *J Anim Sci* 62, 968-979.
- THIEL-COOPER RL, PARRISH FC, SPARKS JC, WIEGAND BR Y EWAN RC.** (2001). Conjugated linoleic acid changes swine performance and carcass composition. *J Anim Sci* 79, 1821–1828.

- THONNEY ML, ARNOLD AM, ROSS DA, SCHAAF SL Y ROUNSAVILLE R.** (1991). Energetic efficiency of rats fed low or high protein diets and grown at controlled rates from 80 to 205 grams. *J Nutr* 121, 1397-1406.
- TOLNAI S.** (1975). A method viable for cell count. *Methods Cell Sci* 1, 37-38.
- TONG JZ, BERNARD O, ALVAREZ F.** (1990). Long-term culture of rat liver cell spheroids in hormonally defined media. *Exp Cell Res* 189, 87-92.
- TOOMEY S, ROCHE H, FITZGERALD D, BELTON O.** (2003). Regression of pre-established atherosclerosis in the apoE^{-/-} mouse by conjugated linoleic acid. *Biochem Soc Trans* 31, 1075-1079.
- TRINDER P.** (1969). Determination of Glucose in Blood Using Glucose Oxidase with an Alternative Oxygen Acceptor. *Ann Clin Biochem* 6, 24-33.
- TSUBOYAMA-KASAOKA N, TAKAHASHI M, TANEMURA K, KIM HJ, TANGE T, OKUYAMA H, KASAI M, IKEMOTO S, EZAKI O.** (2000). Conjugated linoleic acid supplementation reduces adipose tissue by apoptosis and develops lipodystrophy in mice. *Diabetes* 49, 1534-1542.
- VARGAS JD Y APARICIO MA.** (2000). En: El cerdo ibérico en la dehesa extremeña. Análisis técnico y económico. Badajoz: Caja Rural y Diputación Provincial de Badajoz.
- VINTERMYR OK, DØSKELAND SO.** (1987). Cell cycle parameters of adult rat hepatocytes in a defined medium. A note on the timing of nucleolar DNA replication. *J Cell Physiol* 132, 12-21.
- VIRTANEN E Y CAMPBELL RG.** (1994). Reduction of backfat thickness through betaine supplementation of diets for fattening pigs. *Handb. Tierische Veredlung* 19, 145-150. Verlag H. Kamlage, Osnabruek, Deutschland.
- VIRTANEN E.** (1995). Piecing together the betaine puzzle. *Feed Mix* 3, 12-17.
- VONEN B, MØRLAND J.** (1982). Penicillin toxicity in isolated rat hepatocytes revealed by decreased incorporation of valine into proteins. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 51, 81-6.

- WANSON JC, DROCHMANS P, MOSSELMANS R, RONVEAUX MF.** (1977). Adult rat hepatocytes in primary monolayer culture. Ultrastructural characteristics of intercellular contacts and cell membrane differentiations. *J Cell Biol* 74, 858-77.
- WATANABE N, TSUKADA N, SMITH CR Y PHILLIPS MJ.** (1991). Motility of bile canaliculi in the living animal: implications for bile flow. *J Cell Biol* 113, 1069-1080.
- WATKINS BA, LIPPMAN HE, LE BOUTELLER L, LI Y, SEIFERT MF.** (2001). Bioactive fatty acids: role in bone biology and bone cell function. *Prog Lipid Res* 40, 125-48.
- WAXMAN DJ, MORRISSEY JJ, NAIK S, JAUREGUI HO.** (1990). Phenobarbital induction of cytochromes P-450. High-level long-term responsiveness of primary rat hepatocyte cultures to drug induction, and glucocorticoid dependence of the phenobarbital response. *Biochem J* 1; 271, 113-9.
- WENK C, COLOMBANI PC, VAN MILGEN J Y LEMME A.** 2001. Glossary: Terminology in animal and human energy metabolism. Page 409 in *Energy Metabolism in Animals*. EAAP Publ. No. 103, A. Chwalibog and K. Jakobsen, ed. Wageningen Pers, The Netherlands.
- WIEGAND BR, PARRISH FC, SWAN JE, LARSEN ST Y BAAS TJ.** (2001). Conjugated linoleic acid improves feed efficiency, decreases subcutaneous fat, and improves certain aspects of meat quality in Stress-Genotype pigs. *J Anim Sci* 79, 2187–2195.
- WILLIAMS GM, BERMUDEZ E, SCARAMUZZINO D.** (1977). Rat hepatocyte primary cell cultures. III. Improved dissociation and attachment techniques and the enhancement of survival by culture medium. *In Vitro* 13, 809-17.
- WITTENBERG BA, ROBINSON TF.** (1981). Oxygen requirements, morphology, cell coat and membrane permeability of calcium-tolerant myocytes from hearts of adult rats. *Cell Tissue Res* 216, 231-51.
- WÖLFLE D, SCHMIDT H, JUNGERMANN K.** (1983). Short-term modulation of glycogen metabolism, glycolysis and gluconeogenesis by physiological oxygen concentrations in hepatocyte cultures. *Eur J Biochem* 135, 405-12.

WRIGHT KJ, BLAJI R, HILL CM, DRITZ SS, KNOPPEL EL, Y MINTON JE. (2000). Integrated adrenal, somatotropic, and immune responses of growing pigs to treatment with lipopolysaccharide. *J Anim Sci* 78, 1892-1899.

YUAN J, FLAD RK. (2002). Pig domestication in ancient China. *Antiquity* 76, 724–732.

YUSOF, YAM; EDWARDS, AM. (1990). Stimulation of dna-synthesis in primary rat hepatocyte cultures by liver-tumor promoters - interactions with other growth-factors. *Carcinogenesis* 11, 761.

ZEDER MA, EMSHWILLER E, SMITH BD, BRADLEY DG. (2006). Documenting domestication: the intersection of genetics and archaeology. *Trends in genetics* 22, 139 -155.